

2022年度（第47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 ⑤ 脂肪酸代謝		

○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
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
浅 井 直 也	藤田医科大学 医学部	教 授	検体の病理解析
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・ 細胞生物学的解析
前 田 真 男	藤田医科大学 医学部	講 師	腫瘍移植実験 網羅的データ解析
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。さらに、これまでの成果を踏まえ、GGCT バリエーション 2 (GGCTv2) によるがんの浸潤・転移機構の解明にも取り組む。

(1) GGCT バリエーション依存性がん細胞制御機構

① 乳がん組織の GGCT バリエーション発現量

収集した乳がん手術検体より RNA を抽出し、GGCT バリエーションの発現量を測定する。あわせてがん幹細胞性やがんの進展に関わる遺伝子の発現量を測定し、それらとの相関関係を解析する。

② GGCTv2 の細胞内局在の解析

GGCTv2 に対する特異抗体を作製し、その特異性をウエスタンブロットなどにて検証する。つぎに GGCT バリエーション 1 (GGCTv1) と GGCTv2 の細胞内局在を免疫細胞染色法および細胞分画法により解析する。

③ GGCT バリエーションによるがん細胞制御能

GGCTv2 強制発現乳がん細胞株を作製し、がん細胞の浸潤能を解析する。さらに GGCTv2 強制発現細胞を用いて次世代シーケンサー解析を行い、がんの浸潤・転移などの制御に関わるシグナルや標的分子を同定する。

(2) GGCT によるがん幹細胞代謝の制御機構

① GGCT による脂質代謝制御機構

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。GGCT 抑制により脂肪酸合成酵素 FASN の発現低下を認めたことを踏まえ、FASN 抑制や脂質代謝阻害剤を用いてがん細胞のオルガノイド形成能に及ぼす影響を解析する。

(3) GGCT による腫瘍転移促進機構

① GGCTv2 による腫瘍転移促進能

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、GGCTv1 および GGCTv2 を強制発現した乳がん細胞を用いて、腫瘍形成能および転移能を評価するとともに、マウスの脾臓に注入してがん転移能を評価する。

3. 研究の成果

(1) GGCT バリエーション依存性がん細胞制御機構

① 乳がん組織の GGCT バリエーション発現量

GGCT には複数のバリエーションがあり GGCTv1 のみが酵素活性を有する。乳がん手術検体を用いて GGCT の四つのバリエーションと遺伝子発現の関連を解析したところ、GGCTv1 と GGCTv2 の乳がん組織における発現レベルには相関がなく、GGCTv2 発現のみががんの浸潤・転移と関係する転写因子 Twist と Snail の発現レベルと強く相関した。一方、GGCTv1 の発現はがん幹細胞遺伝子 CD44 の発現と相関した。酵素活性をもたない GGCT バリエーションががんの促進に関わる可能性を示唆する本結果は、これまで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 GGCTv2 の細胞内局在の解析

GGCTv2 が GGCTv1 と異なる機能を持つ可能性が示されたことから、GGCTv2 に対する特異抗体を作製し解析した。免疫細胞染色にて、内因性および強制発現 GGCTv2 は共に核に局在を認めた。一方、GGCTv1 は細胞質に局在した。つぎに、細胞を分画して細胞内局在を解析した。GGCTv1 タンパク質は細胞質分画に検出されたが、GGCTv2 タンパク質は核分画に強く検出された。GGCTv1 と GGCTv2 の局在の違いからも両者は機能が異なる可能性が示唆された。

③ GGCT バリエントによるがん細胞制御能

GGCTv2 によりがん細胞の浸潤能は有意に亢進し、その抑制はがんの浸潤能を有意に低下させた。一方、GGCTv1 によりがん幹細胞性を反映するスフェア形成能は亢進したが、がん細胞の浸潤能は低下した。また、GGCTv2 強制発現細胞を用いて次世代シーケンサー解析を行ったが、がんの浸潤・転移と関わるパスウェイや遺伝子発現の変化は検出できなかった。

(2) GGCT によるがん幹細胞代謝の制御機構

① GGCT による脂質代謝制御機構

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 FASN の転写およびタンパク質発現が抑制された。また、FASN ノックダウンあるいはその阻害剤は乳がん PDX 細胞のオルガノイド形成能を有意に抑制した。しかし、脂肪酸の添加によりこれらの抑制を回復させることは出来なかった。

(3) GGCT による腫瘍転移促進機構

① GGCTv2 による腫瘍転移促進能

GGCTv1 発現細胞は GGCTv2 発現細胞より腫瘍形成能が有意に高かった。つぎに、乳がん検体において GGCTv2 の発現ががんの浸潤・転移を促進する Twist 遺伝子などの発現と相関したことを踏まえ、GGCTv2 発現がん細胞の転移能を解析した。マウスの脾臓に注入したがん細胞の肝臓転移能は、GGCTv2 細胞が GGCTv1 細胞よりも有意に高かった。

4. 研究の反省・考察

(1) GGCT バリエント依存性がん細胞制御機構

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。私たちの検討でも、酵素活性をもつ GGCTv1 の発現により活性酸素種の除去能は亢進し、GGCT の酵素活性抑制剤 Pro-GA により活性酸素種が蓄積した。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。本研究を通じて酵素活性をもたない GGCTv2 にも当初想定しなかったがん浸潤・転移促進機能があることが明らかになった。主としてがん幹細胞性を亢進させる GGCTv1 と、がんの浸潤・転移を促進する GGCTv2 それぞれの機能および発現制御機構の解析を通じて活性酸素種除去能以外の GGCT の未知の機能を明らかにすることが、乳がんに対する有効な GGCT 阻害治療法確立のために求められる。

(2) GGCT による脂質代謝制御機構

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おこり、がん化が誘導される (代謝リプログラミング)。本研究では、乳がん幹細胞の制御因子 GGCT が脂肪酸合成酵素 FASN の発現制御を介して脂質代謝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検討をすすめた。GGCT ノックダウンおよび GGCT 阻害剤 Pro-GA により乳がん細胞における脂質代謝酵素 FAS の転写およびタンパク質発現の抑制、および乳がん PDX 細胞のオルガノイド形成能の抑制を認めたが、予想に反して脂肪酸の添加によりこれらの抑制を回復させることは出来なかった。これらの問題点を克服するために、脂肪酸の添加方法、解析に使用するモデルの検討などをさらに進める必要がある。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Toriuchi K, Kihara T, Aoki H, Kakita H, Takeshita S, Ueda H, Inoue Y, Hayashi H, Shimono Y, Yamada Y, Aoyama M. Monocyte-Derived miRNA-1914-5p Attenuates IL-1 β -Induced Monocyte Adhesion and Transmigration. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3):2829. doi:10.3390/ijms24032829. PMID: 36769149; PMCID: PMC9917334.

(2) 口頭発表

- ① Shimono Y, Hayashi T, Kono S, Shibuya N, Hisamori S, Mukohyama J, Yanagi H, Watanabe T, Maeda M, Hirata M, Kakeji Y, Kawada K, Asai N, Okada S, Suzuki M, Takao S, Minami H, Kijima Y, Gotoh N, Dalerba P. Distantly metastasized cancer stem cells in human breast cancer xenograft mouse. The 6th International Workshop on Humanized Mice、2022年。招待講演
- ② Shimono Y, Hisamori S, Mukohyama J, Isobe T, Kakeji Y, Dalerba P. Analyses of terminally differentiated normal cells guide the identification of cancer stem cell-suppressor microRNAs. 第81回日本癌学会学術総会（ミニシンポジウム）、2022年。
- ③ Shimono Y, Hisamori S, Mukohyama J, Isobe T, Kakeji Y, Dalerba P. MicroRNA-mediated suppression of colon cancer stemness by the induction of terminal differentiation. 第33回日本消化器癌発生学会（シンポジウム）、2022年。優秀演題賞