

2021年度（第46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 医 学 部	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 医 学 部	教 授	検体の収集および解析
内 海 俊 明	藤 田 医 科 大 学 医 学 部	教 授	検体の収集および解析
河 田 健 司	藤 田 医 科 大 学 医 学 部	教 授	検体の収集および解析
林 孝 典	藤 田 医 科 大 学 医 学 部	講 師	検体の分子生物学的解析
前 田 真 男	藤 田 医 科 大 学 医 学 部	講 師	検体の分子生物学的解析
渡 辺 崇	藤 田 医 科 大 学 医 学 部	講 師	検体の画像解析
ベフヌーシユ ハレディアン	藤 田 医 科 大 学 医 学 部	助 教	検体の分子生物学的解析
平 田 宗 嗣	藤 田 医 科 大 学 医 学 部	講 師	検体の収集および解析

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

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

本年度は、GGCT ががん幹細胞性の制御に働く分子機構、GGCT による脂質代謝制御機構、がん転移における 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 変異体を活用したがん幹細胞性制御機構の解析

① GGCTの酵素活性とがん幹細胞性制御能との関連

酵素活性部位に変異を導入した酵素活性喪失変異型GGCTを作製する。GGCTの γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ活性の喪失をその代謝産物の吸光度測定により確認する。つぎに、GGCT発現のノックダウン（発現抑制）により低下した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、野生型あるいは酵素活性喪失変異型GGCTの追加導入が回復させる能力を解析する（レスキュー実験）。

② GGCTが制御するがん幹細胞関連シグナルや標的分子の解析

GGCTノックダウン細胞を用いて次世代シーケンサー解析を行い、がん幹細胞性の制御に関わるシグナルや標的分子を同定する。

③ GGCT抑制による抗がん剤感受性の解析

GGCTノックダウン乳がん細胞株の三次元培養を行い、GGCTの発現抑制が各種抗がん剤の感受性に及ぼす影響を解析する。

(2) GGCT によるがん幹細胞代謝の制御機構の解析

① GGCTによる乳がん細胞の脂質代謝制御機構の解析

脂質代謝は核酸代謝などと同様ながん細胞の基本骨格の供給に関わり、細胞活性を維持するエネルギー産生やシグナル伝達にも重要である。上述の次世代シーケンサー解析にてGGCTが脂質代謝酵素の発現を制御する可能性を見出した。そこで、脂質代謝酵素発現のGGCT依存性と、三次元培養した乳がん細胞に対する脂質代謝阻害剤の効果を解析する。

(3) GGCT による腫瘍形成能の解析

① GGCT発現阻害による腫瘍形成および転移の抑制効果

がん幹細胞は腫瘍の形成のみならず転移巣の形成にも中心的な役割をもつ。本研究では、GGCTの発現を抑制した乳がん細胞株や、遠隔臓器への潜在的な微小転移が観察可能な乳がんPDX腫瘍 (Yanagi H, Shimono Y, Cancer Science, 2020ほか) をマウスに移植することで、GGCTノックダウンが腫瘍形成能や乳がん細胞の転移能に及ぼす影響を解析する。

3. 研究の成果

(1) GGCT 変異体を活用したがん幹細胞性制御機構の解析

① GGCTの酵素活性とがん幹細胞性制御能との関連

今回作製した GGCT 変異体は酵素活性を完全に喪失していた。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に、野生型あるいは酵素活性喪失変異型 GGCT を再発現させるレスキュー実験を行った。野生型あるいは酵素活性喪失変異型 GGCT はともに、GGCT 発現をノックダウンした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回復させた。GGCT には酵素活性に依存しないがん幹細胞性の亢進能があることは、前年度の乳がん患者検体の解析から考察される結果とも一致する。

② GGCT が制御するがん幹細胞関連シグナルや標的分子の解析

次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析の結果、GGCT ノックダウンによりがん幹細胞遺伝子 CD44 や BMI1 (ポリコム群遺伝子) に加え脂質代謝酵素の発現も低下することを発見した。

③ **GGCT 抑制による抗がん剤感受性の解析**

GGCT ノックダウンによりシスプラチンに対する乳がんオルガノイドの感受性が高まったため、引き続き検討を行っている。

(2) **GGCT によるがん幹細胞代謝の制御機構の解析**

① **GGCT による乳がん細胞の脂質代謝制御機構の解析**

GGCT ノックダウンおよび GGCT の特異的阻害剤 (Pro-GA) により乳がん細胞における脂質代謝酵素の転写およびタンパク質発現が抑制された。また、脂質代謝酵素の阻害剤は乳がん PDX 細胞のオルガノイド形成能を有意に抑制した。

(3) **GGCT による腫瘍形成能の解析**

① **GGCT 発現阻害による腫瘍形成および転移の抑制効果**

乳がん細胞株を移植したマウスの自然転移は GGCT ノックダウンにより顕著に抑制された。そこで、乳がん PDX 細胞を異種移植したマウスを用いてがんの遠隔転移の解析を行ったが、GGCT ノックダウンによる転移抑制効果は明らかではなかった。

4. 研究の反省・考察

(1) **脂質代謝によるがん幹細胞性制御機構**

がん細胞では、ATP 産生経路や脂質・核酸合成、アミノ酸代謝などの細胞内代謝の変化が起こり、がん化が誘導される (代謝リプログラミング)。さらに、がん組織を構成するがん細胞は不均一であり (がんの不均一性)、例えば、がん幹細胞の糖代謝制御機構は他のがん細胞と異なるが、がん幹細胞を特徴づける脂質代謝機構は依然明らかではない。本研究では、乳がん幹細胞の制御因子として解析を続けてきた GGCT が脂質代謝制御に関わるという新知見を踏まえ、GGCT による「脂質代謝とがん幹細胞」の研究をテーマとして引き続き解析を続ける。

(2) **GGCTの酵素活性非依存性がん幹細胞制御機構**

GGCTはγ-グルタミルシクロ転移酵素活性をもち、グルタチオン生合成を介して細胞内の活性酸素種の除去を行う。活性酸素種の除去能はがん幹細胞性に関わる重要な因子であることから、当初はGGCTの酵素活性ががん幹細胞性の制御に重要であるという想定で研究を立案した。本研究を通じてGGCTのがんおよびがん幹細胞性の促進機構には、酵素活性非依存性の働きも重要である可能性が明らかになった。今後、GGCTの結合タンパク質の解析などを進めることでGGCTの未知の機能の解明を目指す。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Mizuno M, Khaledian B, Maeda M, Hayashi T, Mizuno S, Munetsuna E, Watanabe T, Kono S, Okada S, Suzuki M, Takao S, Minami H, Asai N, Sugiyama F, Takahashi S, Shimono Y. Adipsin-Dependent Secretion of Hepatocyte Growth Factor Regulates the Adipocyte-Cancer Stem Cell Interaction. *Cancers*. 2021;13(16):e4238. doi: 10.3390/cancers13164238.
- ② Ishihara S, Sasagawa Y, Kameda T, Yamashita H, Umeda M, Kotomura N, Abe M, Shimono Y, Nikaido I. Local states of chromatin compaction at transcription start sites control transcription levels. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(14):8007-8023. doi: 10.1093/nar/gkab587.
- ③ Hisamori S, Mukohyama J, Koul S, Hayashi T, Rothenberg ME, Maeda M, Isobe T, Valencia Salazar LE, Qian X, Johnston DM, Qian D, Lao K, Asai N, Kakeji Y, Gennarino VA, Sahoo D, Dalerba P, Shimono Y. Upregulation of BMI1-suppressor miRNAs (miR-200c, miR-203) during terminal differentiation of colon epithelial cells. *J Gastroenterology*. 2022. doi: 10.1007/s00535-022-01865-9.

(2) 口頭発表

- ① Shimono Y, Yanagi H, Watanabe T, Nishimura T, Hayashi T, Okada S, Suzuki M, Kawada K, Minami H, Gotoh N. Role of S100A10 in the metastatic colonization of breast cancer stem cells. AACR Virtual Annual Meeting 2021、2021年
- ② Shimono Y, Nishimura T, Kono S, Shibuya N, Yanagi H, Hayashi T, Watanabe T, Maeda M, Kakeji Y, Kawada K, Asai N, Takao S, Minami H, Kijima Y, Suzuki M, Gotoh N. Application of organoids to breast cancer research. 第80回日本癌学会学術総会 (コアシンポジウム)、2021年