

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07658

研究課題名(和文) TGF- 関連分子によるがん幹細胞様特性獲得を介した腫瘍形成機構の解明

研究課題名(英文) Role of TGF-beta related molecules in tumorigenesis through cancer stemness induction

研究代表者

沖田 結花里 (Okita, Yukari)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30743710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、がんの根治を妨げる原因と考えられているがん幹細胞におけるTGF- 関連分子(Mafk、GPNMB)の役割を解明することを目的とした。膜糖タンパク質であるGPNMBは、様々ながんでの発現亢進が知られており、私たちは乳がん細胞において、がん幹細胞様性質の誘導に関与していることを示した。GPNMBの細胞内領域に存在するセリン残基がリン酸化を受けることを明らかにし、リン酸化を受けない変異体では、腫瘍形成、スフェア形成、細胞運動、幹細胞マーカー遺伝子の発現が抑制されることを明らかにした。また乳がんだけでなく、咽頭がん細胞においても腫瘍形成に重要な役割を果たしていることを発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題によりGPNMBにはリン酸化を受けるセリン残基が存在することが明らかになった。このセリン残基のリン酸化は、GPNMBによる腫瘍形成、細胞運動能、幹細胞マーカー遺伝子の発現に重要な役割を果たすことを示した。この研究成果をもとにGPNMBを標的とした新規がん治療薬の開発につながれば、その意義は学術的にも社会的にも大きい。また喉頭がん細胞においてもGPNMBが腫瘍形成能に関与していることを示すことができた。咽頭がんは現在のところ分子標的治療薬がなく、その開発が望まれているため、本研究の成果が分子標的治療薬の開発につながれば、その意義は学術的にも社会的にも大きい。

研究成果の概要(英文)：Cancer tissue is recognized as heterogeneous, and it contains a small proportion of cancer stem cells (CSCs), which is thought to be the root cause of cancer metastasis and relapse. Glycoprotein NMB (GPNMB) is a transmembrane protein, which highly expressed in many types of cancers. Previously we showed that GPNMB induces CSC-like properties in breast cancer cells. In this study, we identified the important serine residue which is phosphorylated in the intracellular domain for its tumorigenic potential. Inducing point mutation in this serine resulted in reduction of tumor and sphere growth, cell migration, and CSC-related genes' expression. Furthermore, we reported the critical role of GPNMB in laryngeal squamous cell carcinoma tumorigenesis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：TGF- がん幹細胞 腫瘍形成 スフェア形成 細胞運動

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がん幹細胞は、正常な組織中にある幹細胞と同様、腫瘍中に数%しか存在しないと考えられている。がん幹細胞の多くは増殖が停止している休眠期状態にあるされており、増殖速度も遅いが、抗がん剤や放射線などの治療に対して抵抗性が高く、転移や再発の原因になると考えられている。そのためがんの完治には、がん幹細胞の根絶が必要である。

(2) 1970~80年代に多くのがん遺伝子は、軟寒天コロニー形成実験によって、足場非依存的な増殖能を指標として発見されてきた。また軟寒天コロニー形成に重要な液性因子として、Transforming growth factor- $\alpha$  と - $\beta$  (TGF- $\alpha$  と TGF- $\beta$ ) が1981年に同定された。研究代表者の研究対象である TGF- $\beta$  は、機能が多岐にわたっており、がん治療において TGF- $\beta$  そのものを標的とすることは副作用の面からも難しい。

(3) 研究代表者が TGF- $\beta$  の標的遺伝子として同定した musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K (MafK) (Okita et al, J Biol Chem, 2013) および MafK によって発現増加が認められる膜糖タンパク質である Glycoprotein nmb (GPNMB) は、腫瘍形成さらには浸潤・転移に關与する上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) を引き起こすことを報告した (Okita et al, Sci Signal, 2017)。EMT は浸潤・転移だけでなく、がん幹細胞様特性の獲得にも關与していると考えられており、GPNMB が増殖の停止した一部のがん細胞でのみ細胞表面に局在し、がん幹細胞様特性を誘導していることを明らかにした (Chen et al, Cancer Res, 2018)。

### 2. 研究の目的

本研究課題では、TGF- $\beta$  関連分子 (MafK および GPNMB) に着目し、がん幹細胞様特性の誘導機構および腫瘍形成機構を明らかにすることを目的とし、以下のような研究計画を立案した。

(1) MafK および GPNMB が腫瘍形成能および EMT を誘導することはすでに発表しているが、その機序については不明な点が残されている。そこで、MafK および GPNMB の機能をより詳細に検討するために、いくつかの変異体を作製し、MafK および GPNMB の機能に与える影響について検討することとした。

(2) これまで主に乳がんモデルを用いて MafK および GPNMB が腫瘍形成およびがん幹細胞様特性誘導における働きについて解析を行ってきた。特に GPNMB はさまざまながんでの発現亢進が報告されており、乳がん以外のがんでの働きについても調べることにした。

(3) 2次元の培養システムと個体を用いた実験とのギャップを埋めるために、3次元での細胞培養法が注目されている。研究代表者はより効率的な3次元培養法を見つけることにより、安定的にがん幹細胞を濃縮する方法を確立できないかと考え、検討することとした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞株および細胞培養

ヒト乳がん細胞株 (Hs-578T, MDA-MB-231, MDA-MB-157)、GPNMB (WT 野生型)、GPNMB (SA 変異体) を恒常的に発現させた NMuMG 細胞株、ヒト喉頭がん細胞株 (UMSCC-10A, UMSCC-10B, UMSCC-11A, UMSCC-11B, UMSCC-12, UMSCC-13, UMSCC-25)、ヒトすい臓がん細胞株 (Sui67, Sui72) を用いた。通常2次元単層培養には、10%ウシ血清、1%ペニシリン・ストレプトマイシンを添加した DMEM 培地を用い、37℃、5%CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。ただし、Hs578T 細胞は 5  $\mu$ g/mL インスリン、NMuMG GPNMB 恒常発現細胞は 1  $\mu$ g/mL ピューロマイシンをそれぞれ添加した培地を用いた。

3次元スフェア培養は、DMEM と F-12 混合培地に 2%B-27、20 ng/mL EGF および 20 ng/mL b-FGF を添加した培地を用い、低接着培養皿を用いて浮遊状態にて培養した。この場合も Hs578T 細胞用には 5  $\mu$ g/mL インスリンを加えた培地を用いた。ポリビニルアルコール (PVA) を添加する実験では、DMEM と F-12 混合培地に 20 ng/mL EGF および 20 ng/mL b-FGF を添加した培地を用い、B-27 の濃度を 0.2% または 0.02% と低くし、0.1% の PVA を加えた。

PVF を用いた培養では、親水処理を施した PVF リジンと細胞溶解液を混ぜ、遠心することにより、細胞を固定化させた。培地は、DMEM と F-12 混合培地に 2%B-27、20 ng/mL EGF および 20 ng/mL b-FGF を添加した培地を用いた。

#### (2) RNA 抽出および定量的 RT-PCR (qPCR)

Total RNA は ISOGEN II を用いて抽出した。High Capacity RNA-to-cDNA Kit を用いて、total RNA 1  $\mu$ g を逆転写して cDNA を合成後、GeneAmp SYBR qPCR Mix  $\alpha$  Low ROX 試薬を用い、定量的 RT-PCR 法により mRNA 発現量を調べ、 $\beta$ -actin の発現量により補正した。

#### (3) 蛍光免疫染色

パラフィン包埋された腫瘍組織をキシレンで脱パラフィン後、アルコールで親水処理を施し、クエン酸バッファー中で 121℃、20分オートクレーブを行った。フロッキング処理後、1次抗体: 抗 GPNMB、抗 Ki-67 抗体、蛍光標識された2次抗体: Alexa 488 anti-goat IgG、Alexa 546

anti-rabbit IgG を用いて染色を行った。

#### (4) 動物実験

Balb/c ノードマウスの皮下に細胞を移植し、移植片の増殖を調べた。腫瘍の大きさは、長径×短径 2×0.5 により計算した。移植腫瘍の継時的な観察を行い、体重の減少が認められる場合もしくは移植腫瘍サイズが体重の 10%に達する前に安楽死させた。

#### 4. 研究成果

得られた研究成果のうち、次の研究項目の成果について報告する。

- (1) GPNMB の翻訳後修飾がその機能に与える影響についての解析
- (2) 喉頭がん細胞における GPNMB の機能解析
- (3) がん幹細胞の大量培養法の開発

##### (1) GPNMB のセリンリン酸化は GPNMB による腫瘍形成能に重要である

GPNMB の細胞内領域にあるセリン残基 (ヒトの GPNMB アイソフォーム b では 546 番目、マウスの GPNMB では 530 番目) が翻訳後修飾の 1 つであるリン酸化を受けることを質量分析法により明らかにした。そこで、セリン (S) をアラニン (A) に置換した変異体 GPNMB(SA) を作製し、リン酸化が起こりにくくなっていることを確認後、マウスの乳腺上皮細胞である NMuMG 細胞より、野生型の GPNMB(WT) および GPNMB(SA) 恒常発現細胞株を樹立した。

これら樹立した細胞株を用いて、腫瘍形成、スフェア形成、細胞運動性、EMT 誘導、またがん幹細胞関連遺伝子や EMT 関連転写因子の発現への影響について検討した。すると、GPNMB(SA) 発現細胞では、GPNMB(WT) 発現細胞に比べて、腫瘍形成能、スフェア形成能が有意に低下していた。がん幹細胞関連遺伝子として、*Sox2*、*Nanog*、*Oct4*、*Cd44* の遺伝子発現解析を行うと、GPNMB(WT) 発現細胞をスフェア培養 (3D 培養) することでこれらの遺伝子の発現亢進が認められるが、GPNMB(SA) 発現細胞ではその亢進がみられなかった。

またトランスウェルを用いた検討により、細胞の運動性も有意に低下することが明らかとなった。GPNMB(WT) によってみられる EMT 誘導についても検討を行うと、GPNMB(SA) 発現細胞では EMT マーカーである E-cadherin の発現低下が認められず、加えて EMT 関連転写因子である *Snail*、*Slug*、*Zeb1* の発現が低いことが明らかになった。これらのことより、GPNMB による腫瘍形成能や EMT 誘導には、セリン残基のリン酸化が重要であることが示された。

##### (2) GPNMB は喉頭がんにおいて腫瘍形成に関与する

喉頭がんは、頭頸部がんの中で発生頻度が高く、早期診断が難しくまた有効な分子標的治療薬がないことが課題とされている。研究代表者はこれまで主に乳がんモデルを用いて GPNMB の腫瘍形成への影響について検討してきたが、喉頭がんにおいても GPNMB が腫瘍形成に関与しているのか否かについて検討することとした。まずパブリックデータベースを用いて頭頸部がんにおける GPNMB の発現とがんの進行度 (病期)、悪性度、また予後との相関について検討した。GPNMB は正常組織に比べてがん組織で発現が有意に亢進しており、がんの進行度および悪性度が上がるにつれて発現がより高くなることが明らかになった。しかしながら、GPNMB の発現は全生存期間に有意な差は認められなかった。

次に 7 種類の喉頭がん細胞株 (UMSCC-10A、-10B、-11A、-11B、-12、-13、-25) を用いて GPNMB の発現を調べた。その結果、いくつかの細胞株で GPNMB の発現が確認され、発現の比較的高かった UMSCC-11A および UMSCC-11B 細胞を用いて GPNMB をノックダウンした細胞株を樹立した。GPNMB をノックダウンすることにより、2 次元での細胞増殖、3 次元でのスフェア形成が抑制されることが明らかになった。さらに GPNMB ノックダウン細胞株を免疫不全マウスに移植し腫瘍形成能についても検討し、GPNMB ノックダウン細胞株では腫瘍サイズが減少するという結果を得た。

またヒト喉頭がん組織の蛍光免疫染色により、GPNMB 陽性細胞では、増殖マーカーである Ki-67 の発現が認められず、反対に GPNMB 陰性細胞において Ki-67 の発現が認められた。これらの結果から、GPNMB は喉頭がんの腫瘍形成に重要であることが示され、喉頭がん組織において GPNMB 陽性細胞は、増殖の停止した Ki-67 陰性細胞であることから、増殖の停止したがん幹細胞様の細胞であることが示唆された。

##### (3) がん細胞を 3 次元的に長期間培養し、がん幹細胞を濃縮する方法の模索

研究代表者はこれまでに、がん細胞を 3 次元のスフェア培養もしくはマウス個体での腫瘍形成で得られたスフェアおよび腫瘍では、増殖の盛んな細胞と増殖の停止した細胞といった異なる性質を持った細胞が不均一な細胞集団を形成することを見出した。3 次元培養はがん幹細胞を濃縮する方法としても知られており、研究代表者らも 3 次元培養によって得られたスフェアを用いて、がん幹細胞マーカー遺伝子の発現解析などを行っている。スフェア培養は簡便な培養方法ではあるが、B-27 サプリメントや EGF や bFGF などのリガンドを必要とし、費用がかかる。また長期培養には向かないといった特徴がある。

ポリビニルアルコール (PVA) は、毒性や免疫原性がないと考えられている安価な合成ポリマーで、工業や生物医学などの分野で広く使われている。PVA は ES 細胞の培養や、造血幹細胞の

培養においてアルブミンの代わりに PVA を使用することが報告されている。これらの報告から、スフェア培養に PVA を添加してはどうかと考えた。

研究代表者が用いているスフェア培養の培地に添加している B-27 サプリメントの量を減らすと、スフェア形成が大きく低下してしまうが、B-27 を減らした代わりに PVA を培地に添加することによって、スフェア形成能がある程度維持されることを見出した。

次に PVA をホルムアルデヒドで架橋したポリビニルホルマール (PVF) 上でもがん細胞を培養してみることにした。スフェア培養では長期に細胞を維持することが難しいが、PVF 上で培養した場合には、適宜培養液を交換することにより、30 日まで培養することができた。また細胞同士の接着が弱く、スフェア培養が難しかったがん細胞も PVF 上では細胞塊を作りながら増殖を維持することができた。PVF 上で培養した細胞を回収し、*GPNMB* および *SOX2* の遺伝子発現について検討したところ、PVF 上で培養したことにより、*GPNMB* および *SOX2* の遺伝子発現が亢進しており、がん幹細胞を濃縮する方法として利用可能であると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Manevich L, Okita Y, Okano Y, Sugasawa T, Kawanishi K, Poullikkas T, Dang Cao LTL, Zheng L, Nakayama M, Matsumoto S, Tabuchi K, Kato M	4. 巻 -
2. 論文標題 Glycoprotein NMB promotes tumor formation and malignant progression of laryngeal squamous cell carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15359	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 Wang C, Okita Y, Zheng L, Shinkai Y, Manevich L, Chin JM, Kimura T, Suzuki H, Kumagai Y, Kato M.	4. 巻 112(10)
2. 論文標題 Glycoprotein non-metastatic melanoma protein B functions with growth factor signaling to induce tumorigenesis through its serine phosphorylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4187-4197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15090	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 Okita Y, Zheng L, Kawanishi K, Miyoshi H, Yanagihara K, Kato M	4. 巻 26(5)
2. 論文標題 Polyvinyl alcohol scaffolds and supplementation support 3D and sphere culturing of human cancer cell lines by reducing apoptosis and promoting cellular proliferation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 336-343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12843	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八幡原礼音、沖田結花里、加藤光保
2. 発表標題 薬剤耐性における転写因子MAFKの作用
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤光保、沖田結花里
2. 発表標題 幹細胞性誘導によるがんの持続的増殖機構
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沖田結花里、加藤光保
2. 発表標題 乳がん細胞の幹細胞性獲得におけるGPNMBの作用
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 沖田結花里、陳晨、加藤光保
2. 発表標題 GPNMBによる幹細胞性誘導機構の解明
3. 学会等名 第3回がん三次元培養研究会
4. 発表年 2019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
---------	---------