

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11131

研究課題名(和文)統合オミックス解析をもちいたGGCT発現阻害による抗腫瘍メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of antitumor effect in inhibition of GGCT expression using integrated omics analysis

研究代表者

窪田 成寿(Kubota, Shigehisa)

滋賀医科大学・医学部・医員

研究者番号：80759118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：癌増殖関連蛋白GGCTの発現阻害による抗腫瘍メカニズムを解明するためにオミックス解析を行った。乳癌由来MCF-7のを用いたトランスクリプトーム解析では、細胞周期関連遺伝子群の有意な発現変動が明らかになった。GGCT発現阻害によりCDK inhibitor(p15,p21)の発現上昇を認め、これらはGGCTとの同時silencingにより癌増殖抑制効果を阻害し、G0/G1細胞周期停止を回復させた。CDK inhibitorの誘導機序をさらに解析した結果、GGCT発現阻害によるTGF β -SMAD signaling pathwayの活性化が、抗腫瘍メカニズムの一因であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GGCTは発現阻害により癌特異的に増殖抑制効果を示す有望な治療標的であり、種々の癌における新規治療への応用が期待されている。本研究の結果により、GGCT阻害によりTGF β -SMAD signaling pathway が活性化され、CDK inhibitorの誘導を介した細胞周期停止が起こることが明らかになった。この機序は、従来の抗癌剤や分子標的薬が提唱するアポトーシス細胞死とは異なるメカニズムであり、既存治療抵抗例への治療効果や既存治療への併用による治療効果の向上が期待される。GGCTを標的とする新規治療の開発に必須である作用機序の一端を解明し得た点が、非常に有意義であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We performed omics analysis to elucidate the mechanism of anti-tumor effect in inhibiting the cancer growth-related protein GGCT. Transcriptome analysis using breast cancer-derived MCF-7 revealed significant changes of expression level of cell cycle-related genes. In the network of cell cycle, GGCT depletion induced up-regulation of CDK inhibitors (p15 and p21), and simultaneous knockdown of p15 and/or p21 recovered the cell cycle arrest, and rescued the subsequent growth inhibition. Further analysis revealed the activation of TGF β -SMAD signaling pathway associated with induction of CDK inhibitors, was one of anti-tumor mechanisms on GGCT depletion.

研究分野：バイオインフォマティクス

キーワード：-グルタミルシクロトランスフェラーゼ トランスクリプトーム解析 メタボローム解析 抗腫瘍メカニズム 癌関連タンパク

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1. 研究開始当初の背景 われわれは尿路上皮癌の診断・治療の標的

当研究室では、尿路上皮がんの診断・治療標的となるタンパク質をスクリーニングする目的で、尿路上皮癌組織と正常尿路上皮組織を試料としてプロテオーム解析を行い、尿路上皮癌で高発現するタンパク質群の1つとして GGCT (gamma-glutamylcyclotransferase, 別名 C7orf24, CRF21)を同定した。C7orf24 を同定した 2001 年当時、機能はおろかタンパク質としての実在も明らかではなかったが、リコンビナントタンパク質からモノクローナル抗体を樹立し、臨床検体で発現を検討したところ、種々の臓器において正常組織と比し癌組織で明らかに高発現しているタンパク質であることを明らかにした。癌細胞における C7orf24 の機能を検討した結果、C7orf24 を正常組織由来細胞に導入すると細胞増殖促進がみられたが悪性形質転換は認めず、癌細胞株において C7orf24 をノックダウンすると細胞増殖抑制効果を示すことが明らかになった (Kageyama, Proteomics Clin Appl, 2007)。以上から C7orf24 は悪性腫瘍の治療標的となりうると考えられた。われわれの報告の翌年に Oakley らによって C7orf24 が グルタミン回路の構成酵素の1つである GGCT と同一であると報告した (J Biol Chem, 2008)。その後、Gromov らにより乳癌 123 例の臨床検体を試料としたプロテオーム解析から、乳癌組織における GGCT の高発現と予後への相関が明らかにされた (J Proteome Res, 2010)。さらに他の癌種においても検討がなされ、子宮癌、肺癌、大腸癌においても GGCT の高発現が報告された。

われわれは多くの施設と共同研究体を構築し、癌における GGCT の役割解明と GGCT を標的とした治療法の開発をテーマに研究を積み重ねてきた。Uejima らは骨肉腫を対象とし、手術標本 40 例での GGCT mRNA 発現が正常骨芽細胞株よりも全例で高いことを示した (Anticancer Res, 2011)。また、GGCT が遊走能と浸潤能の促進にも関与することを、マトリゲルチャンパーを用いた骨肉腫細胞株 HOS に対する GGCT-siRNA 投与実験により明らかにした。治療実験においては、肺癌細胞株 EBC-1 を皮下移植した担癌マウスモデルを作製し、needle-free jet injection を用いて GGCT-siRNA を投与して著明な腫瘍縮小効果が得られることを示した (Hama, Cancer Gene Ther, 2012)。この際、注射部位への組織損傷及び体重減少などの有害事象は認めなかった。以上より、GGCT を標的とした治療は癌細胞における増殖、遊走、浸潤を阻害し、著明な抗癌効果を発揮するのみならず、正常組織へのダメージも軽微であることから、副作用の少ない新規抗癌薬としての可能性が期待された。

しかしながら、GGCT を標的とする新規治療薬の開発に際し、抗腫瘍メカニズムの解明が喫緊の課題となった。Matsumura は、乳癌由来 MCF-7 や MDA-MB-231、前立腺癌由来 PC3、LNCap を用いて RNA 干渉実験を行い、GGCT ノックダウン細胞が老化細胞に特徴的な形態変化をきたすことを明らかにした。また、この細胞老化には p16^{ink4a}、p21^{cip1} といった cycle dependent kinase (CDK) inhibitor の誘導が関与していることを示し (BMC cancer, 2016)、GGCT 発現阻害による抗腫瘍効果は、細胞老化を介した非アポトーシス性の細胞死によるものであることを明らかにした。一方で、細胞種により誘導される CDK inhibitor が異なる点、CDK inhibitor の誘導を惹起する細胞内カスケードは依然として未解明であった。

以上より、GGCT を効率的に抑制できる治療薬を開発し、新しい癌治療法の発展を目指すにあたり、GGCT 発現阻害時の抗腫瘍メカニズムの詳細を明らかにすることが必須であると考えられた。そこで、GGCT ノックダウン細胞を試料としたオミックス解析を行い、遺伝子や代謝産物の変動を網羅的に解析することでメカニズムの解明に繋がるのではないかと考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

われわれが尿路上皮癌プロテオーム解析から同定した細胞増殖促進に関わる新規癌関連タンパク質 GGCT の発現時における遺伝子や代謝産物の変動を、ノックダウン細胞を用いたトランスクリプトーム解析及びメタボローム解析により網羅的に解析し、抗腫瘍メカニズムの鍵となる分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 乳癌由来 MCF-7 を用いた全トランスクリプトーム解析

乳癌由来 MCF-7 に対して Control-siRNA 及び GGCT-siRNA をリポフェクション法による核酸導入を行い、ノックダウン細胞から抽出した mRNA よりライブラリーを作成した。

を試料とし、次世代シーケンサー (Genome Analyzer IIx, Illumina) を用いて全トランスクリプトーム解析を行った。遺伝子発現差解析を行い、発現差遺伝子 (DEG) の機能解析 (Gene Ontology, Pathway) を行った。

(2) 乳癌由来 MCF-7 を用いたメタボローム解析

(1)と同様の処理を行った細胞を用いてメタボローム解析を行った。主に -グルタミン回路の代謝産物の変動に注目し、候補代謝産物の選定を行った。

(3) トランスクリプトーム解析結果とメタボローム解析結果との統合

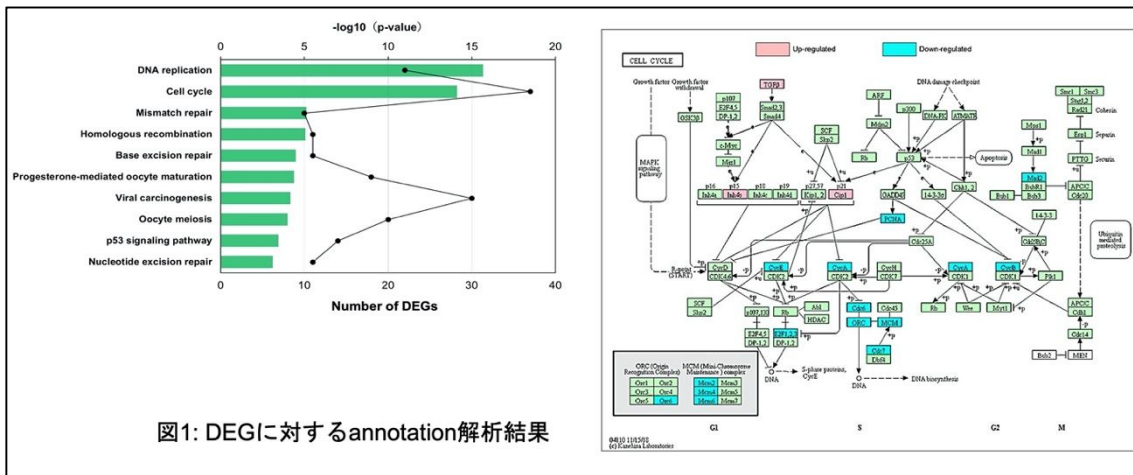
次世代シーケンスデータによる mRNA 定量的発現解析結果とメタボローム解析による酵素の基質および代謝物の定量結果を照合した。主に -グルタミン回路における遺伝子及び代謝産物の変

動を解析し、変動分子に対して細胞増殖抑制への関与について検証を行った。

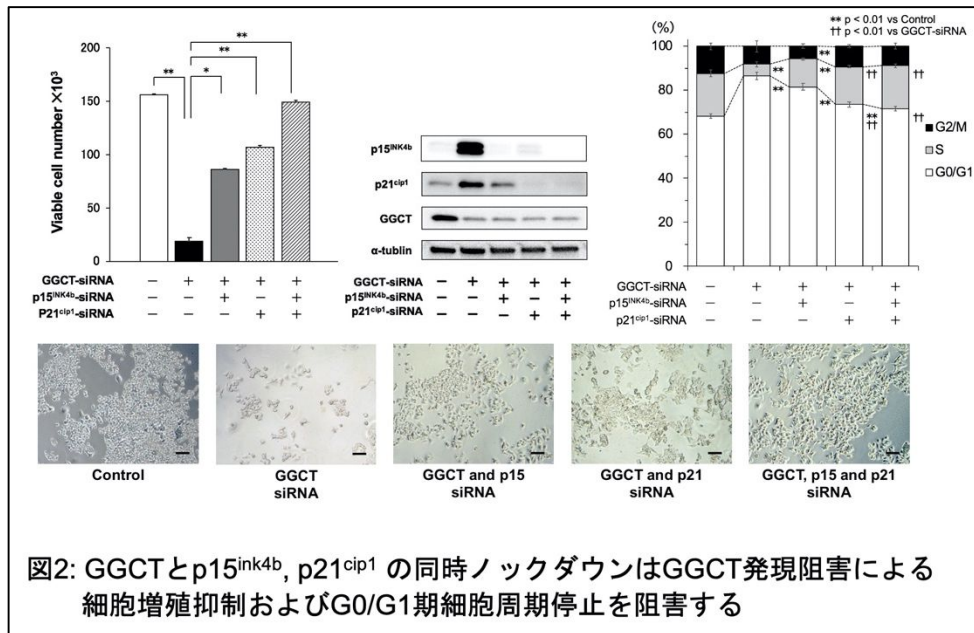
4. 研究成果

(1) 乳癌由来 MCF-7 を用いた全トランスクリプトーム解析

トランスクリプトーム解析の結果、GGCT ノックダウン細胞において、1235 個 (up-regulated 661 個, down-regulated 574 個) の発現差遺伝子 (DEG) を同定した。DEG に対する Pathway 解析の結果、DEG の多くは DNA 複製及び細胞周期に関与する遺伝子であった。細胞周期関連遺伝子群の変動に着目すると、2 つの CDK inhibitor ($p15^{ink4b}$, $p21^{cip1}$) の発現亢進と、その downstream である G1/S 細胞周期関連遺伝子の有意な変動が明らかになった (図 1)。



GGCT と $p15^{ink4b}$, $p21^{cip1}$ の同時ノックダウンを行ったところ、GGCT 発現阻害による細胞増殖抑制および G0/G1 期細胞周期停止が回復し (図 2), 2 つの CDK inhibitor は共に GGCT 発現阻害時の細胞増殖抑制に関与していることが示唆された。



$p15^{ink4b}$, $p21^{cip1}$ の誘導を惹起する細胞内カスケードとして、cell cycle (図 1) における CDK inhibitor の upstream である TGF- β -SMAD axis に着目し、qPCR による発現解析および RNAi による検証実験を行った。 $TGFB2$ および $SMAD3$ の発現は GGCT 発現阻害により、早期に upregulation し (図 3), GGCT と $TGFB2$, $SMAD3$ の同時ノックダウンにより細胞増殖抑制が回復した (図 4)。また、 $TGFB2$ の発現阻害により $SMAD3$ の蛋白およびリン酸化レベルの発現量の低下を認め $p15^{ink4b}$ および $p21^{cip1}$ の発現も低下した。また、 $SMAD3$ の発現阻害においても同様に $SMAD3$ の蛋白およびリン酸化の阻害程度に応じ $p15^{ink4b}$ および $p21^{cip1}$ の発現が制御された (図 4)。以上より、GGCT 発現阻害による細胞増殖抑制は、TGF- β -SMAD signaling pathway の活性化を介した CDK inhibitor の誘導が G0/G1 期細胞周期停止を惹起することで生じていることが示唆された。

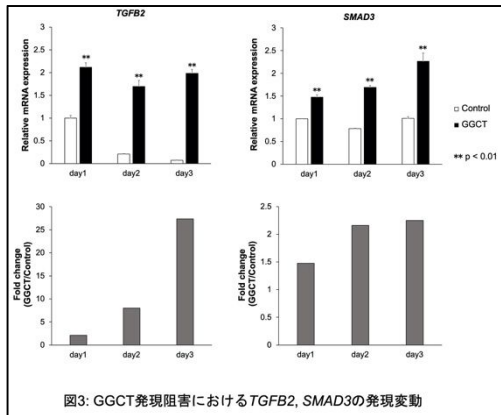


図3: GGCT発現阻害におけるTGFB2, SMAD3の発現変動

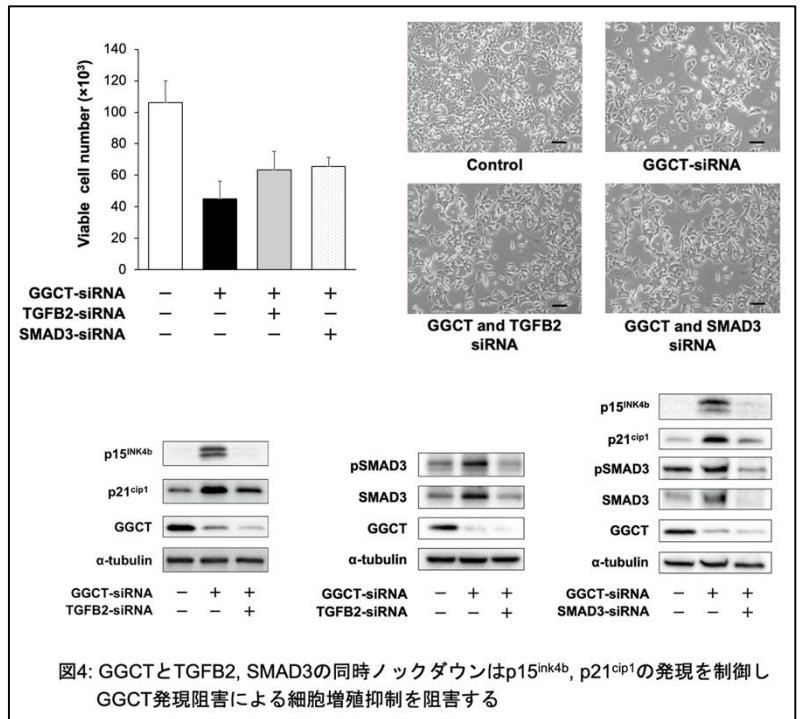


図4: GGCTとTGFB2, SMAD3の同時ノックダウンはp15^{ink4b}, p21^{cip1}の発現を制御しGGCT発現阻害による細胞増殖抑制を阻害する

(2) 乳癌由来 MCF-7 を用いたメタボローム解析

メタボローム解析の結果, 種々の代謝産物の変動を確認した(図5左). GGCT 発現阻害による経時的な変動が大きかった代謝産物を探索した結果, グルタチオン(GSH)を含む種々の代謝産物の著明な変動が明らかになった.

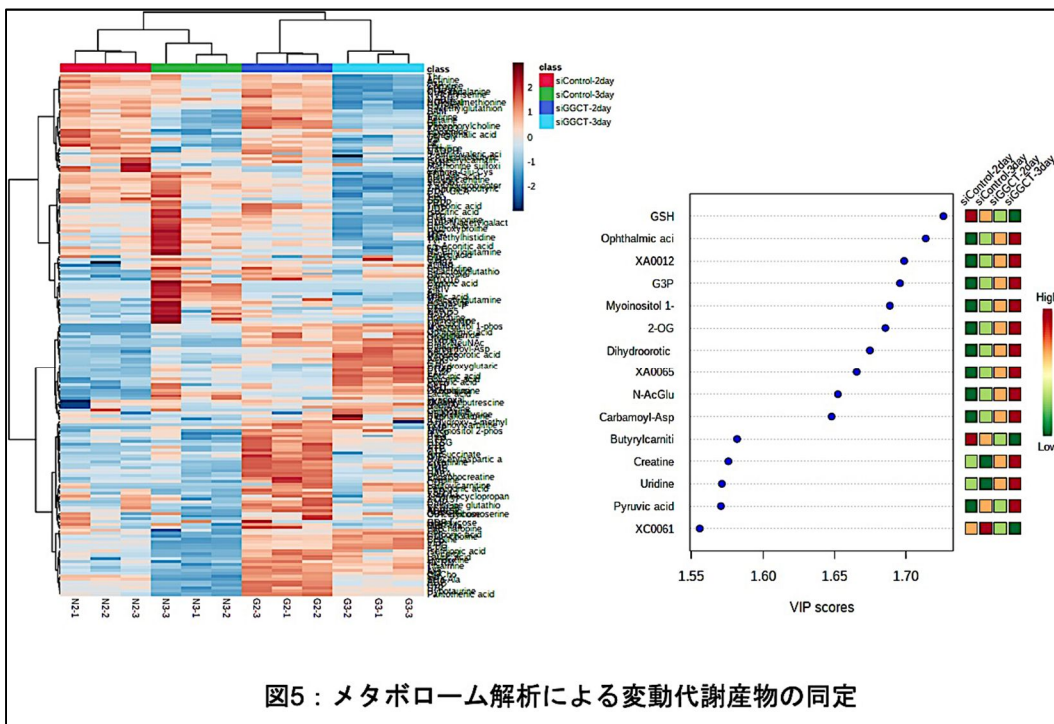
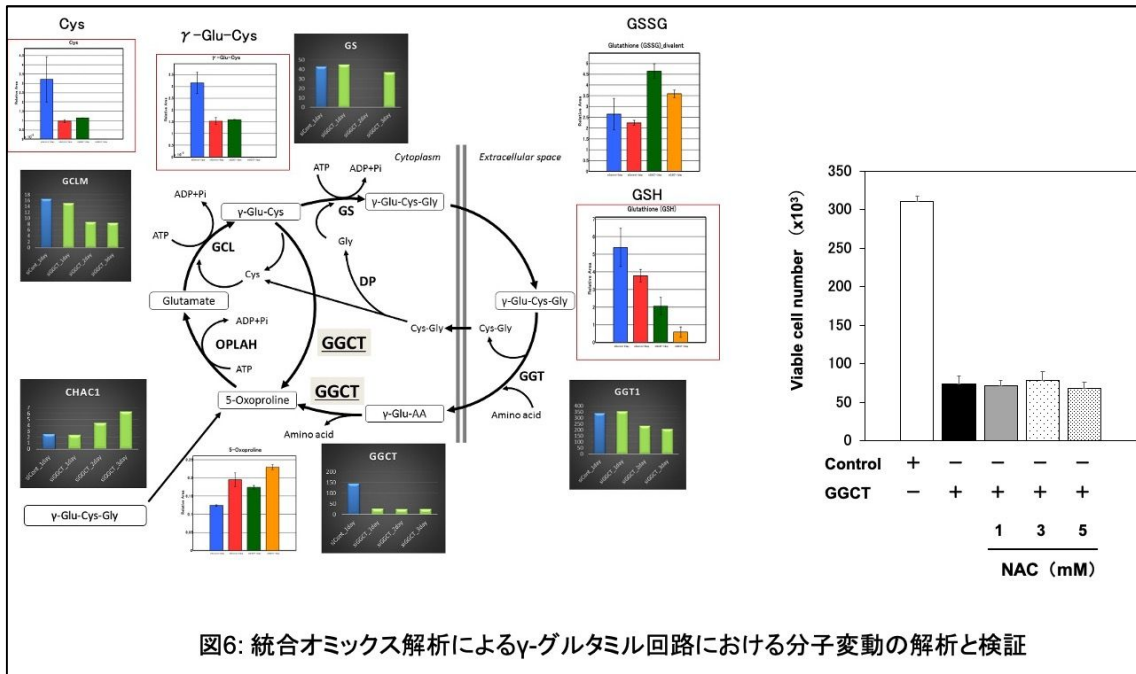


図5: メタボローム解析による変動代謝産物の同定

(3) トランスクリプトーム解析結果とメタボローム解析結果との統合

(1)におけるシーケンスデータと(2)で得られた代謝産物に関する網羅的解析データを統合した。(2)において, GGCT 発現阻害により GSH の著明な変動が確認されたことから, GSH 合成経路である -グルタミル回路に着目し, その分子変動を統合的に解析した. -グルタミル回路において, GGCT を含む酵素群をコードする遺伝子(黒背景)およびその代謝産物(白背景)を mapping した(図6左). この回路の中心代謝産物である GSH に加え, その基質となる Cys, -Glu-Cys の著明な減少を認め, これらアミノ酸代謝異常, もしくは GSH 減少に伴う酸化ストレスなどが GGCT 発現阻害における細胞増殖抑制に関与する可能性を示唆した. GSH の基質である Cys の前駆体である N-acetyl-L-cysteine(NAC)を添加し, 細胞増殖抑制が rescue されるか検討したが, 添加による明らかな影響は認めなかった(図6右).



以上より、トランスクリプトーム解析により、GGCT 発現阻害による TGF- β /SMAD axis を介した CDK inhibitor の誘導という抗腫瘍メカニズムの一部を明らかにすることができたが、GGCT 発現阻害と TGF- β 誘導の因果関係に関してはメタボローム解析の結果を統合して検討を進めたものの明らかにすることはできなかった。これらに関しては、実験条件の再検討や他の経路における代謝産物の解析も含めさらに検討を進める必要があると考えられた。また、本研究で解明した機序に関し、他の癌種における細胞株においても検討を行い、類似の遺伝子発現変動プロファイルを示す細胞株を同定した。今後、GGCT 発現阻害による細胞増殖メカニズムを解明し、治療標的として応用するために研究を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	磯野 高敬 (Isono Takahiro) (20176259)	滋賀医科大学・実験実習支援センター・准教授 (14202)	
研究分担者	影山 進 (Kageyama Susumu) (50378452)	滋賀医科大学・医学部・講師 (14202)	
研究分担者	吉田 哲也 (Yoshida Tetsuya) (60510310)	滋賀医科大学・医学部・助教 (14202)	
研究分担者	河内 明宏 (Kawauchi Akihiro) (90240952)	滋賀医科大学・医学部・教授 (14202)	