

2020年度（第45回）学術研究振興資金 学術研究報告

学 校 名	藤 田 医 科 大 学	研究所名等	
研 究 課 題	がん幹細胞を標的とした新規乳がん治療法の開発 － γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼGGCTを標的として－	研究分野	医 学
キ ー ワ ー ド	① 活性酸素 ② がん幹細胞 ③ γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT) ④ 乳がん		

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
下 野 洋 平	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	教 授	研究の統括

○研究分担者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
喜 島 祐 子	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	教 授	検体の収集および解析
内 海 俊 明	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	教 授	検体の収集および解析
河 田 健 司	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	教 授	検体の収集および解析
林 孝 典	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	講 師	検体の分子生物学的解析
渡 辺 崇	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	講 師	検体の画像解析
前 田 真 男	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	講 師	転移モデルの解析
柳 久 乃	藤 田 医 科 大 学 部 医 学	助 教	臨床特性との関連の解析

がん幹細胞を標的とした新規乳がん治療法の開発 — γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ GGCT を標的として —

1. 研究の目的

乳がん組織中に存在する「がん幹細胞」は、幹細胞としての自己複製能と並外れた腫瘍形成能力をあわせもつ特殊ながん細胞であり、がんの発生、進展、転移に中心的な役割をはたす。本研究では、乳がん幹細胞で発現上昇しているがん遺伝子「 γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT)」に着目して、その乳がん幹細胞における働き、がん進展における役割、および臨床的特性との関連を統合的に解析する。治療標的としての GGCT の意義を明らかにすることで、がん幹細胞を標的とした新規乳がん治療法を実現するための基盤データを得る。

2. 研究の計画

2020 年度および翌年の新型コロナウイルス感染症蔓延に伴う繰越期間には、GGCT ががん幹細胞性の制御に働く分子機構、乳がんの臨床的特性と GGCT 発現量の関連、がん細胞代謝における GGCT の役割を解明するため、乳がん患者検体、乳がん異種移植マウス腫瘍 (PDX)、およびがん細胞株を用いた解析を行う。

(1) GGCT 阻害による腫瘍進展抑制能

① GGCT 阻害によるがん幹細胞性抑制

オルガノイドアッセイをはじめとした三次元培養法では、患者がん組織の組織分化を反映した形でがん幹細胞機能を評価することが出来る (Shimono Y et al. *Methods Molecular Biology*, 2019)。そこで、GGCT の特異的競合阻害剤として報告されている Pro-GA を用いて乳がん細胞のオルガノイド形成能やスフェロイド形成能を解析する。つぎに、GGCT 阻害効果をより特異的に解析するため、shGGCT 発現ウイルスにて GGCT の発現をノックダウン (発現抑制) した乳がん細胞株や乳がん患者由来異種移植腫瘍 (PDX) 細胞を樹立して同様の解析を行う。

② GGCT 発現阻害による腫瘍形成抑制効果

上記で作製した GGCT ノックダウン乳がん PDX 細胞を用いて、GGCT 発現抑制に伴う腫瘍形成抑制効果を、高度免疫不全マウスを用いた異種移植モデルにて検証する。

(2) GGCT 発現量とがんの臨床的特性との相関

① 乳がん患者検体の GGCT バリエーション別発現量と乳がん臨床的特性との関連

書面で同意が得られた藤田医科大学乳腺外科乳がん患者の手術検体の腫瘍組織部分の GGCT 発現量を GGCT バリエーション別に解析し、乳がんサブタイプ、がん進行度などとの関連を解析する。

(3) GGCT による乳がん細胞の代謝制御機構の解析

① 質量分析法による GGCT 代謝産物の測定

shGGCT 発現ウイルスにて GGCT 発現をノックダウンした乳がん細胞株の代謝産物を質量分析法にて測定することで、GGCT 依存性のがん代謝機構を解析する。

② GGCT と活性酸素種除去能との関連

活性酸素種の除去能はがん幹細胞維持の根幹にある重要な性質である (Diehn M et al. *Nature*, 2009; Yagi H et al. *Cancer Cell*, 2011)。GGCT は活性酸素種除去に働くグルタチオン生合成に関わる酵素であることから、GGCT およびその酵素活性変異体を用いて、乳がん細胞や乳がん幹細胞の活性酸素種量を活性酸素種反応性 DCFDA/H₂DCFDA プローブを用いて解析する。

3. 研究の成果

(1) GGCT 阻害による腫瘍進展抑制能

① GGCT 阻害によるがん幹細胞性抑制

GGCTの特異的競合阻害剤 (Pro-GA) により乳がん細胞株および乳がんPDX細胞のオルガノイド形成能は強力に抑制された。つぎに、shGGCT発現ウイルスにてGGCTの発現をノックダウンした乳がん細胞株や乳がんPDX細胞を樹立した。これらの細胞でも同様にGGCTノックダウンによりオルガノイド形成能は抑制された。

② GGCT 発現阻害による腫瘍形成抑制効果

乳がん細胞株を移植したマウスの腫瘍形成能および肺などへの遠隔転移能は、GGCT ノックダウンにより抑制された。さらに、乳がん PDX 細胞を用いた高度免疫不全マウスへのがん移植実験では、GGCT ノックダウンにより同様に腫瘍増殖能が抑制された。

(2) GGCT 発現量とがんの臨床的特性との相関

① 乳がん患者検体のGGCTバリエント別発現量と乳がんの臨床的特性との関連

乳がん手術検体の腫瘍およびセンチネルリンパ節の解析から、GGCT の 4 つのバリエント (多様体) のうち酵素活性部位を欠くバリエント 2 と 4 が閉経前症例、Ki-67 発現の高い症例で高値である傾向が示された。この結果から、GGCT には γ -グルタミルシクロ転移酵素活性を介さないがん促進機能がある可能性も考えられた。

(3) GGCT による乳がん細胞の代謝制御機構の解析

① 質量分析法による GGCT 代謝産物の測定

GGCT 発現およびノックダウン細胞を用いてメタボローム解析を行った (慶應義塾大学曾我教授との共同研究)。その結果、GGCT の発現低下が糖および脂質代謝の鍵となるカルニチンの発現上昇と相関することが判明した。

② GGCT と活性酸素種除去能との関連

GGCT 発現およびノックダウン乳がん細胞を用いて、フローサイトメトリーにて活性酸素種反応性 DCFDA/H2DCFDA プローブを用いた発色強度の測定を行った。通説と異なり GGCT ノックダウンと活性酸素種除去能との関連は明らかではなかった。次年度以降は酵素活性に依存しない GGCT の腫瘍促進能の解明を進める。

4. 研究の反省・考察

(1) GGCT 特異的阻害剤 Pro-GA と shRNA のがん抑制効果の比較

Pro-GAはGGCTがもつ γ -グルタミルシクロ転移活性を競合阻害する特異的阻害剤として開発された。今回、オルガノイドアッセイやメタボローム解析などにて乳がん細胞に対するPro-GAとshRNAの効果解析をしたところ、両者の働きに種々の違いを認めた。したがって、GGCTによるがんおよびがん幹細胞性の促進機構には、酵素活性に依存しない新機構も関与すると考えられた。

(2) がん幹細胞制御におけるカルニチンの役割

代謝制御はがん細胞機能を制御する重要な因子である。今回のメタボローム解析の結果から、カルニチンの代謝ががん幹細胞性の制御と関連する可能性を見出した。カルニチンの添加により乳がんPDX細胞のオルガノイドが変化する可能性も見出されたことから、本件に関しても引き続き検討を続けていく。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Shibuya N, Kakeji Y, Shimono Y. miR-93 targets WASF3 and functions as a metastasis suppressor in breast cancer. *Cancer Science*. 2020;111:2093-2103. doi: 10.1111/cas.14423.
- ② Nishio E, Hayashi T, Akaza M, Hisatomi Y, Hikichi M, Fujii T, Utsumi T, Harada N, Shimono Y. Upregulation of CIP2A in estrogen depletion-resistant breast cancer cells treated with low-dose everolimus. *FEBS Open Bio*. 2020;10:2072-

2080. doi:10.1002/2211-5463.12956.

- ③ Yanagi H, Watanabe T, Nishimura T, Hayashi T, Kono S, Tsuchida H, Hirata M, Kijima Y, Takao S, Okada S, Suzuki M, Imaizumi K, Kawada K, Minami H, Gotoh N, Shimono Y. Upregulation of S100A10 in metastasized breast cancer stem cells. *Cancer Science*. 2020;111(12):4359-4370. doi: 10.1111/cas.14659.

(2) 口頭発表

- ① Shimono Y, Shibuya N, Nishimura T, Gotoh N, Kakeji Y. MicroRNA profiling of latently metastasized human breast cancer stem cells 第79回日本癌学会学術総会 (International Session)、2020年
- ② Shimono Y, Gotoh N. 脂肪細胞によるがん幹細胞性制御能の解析 令和2年度金沢大学がん進展制御研究所共同利用・共同研究拠点研究成果報告会、2021年

(3) 出版物

なし