

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06338

研究課題名(和文) 乳癌における、ミトコンドリア複合体 が上皮間葉転換に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the effect of mitochondrial complex I on epithelial mesenchymal transition in breast cancer

研究代表者

松本 純明 (Matsumoto, Yoshiaki)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：80760769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌細胞株について、ミトコンドリア複合体構成遺伝子の変化に伴う代謝機能の変化ががん幹細胞性(特に足場非依存性増殖)に関与するという仮説を持ち、代謝機能を修飾した乳癌細胞株の足場非依存性増殖を検討して来た。同時に上皮間葉転換に伴って代謝プロファイルに違いが認められ、これらの特徴が癌細胞にどのような変化をもたらすかについて検討中である。

また、shRNAを用いて細胞の移動能に関する検討で以前から見出していた遺伝子の下流に、足場非依存性増殖や、anoikis抵抗性に関与すると思われる遺伝子を新たに同定し、この遺伝子がCD44バリエーションを介して癌幹細胞性と関連することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that metabolic function of breast cancer is modified when its mitochondrial complex gene changes, resulting in acquisition of cancer stemness (especially anchorage independent growth ability). We examined anchorage independent growth ability of breast cancer cell line with modified metabolic function. Changes in the metabolism of breast cancer cell line accompanying epithelial mesenchymal transition are under analysis. We newly identified a gene which is thought to be involved in anchorage independent growth and anoikis resistance. The gene exists downstream of a certain gene related to cell migration ability. We revealed that this gene is involved in cancer stemness via CD44 variant.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん幹細胞性 足場非依存性 乳癌

## 1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の治療においては、trastuzumab・imatinib等の分子標的薬が登場し、それまで予後不良であったHER2陽性乳癌・慢性骨髄性白血病の治療は格段に進歩した。しかしホルモン受容体陰性・HER2陰性のいわゆるトリプルネガティブ乳癌は、分子標的が未だ同定されておらず、臨床上的の問題となっている。

化学療法抵抗性のメカニズムとして癌幹細胞の存在が示唆されている。ヒト乳癌組織はCD44/CD24細胞表面マーカーで識別できる不均一な細胞集団であり、NOD/SCIDマウスに移植した場合、CD44<sup>hi</sup>CD24<sup>lo/-</sup>の細胞集団がより効率よく腫瘍を形成することが判っている(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3983-3988, 2003)。

乳癌は遺伝子発現解析によりluminal A/B、basal A/Bに分類される事が知られている(Nature 406:747-752, 2000)。basal type乳癌はトリプルネガティブ乳癌に大まかに対応している。腫瘍形成能の高い細胞集団はCD44<sup>hi</sup>CD24<sup>lo/-</sup>でありbasal Bに分類され、上皮マーカーの発現は失われ、TGFシグナル関連遺伝子、特に間葉系遺伝子の発現が亢進しepithelial-mesenchymal transition (EMT, 上皮間葉転換)を起こした細胞であることが判っている(Cancer Cell, 11:259-273, 2007)。

ヒトin vitro発癌細胞モデルHMLE/HMLER細胞では、EMTの結果、乳癌幹細胞の表現型であるCD44<sup>hi</sup>CD24<sup>lo/-</sup>細胞が誘導され、効率的にsphereを形成する。マウス正常乳腺ではCD49f<sup>hi</sup>CD24<sup>med</sup>分画が乳腺再構築能のある正常乳腺幹細胞を内包しているが、この分画も間葉系マーカー遺伝子の発現が亢進している。

また、造腫瘍性には癌遺伝子と上皮間葉転換の両方が必要であることが報告されている(Cell 133:704-715, 2008)。

以上のことから、上皮間葉転換が正常乳腺

と乳癌の両方の幹細胞特性と密接な関係にあること、トリプルネガティブ乳癌、なかでもbasal B乳癌と関連があることが判ってきた。しかし未だ正常乳腺幹細胞を定義できるマーカーが存在せず、上皮間葉転換の特徴と幹細胞特性を持つ間葉系乳癌の治療標的も未同定である。これまで乳癌幹細胞特性である上皮間葉転換の誘導因子を同定するための新規スクリーニング系を用いた検討で、Snailを単離している。

## 2. 研究の目的

上皮間葉転換に伴って起こることが想定される癌細胞の代謝変化を人工的に起こし、癌幹細胞特性を獲得することを証明し、トリプルネガティブ乳癌の治療標的を見出すこと。

## 3. 研究の方法

上皮間葉転換を起こした乳腺細胞をGFP発現と薬剤耐性によって選択できるレポーターシステムを用い、間葉系乳癌細胞株のひとつであるBT549由来のcDNAライブラリーを用いて遺伝子スクリーニングを行ったデータから、上皮間葉転換さらには癌幹細胞特性に関与する遺伝子の同定を試みた。癌幹細胞特性の指標はおもに足場非依存性増殖とした。癌細胞の代謝機能を修飾する方法はshRNAシステムを用いて、同定された代謝関連遺伝子をノックダウンすることで行った。代謝活性はシーホース社のXF96eを使用して、細胞外酸性化速度(ECAR)、酸素消費速度(OCR)を測定することで計測した。

また、あらかじめ上皮間葉転換を起こした細胞と起こしていない細胞のメタボローム解析も行うこととした。

## 4. 研究成果

同定した遺伝子の中にはミトコンドリア呼吸鎖複合体の構成遺伝子が含まれており、その発現誘導が上皮間葉転換と協調して乳腺細胞の足場非依存性増殖を増強する結

果を得たことから、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の活性は上皮間葉転換とともに癌幹細胞性に関与することが示唆された。

上皮間葉転換に関与する因子を同定する既存の方法には形態変化の観察、FACS解析におけるCD44/CD24 profile、ソフトアガーアッセイ、間葉系マーカーの発現解析などがあるが、いずれも手間がかかりスクリーニングには向かない。そのため本研究ではライブイメージングテクニック(GFP)を活用した間葉系レポーター細胞を作製することとした。具体的には、上皮間葉転換に関与する因子さらには癌幹細胞性に関与する因子を同定する為、間葉系乳癌細胞株のBT549(RB1遺伝子の欠失変異、EGFRの増幅、PTENの変異を持つ株として知られる)のcDNA libraryを用いた。

上皮間葉転換を起こしたinsert cDNAを同定するため、ライブラリーの共通配列を認識するプライマーを用いてPCR増幅しシーケンス解析したところSnail, Twistを含む複数の候補遺伝子を得た。

間葉系細胞の性質として、ソフトアガーコロニー形成能が知られている。そこで2次スクリーニングとしてソフトアガーアッセイを行ったところ著明にコロニーを形成するクローンとそうでないクローンに分けられた。この2次スクリーニングにより得られた候補遺伝子をそれぞれ個別にクローニングした。

これらの候補遺伝子の機能を考えた時に2つの可能性が存在する。つまり、上皮間葉転換誘導因子としての可能性と間葉系特質を促進する因子としての可能性である。

まず誘導因子としての機能を判定する為に各々をクローニングし、乳腺細胞に導入したが、既知の上皮間葉転換誘導因子であるSnail, Twist以外は、単独で上皮間葉転換誘導能を持つものは認められなかった。

次に間葉系特質の促進に寄与する可能性

を検証した。

Snailで上皮間葉転換を起こした細胞において、間葉系の性質が助長されるかどうかを検証した。

ER-Snailのコンストラクトにより、タモキシフェンを添加することでSnailが活性化し、候補遺伝子がDoxによって誘導される系を用いることとしたが、Snailを導入した時点でこれ以降は間葉系の性質をCD44/24のFACS解析や間葉系マーカーの発現量で判定できなくなるため、ソフトアガーアッセイを用いてその間葉系特質を促進する因子としての効果を検証することとした。

その結果、ミトコンドリア呼吸鎖複合体の構成遺伝子を複数同定しえた。

ミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子の高発現が転移を抑制するという既報告があり、我々は間葉系の乳癌細胞株SUM159とMDA-MB231についてもこの遺伝子の誘導系を作成し、誘導の有無で違いを検証したが、形態、2D growth, ソフトアガーコロニー形成能に有意な差は認めなかった。

このスクリーニングで上皮間葉転換の誘導因子Snail, Twistと上皮間葉転換の促進因子が同定されたことになる。誘導因子としては既知の遺伝子しかとれなかったが、促進因子としてはミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子が新たに同定された。この遺伝子はミトコンドリアの構成因子であるため、上皮系と間葉系(basal-like 乳癌を含む)の細胞では代謝の違いがあることを反映していると考えられた。

ミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子が上皮間葉転換の促進因子であるならば、間葉系の乳癌細胞株の増殖、生存に関与している可能性がある。その解析の為、ミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子に対しshRNAを複数作成した。

各遺伝子をノックダウンしたSUM159細胞で2D growth能および3Dコロニー形成能を検証

した。その結果、著明な増殖抑制およびコロニー形成能の低下を認めた。これは MDA-MB231 細胞でも同様の結果が得られた。上皮系の乳癌細胞株の代表として MCF7 を、間葉系の乳癌細胞株として SUM159 と MDA-MB231 以外に数種類加えて、それらの細胞株に対してミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子の shRNA が増殖に与える影響を検証したところ MCF-7 では増殖抑制効果が小さく、間葉系の細胞株では有意な増殖抑制効果を認めた。これより、ミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子のノックダウン効果は間葉系細胞に特異的に起きることがわかった。

次にこの上皮系と間葉系の細胞株におけるミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子の shRNA が growth に及ぼす効果の違いが、増殖に影響を与えた結果なのか生存に影響を与えた結果なのかを確認する為 TUNEL アッセイを行ったところ、間葉系の細胞株の方で有意に細胞死が多く認められた。

一方、間葉系の乳癌細胞株ではミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子のノックダウンによりその増殖能も低下したが、上皮系の細胞株では影響がなかった。

以上より、乳癌においてミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子は間葉系促進因子として働くと考えられた。

ミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子の機能から、乳癌では間葉系の細胞株においてミトコンドリアでの酸化的リン酸化 (OXPHOS) への依存度が上皮系に比べて高い可能性があると考えられた。

次に、ミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子は ATP の増産を介して幹細胞性に寄与する可能性を検討した。ミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子が間葉系細胞のソフトアガーコロニー形成能を促進したことから ATP の増産が腫瘍の足場非依存性増殖に重要な役割を演じていると考え、2D

の接着状態と 3D の非接着状態における細胞内外の代謝産物の解析を行った。その結果 ATP は 3D 状態で著明に高値であり、ミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子の活性指標となる  $NAD^+/NADH$  比も 3D 状態で著明に高値であった。

上皮間葉転換を起こした乳癌細胞においてミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子を発現誘導することで足場非依存性増殖が増強したこと、3D 培養下での  $NAD^+$ , ATP 量の増加が認められたことから、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化と上皮間葉転換の相加もしくは相乗効果が示唆された。

Brugge らは 3D 培養により anoikis を起こした正常乳癌細胞株 MCF10A においてミトコンドリアでの ATP 産生が低下していること、Her2 遺伝子や抗酸化物により ATP 産生の増大とともに足場非依存性増殖が可能になることを報告している。

以上よりミトコンドリアの活性が癌幹細胞の特徴の一つである足場非依存性増殖に関与していることが示唆された。

これまで、正常乳癌細胞株に上皮間葉転換を誘導することで、ある程度の造腫瘍能は獲得されることが知られていたが、本研究で、上皮間葉転換の誘導に加えてミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子を強制発現させることでその造腫瘍能は飛躍的に高まることがわかった。

上皮間葉転換を起こしている Basal 乳癌に間葉上皮転換を誘導する方法は見いだされていないが、ミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子の抑制、つまりミトコンドリアの障害はメトホルミンに代表されるような既存臨床薬剤で可能である。実際にある種の癌細胞株ではミトコンドリアでの酸化的リン酸化の阻害剤が有効であることが示唆されている。メトホルミンの癌に関する臨床試験の結果は芳しくなかったが、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化が生存あるい

は増殖のキーになっている癌を選別できれば、阻害剤が治療に利用可能になると思われる。

上皮間葉転換誘導スクリーニングで得られた候補遺伝子の中には REDOX 関係の遺伝子も複数同定されており、ミトコンドリアの活性化による ATP の増産と引き換えに発生する ROS の軽減に上皮間葉転換が関与していることも考えられる。今後は抗酸化物質 + ミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子で同様なコロニー形成能の増大効果が得られるか、SOD2 などの ROS スカベンジャー酵素とミトコンドリア呼吸鎖複合体を構成する遺伝子の組合せで同じ効果が得られるかなどを検証する予定である。

なお、進行中のメタボローム解析によって、上皮間葉転換に伴い、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化以外の代謝プロファイルの変化も複数認められている。これらの特徴が癌細胞にどのような変化をもたらしているかについても検討中であり、様々な細胞株でこれらを検証する必要があると考えている。

また、代謝に関与する遺伝子であることから、創薬を目標にした場合、副作用のメカニズムも十分考慮しておく必要がある。In vivo での解析を計画中である。

また、shRNA を用いて上皮転換を引き起こす遺伝子のスクリーニングも行った。その中で細胞の移動能に関与していることが示されたある遺伝子の下流に、足場非依存性増殖や、anoikis 抵抗性に関与すると思われる遺伝子を新たに同定し、この遺伝子が CD44 バリエーションを介して癌幹細胞性と関連することが明らかになった。現在この機能について検証中である。また、この遺伝子のノックダウンにより代謝機能に変化がないかを確認する予定である。こちらについても現在、in vivo で造腫瘍性、転移能などが変化するかどうかを検証している最中である。

上記研究について、いずれも論文投稿準備

中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松本 純明 (MATSUMOTO, Yoshiaki)  
京都大学・大学院医学研究科・特定助教  
研究者番号： 80760769

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者

##### (4) 研究協力者

( )