

平成 31 年 4 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K06829

研究課題名(和文) がん進展における代謝を介した足場非依存性増殖制御の役割

研究課題名(英文) Role of anchorage-independent growth regulation in tumor progression

研究代表者

坂本 毅治 (Sakamoto, Takeharu)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：70511418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：足場非依存性増殖はがん細胞に特徴的であり有望な治療標的と考えられるが、そのメカニズムの全容は未だ不明である。そこで、足場非依存性増殖に関わる分子Xに着目し、分子Xの生体における役割、特にがん進展における役割の解明を目指した。ノックアウトマウスの解析により、分子Xはがん細胞だけでなく腫瘍免疫抑制細胞にも発現しその数を増加させていることが分かった。また、乳がんモデルマウスを用いた解析から、分子Xは個体レベルでのがんの増殖と転移を促進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により分子Xが、がん細胞だけでなくがん間質細胞にも発現し、腫瘍免疫を抑制することでがんの進展を促進していることが明らかとなった。分子Xはいわゆるがん精巢抗原であり、精巢以外の正常組織ではほとんど発現していないことから、分子Xを標的としてがん細胞とがん間質細胞の両者を制御することで、新たながん治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Anchorage-independent growth is characteristic for cancer cells, but the perspective of its regulatory mechanisms remains unclear. To address this, we focused on the molecule X which has been reported to control anchorage independent growth of cancer cells in vitro and tried to clarify the role of molecule X in vivo, especially in tumor progression. The analyses of X knockout mice revealed that molecule X expressed not only in cancer cells but also in host immunosuppressive cells and increased the number of immunosuppressive cells. The molecule X also promoted tumor growth and lung metastasis in breast cancer model mice.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

細胞 - 細胞外基質(ECM)間の接着は血球系細胞以外の多くの正常細胞の生存、増殖に必須であり、ECM から離れた状態の細胞は anoikis と呼ばれる細胞死を迎える。一方、がん細胞では EGFR からのシグナルなどにより anoikis に抵抗性を示し、足場非依存的な細胞増殖を起こす。この anoikis 抵抗性を標的としたがん治療法の開発が期待されているが、がん細胞の anoikis 抵抗性のメカニズムの全容は未だ明らかではない。近年、がん研究において細胞内代謝を標的とした基礎研究、治療法の実現が急速に展開されており、anoikis 抵抗性と代謝の関係についても少しずつ明らかになってきている。例えば、細胞の接着 - 浮遊状態で細胞内代謝が変化し、正常細胞では浮遊状態になると PDK4 の発現が誘導され、それにより解糖系から TCA サイクルへの代謝フラックスが抑制されて増殖停止、細胞死を起こすのに対し、がん細胞では ErbB2 から Erk へシグナルが入ることで PDK4 の発現抑制がかり足場非依存的な増殖が起こることが Joan Brugge 博士らのグループから報告されている(Schafer et al., Nature, 2009; Grassian et al., Genes Dev, 2011)。

がんの代謝研究に関して、我々もこれまでに、解糖系の主要な制御転写因子である低酸素応答性転写因子 HIF を活性化させる分子として Mint3 を同定し、Mint3 が膜型のプロテアーゼである MT1-MMP と協調してがん細胞の解糖系の亢進 (Warburg 効果) や造腫瘍能の促進をしていること、さらにマクロファージの解糖系制御を介し炎症反応やがん転移を制御していることを明らかにしてきた (Sakamoto et al., JBC, 2009, 2010, 2011; Hara et al., JBC, 2011; Hara et al., BBRC, 2011; Sakamoto et al., MCB, 2014)。この一連の研究と並行して、我々は、これまでにゲノムワイド shRNA ライブラリーを用いた網羅的スクリーニングを行い、がん細胞の増殖に関わる遺伝子を 13 種類同定した(Yoshino et al., PLoS ONE, 2012)。その中の 1 つである分子 X はがん細胞の浮遊状態での生存、増殖に関わることを見出していた。

## 2. 研究の目的

これまでのがん細胞株を用いた研究から、分子 X は細胞内代謝を制御することでがん細胞の足場非依存的な増殖を促進していることが明らかとなった。しかしながら、分子 X が生体においてがんの進展においてどのような役割を果たしているかについては不明である。そこで、本研究では分子 X ノックアウトマウスおよび発がんモデルマウスを用いて個体レベルでのがん進展におけるがん細胞およびがん間質細胞での分子 X の役割を解明し、分子 X が新たながん治療の標的に成り得るかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### 分子 X 欠損マウスの作製

分子 X の flox マウスを作製し、CAG-Cre マウスと交配後、得られた産仔を野生型マウスと交配させ、CAG-Cre 遺伝子を持たない分子 X ヘテロマウスを得た。分子 X ヘテロマウス同士を交配し、得られたノックアウトマウスを実験に用いた。また、分子 X flox マウスとタモキシフェン誘導型 cre リコンビナーゼ発現マウス (CAG-CreER) を交配させ、タモキシフェン誘導型ノックアウトマウス(cKO マウス)を作製した。

### 乳癌モデル MMTV-PyMT マウス

MMTV-PyMT マウスは原発巣での乳癌の進展から肺転移までを解析することができる有用なモデルである。C57BL/6 にバッククロスした MMTV-PyMT マウスと分子 X ノックアウトマウス

スを交配し、分子 X ノックアウト MMTV-PyMT マウスを作製した。MMTV-PyMT マウスのメスは、触診により乳がんの発症を確認し、腫瘍の最大径が 1.5 cm になった時に全腫瘍を摘出し、腫瘍重量および肺転移の解析を行った。

#### 腫瘍移植モデル：

がん進展にはがん細胞だけでなく間質細胞も強く影響を与えている。そこで、CAG-CreER;Rnf126<sup>flox/flox</sup> マウスに同系統のマウス乳がん E0771 細胞を皮下移植し、腫瘍の増殖を解析した。また、得られた腫瘍を免疫染色やサイトカインアレイで解析を行った。

#### 4 . 研究成果

生体における分子 X の役割を明らかにするため、まず分子 X のマウス個体における発現を解析したところ、成体では精巣でのみ検出された。このことから、分子 X はいわゆるがん精巣抗原であることが明らかとなった。次に分子 X KO マウスを作製したところ、オスマウスでは精巣重量が低下し、妊孕性が著しく低下していた。このことから分子 X は精巣の発達および精子機能に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、性別にかかわらず、分子 X ノックアウトマウスは期待されるメンデル比以下でしか出生しなかったことから、胚発生においても分子 X は何らかの役割を果たしていることが示唆された。

次に、がん間質における分子 X の役割を明らかにするため、マウス乳がん E0771 細胞腫瘍組織における分子 X の発現を免疫染色で解析した結果、分子 X は免疫抑制に関わる IL-10 産生 B 細胞( B10 細胞 )に発現していることが明らかとなった。そこで、タモキシフェン誘導分子 X KO マウス(cKO マウス) に E0771 細胞を移植したところ、少数の移植では cKO マウスでは腫瘍が退縮した一方、多数の移植ではコントロールと有意な差がつかなかった。しかしながら、この腫瘍において、コントロールに比べ、cKO マウスの腫瘍では B10 細胞の数が減少し、炎症性サイトカインの発現レベルが上昇していることが明らかとなった。さらに、乳がんモデルマウス MMTV-PyMT マウスと分子 X KO マウスを交配し解析した結果、コントロールに比べ分子 X KO マウスでは乳がんの腫瘍重量および転移が低下することが明らかとなった。

以上の結果から、分子 X はがん組織においてがんの進展を促進していることが明らかとなった。分子 X は正常組織では精巣以外にはほとんど発現していないことから、分子 X を標的としたがん細胞・がん間質細胞の両者をコントロールする新たながん治療法の可能性が期待される。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. Terada H, Saitoh Y, Kametani K, Sakaguchi M, **Sakamoto T**, Kamijo A, Terada N\*. Electron microscopic observation of photoreceptor cells in directly inserted anesthetized *Drosophila* into a high-pressure freezing unit. *Microsc Res Tech*. 2019;82:244-249. doi: 10.1002/jemt.23166
2. Saitoh Y, Kamijo A, Yamauchi J, **Sakamoto T**, Terada N\*. The membrane palmitoylated protein, MPP6, is involved in myelin formation in the mouse peripheral nervous system. *Histochem Cell Biol*. 2018; doi: 10.1007/s00418-018-1745-y.
3. Tsubaki T, Kadonosono T, Sakurai S, Shiozawa T, Goto T, Sakai S, Kuchimaru T, **Sakamoto T**, Watanabe H, Kondoh G, Shinae Kizaka-Kondoh\*. Novel adherent CD11b+ Gr-1+ tumor-infiltrating cells initiate an immunosuppressive tumor microenvironment. *Oncotarget*. 2018;9:11209-11226. doi: 10.18632/oncotarget.24359.
4. Saitoh Y, Ohno N, Yamauchi J, **Sakamoto T**, Terada N\*. Deficiency of a membrane skeletal protein, 4.1G, results in myelin abnormalities in the peripheral nervous system. *Histochem Cell Biol*.

- 2017;148:597-606. doi: 10.1007/s00418-017-1600-6.
5. Hara T, Murakami Y, Seiki M, **Sakamoto T\***. Mint3 in bone marrow-derived cells promotes lung metastasis in breast cancer model mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2017;49:688-692. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.102.
  6. **Sakamoto T\***, Seiki M\*. Integrated functions of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in regulating cancer malignancy: beyond a proteinase. *Cancer Sci*. 2017;108:1095-1100. doi: 10.1111/cas.13231.
  7. Hara T, Nakaoka HJ, Hayashi T, Mimura K, Hoshino D, Inoue M, Nagamura F, Murakami Y, Seiki M, **Sakamoto T\***. Control of metastatic niche formation by targeting APBA3/Mint3 in inflammatory monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017;114:E4416-E4424. doi: 10.1073/pnas.1703171114.
  8. Nakaoka HJ, Tanei Z, Hara T, Weng JS, Kanamori A, Hayashi T, Sato H, Orimo A, Otsuji K, Tada K, Morikawa T, Sasaki T, Fukayama M, Seiki M, Murakami Y, **Sakamoto T\***. Mint3-mediated L1CAM expression in fibroblasts promotes cancer cell proliferation via integrin  $\alpha 5\beta 1$  and tumour growth. *Oncogenesis*. 2017;6:e334. doi: 10.1038/oncsis.2017.27.
  9. Uematsu T, Fujita T, Nakaoka HJ, Hara T, Kobayashi N, Murakami Y, Seiki M, **Sakamoto T\***. Mint3/Apba3 depletion ameliorates severe murine influenza pneumonia and macrophage cytokine production in response to the influenza virus. *Sci Rep*. 2016; 6:37815. doi: 10.1038/srep37815.
  10. Huai W, Song H, Yu Z, Wang W, Han L, **Sakamoto T**, Seiki M, Zhang L, Zhang Q, and Zhao W\*. Mint3 potentiates TLR3/4- and RIG-I-induced IFN- $\beta$  expression and antiviral immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Oct 18;113(42):11925-11930. doi: 10.1073/pnas.1601556113
  11. Yoshino S, Hara T, Nakaoka HJ, Kanamori A, Murakami Y, Seiki M, **Sakamoto T\***. The ERK-signaling target RNF126 regulates anoikis resistance in cancer cells by changing the mitochondrial metabolic flux. *Cell Discov*. 2016 Jul 26;2:16019. doi: 10.1038/celldisc.2016.19.
  12. Nakaoka HJ, Hara T, Yoshino S, Kanamori A, Matsui Y, Shimamura T, Sato H, Murakami Y, Seiki M, **Sakamoto T\***. NECAB3 Promotes Activation of Hypoxia-inducible factor-1 during Normoxia and Enhances Tumorigenicity of Cancer Cells. *Sci Rep*. 2016 Mar 7;6:22784. doi: 10.1038/srep22784.

〔学会発表〕(計 53 件)

国外学会：

1. RNA exosome component EXOSC9 is indispensable for stress resistance in breast cancer. ポスター、Seiko Yoshino, Yuya Fukui, Yusuke Matsui, Motoharu Seiki, Yoshinori Murakami, Jun-ichiro Inoue, **Takeharu Sakamoto**, 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research, 2019. 2.11, 国外 .
2. **Takeharu Sakamoto**. 口頭、Control of metastatic niche formation by targeting APBA3/Mint3 in inflammatory monocytes. 7th International Conference on Tumor-Host Interaction and Angiogenesis. Ascona, Switzerland, 2017/6/27.
3. **Takeharu Sakamoto**. ポスター、Control of metastatic niche formation by targeting APBA3/Mint3 in inflammatory monocytes. 7th International Conference on Tumor-Host Interaction and Angiogenesis. Ascona, Switzerland, 2017/6/26.

他 1 件

## 国内学会：

1. HIF 活性化分子 Mint3 によるがん微小環境制御機構の解明と創薬への応用、(招待講演) 口頭、坂本毅治、日本薬学会第 139 年会、2019.3.23、国内。
2. RNA exosome complex 9 (EXOSC9)はがん細胞のストレス耐性と造腫瘍能に必要である、ポスター、坂本毅治、芳野聖子、福井優也、清木元治、村上善則、井上純一郎、第 41 回日本分子生物学会年会、2018.11.28、国内。
3. 化学療法誘導性肺転移における宿主 Mint3 の役割、ポスター、坂本毅治、福井優也、鄭裕花、村上善則、井上純一郎、第 16 回 がんとハイポキシア研究会、2018.11.09、国内。
4. 腫瘍関連マクロファージにおける Mint3 の役割、口頭、坂本毅治、第 77 回日本癌学会学術総会、2018/9/27、国内。
5. 腫瘍関連マクロファージの分極化に関わる分子機構の解析、口頭、坂本毅治、第 27 回 日本がん転移学会 学術集会・総会、2018.7.20、国内。
6. Mint3 を標的としたがん治療の可能性、ポスター、坂本毅治、林哲郎、福井優也、鄭裕花、村上善則、清木元治、第 6 回 がんと代謝研究会、2018.5.10、国内。
7. 腫瘍関連マクロファージにおける Mint3 の役割、ポスター、坂本毅治、林哲郎、福井優也、村上善則、第 15 回 がんとハイポキシア研究会、2017/11/11、国内。
8. 若手研究者から見たがん微小環境研究の展望、(招待講演) 口頭、坂本毅治、第 76 回日本癌学会学術総会、2017/9/28、国内。
9. 膜型プロテアーゼ MT1-MMP の非プロテアーゼ活性によるがん微小環境制御機構の解明、(招待講演) 口頭、坂本毅治、第 76 回日本癌学会学術総会、2017/9/28、国内。
10. Mint3 は膀胱癌細胞の細胞増殖を制御する、ポスター、金森茜、中岡寛樹、林哲郎、村上善則、坂本毅治、第 76 回日本癌学会学術総会、2017/9/28、国内。
11. がん微小環境の制御に関わる分子機構の研究、(招待講演) 口頭、坂本毅治、第 26 回 日本がん転移学会学術集会・総会、2017/7/28、国内。
12. Mint3 は解糖系を介してがん転移性ニッチを形成する、口頭、坂本毅治、第 5 回 がんと代謝研究会、2017/7/14、国内。
13. Mint3 は線維芽細胞において LICAM 発現を誘導することでインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を介したがん細胞増殖と造腫瘍能を促進する、口頭、坂本毅治、清木元治、第 21 回 日本がん分子標的治療学会学術集会、2017/6/15、国内。
14. がんおよび炎症性疾患における HIF 活性化分子 Mint3 の役割、口頭、坂本毅治、原敏朗、中岡寛樹、金森茜、清木元治、村上善則、第 39 回日本分子生物学会年会、2016/11/30、国内。
15. Mint3 は線維芽細胞において LICAM 発現を誘導することでインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  を介したがん細胞増殖と造腫瘍能を促進する、ポスター、坂本毅治、中岡寛樹、種井善一、金森茜、清木元治、村上善則、第 14 回 がんとハイポキシア研究会、2016/11/4、国内。
16. ERK シグナル標的分子 RNF126 はミトコンドリアへの代謝フラックスを変えることでアノイキス抵抗性を制御する、口頭、坂本毅治、芳野聖子、中岡寛樹、金森茜、清木元治、村上善則、第 75 回日本癌学会学術総会、2016/10/8、国内。
17. ERK シグナル標的分子 RNF126 はミトコンドリアへの代謝フラックスを変えることでがんのアノイキス耐性を制御する、ポスター、坂本毅治、芳野聖子、原敏朗、中岡寛樹、金森茜、清木元治、村上善則、文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会、2016/9/16、国内。

18. 線維芽細胞における Mint3 が HIF-1 を介してがん細胞の増殖を促進する, ポスター、坂本毅治、第 4 回低酸素研究会、2016/7/23, 国内.
19. RNF126 はミトコンドリアへの代謝フラックスを変化させることでがん細胞のアノキス耐性を制御する、口頭、坂本毅治、清木元治、第 25 回日本がん転移学会学術集会・総会、2016/7/21, 国内.
20. 水酸化シグナルによる低酸素応答とその制御,(招待講演)口頭、坂本毅治、第 16 回日本抗加齢医学会総会、2016/6/10, 国内.
21. Mint3 を標的としたがん微小環境の制御,(招待講演)口頭、坂本毅治、清木元治、第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2016/5/31, 国内.

他 28 件

〔図書〕(計 1 件)

1. 医試薬出版株式会社 医学のあゆみ、「MMP を標的にしたがん微小環境の制御」、坂本毅治、Vol. 258 No. 1、107-111, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

東京大学医科学研究所 分子発癌分野 HP

<https://www.traf6.com/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。