

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07759

研究課題名(和文)cGAS-STING経路によるがん細胞の維持と転移促進機構の解析

研究課題名(英文)The role of cGAS-STING pathway in cancer maintenance and metastasis

研究代表者

上原 郁野(Uehara, Ikuno)

日本医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号：50434139

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究は、抗がん剤や放射線治療により活性化されるcGAS-STING経路が発がんやがん幹細胞の維持に与するのか、その機構を明らかにすることを目的とした。その結果、cGAS-STING経路の活性化で産生されるIFN- $\gamma$ により、がん細胞の増殖は抑制されるが、がん幹細胞の維持に与するoGlcNAc修飾が促進され、さらにPD-L1の発現が亢進されることを明らかにした。さらに、cGAS-STING経路の活性化で同時に産生される、SASPに与する炎症性サイトカインも、がん幹細胞の維持に与しており、この経路を阻害するSTING阻害剤H-151ががん幹細胞抑制の標的薬になる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの再発・転移を抑制することは、がんの完治をもたらすが、実際に放射線治療や抗がん剤治療を行っても、今のところ再発・転移を抑制することはできない。本研究では、放射線刺激や抗がん剤によるDNA損傷によって活性化される、cGAS-STING経路を介して産生されるIFN- $\gamma$ や炎症性サイトカインが、がん幹細胞の維持やがん転移に与していることがわかり、さらにSTING阻害剤でcGAS-STING経路を抑制することにより、がん幹細胞の生存を下げる結果を見出した。今後、抗がん剤や放射線治療とSTING阻害剤の併用により、がんの転移再発を抑制できる可能性がある点で、非常に意義があると思われる。

研究成果の概要(英文):The purpose of this study was to clarify the mechanism of how the c-GAS-STING pathway, which is activated by anticancer drugs and radiotherapy, is involved in carcinogenesis and cancer stem cell maintenance. We found that IFN- $\gamma$  produced by activation of the cGAS-STING pathway suppresses cancer cell proliferation but promotes oGlcNAc modification, which is involved in cancer stem cell maintenance, and enhances PD-L1 expression. Furthermore, inflammatory cytokines involved in SASP, which are simultaneously produced by activation of the c-GAS-STING pathway, are also involved in the maintenance of cancer stem cells, and the STING inhibitor H-151, which blocks this pathway, was found to be a candidate therapeutic for cancer stem cell suppression.

研究分野：分子生物学

キーワード：cGAS-STING経路 IFN- $\gamma$  sphere がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

I 型インターフェロン(IFN- $\beta$  /  $\gamma$ )は生体内に侵入するウイルス感染にตอบสนองし、その増殖を抑制するために産生される因子である。IFN- $\beta$  /  $\gamma$  は、B 型 C 型肝炎の治療薬として多くの患者に使用され、さらには腫瘍細胞増殖抑制作用の報告もある。しかし、近年ウイルス感染以外の新たな IFN- $\beta$  /  $\gamma$  産生メカニズムとして、細胞質の DNA センサーである cGAS-STING 経路(図1)が、老化や DNA 損傷、染色体不安定性により核から放出されて細胞質に蓄積した二本鎖 DNA を認識して、IFN- $\beta$  /  $\gamma$  や炎症性サイトカインを産生し、細胞老化関連分泌形質(SASP)による慢性炎症と発がんに関わっているとの報告があった。

私自身の研究でも、がん抑制遺伝子 p53 を欠損したマウス線維芽細胞(MEF)やがん細胞が、抗がん剤による DNA 損傷刺激時に野生型より多くの IFN- $\beta$  /  $\gamma$  を産生する事、IFN- $\beta$  /  $\gamma$  受容体である IFNAR1 と p53 の両欠損したマウスでは、腫瘍の発生が遅く、p53 単独欠損マウスと比較して生存期間が長い傾向が見られたことなどを見出しており、IFN- $\beta$  /  $\gamma$  はがん化に何かしらの影響を及ぼしているのではないかと考えられた。

そこで、本来細胞増殖を抑制している IFN- $\beta$  /  $\gamma$  を、p53 欠損細胞やがん細胞が DNA 損傷時に cGAS-STING 経路を介して自ら過剰に産生する意義、cGAS-STING 経路や IFN- $\beta$  /  $\gamma$  が細胞のがん化やがん幹細胞の維持にどのような影響を及ぼしているのかを解明することを、本研究の課題とした。

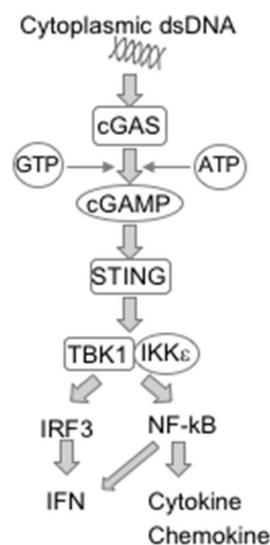


図1 cGAS-STING経路

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、c-GAS-STING 経路の発がん及びがん幹細胞維持への関与機構を明らかにすることにより、抗がん剤や放射線治療によるがん治療時に cGAS-STING 経路の活性化によって起こるべき障害を予測し、今後の治療に役立てることである。さらに、がん細胞の増殖を抑制する IFN- $\beta$  /  $\gamma$  の相反する作用：がん幹細胞の維持・増殖に関与するシグナルを解明することである。抗がん剤や放射線による DNA 損傷時の cGAS-STING 経路の活性化は、二本鎖 DNA 切断後の有糸分裂における細胞周期の進行により、微小核が形成されることに起因すると報告(Nature 548,466-470,2017)されている。よって抗がん剤や放射線で DNA 損傷刺激を与えると、がん細胞自体の増殖は一時的に抑制されるものの、産生した IFN- $\beta$  /  $\gamma$  や SASP によって、がん幹細胞が活性化・増殖し、転移・再発する可能性がある。さらに、肝炎治療目的で IFN- $\beta$  /  $\gamma$  を投与する際、がん幹細胞を増やし、がんの発症を促進する可能性も否定できない。よって、cGAS-STING 経路のがん細胞・がん幹細胞への関与機構を明らかにし、がんの再発を抑制する治療法につなげるのが、この研究の目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) p53 欠損 MEF と野生型 MEF の DNA 損傷刺激時の IFN- $\beta$ / $\gamma$ 産生量の違いの原因を究明。

p53 欠損 MEF に DNA 損傷刺激を与えた際に、野生型と比較して IFN- $\beta$  /  $\gamma$  の産生量が多く、IFN 誘導遺伝子群の発現が高い現象を既に見出している。この理由を解明するとともに、DNA 損傷刺激(抗がん剤による刺激)で、本当に cGAS-STING 経路の影響を受けるのかを、STING 阻害剤 H151 で刺激した実験で確認した。

### (2) p53 欠損 MEF と IFNAR1 と p53 の両欠損 MEF を使用した、IFN- $\beta$ / $\gamma$ の影響を調べる研究

p53 欠損 MEF と IFN- $\beta$  /  $\gamma$  の影響を受けない IFNAR1 と p53 の両欠損 MEF を用いて、STING 阻害剤 H151 で刺激しつつ DNA 損傷刺激を加えることで、その下流で発現誘導される遺伝子の中に、SASP による炎症性サイトカイン群の影響ではなく、IFN- $\beta$  /  $\gamma$  が産生されることにより発現変動が見られる遺伝子群があるかを確認した。さらに、これらの MEF にかん遺伝子 H-ras を恒常的に発現させた細胞を作成し、この細胞を用いてがん幹細胞の指標となる sphere を作らせることにより、sphere 細胞作成時に H151 の有無や IFN- $\beta$  /  $\gamma$  刺激の有無で、どのような影響を受けるのか調べるために、幹細胞マーカーの発現や sphere 形成に必要な遺伝子群の発現を確認した。

### (3) がん細胞での cGAS-STING 経路の影響の検討

DNA 損傷刺激時に IFN- $\beta$  /  $\gamma$  を産生し、sphere 形成能を有する肺がん細胞 HCC827 と、sphere 形成能を有し、IFNAR1 を CRIPR/CAS9 法により欠損させることができた乳がん細胞 MCF-7 について、MEF での実験と同様に、sphere 形成時に H151 や IFN- $\beta$  /  $\gamma$  やで刺激した際の幹細胞マーカーの発現などを調べた。MCF-7 に関しては、マウス IFNAR1 遺伝子(マウス由来の IFN- $\beta$  /  $\gamma$  のみ反応)を恒常発現させた細胞株と CRIPR/CAS9 法で IFNAR1 を欠損させた細胞株を作成し、ヌードマウスに移植して、腫瘍の形成を確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) p53 欠損 MEF の DNA 損傷刺激時の IFN- $\gamma$ / $\beta$ 産生量が多いメカニズムの解明

p53 欠損 MEF は、通常状態でも野生型と比較して、細胞質 DNA(クロマチン由来 DNA だけでなくミトコンドリア DNA も含む)の含有量が多いことが、dsDNA assay の結果で明らかになった。さらに、H151 での STING 阻害やその上流遺伝子 cGAS の knock down(KD)により、抗がん剤 Doxorubicin による DNA 損傷刺激時の TBK1 の活性化や IFN- $\gamma$  /  $\beta$  及びその誘導遺伝子の発現が抑制されることがわかった。よって、p53 欠損 MEF は、p53 由来の DNA 修復機能が失われているために細胞質 DNA 量が多く、cGAS-STING 経路が常に活性化しており、DNA 損傷刺激を与えることによりさらに cGAS-STING 経路の活性化が起き、多量の IFN- $\gamma$  /  $\beta$  の産生が起きていると推測された。

##### (2) がん遺伝子発現 p53 欠損 MEF において、IFN- $\gamma$ / $\beta$ はがん幹細胞の維持に必要である

p53 欠損 MEF で DNA 損傷刺激時に産生される IFN- $\gamma$  /  $\beta$  のがん化に対する機能を調べるために、p53 欠損 MEF 及び IFNAR1 と p53 両欠損 MEF にかん遺伝子 HrasV12 を恒常的に発現させた細胞を作成し、がん化の指標として Transformation assay を行ったところ、p53 欠損 MEF ではコロニーが多数作成されたのに対し、IFNAR1 と p53 両欠損 MEF では作成されたコロニー数の減少していた。さらに、がん幹細胞の指標となる sphere を同じ細胞を用いて形成させたところ、どちらも sphere は形成されたが、IFNAR1 と p53 の両欠損 MEF で形成された sphere のサイズが小さいことがわかった。形成された sphere を回収し、幹細胞マーカー遺伝子などの発現を調べたところ、IFNAR1 と p53 両欠損 MEF では、Isg15 や Ip10 などの IFN 誘導遺伝子群の発現抑制だけでなく、Sox2 や KLF4、Nanog などの幹細胞マーカーの発現が低下していた。さらに、IFNAR1 と p53 両欠損 MEF では、Glucose Transporter である Glut3 の mRNA レベルでの発現が非常に低いことがわかった。我々の研究で、ヒトがん細胞の実験において、がん幹細胞の維持に IL-8 による Glut3 の発現更新を介した oGlcNAc 修飾が関与していることを以前報告しており、これら sphere における oGlcNAc 修飾の有無についても確認したところ、IFNAR1 と p53 両欠損 MEF から形成された sphere は、oGlcNAc transferase (OGT) のタンパク質レベルでの発現が低く、oGlcNAc 修飾が非常に抑制されていることがわかった。以上のことから、IFN- $\gamma$  /  $\beta$  は p53 欠損 MEF において、Glut3 の発現亢進を介して oGlcNAc 修飾を更新し、がん幹細胞の維持に関与していることが示唆された。

さらに、STING 阻害剤 H151 で刺激した HrasV12 発現 p53 欠損 MEF の sphere 形成を行ったところ、IFNAR1/p53 両欠損 MEF 以上に sphere の形成が抑制された。STING の阻害は IFN- $\gamma$  /  $\beta$  の発現抑制だけでなく、SASP に関与する炎症性サイトカインの抑制も起こり、特に IL-6 は sphere の形成促進に関与していることがすでに知られているため、より sphere の形成が抑制されたと考えられた。また、形成された sphere において、IFNAR1 と p53 両欠損 MEF の sphere と同様、oGlcNAc transferase (OGT) のタンパク質レベルでの発現が非常に低く、oGlcNAc 修飾が非常に抑制されていることがわかった。よって STING 阻害剤 H151 は、がん幹細胞形成阻害剤として、がんの再発・転移抑制作用がある可能性が示唆された。

##### (3) がん細胞の cGAS-STING 経路の抑制は、がん幹細胞の発現減少に寄与する

p53 欠損 MEF で見られた現象が、実際のがん細胞でも起こるのかを確認するために、まず DNA 損傷刺激で IFN- $\gamma$  /  $\beta$  を発現更新する肺がん細胞 HCC827 で実験を行った。HCC827 の接着細胞に IFN- $\gamma$  /  $\beta$  で刺激すると、p53 欠損 MEF と同様に IFN- $\gamma$  /  $\beta$  濃度依存的に、Glut3 や IL-6、OGT、IL-8 や GFAT の発現や間葉転換マーカーである Snail や Slug の発現が上昇し、さらに Sox2 のタンパクレベルでの発現も上昇していた。また HCC827 接着細胞に DNA 損傷と H151 の同時刺激を行ったところ、DNA 損傷刺激で活性化された cGAS-STING 経路の TBK1 や IRF-3 の活性化が抑制されただけでなく、同様に DNA 損傷で発現亢進する IFN- $\gamma$  /  $\beta$  や IFN- $\gamma$  /  $\beta$  で誘導される PD-L1 の発現が、H151 との同時刺激により、抑制されていることがわかった。さらに HCC827 の sphere 作成を開始し、3 日目 5 日目 7 日目の sphere を回収して、IFN- $\gamma$  /  $\beta$  の発現を確認したところ、3 日目 5 日目に IFN- $\gamma$  /  $\beta$  の発現が徐々に上昇していることを確認できた。そして、STING 阻害剤 H151 で刺激して sphere を形成させると、sphere の形成が抑制され、さらに p53 欠損 MEF での実験と同様、oGlcNAc transferase (OGT) のタンパク質レベルでの発現が非常に低く、oGlcNAc 修飾が非常に抑制されていることがわかった。HCC827 の IFNAR1 欠損株を作成するために、sgIFNAR1 の手法で欠損株作成を試みたが、HCC827 は single コロニーから細胞を増やすことができなかった。そこで他の sphere を作成できる細胞株として、乳がん細胞 MCF-7 で実験を行った。MCF-7 細胞は、IFN- $\gamma$  /  $\beta$  で刺激後に sphere を形成させると、できる sphere の大きさが大きいことがわかった。さらに MCF-7 の sphere 作成を開始後、3 日目 5 日目には、HCC827 と同様に IFN- $\gamma$  /  $\beta$  の発現が徐々に上昇していることを確認できた。そこで、MCF-7 の sgIFNAR1 により IFNAR1 を欠損させた細胞並びに、人由来の受容体には反応しないマウスの IFN- $\gamma$  /  $\beta$  に対応するマウス IFNAR1(mIFNAR1)を恒常的に発現する細胞を作成し、これらの細胞をヌードマウスに移植して、できる腫瘍の大きさを調べたところ、IFNAR1 欠損細胞ではほとんど腫瘍はできず、マウスの IFNAR1 を発現させた細胞では、コントロール細胞と比較して、より大きい腫瘍ができることを確認した。

以上のことから、cGAS-STING 経路の活性化により、その下流で産生される SASP に関連する炎症性サイトカインや IFN- $\gamma$  /  $\beta$  が発現誘導されることによって、がん細胞は oGlcNAc 修飾を介して Sox2 などの幹細胞マーカー遺伝子群や間葉性マーカー遺伝子群の発現を亢進し、がん幹細胞の維持、その後のがん転移や再発に関与していることが推察された。また、がん細胞が抗がん剤などで DNA 損傷刺激を

与えられた際、自身の細胞増殖を抑制する IFN- $\gamma$  をわざわざ産生する理由として、cGAS-STING 経路の活性化により、細胞自身が抗がん剤に対して抵抗性を持つがん幹細胞として生き残るための生存シグナルになっていることが考えられた。今後は、抗がん剤と STING 阻害剤 H151 との併用療法で、がんの転移や再発に影響が出るかどうかを調べていき、cGAS-STING 経路の活性化により生じる、がん幹細胞の抑制方法を検討していきたいと思っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 上原 郁野、田中 信之
2. 発表標題 Role of type1 interferon induced by cGAS-STING pathway in cancer stem cell maintenance.
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 上原郁野、梶田満子、田中信之
2. 発表標題 cGAS-STING経路を介して産生されるI型インターフェロンのがん細胞における役割
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
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
---------	---------