

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10060

研究課題名（和文）骨内における上皮間葉転換のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanism for Epithelial-Mesenchymal Transition in Bone

研究代表者

田中 宗一（TANAKA, Soichi）

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：20548200

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）：ビスホスホネート製剤（ZOL）は乳がん患者の予後を改善する事が臨床試験で明らかにされた。本研究においては骨におけるZOLの上皮間葉転換（EMT）への関与について着目し解析した。その結果、骨は乳がんのEMTを促進すること、さらにZOLはEMT促進因子Snailをユビキチン化による分解を阻害するUSP45を抑制しEMTを阻害する事が示唆された。ZOLは骨内でEMTを阻害し骨から軟組織臓器への二次転移を抑制する事が推察される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ZOL製剤の投与で副作用を生じる可能性は低い。しかし長期服用や窒素含有のZOL製剤はまれに顎骨壊死をまねく。その副作用を回避するために、極めて低容量のZOL製剤によって抑制効果を生じる上皮間葉転換促進因子の探索を行ってきた。その結果からSnailを本研究におけるマーカー遺伝子として選択した。Snailのタンパク質レベルでの発現を安定化する現在まで機能解析に関する論文報告は一報もない脱ユビキチン化酵素USP45を同定した。しかしUSP45の機能解析をおこなった報告は全くない。新たな創薬の可能性を示唆させる世界に先駆けられた研究として報告できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Clinical study has shown that breast cancer patients are improved overall survival by Bisphosphonate (ZOL). We investigated whether ZOL is involved in Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in bone. We showed bone environment promotes EMT in breast cancer cells. Moreover, ZOL inhibits EMT in bone via stimulation of EMT inducing factor Snail degradation by preventing its de-ubiquitination by USP45, leading to the suppression of secondary metastases from bone.

研究分野：分子生物学

キーワード：ビスホスホネート ユビキチン化 上皮間葉転換 骨転移

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体の微小環境においてニッチを形成したがん細胞は、その中で転移能力の高い一部の細胞が、血管内に遊走し生着臓器(転移土壌)を選択することで転移が成立する事が示されている。その転移能力の高いがん細胞は、上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal transition: EMT)によって強い悪性形質を獲得したがん幹細胞(造腫瘍細胞)として維持される事が示唆されている。微小環境のうち骨髄は骨芽細胞・間質細胞がニッチを形成し接着分子を介して造血幹細胞の増殖、分化の制御に関与することが明らかにされた。がんの骨転移などにおいてもおそらくこのような骨芽細胞を主体とするニッチが重要な役割を演じていることが考えられ、がん細胞の一部はまず骨に形成されるニッチに移動しそこでより強い転移能力を獲得し肺や肝臓など標的軟組織臓器に転移する事が推察される。以上の仮説を支持する臨床試験として、ウーン大学の Gnant らは、ホルモン療法をうける乳がん患者約 900 名に対し、ビスホスホネートであるゾレドロン酸(ZOL)を併用投与すると、転移や再発といった予後に影響する因子が ZOL 非投与群に比較して大きく減少させることを発表した。ビスホスホネートは骨粗鬆症や骨転移治療に用いられる薬剤で、破骨細胞特異的に作用し骨吸収を抑制する Bone modifying agent(BMA)と呼ばれ骨環境に対して破壊的に作用する。また、投与後速やかに尿中排泄され、骨に長期間蓄積する事が大きな特徴である。すなわち、がん細胞が生理的な骨リモデリングが生じている状況に暴露されると、自ら悪性度を高め、患者の予後を増悪させている事が推測できる。この原因を骨代謝の分子生物学から考察すると、骨は様々な増殖因子を豊富に含むことは明らかで、ZOL による骨吸収抑制によりそれらの因子が骨髄中へ漏れ出す事を抑制し、間接的にがん細胞の飢餓を誘導する事が推察できる。

近年のがん研究の進歩はめざましく、今後より効果的な化学療法剤の創出の可能性が高まっている。その一方で、患者生存率向上に伴う骨転移症例数の増加が予測されており、こういった症例への対応策を確立することは我が国にとって急務であり、骨とがんのクロストークの分子生物学的な理解はこのような問題をクリアするために重要な手がかりとなることが期待できる。

2. 研究の目的

以上の背景をふまえ、骨におけるがん細胞の悪性形質獲得メカニズムは、EMT が関与している可能性を推測した。また、がん細胞が、造血幹細胞同様、骨髄中で間質細胞とニッチを形成していれば、がん特異的な分子メカニズムが存在している可能性も考えられる。そこで本研究では、がんの骨微小環境における特異的な EMT 促進メカニズムを明らかにする事を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1)現在までのところ、がん細胞の EMT が *in vivo* で明らかにされた報告は少なく、さらに臓器、組織特異的な EMT の存在は明確ではない。そこで研究代表者は骨環境が実際にがんの EMT を促進する環境であるか否かを検討するために *in vivo* のマウスモデルの作製を行った。乳がん細胞である MCF7 細胞をヌードマウスの乳腺部皮下ならびに脛骨骨髄中へ直接接種し、EMT 関連遺伝子の発現を検討した。

(2)作製したマウスモデルに対して、ZOL を投与し腫瘍増殖への影響ならびに EMT 関連遺伝子の発現パターンへの影響を検討する。

(3)ZOL は破骨細胞特異的に作用し骨吸収を抑制する薬剤である。そのため、骨基質に豊富に含まれるがん細胞が好むサイトカインが、骨髄中において不足することによって間接的にがんの形質変化を阻害している事が強く推察できる。しかしながら、研究代表者は本申請前の予備実験において ZOL が直接的に EMT 促進因子 Snail をユビキチン-プロテアソーム系による分解を促進していることを見出した。さらに詳細に解析をすすめるなかで、Snail に直接結合し脱ユビキチン化する USP45 をハイスループットスクリーニングから同定した。そこで研究期間内では、両者の相互作用の解析を生化学的に遂行してきた。特に以下の点を明らかにすることを目的とした。

in vitro de-Ubiquitination assay において USP45 が Snai のユビキチン化を直接阻害するか調べる。

in cell Ubiquitination assay を用い、数種の細胞内で USP45 の Snail のユビキチン化への関与を調べる。

上記 2 項目について妥当な結果が示された際には、USP45 がどのリジン残基を介したポリユビキチン鎖を標的として切断するか調べる。

ZOL が Snail と USP45 の相互作用にどのような影響を持つか調べる。

(4)Snail ならびに USP45 をレンチウイルスシステムをもちい EMT を形態的ならびに分子レベルにおいて起こしていない MCF7 細胞に安定発現させ、その影響を調べる。形態的な変化が示された際には、細胞運動の変化など biological な assay 系を用い評価する。

4. 研究成果

(1) 乳腺部皮下ならびに脛骨内乳がん細胞摂取モデルの作成

乳がん細胞株 MCF7 に対して GFP の変異体である Venus をレンチウイルスシステムを用い安定発現させ乳腺部および脛骨骨髓中に接種に約 3 ヶ月後、蛍光強度が増加したものの腫瘍増殖状態として解析に用いた。なお骨環境ががん細胞に対する影響を検討するため骨環境破壊剤として ZOL を投与した。

(2) (1)で作成したマウスモデルから *invivo*の状態を可能な限り反映させるため、直接 mRNA を回収し Real-time PCR にて EMT 関連遺伝子の発現を検討した。その結果、EMT 促進因子である Snail 発現が乳腺部に比較して骨において著明に高まっていた。一方 Snail によって発現が抑制される E-cadherin 発現は骨において著しい低下が見られた。

また、ZOL 投与マウスにおいては、このような変化は見られなかった。以上の結果から骨環境は乳がん細胞の EMT を促進する環境であることが示唆された。

(3) Snai と USP45 の相互作用は申請に先立ち解析を進めてきた。Snail 発現は USP45 の過剰発現によって高められ、ロックダウンにおいては低下した。なおこの際 Snail の mRNA 発現に影響する事はなかった。免疫沈降法による相互作用の解析によって、Snail ならびに USP45 が結合する事が明らかになった。さらに、USP45 の WT および活性中心である 199 番目のシステイン残基をアラニンに置換した変異体を作成し、たんぱく質精製を行い *in vitro* および細胞内で Snail のポリユビキチン化に対する影響を調べた。その結果、*invitro* de-Ubiquitination assay において WT の USP45 存在下で Snail のユビキチン化は阻害されることが示された。なお、細胞内においても同様の傾向が観察された。以上の結果から Snail のポリユビキチン化は、USP45 の酵素活性依存的に直接脱ユビキチン化されることが示唆された。

これに並行して、USP45 がユビキチンのどのリジン残基を介したポリユビキチン鎖を切断するか検討した。たんぱく質分解に関与する 48 番目のリジンを介したものと、細胞内シグナル伝達に関与する 63 番目のリジン残基を介したものを特異的に認識する抗体を用いで検討したところ、USP45 は 48 番目のリジン残基を介したポリユビキチン鎖を特異的に切断する事が観察された。

(4)USP45 活性の生物学的意義を MCF7 細胞にレンチウイルスを用い安定発現させ検討した。その結果、上皮様形態から紡錘形に変化し典型的な EMT が観察された。その際、上皮系マーカーとされる E-cadherin 発現が完全に消失した。また EMT 促進因子である Snail のたんぱく質レベルでの蓄積が見られた。なおこの際 Snail mRNA 発現への影響は見られなかった。

(5)ZOL の Snail と USP45 の相互作用への影響を(3)同様 *invitro* de-Ubiquitination assay を行った。その結果、ZOL の量依存的に USP45 による Snail の脱ユビキチン化が阻害された。すなわち、ZOL は USP45 の酵素活性を阻害する事で脱ユビキチン活性を抑制する化合物であることが推察された。

以上の結果から骨微小環境は乳がん細胞の EMT を促進する環境であること、またそのメカニズムは USP45 が Snai のユビキチン化による分解を阻害する事に依存することが示唆された。また ZOL は骨環境破壊による間接的な EMT 阻害効果のみならず、USP45 の酵素活性を阻害することで Snail のユビキチン化を促進する直接的な EMT 抑制効果を持つことが推察され、現在詳細な解析を進めている。

前述したように、臓器特異的な EMT 制御メカニズムは現時点で明らかになっていない。本研究によって骨特異的な EMT 制御メカニズムを明らかにしたことは、世界に先駆けたもので、ZOL の新たな抗がん効果を示したことは今後のがん治療に有用な情報になりうると考えている。

本申請中は、USP45 の構造解析にむけた、たんぱく質精製をおもにすすめてきた。814 アミノ酸を有するたんぱく質であることもあり、非常に難渋している。しかしながら、多数でファミリーを形成する遺伝子であり、USP45 の構造解析の成功で、数多くのユビキチンシステムを明らかにすることが推察でき、引き続き解析に努める価値があると考えている。

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	吉村 善隆 (yoshimura yoshitaka) (30230816)	北海道大学・歯学研究院・准教授 (10101)	
研究分担者	東野 史裕 (higashino fumihiro) (50301891)	北海道情報大学・医療情報学部・教授 (30115)	

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