

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的研究(開拓)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K20597

研究課題名(和文)がん細胞の持続的増殖における幹細胞性誘導の可視化と細胞増殖動態解析システムの開発

研究課題名(英文) Live imaging and counting system of stemness induction and cellular kinetics during persistent growth of cancer cells

研究代表者

加藤 光保 (Kato, Mitsuyasu)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20194855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,000,000円

研究成果の概要(和文)：MAFK、GPNMB並びにTMEPAI(PMEPA1)は、乳癌や膵癌で幹細胞誘導に関与し、THG-1は扁平上皮癌の幹細胞誘導に関与する。単層培養されているがん細胞は持続的に細胞周期を周り続けるが、in vivoにおけるがんの腫瘍形成性増殖や3次元のスフェア培養では、誘導された幹細胞だけが長期生存して間欠的に不均等分裂を起こし、一過性増殖細胞や最終分化したがん細胞は一定の寿命のうちに死に至るが、一部の増殖が停止したがん細胞に幹細胞性が誘導される。一定以上の総細胞数に達すると、誘導された幹細胞が持続的に増加し、生まれる細胞と死ぬ細胞の動的平衡が成立する総細胞数が持続的に増加することになる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在のがん治療は、早期であれば多くの患者が治癒するが、進行して全身に広がったがんや再発がんの治癒率は低い。転移や再発は幹細胞に依存して発生する。Dormantながん幹細胞の本態解明とがん細胞増殖動態全体における位置付けを解明することは、次世代の進行がんにも有効ながん治療の開発に必須である。本研究は、幹細胞が増殖が停止したがん細胞の一部に誘導されて数を増し続けること、その際に不均等分裂が起こることを明らかにしている。今後は、がん細胞の分裂寿命の決定機構並びにがん幹細胞化における分裂寿命のリセット機構の研究が重要になることを示す学術的価値と幹細胞誘導標的医療の開発につながる社会的意義をもつ。

研究成果の概要(英文)：MAFK, GPNMB, and TMEPAI (PMEPA1) is involved in stem cell induction in breast and pancreatic cancer cells, while THG-1 is involved in stem cell induction in squamous cell carcinoma cells. Cancer cells in normal monolayer culture continuously go around the cell cycle and proliferate continuously, but under conditions of tumorigenic cancer cell proliferation in vivo or in 3D sphere culture, only induced stem cells survive long term and intermittently undergo asymmetric division, while all of differentiated transiently proliferating cells or terminally differentiated cells cease to proliferate die. When total cell number reaches a certain level, stem cell induction constantly increase stem cell numbers and the total number of cells in which a dynamic equilibrium of born and dead cells is established start to continuously increase by a sustained increase in newly induced stem cells.

研究分野：実験病理学、腫瘍学

キーワード：がん 幹細胞 幹細胞誘導 GPNMB TMEPAI(PMEPA1) THG-1 不均等分裂 イメージング

1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は、2006年に米国癌学会でワークショップが開かれ、腫瘍形成の起点となり、がん細胞集団中のごく一部の稀な細胞で、自己複製能と分化能をもち、休眠状態にあって、薬剤耐性を示し、再発・転移の元となる細胞であると定義された(1)。がん細胞は、がん遺伝子の活性化とがん抑制遺伝子の不活化によって生じ、増殖シグナルの自己充足、増殖抑制シグナルへの不応答、アポトーシスからの回避、無限増殖能、浸潤と転移を示すことが特徴であると理解されてきた(2)。しかし、この理解だけでは、幹細胞以外のがん細胞が生体内で腫瘍形成能を持たないことを説明できない。がんは、組織幹細胞にゲノム異常が起こって、がん幹細胞になり、そこから分化・増殖するがん細胞集団によって腫瘍が形成されるようになり、さらにはがん幹細胞にゲノム異常が蓄積して、浸潤や転移をきたす悪性化したがん細胞集団が形成されるというがんのクローン進化説が提唱された(3)。さらに、トランスフォーミング増殖因子 β などで上皮間葉移行を誘導すると幹細胞の特性を持った細胞が誘導されることや、腫瘍を形成させた大腸がんで、幹細胞のみを殺傷しても、しばらくすると幹細胞が復活することが報告され、幹細胞以外の細胞から幹細胞が誘導されるがんの可塑性という概念が生まれてきた(4)(5)。

私たちは、乳腺上皮細胞株にトランスフォーミング増殖因子 β を作用させると発現が亢進する転写因子 MAFK の機能について解析し、MAFK は細胞増殖や細胞死には影響することなく上皮間葉移行とともに腫瘍形成能を誘導することを見出し、その機能の少なくとも一部は、膜タンパク質 GPNMB の誘導によるものであることを明らかにした(6)(7)。また、MAFK や GPNMB は、がん細胞を2次元の単層培養から *in vivo* の腫瘍形成あるいは3次元のスフェア培養条件に移行させた時に、増殖が停止したがん細胞の一部に幹細胞遺伝子の発現を誘導することで腫瘍形成やスフェアの持続的な増殖に関与することを明らかにした(8)。この発見は「GPNMB induces stemness in dormant breast cancer cells」というタイトルで *Cancer Research* の *Breaking Insights* に紹介された(9)。さらに扁平上皮がん細胞においても TGF- β -stimulated clone 22 Homologous Gene-1 (THG-1) が転写因子 SALL4 の分解抑制を介して幹細胞性を誘導し、スフェアの持続増殖能を獲得させることを示した(10)。これらの研究により、増殖が停止したがん細胞集団の中で、幹細胞機能が再び獲得されることで幹細胞数が持続的に増殖するようになり、これにともなって分裂による細胞数の増加と細胞死による減少の動的平衡を生じるがん細胞総数が持続的に増加し腫瘍を形成するようになるという新たながん細胞の持続的な増加の動態に関する概念が生まれ、その背景にある分子機構の解析を開始した。

- (1) Cancer stem cells—Perspectives on current status and future direction: AACR workshop on cancer stem cells. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB *et al.*, **Cancer Res.** 66: 9339-9334, 2006.
- (2) The hallmarks of cancer. Hanahan D, Weinberg RA. **Cell** 100: 57-70, 2000.
- (3) The cancer stem cell: premises, promises and challenges. Clevers H. **Nat. Med.** 17: 313-319, 2011.
- (4) The epithelial-mesenchymal sttansition generates cells with properties of stem cells. Mani SA, Guuo W, Liao MJ *et al.*, **Cell** 133: 704-715, 2008.
- (5) Cancer: Tumor stem-cell surprises. Greten FR. *Nature* 543: 626-627, 2017.
- (6) Okita Y, Kamoshida A, Suzuki H, Itoh K, Motohashi H, Igarashi K, Yamamoto M, Ogami T, Koinuma D, and **Kato M**. Transforming Growth Factor- β induces transcription factors MafK and Bach1 to suppress expression of the heme oxygenase-1 gene. **J. Biol. Chem.** 288: 20658-20667, 2013.
- (7) Okita Y, Kimura M, Xie R, Chen C, Shen LTW, Kojima Y, Suzuki H, Muratani M, Saitoh M, Semba K, Heldin C-H, **Kato M**. The transcription factor MAFK induces EMT and malignant progression of triple-negative breast cancer cells through its target GPNMB. **Sci. Signal.** 10 (474): pii: eaak9397, 2017.
- (8) Chen C, Okita Y, Watanabe Y, Abe F, Fikry MA, Ichikawa Y, Suzuki H, Shibuya A, **Kato M**. Glycoprotein nmb is exposed on the surface of dormant breast cancer cells and induces stem cell-like properties. **Cancer Res.** 78(22): 6424-6435, 2018.
- (9) GPNMB induces stemness in dormant breast cancer cells. *Cancer Res* (Editorial). 78: 6029-6030, 2018.
- (10) Hwang J, Haque MA, Suzuki H, ten Dijke P, **Kato M**. THG-1 suppresses SALL4 degradation to induce stemness genes and tumorsphere formation through antagonizing NRBP1 in squamous cell carcinoma cells. **Biochem Biophys Res Commun.** 523(2):307-314, 2020.

2. 研究の目的

本研究は、生物発光共鳴エネルギー移行 Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET) を用いた幹細胞性 (OCT4, SOX2, NANOG) と細胞増殖(MKI67)のレポーターを用いて、発光顕微鏡を用いたライブイメージングを可能にし、がんの総細胞数、増殖細胞数、非幹がん細胞の分裂回数、幹細胞数、がん幹細胞の分裂頻度 (均等、不均等) ならびに非幹がん細胞に幹細胞性が誘導される幹細胞性誘導によるがん幹細胞の増加数などを観察して、3次元のスフェア培養条件並びに *in vivo* の主要形成過程において、がん細胞数の持続的増加が幹細胞性誘導に依存して生じるという仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

複数の乳癌細胞株、膵がん細胞株、食道がん細胞株、喉頭がん細胞株、膀胱がん細胞株を用いて、2次元の単層培養、3次元のスフェア培養、浸潤アッセイ、免疫不全マウスを用いた皮下腫瘍形成、尾静脈注射による肺における腫瘍形成実験を行い、得られた細胞や組織を免疫蛍光染色、ウェスタンブロットティング、qPCR、RNA sequence、ライブイメージング、FACS などの方法で解析した。TMEMPAI(PMEMPA1)と THG-1 についてはゲノム編集によるノックアウト細胞も作成した。また GPNMB はノックアウト細胞が生存できなかったため、siRNA や shRNA を用いてノックダウンを行った。種々の分子の siRNA によるノックダウンを加え、幹細胞誘導やそのシグナル伝達機構を解析した。enhanced Nano-Lantern を用いた BRET イメージングも行ったが、発光顕微鏡が機能せず研究期間中修理を繰り返したのが回復しなかったため、断片的なデータを取得するに留まった。

組換え DNA 実験については、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」と「筑波大学組換え DNA 実験安全管理規則」に基づき、大学に実験計画を提出し、承認を得て実施した。

動物実験については、「動物の愛護及び管理に関する法律」に従い、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (日本学術会議)」と「筑波大学動物実験取扱規程」に基づいて大学に実験計画を提出し、承認を得て実施した。

患者検体を用いた研究は、「ヒトを対象とする研究に関する倫理指針」に従い、倫理講習を受講し、筑波大学医学医療系「医の倫理委員会」に研究計画を提出し、承認を得て実施している。

4. 研究成果

MAFK, GPNMB, THG-1 に加え、TGF- β によって直接発現が誘導される TMEMPAI(PMEMPA1)も2次元の単層培養における細胞増殖やアポトーシスには影響しないが上皮間葉移行、3次元のスフェア形成並びに腫瘍形成を強く誘導することを見出した(11)(14)(15)(18)。TMEMPAI は細胞質ドメインに2つの PY モチーフとひとつの Smad 結合モチーフをもち、その両者が腫瘍形成能に関与していた。PY モチーフは、E3 リガーゼである NEDD4-2 に結合し、NEDD4-2 による PHLPP1 の分解を促進することで AKT の S473 の脱リン酸化を抑制して AKT を活性化していた(11)(14)(15)。

THG-1 は活性化 RAS の下流で S264 がリン酸化され活性化して腫瘍形成能や浸潤能を亢進させた。THG-1 の下流では、SALL4 タンパク質の分解抑制に加え、CD44 のスプライシングが起こり、バリエーションフォームの CD44 が増加することも腫瘍形成能に関与していた(18)。

通常のスフェア培養は細胞が浮遊して移動するため長期のイメージングには適していないため、種々の培養条件を検討し、ポリビニルアルコールが幹細胞誘導を亢進することも見出した(12)。イメージングにはマトリジェル内への包埋や培養液の粘稠性をあげることも有効だった。

GPNMB の機能には SRC による hemITAM チロシンのリン酸化に加え、増殖因子シグナルによるヒト GPNMB isoform b S530 (マウス GPNMB S546)のリン酸化も必要だった(13)。GPNMB は、喉頭がんでも増殖が停止した一部のがん細胞で発現し、腫瘍の悪性化に関与していたが、膀胱がんではほとんどのがん細胞で発現し、浸潤能の亢進に関与していた(17)(19)。

がん細胞は、2次元の単層培養条件では、ほとんどの細胞が Ki-67 陽性で幹細胞に依存せず連続的に細胞周期を周り総細胞数の対数増加を示すが、スフェア培養に移すと、細胞死が活性化した。死ぬ細胞の割合は細胞株ごとに異なっていたが、生存している細胞は増殖が停止し、その一部で幹細胞性遺伝子の発現が誘導された。また不均等な細胞分裂が多く観察され、分裂後の2つの娘細胞のうちひとつだけが引き続き分裂し、もう一方は分裂を停止していることが多く観察された。また GPNMB のノックダウンにより、不均等分裂した娘細胞のひとつだけが膨化して細胞死に至る像が多く観察された。この現象は現在も解析を継続しており、幹細胞誘導と幹細胞の不均等分裂並びにこれに伴う細胞寿命の変化について検討している。

- (11) Puteri MU, Watanabe Y, Wardhani BWK, Amalia R, Abdelaziz M, **Kato M**. PMEPA1/TMEPAI isoforms function via its PY and Smad interaction motifs for tumorigenic activities of breast cancer cells. *Genes Cells*, 25(6): 375-390, 2020.
- (12) Okita Y, Zheng L, Kawanishi K, Miyoshi H, Yanagihara K, **Kato M**. Polyvinyl alcohol scaffolds and supplementation support 3D and sphere culturing of human cancer cell lines by reducing apoptosis and promoting cellular proliferation. *Genes Cells*. 26(5):336-343, 2021.
- (13) Wang C, Okita Y, Zheng L, Shinkai Y, Manevich L, Chin JM, Kimura T, Suzuki H, Kumagai Y, **Kato M**. Glycoprotein non-metastatic melanoma protein B functions with growth factor signaling to induce tumorigenesis through its serine phosphorylation. *Cancer Sci*. 112: 4187-4197, 2021.
- (14) Wardhani BWK, Louisa M, Watanabe Y, Setiabudy R, **Kato M**. TGF- β -Induced TMEPAI promotes epithelial-mesenchymal transition in Doxorubicin-treated triple-negative breast cancer cells via SMAD3 and PI3K/AKT pathway alteration. *Breast Cancer (Dove Med Press)*. 13:529-538, 2021.
- (15) Haque MA, Abdelaziz M, Puteri MU, Vo Nguyen TT, Kudo K, Watanabe Y, **Kato M**. PMEPA1/TMEPAI Is a unique tumorigenic activator of AKT promoting proteasomal degradation of PHLPP1 in triple-negative breast cancer cells. *Cancers (Basel)*. 13(19):4934, 2021.
- (16) Tsubakihara Y, Ohata Y, Okita Y, Younis S, Eriksson J, Sellin ME, Ren J, Ten Dijke P, Miyazono K, Hikita A, Imamura T, **Kato M**, Heldin C-H, Moustakas A. TGF β selects for pro-stemness over pro-invasive phenotypes during cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *Mol Oncol*. 16(12): 2330-2354., 2022.
- (17) Manevich L, Okita Y, Okano Y, Sugawara T, Kawanishi K, Poullikkas T, Dang Cao LTL, Zheng L, Nakayama M, Matsumoto S, Tabuchi K, **Kato M**. Glycoprotein NMB promotes tumor formation and malignant progression of laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci*. 113(9): 3244-3254, 2022.
- (18) Goto N, Suzuki H, Zheng L, Okano Y, Okita Y, Watanabe Y, Kato Y, **Kato M**. Promotion of squamous cell carcinoma tumorigenesis by oncogene-mediated THG-1/TSC22D4 phosphorylation. *Cancer Sci*. 114(10):3972-3983, 2023.
- (19) Kimura T, Okita Y, Nagumo Y, Chin JM, Fikry MA, Shiga M, Kandori S, Kawahara T, Suzuki H, Nishiyama H, **Kato M**. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B impacts the malignant potential of bladder cancer cells through its hem-immunoreceptor tyrosine-based activation motif. *Pathol Int*. 74(5): 262-273, 2024

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kimura T, Okita Y, Nagumo Y, Chin JM, Fikry MA, Shiga M, Kandori S, Kawahara T, Suzuki H, Nishiyama H, Kato M.	4. 巻 74
2. 論文標題 Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B impacts the malignant potential of bladder cancer cells through its hem-immunoreceptor tyrosine-based activation motif.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 262-273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13419	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 Manevich L, Okita Y, Okano Y, Sugawara T, Kawanishi K, Poullikkas T, Dang Cao LTL, Zheng L, Nakayama M, Matsumoto S, Tabuchi K, Kato M.	4. 巻 113
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 Sci.	6. 最初と最後の頁 3244-3254
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
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 Haque MA, Abdelaziz M, Puteri MU, Vo Nguyen TT, Kudo K, Watanabe Y, Kato M.	4. 巻 13
2. 論文標題 PMEPA1/TMEPA1 is a unique tumorigenic activator of AKT promoting proteasomal degradation of PHLPP1 in triple negative breast cancer cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4934(20ページ)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13194934.	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 Wardhani BWK, Louisa M, Watanabe Y, Setiabudy R, Kato M.	4. 巻 13
2. 論文標題 TGF- β -Induced TMEPAI Promotes Epithelial-Mesenchymal Transition in Doxorubicin-Treated Triple-Negative Breast Cancer Cells via SMAD3 and PI3K/AKT Pathway Alteration.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 529-538
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/BCTT.S325429.	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 該当する

1. 著者名 Tsubakihara Y, Ohata Y, Okita Y, Younis S, Eriksson J, Sellin ME, Ren J, Ten Dijke P, Miyazono K, Hikita A, Imamura T, Kato M, Heldin CH, Moustakas A.	4. 巻 16
2. 論文標題 TGF β selects for pro-stemness over pro-invasive phenotypes during cancer cell epithelial-mesenchymal transition.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 2330-2354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.13215.	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 該当する

1. 著者名 Puteri MU, Watanabe Y, Wardhani BWK, Amalia R, Abdelaziz M, Kato M	4. 巻 25(6)
2. 論文標題 PMEPA1/TMEPAI isoforms function via its PY and Smad interaction motifs for tumorigenic activities of breast cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 375-390
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12766	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 該当する

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 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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学人間総合科学学術院実験病理学研究室－研究内容 https://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/service.html 幹細胞性誘導が、がん細胞の持続的な増加をもたらす http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/service.html トランスボーダー医学研究センター 統合医科学部門 細胞動態科学分野 http://www.md.tsukuba.ac.jp/tmrc/research_lab/cell_dynamics/ Cell Dynamics, Transborder Medical Research Center http://www.md.tsukuba.ac.jp/tmrc/en/research_lab/cell_dynamics/

6. 研究組織			
<table border="1"><thead><tr><th>氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)</th><th>所属研究機関・部局・職 (機関番号)</th><th>備考</th></tr></thead></table>	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
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
---------	---------