

平成 31 年 4 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18414

研究課題名(和文) ニトロcGMPのがん幹細胞制御における機能と分子機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of function and molecular mechanism of nitro-cGMP in cancer stem cell regulation

研究代表者

伊藤 千秋 (Ito, Chiaki)

金沢大学・がん進展制御研究所・研究協力員

研究者番号：60733334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、正常造血幹細胞および白血病細胞を対象とし、ニトロcGMPの細胞内レベルを評価した。正常造血では、未分化性の高い細胞群と分化した細胞群とで比較をしたところ、分化した細胞群のほうがよりニトロcGMPレベルが高いという結果になった。また、スフィア培養系において、ニトロcGMPは濃度依存的にグリオーマ細胞の増殖を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一酸化窒素と活性酸素のシグナル伝達物質であるニトロcGMPと幹細胞性との関連や、がんに対する薬剤としての効果については今までよく知られていなかった。がん治療では、幹細胞様の性質をもった、いわゆるがん幹細胞の根絶が重要である。ニトロcGMPは、幹細胞様のがん細胞に対し増殖抑制効果を示した。薬剤としては改善が必要であるものの、誘導体の開発等により、がん治療への応用につながるものである。

研究成果の概要(英文)：In this research, I analyzed cellular levels of nitro-cGMP in hematopoietic stem cells and in leukemia cells. In normal hematopoietic cells, I compared undifferentiated cells and differentiated cells. Differentiated cells showed higher level of nitro-cGMP. Nitro-cGMP addition inhibited growth of glioma cells in sphere culture in a dose dependent manner.

研究分野：生命科学

キーワード：幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) NOとROSのシグナルメッセンジャーであるニトロ cGMP: 一酸化窒素(NO)は、生体内で主要なシグナル分子として機能している。生成されたNOは可溶性グアニル酸シクラーゼを活性化し、環状グアノシンーリン酸(cGMP)を生成する。cGMPはNOのセカンドメッセンジャーとして、さまざまなタンパク質に結合し、筋肉弛緩や神経伝達などの多様な生理現象の調節に関与している。一方、酸化ストレスの要因の一つとされる活性酸素種(ROS)は、主にミトコンドリアで生成し、NOと反応することでより反応性の高い活性窒素酸化種となり、核酸や脂質等の生体分子を修飾することが知られている。2007年にcGMPの内因性誘導体として発見された8-ニトロ環状グアノシンーリン酸(以下、ニトロ cGMP)は、グアノシン三リン酸(GTP)が活性窒素酸化種によりニトロ化されたのち、グアニル酸シクラーゼによって環状化した分子であり、NOとROSの新たなシグナルメッセンジャーとして注目された(図1)(Nature Chem. Biol., 3, 727-735, 2007)。ニトロ cGMPは、当初はサイトカイン刺激や細菌感染したマクロファージでの生成が同定されたが、その後上皮細胞や脂肪細胞、がん細胞や植物細胞などにも存在することが明らかとなった。ニトロ cGMPは、cGMPとは異なる性質を有している事が明らかとなっている。まず、cGMPはホスホジエステラーゼという加水分解酵素による分解を受けてそのシグナルが消去されるが、ニトロ cGMPはこの酵素による分解を受けない。さらに特筆すべき点として、ニトロ cGMPはcGMPとは異なり、タンパク質のシステイン残基と反応し、cGMPを付加する性質を有している(S-グアニル化反応)。例えば、ニトロ cGMPは酸化ストレスセンサーであるKeap1(Kelch-like ECH-associated protein 1)をS-グアニル化することで転写因子Nrf2を活性化し、抗酸化作用をもたらすことが知られている。このように、ニトロ cGMPはさまざまな細胞に存在し、NOとROSの新たなシグナルメッセンジャーとして重要な働きをしていると考えられた。

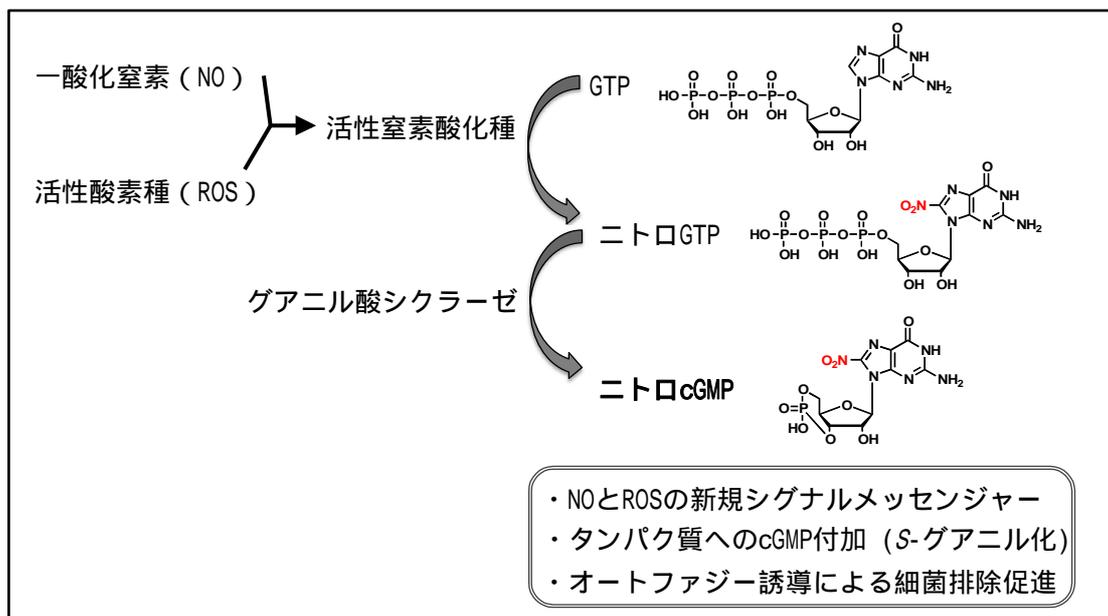


図1: 新規シグナルメッセンジャーニトロ cGMPの生成

(2) ニトロ cGMPの新たな生理機能の発見: 我々は、ニトロ cGMPが、オートファジーによる細菌排除の促進を行う事を明らかにした(Mol. Cell, 52, 794-804, 2013)。オートファジーは、細胞内のタンパク質分解機構の一つである。生体が飢餓状態に陥った際のアミノ酸・エネルギー供給の他、古くなった細胞小器官や侵入してきた異物を認識し排除することで、恒常性の維

持に寄与するシステムである。そして、特定の対象を認識して分解する経路は「選択的オートファジー」と呼ばれている。マウスのマクロファージに A 群連鎖球菌を感染させると、マクロファージ細胞はオートファジーによって細菌を取り込み、分解する。この培養系にニトロ cGMP を添加すると、オートファジーによる細菌排除がさらに促進され、反対にニトロ cGMP 生成を阻害すると細菌排除は阻害された。また、マクロファージに取り込まれた細菌の表面に S-グアニル化が認められ、さらにその外側に、選択的オートファジーの標識とされる Lys63 型ポリユビキチン化が確認された。すなわち、ニトロ cGMP が S-グアニル化によってオートファジー分解の目印となり、細菌の排除を促進していることが示唆された。

2. 研究の目的

(1) 発見からこれまでに、ニトロ cGMP の機能について徐々に明らかになってきたが、未だ不明な点が多い。幹細胞やがん幹細胞におけるニトロ cGMP 産生についても明らかにされていない。そこで、本研究の目的の一つ目は、幹細胞やがん幹細胞を対象に細胞内ニトロ cGMP レベルを評価することである。

(2) 本研究の目的の二つ目は、ニトロ cGMP が抗がん治療に有用であるかを明らかにする事である。ニトロ cGMP はオートファジーによる細菌排除を促進する効果がある。オートファジーは、細菌感染以外にもさまざまな疾患と関連があることが知られており、がんもその一つである。一般的には、がんではオートファジーが活性化されていて、オートファジーを阻害することが、がん治療の基本戦略とされる。しかしながら、それとは逆に、オートファジーを活性化させタンパク質を過剰に分解することで細胞死を誘導する薬剤も存在する。そこで、ニトロ cGMP をがん細胞に与えた場合に、どのような影響が出るか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ニトロ cGMP レベルの評価: ニトロ cGMP の細胞内レベルを評価する方法には、質量分析法や抗体を用いた方法があるが、簡便性から抗体を用いた方法で解析することにした。幹細胞としてマウスの骨髄由来造血幹細胞を使用した。野生型 C57B6 マウスの骨髄細胞を回収し、フローサイトメトリーにより Lineage-negative の細胞 (Lin^- ; 未分化細胞が多く含まれる細胞群) と Lineage-positive の細胞 (Lin^+ ; 分化細胞が多く含まれる細胞群) とを分取した。回収した細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、メタノール透過処理し、ニトロ cGMP 認識抗体で染色した。染色サンプルをフローサイトメトリーで解析した。造血器腫瘍モデルとして急性骨髄性白血病(AML)モデルマウスを作製した。AML モデルマウスは、マウスの KSL($cKit^+ Sca1^+ Lin^-$) 細胞を骨髄から回収し、GFP 標識した MLL-AF9 融合遺伝子をウイルスにより導入後レシピエントマウスに移植することで作製した。マウスの脾臓および骨髄から GFP 陽性細胞を回収し、既述の方法で固定・染色後フローサイトメトリーで解析した。白血病幹細胞がより多く含まれる cKit 陽性画分 (Cancer Cell, 10, 257-268, 2006) と、cKit 陰性画分を分取し、細胞抽出物を作成してウエスタンブロット法によりニトロ cGMP レベルを S-グアニル化認識抗体で検出した。S-グアニル化認識抗体は、有本博一教授(東北大学生命科学研究科)に御提供頂いた。

(2) ニトロ cGMP のがんの増殖に与える影響の評価: ヒトグリオーマ細胞を、FGF や EGF 等を含む血清無添加の DMEM-F12 培地を入れた超低接着ウェルプレート中で培養した。この培養法では、幹細胞様のがん細胞は球状の細胞塊スフィアを形成する。スフィア培養系に、ニトロ cGMP を添加することで薬剤の効果を見た。スフィア形成能は、細胞解離液で一つ一つばらばらにし

た細胞を一定数スフィア培養に供した際に、形成されたスフィアを目視あるいは顕微鏡で撮影し数えて算出した。ニトロ cGMP は、有本博一教授(東北大学生命科学研究科)に御提供頂いた。

4. 研究成果

(1)正常造血幹細胞のニトロ cGMP レベルの解析: 野生型マウス骨髓細胞中の未分化性の高い Lin⁻細胞とより分化した Lin⁺細胞とでは、Lin⁺細胞でよりニトロ cGMP レベルが高いという結果が得られた。未分化な造血幹細胞では ROS が低く抑えられていることが知られている。ROS の下流で生成するニトロ cGMP レベルも、未分化な細胞では低く、分化した細胞では高くなったと考える事が出来る。今後、幹細胞においてニトロ cGMP レベルを意図的に上昇させた時に、コロニー形成能や造血能に影響が出るかを解析することで、この分子の生理機能をより明らかにすることができると思われる。

(2)白血病細胞のニトロ cGMP レベルの解析: 白血病細胞では、およそ 70%の細胞で染色陽性となった。p62 欠損型の AML モデルマウス (p62-floxed; RosaCreER+マウスの KSL 細胞に MLL-AF9 を導入し、レシピエント移植後タモキシフェン処理により p62 を欠損させた) についても解析したところ、これより高い割合の細胞で陽性となった。p62 は、酸化ストレスセンサーである Keap1 と直接結合し、Keap1 と転写因子 Nrf2 の結合を競合的に阻害する。これによって Nrf2 が核内に移行し、抗酸化酵素の発現が誘導される。p62 欠損型白血病細胞では、Nrf2 の活性化と抗酸化酵素発現が誘導されなくなり、細胞内の ROS レベルが上昇し、結果としてニトロ cGMP レベルが上昇すると考えられた。しかしながら、p62 欠損型と野生型では、in vitro でのコロニー形成率や in vivo での白血病発症および生存日数に大きな違いはなく、ニトロ cGMP レベルと白血病幹細胞の性質との相関は認められなかった。白血病幹細胞がより多く含まれる cKit 陽性画分と cKit 陰性画分とでは、ニトロ cGMP レベルに大きな差異は認められなかった。

(3)ニトロ cGMP のがん細胞に与える影響の評価: グリオーマ細胞のスフィア培養系にニトロ cGMP を添加すると、濃度依存的にスフィア形成の阻害が見られた(図2)。しかしながら、スフィア形成阻害に効果的な投与濃度は一般的な薬剤に比べ高かった。抗ガン剤としての応用化には、より膜透過性の高いニトロ cGMP アナログの開発が必須と考える。

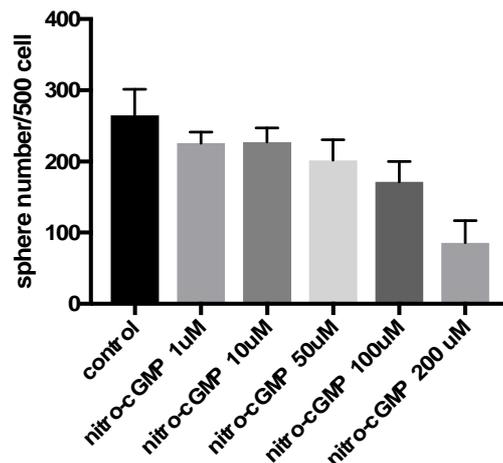


図2: ニトロ cGMP によるスフィア形成阻害

5. 主な発表論文等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者
該当なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名: 有本 博一
ローマ字氏名: Arimoto Hiromasa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。