

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K19573

研究課題名（和文）乳癌幹細胞を標的とした治療法探索のための発光プローブの開発

研究課題名（英文）Development of bioluminescent sensors and their application to breast cancer cells

研究代表者

野田 なつみ（Noda, Natsumi）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・特任研究員

研究者番号：30624358

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、乳癌細胞の浸潤や転移を抑制する治療法を開発することを目的とした。乳癌幹細胞マーカーである接着分子CD44の細胞外ドメインがプロテナーゼによって切断されることで、癌細胞の遊走に与与することが報告されていることに着目し、この切断を光で可視化するセンサーを開発した。開発した発光センサーの切断及び細胞膜局在を確認した。これらの発光センサーにより、乳癌細胞の浸潤を阻害する可能性のある薬剤を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、日本において乳癌は40代女性の癌部位別死亡率1位である。トリプルネガティブ(エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、及びHER2発現陰性)乳癌は、骨や中枢神経系への転移が多く再発率が高いことから、より優れた治療法の開発が急務である。このような有効な治療法が確立できていない難治性癌に対し、癌幹細胞を標的とした治療法を開発し、癌の根治や長期延命を実現したいと考えた。本研究は、乳癌幹細胞マーカーであるCD44を標的とした発光センサーを開発し、乳癌細胞の浸潤を抑制する薬剤を見出すことに成功したことで、乳癌治療の新たな選択肢となる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to develop new therapy for breast cancer. We focused on CD44, a marker for breast cancer stem cells. CD44 undergoes ectodomain cleavage by membrane-associated metalloproteinases in breast cancer cells. Cleavage plays a critical role in cancer cell migration. To explore inhibitors of CD44 ectodomain cleavage, we developed bioluminescent sensors. The sensors revealed that a drug suppressed the invasion of breast cancer cells.

研究分野：乳癌

キーワード：乳癌 CD44 生物発光 ルシフェラーゼ 癌幹細胞 浸潤

1. 研究開始当初の背景

現在、日本において乳癌は40代女性の癌部位別死亡率1位であり、女性の11人に1人が罹患する、生涯罹患する確率が最も高い癌である。5年生存率は90%を超えており、早期発見では予後が良い疾患の一つである一方、ステージIVのそれは30%程度と低いのが現状である。さらに、浸潤性乳癌の10-24%を占めるトリプルネガティブ(エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、及びHER2発現陰性)乳癌は、骨や中枢神経系への転移が多く再発率が高いことから、全生存期間が短く、より優れた治療法の開発が急務である。乳癌細胞の浸潤や転移を抑制する治療法を開発することができれば、難治性の乳癌患者に対する長期延命が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、乳癌細胞の浸潤や転移を抑制する治療法を開発するために、乳癌の幹細胞マーカーである接着分子CD44に着目する。CD44は、その細胞外ドメインがマトリックスメタロプロテイナーゼ等によって切断されることで、癌細胞の遊走と関与することが報告されていることから、この切断を光で可視化するセンサーの開発を目指す。さらに、開発した発光センサーを応用し、CD44の細胞外ドメイン切断阻害剤の探索を行い、癌幹細胞の浸潤や転移の抑制に特異性の高い薬剤を選定する。これにより、難治性乳癌治療への応用が期待できる。

3. 研究の方法

(1) CD44の細胞外ドメイン切断を可視化する発光センサーの開発

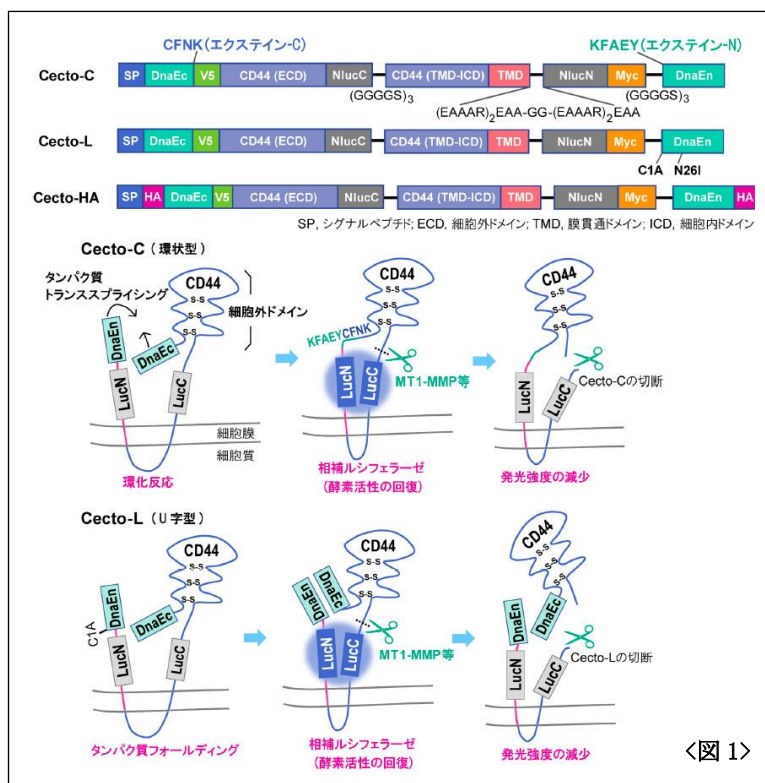
接着分子CD44は主にヒアルロン酸をリガンドとする一回膜貫通タンパク質である。CD44の細胞外ドメインは、膜型マトリックスメタロプロテイナーゼ1(MT1-MMP)やADAM(a disintegrin and metalloprotease)10等によって切断されることが報告されている。本研究では、これらのプロテアーゼがCD44の細胞外ドメインを切断した際に、ルシフェラーゼの発光が消失するベクターを考案した。二分割した深海エビ由来のルシフェラーゼ(NlucN及びNlucC)をCD44のドメイン間及びC末端に融合させ、二回膜貫通タンパク質として発現するベクターを作製した。NlucN及びNlucC断片は、その接近によりNlucの再構成が生じ、発光する。さらに、CD44融合タンパク質のN末端とC末端を結合させて環状化するために、インティンであるDnaEnとDnaEcを両末端に融合した。このインティンは、両末端が接近するとタンパク質のスプライシングが生じ、残った二つのエクステインがペプチド結合を生じることで、センサーを環状化できる。この環状化発光センサーはNlucの再構成による発光が予想できる。

(2) CD44発光センサーを用いた薬剤評価

開発したCD44切断発光センサーを乳癌培養細胞株に導入し、CD44細胞外ドメインの切断を阻害する薬剤の評価をルシフェラーゼアッセイによって試みた。

4. 研究成果

CD44の細胞外ドメインの切断を検出するセンサーとして、スプリットルシフェラーゼの2断片をCD44に融合して発現するベクターを作製した(図1)。Cecto-Cは環状型、Cecto-LはU字型の発光センサーであり、Cecto-HAはCecto-Cが実際に環状化していることを確認するために作製された。作製した発光センサーが細胞膜上に局在することを免疫蛍光染色によって確認した。細胞膜透過処理を行った細胞においては、小胞体内においてもセンサーの局在が確認された(図2A, B)。また、これらの発光センサーが環状化されること(図2C)、及び、センサー内のCD44が内在性のCD44と同様に糖鎖修飾されることも確認した(図2D, E)。

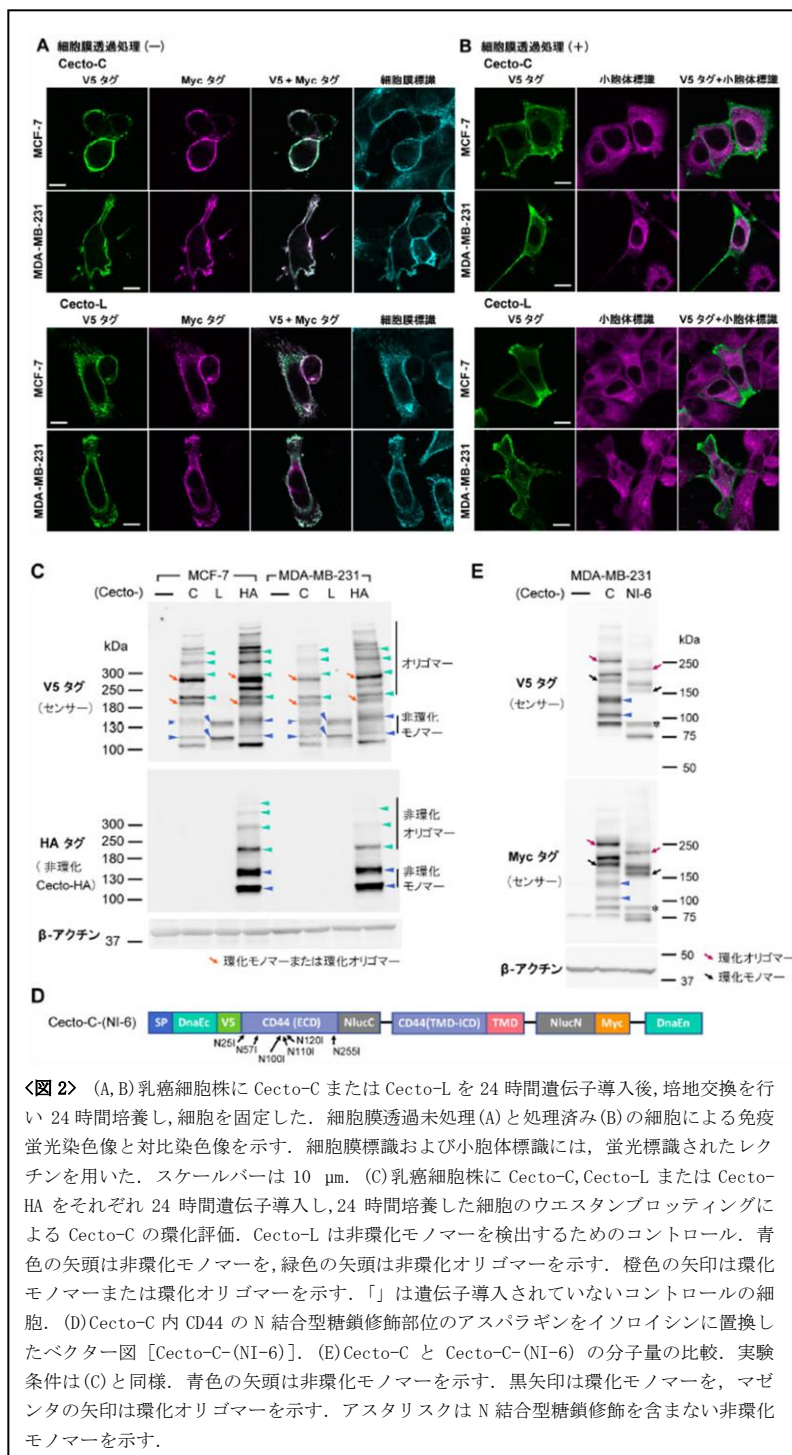


<図1>

Cecto-C および Cecto-L に存在する CD44 の細胞外ドメインが MT1-MMP によって切断されるかどうかを確認するために、MT1-MMP およびその酵素活性を不活化した変異体の強制発現ベクター [MT1-MMP (Mut)] を構築し (図 3A), MT1-MMP の活性による違いを比較した. 乳癌細胞株に Cecto-C または Cecto-L および Mock (空ベクター), MT1-MMP (Mut) または MT1-MMP を同時に遺伝子導入し, 24 時間後と 48 時間後に発光強度を測定した (図 3B, C). いずれの乳癌細胞株においても, Mock と比較して, MT1-MMP と同時に遺伝子導入した Cecto-C および Cecto-L の発光強度は 24 時間後, 48 時間後共に有意に減少した. MCF-7 乳癌細胞株において, MT1-MMP による発光強度の減少は Cecto-L より Cecto-C でわずかに大きかった (図 3B). MDA-MB-231 乳癌細胞株では, MT1-MMP 強制発現下での Cecto-C および Cecto-L の発光強度における変化の差は認められなかった (図 3C). 両細胞株において, Cecto-C と MT1-MMP (Mut) を同時に遺伝子導入した細胞の発光強度は, 24 時間後, 48 時間後ともに MT1-MMP を強制発現した発光強度より有意に高い値を示した (図 3B, C). 一方, Cecto-L での MT1-MMP (Mut) および MT1-MMP 強制発現下での発光強度の比較は, MDA-

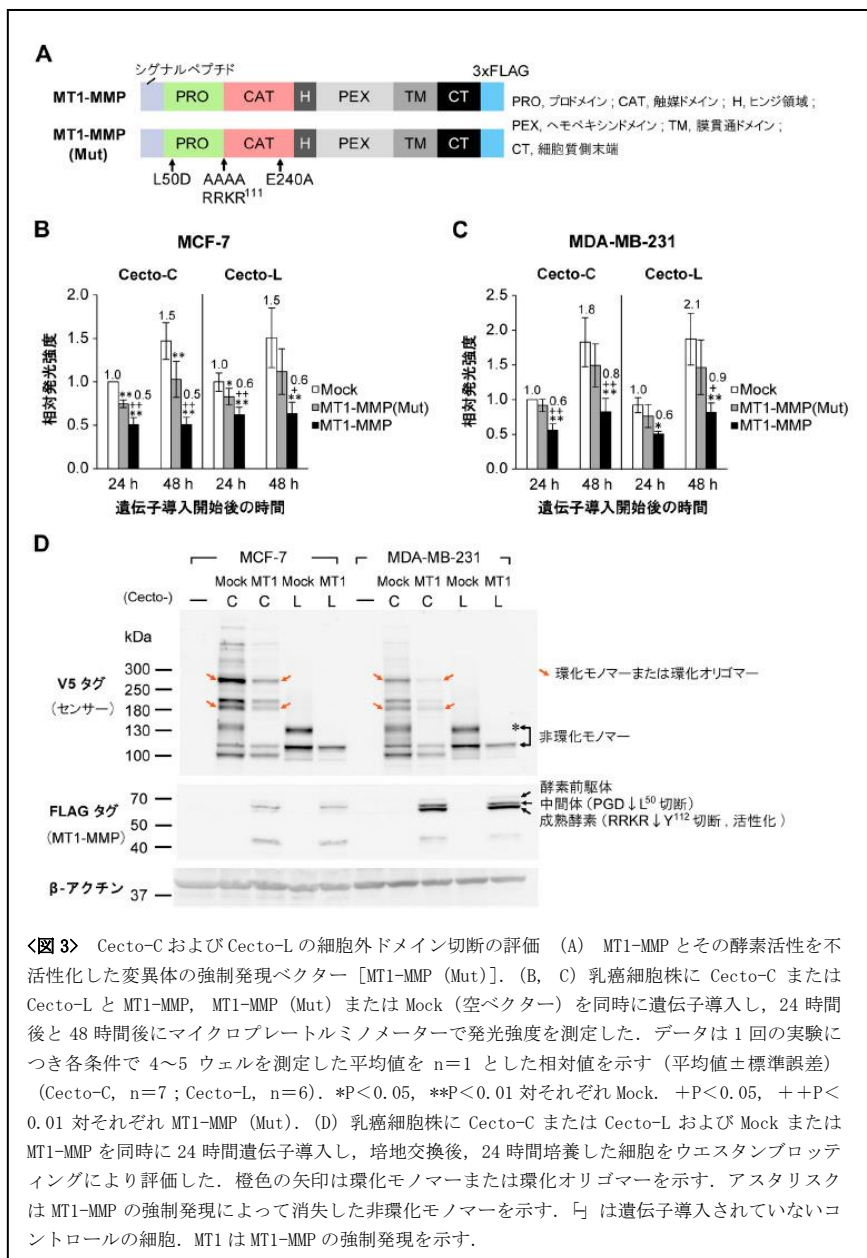
MB-231 細胞株の 24 時間後において発光強度に差が認められなかった点を除き, MT1-MMP (Mut) 強制発現下で高い発光強度を示した (図 3B, C). これらの結果から, Cecto-C および Cecto-L はいずれも MT1-MMP による CD44s 細胞外ドメインの切断が生じて発光強度が減少したことが示唆された. 次に, Cecto-C と Cecto-L の MT1-MMP 強制発現下での発光強度の減少が, センサー内 CD44 細胞外ドメインの切断に起因することをさらに検証するために, 発光測定時と同様の条件下でウエスタンブロッティングを行った (図 3D). MT1-MMP 強制発現下では, 両細胞株において Cecto-C, Cecto-L とともに非環化モノマー 2 本のうち 1 本のバンドが消失し, 検出された 1 本のバンドも Mock コントロール細胞のバンドと比較してその強度が減少した. 環化した Cecto-C においても, MT1-MMP 強制発現下で Mock コントロールよりバンド強度の減少がみられた. これらの結果から, Cecto-C および Cecto-L は強制発現した MT1-MMP により切断され, 発光強度が減少することが示唆された. 以上より, Cecto-C および Cecto-L は, いずれも CD44s の細胞外ドメイン切断を検出する発光センサーとして機能することが確認された.

CD44 の細胞外ドメイン切断阻害剤を探索するために, 糖鎖修飾阻害剤を評価した. その結果, α -グルコシダーゼ阻害剤であるカスタノスペルミン (CS) は, Cecto-C を一過的に遺伝子導入した MDA-MB-231 乳癌細胞株に対して, 40 μ M CS で 24 時間処理すると, 溶媒処理したコントロール群より発光強度が増加した (図 4A). Cecto-C は CD44 の細胞外ドメインの切断によって発



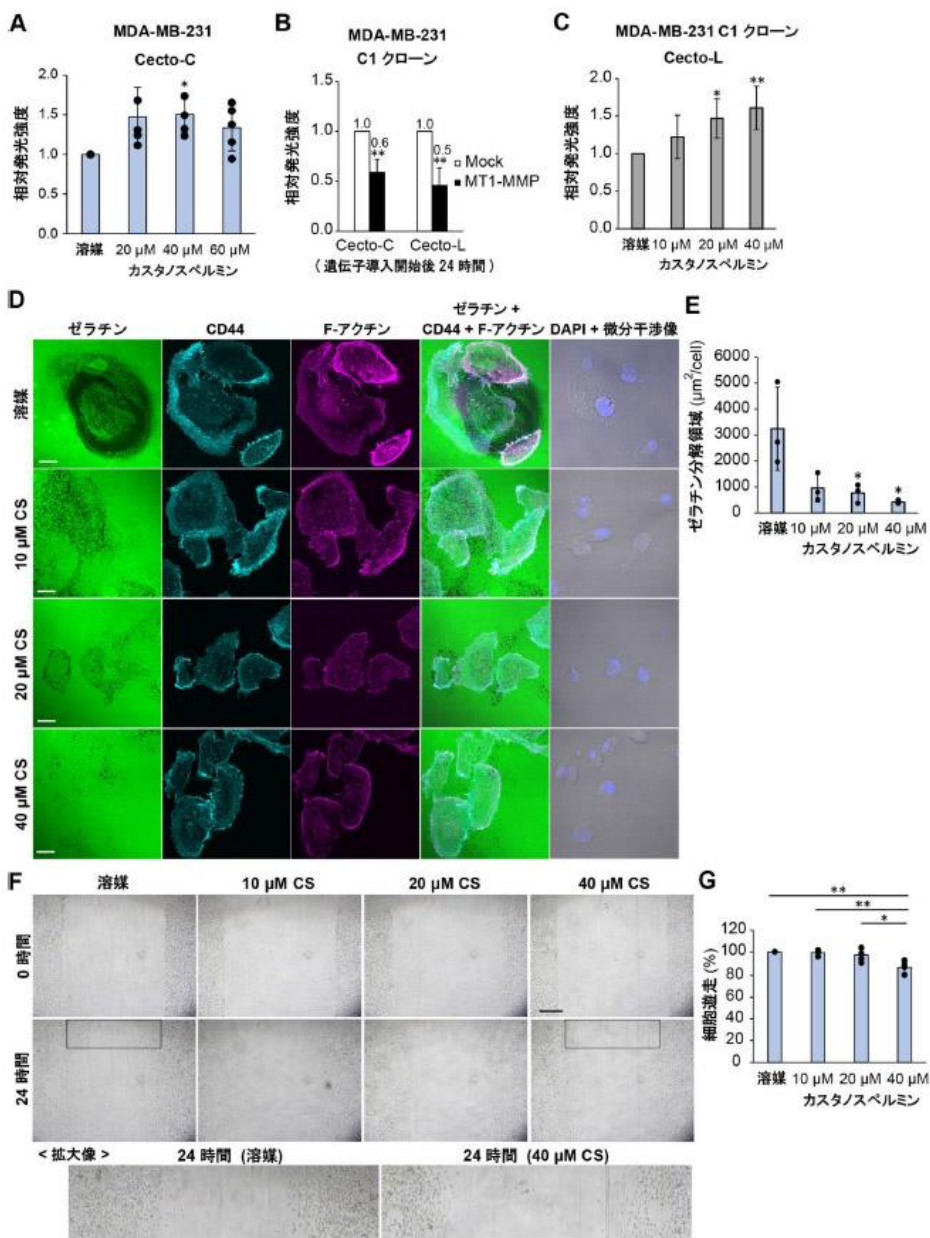
<図 2> (A, B) 乳癌細胞株に Cecto-C または Cecto-L を 24 時間遺伝子導入後, 培地交換を行い 24 時間培養し, 細胞を固定した. 細胞膜透過未処理 (A) と処理済み (B) の細胞による免疫蛍光染色像と対比染色像を示す. 細胞膜標識および小胞体標識には, 蛍光標識されたレクチンを用いた. スケールバーは 10 μ m. (C) 乳癌細胞株に Cecto-C, Cecto-L または Cecto-HA をそれぞれ 24 時間遺伝子導入し, 24 時間培養した細胞のウエスタンブロッティングによる Cecto-C の環化評価. Cecto-L は非環化モノマーを検出するためのコントロール. 青色の矢頭は非環化モノマーを, 緑色の矢頭は非環化オリゴマーを示す. 橙色の矢印は環化モノマーまたは環化オリゴマーを示す. 「」は遺伝子導入されていないコントロールの細胞. (D) Cecto-C 内 CD44 の N 結合型糖鎖修飾部位のアスパラギンをイソロイシンに置換したベクター図 [Cecto-C (NI-6)]. (E) Cecto-C と Cecto-C (NI-6) の分子量の比較. 実験条件は (C) と同様. 青色の矢頭は非環化モノマーを示す. 黒矢印は環化モノマーを, マゼンタの矢印は環化オリゴマーを示す. アスタリスクは N 結合型糖鎖修飾を含まない非環化モノマーを示す.

光強度が減少することから、CS 処理によって内在性のメタロプロテナーゼによるその切断が阻害されたことを示唆している。CS によるこの阻害効果が乳癌細胞株の浸潤性に与える影響を評価するために、浸潤性の高い MDA-MB-231 C1 クローンを使用した。まず、この C1 クローンに Cecto-C または Cecto-L および Mock または MT1-MMP を同時に遺伝子導入し、強制発現された MT1-MMP による CD44 の細胞外ドメイン切断の有無を評価した(図 4B)。遺伝子導入から 24 時間後の発光強度測定では、Cecto-C、Cecto-L とともに MT1-MMP との共発現によって有意な発光強度の減少を認めた。それぞれ Mock コントロールと比較して、Cecto-L では Cecto-C よりわずかながら発光強度の減少が大きかったため、C1 クローンでは



〈図 3〉 Cecto-C および Cecto-L の細胞外ドメイン切断の評価 (A) MT1-MMP とその酵素活性を不活性化した変異体の強制発現ベクター [MT1-MMP (Mut)]. (B, C) 乳癌細胞株に Cecto-C または Cecto-L と MT1-MMP, MT1-MMP (Mut) または Mock (空ベクター) を同時に遺伝子導入し、24 時間後と 48 時間後にマイクロプレートルミノメーターで発光強度を測定した。データは 1 回の実験につき各条件で 4~5 ウェルを測定した平均値を n=1 とした相対値を示す (平均値±標準誤差) (Cecto-C, n=7; Cecto-L, n=6). *P<0.05, **P<0.01 対それぞれ Mock. +P<0.05, ++P<0.01 対それぞれ MT1-MMP (Mut). (D) 乳癌細胞株に Cecto-C または Cecto-L および Mock または MT1-MMP を同時に 24 時間遺伝子導入し、培地交換後、24 時間培養した細胞をウエスタンブロッティングにより評価した。橙色の矢印は環化モノマーまたは環化オリゴマーを示す。アスタリスクは MT1-MMP の強制発現によって消失した非環化モノマーを示す。□ は遺伝子導入されていないコントロールの細胞。MT1 は MT1-MMP の強制発現を示す。

Cecto-L を以降の実験に用いることとした。C1 クローンに Cecto-L を 24 時間遺伝子導入した後、CS で 24 時間処理し、発光強度を測定した(図 4C)。20 μM および 40 μM の CS で処理した細胞群では、溶媒で処理したコントロール群と比較して有意な発光強度の上昇が認められた。この結果から、浸潤性の高い乳癌細胞株においても、CS が CD44 の細胞外ドメインの切断を抑制する可能性が示唆された。次に、CS が C1 クローンの浸潤能に影響するかどうかを評価するために、ゼラチン分解アッセイを行った。蛍光ゼラチン上の C1 クローンを CS 含有培地にて 24 時間培養し、細胞固定した後に免疫蛍光染色および対比染色を行った(図 4D)。その結果、20 μM および 40 μM の CS 処理群は、溶媒で処理したコントロール群と比較して有意な分解面積の減少を示した(図 4E)。さらに、CS が細胞遊走に与える影響を C1 クローンにて評価するために、スクラッチアッセイを行った(図 4F)。C1 クローンを CS 含有培地で 24 時間培養した後、細胞を引っかかり、培地でリンスして浮遊した細胞を除去した。再度 CS 含有培地に交換して細胞を 24 時間培養し、細胞遊走を評価した。40 μM の CS 処理群はその他の実験群およびコントロール群と比較して、有意な細胞遊走の減少を示したが、数値としての減少はわずかであった(図 4G)。これらの結果から、CS は内在性のメタロプロテナーゼによる CD44 の細胞外ドメインの切断を抑制することで、乳癌細胞株の浸潤を抑制し、わずかではあるが細胞遊走を抑制する可能性が示唆された。以上の結果から、Cecto-C および Cecto-L は CD44 細胞外ドメインの切断を阻害する薬剤評価のツールとして有用なツールとなることが示された。



〈図 4〉 カスターノスペルミン (CS) による Cecto-C, Cecto-L の細胞外ドメイン切断抑制および乳癌細胞の浸潤阻害 (A) MDA-MB-231 乳癌細胞株に Cecto-C を 24 時間遺伝子導入した後, CS で 24 時間処理した細胞の発光強度. データは 1 回の実験につき各条件 4 ウェルで測定した平均値を $n=1$ とした相対値 ($n=5$) (平均値 \pm 標準誤差). ドットはそれぞれ 1 回の実験の平均値. * $P<0.05$ 対溶媒. (B) MDA-MB-231 C1 クローンに Cecto-C または Cecto-L と Mock または MT1-MMP を同時に遺伝子導入した 24 時間後の発光強度. データは 1 回の実験につき各条件 4 ウェルで測定した平均値を $n=1$ とした相対値 ($n=5$) (平均値 \pm 標準誤差). ** $P<0.01$ 対 Mock. (C) MDA-MB-231 C1 クローンに Cecto-L を 24 時間遺伝子導入した後, CS で 24 時間処理した細胞の発光強度. データは 1 回の実験につき各条件 4 ウェルで測定した平均値を $n=1$ とした相対値 (平均値 \pm 標準誤差). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 対溶媒. (D) MDA-MB-231 C1 クローンを蛍光ゼラチン上で CS または溶媒含有培地にて 24 時間培養した. 細胞固定後, 免疫蛍光染色および蛍光ファロイジンと 4',6'-ジアミジノ-2-フェニルインドール (4',6'-diamidino-2-phenylindole : DAPI) を用いて F-アクチンと DNA を標識し, 共焦点レーザー走査型顕微鏡により撮影した. スケールバーは 20 μm . (E) (D) のゼラチン分解領域の ImageJ Fiji による測定値. ドットは 1 回の実験で測定した平均値を $n=1$ とした $n=3$ のデータを示す (平均値 \pm 標準誤差) (測定した全細胞数; 溶媒: 334, 10 μM CS: 369, 20 μM CS: 408, 40 μM CS: 381). * $P<0.05$ 対溶媒. (F) MDA-MB-231 C1 クローンを 24 時間培養し, CS 含有培地に置換した. 24 時間後, 細胞をスクラッチリリースした後, 再度 CS 含有培地に置換し, 24 時間培養した. 時間はスクラッチ直後を 0 時間として示す. スケールバーは 0.5 mm. 拡大像は四角で囲まれた領域を示す. (G) (F) の細胞が存在しない領域の定量による細胞遊走の割合を示す. データは 1 回の実験につき各条件 3 ウェルで測定した平均値を $n=1$ とした相対値 ($n=4$) (平均値 \pm 標準誤差). * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 野田 なつみ、小澤 岳昌	4. 巻 95
2. 論文標題 CD44細胞外ドメインの切断を検出する生物発光センサーの開発と乳がん細胞への応用	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 104 ~ 112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 野田 なつみ、小澤 岳昌	4. 巻 95
2. 論文標題 スプリットルシフェラーゼアッセイ (用語解説)	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Noda Natsumi、Ozawa Takeaki	4. 巻 135
2. 論文標題 Castanospermine suppresses CD44 ectodomain cleavage as revealed by transmembrane bioluminescent sensors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs259314
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.259314	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Natsumi Noda, Tetsuya Ishimoto, Hisashi Mori, and Takeaki Ozawa	4. 巻 18
2. 論文標題 Enhanced bioluminescent sensor for longitudinal detection of CREB activation in living cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 2740-2747
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/c9pp00249a.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Natsumi Noda and Takeaki Ozawa	4. 巻 94
2. 論文標題 Light-controllable Transcription System by Nucleocytoplasmic Shuttling of a Truncated Phytochrome B	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Photochemistry and Photobiology	6. 最初と最後の頁 1071 ~ 1076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/php.12955	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野田なつみ、小澤岳昌
2. 発表標題 乳癌細胞におけるCD44s細胞外ドメイン切断を検出する生物発光センサー
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野田なつみ、小澤岳昌
2. 発表標題 CREB活性化を検出する生物発光プローブを用いた1細胞イメージング
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------