

令和元年 8月30日現在

機関番号：82601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19503

研究課題名(和文)脂質による新たな癌幹細胞の増殖機構の解明

研究課題名(英文)A novel role of lipid mediators in cancer stem cells

研究代表者

諫田 泰成 (Kanda, Yasunari)

国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・部長

研究者番号：70510387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：乳癌はホルモン受容体やHER2の発現により分類されるが、ホルモン受容体やHER2などのないトリプルネガティブタイプは標的分子がないため、有効な分子治療薬が存在していない。近年、「癌幹細胞」と呼ばれる幹細胞の性質を有する細胞を起源として、癌細胞が形成されることが明らかとなってきた。そこで、我々は乳癌幹細胞を用いて脂質の網羅的な解析を行った結果、LPAなどの脂質がトリプルネガティブタイプ由来の乳癌幹細胞に高発現していることを見出した。実際、LPA刺激によりインターロイキン8の産生を介して乳癌幹細胞の増殖が誘導された。以上の成果により、癌幹細胞の脂質シグナルを標的とした新たな治療戦略が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌は女性で罹患数・死亡数ともに最も高いがんであり、近年の治療法の進歩にも関わらず、いまだ乳癌の再発や転移を克服できておらず、医学的にも社会的にも大きな問題である。乳癌の中でもトリプルネガティブタイプは予後が悪いが、有効な分子治療薬がない。本研究で我々はトリプルネガティブタイプの乳癌の新たな標的として、脂質の一種であるLPAシグナルを見出した。さらに、乳癌のもととなる癌幹細胞に発現量が多い他の脂質の同定にも成功している。これらの成果をもとに、乳癌に対する新たな創薬の標的分子が明らかとなり、治療法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Breast cancer is the leading cause of cancer death in women worldwide. Especially, there are no available targeted therapies against triple-negative (TN) type of breast cancer, due to lack of hormone receptors and HER2 amplification. Growing evidence suggests that breast cancers originate from breast cancer stem cells (BCSCs), which is a minor population of cells that display stem cell properties. Here, using lipid screening in BCSC model, we have identified a role for a lipid mediator Lysophosphatidic acid (LPA) in TN-type CSC expansion. By using deep sequencing data, we identified IL-8 as a downstream signaling for BCSC regulation. We have currently performed lipidomics using BCSCs and found several lipids which are enriched in BCSCs. Taken together, our findings provide new insights into the lipid-mediated regulation of TN-type BCSCs.

研究分野：薬理学

キーワード：乳癌 脂質 幹細胞 自己複製 増殖機構 ALDH

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

1. 研究開始当初の背景

乳癌は、日本女性の 10 人に 1 人が罹患するがんであり、罹患数・死亡数ともに年々増加傾向である。乳癌は受容体の発現パターンにより、エストロゲン受容体またはプロゲステロン受容体を発現するルミナルタイプ、HER2 受容体を過剰発現する HER2 陽性タイプ、二つの女性ホルモン受容体と HER2 受容体のいずれもが陰性のトリプルネガティブタイプなどに分類される。ルミナルタイプおよび HER2 陽性タイプは受容体を標的とした治療薬が使用されているが、トリプルネガティブタイプには標的とする受容体が発現していないため、有効な分子治療薬がないのが現状である。そのため、従来の細胞毒性作用を有する抗癌剤が使用されているが、再発や転移が多く予後も不良であり、医学的にも社会的にも大きな問題となっている。

近年、「癌幹細胞」と呼ばれる幹細胞の性質を有する細胞を起源として、癌細胞が形成されることが明らかにされつつある。癌幹細胞は既存の薬剤に対して抵抗性を示すため、薬剤による治療後に残存した癌幹細胞が再発・転移に関わるモデルが提唱されている。そのため、癌幹細胞を除去することは、癌の根治療法を開発する上で非常に重要である。

我々はこれまでヒト細胞株を用いて、アルデヒド脱水素酵素 (ALDH) のアッセイをおこない、ALDH 陽性細胞は乳癌幹細胞の特性を有することなどを明らかにしてきた (BBRC 2010; Current Drug Target 2012)。低接着ディッシュなどで形成されるスフィアも同様に癌幹細胞のモデルとしてよく研究されている。

トリプルネガティブタイプの乳癌は ALDH、スフィア形成能、CD44 陽性 CD24 陰性の分画などの手法により、ルミナルタイプなどよりも多くの乳癌幹細胞が含まれることが報告されており、乳癌幹細胞と癌の再発・予後不良の関連が強く示唆される。従って、トリプルネガティブタイプの乳癌において癌幹細胞を標的とした新たな治療薬が期待される。しかしながら、癌幹細胞の増殖機構やシグナル経路は十分に明らかになっておらず、癌幹細胞を直接標的とする癌の根治療法はいまだ実現していない。

2. 研究の目的

我々はすでにリゾリン脂質の 1 種であるスフィンゴシン-1-リン酸が MCF-7 細胞由来乳癌細胞に含まれる癌幹細胞の増殖を誘導することを世界に先駆けて報告してきた (Nature Communications, 2014)。

そこで、本研究では MDA-MB-231 細胞由来の乳癌幹細胞を用いて増殖を誘導する脂質のスクリーニングを行い、乳癌幹細胞に対する新たな治療薬の標的分子を探索し、さらにそのメカニズムを検討した。

3. 研究の方法

1) 細胞培養

ヒトのトリプルネガティブタイプ乳癌細胞株 MDA-MB-231 (ATCC より購入) は 10% FBS を添加した DMEM 培地で培養した。

2) ALDH アッセイ

MDA-MB-231 細胞に含まれる乳癌幹細胞は ALDEFLUOR (STEMCELL Technologies) を用いて、ALDH 陽性細胞として同定した。具体的には、ALDH の基質である

BODIPY-aminoacetaldehyde を細胞に添加し、37、30 min 処理後、代謝産物である BODIPY-aminoacetat の蛍光を FACS Aria II (BD Bioscience) で解析した。ALDH 選択的阻害剤である diethylaminobenzaldehyde 存在下で処理した細胞の蛍光と比較して、ALDH 陽性細胞と陰性細胞をゲートして、ソーティングした。

3) マンモスフィアアッセイ

MDA-MB-231 細胞を 20 ng/ml bFGF (R&D), N₂ supplement (Life technologies) を含む無血清培地で低接着 6 ウェルプレート (コーニング) に播種し、形成したマンモスフィアの数を集計した。

4) RNA-seq

MDA-MB-231 細胞から miRNeasy mini kit (Qiagen) を用いて total RNA を調製し、次世代シーケンスにより RNA-seq データを取得した。次世代シーケンスのデータはタカラバイオの受託サービスを用いて取得した。

5) qPCR

TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA を抽出した。QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen)、ABI PRISM 7900HT を用いて qPCR を行った

6) LS/MS

秋田大学の Lipid 解析サービスにより、MDA-MB-231 細胞の ALDH 陽性および陰性細胞の lipid を網羅的に解析した。

4. 研究成果

1) LPA 刺激による乳癌幹細胞の増殖

既存のリゾリン脂質を用いて、ALDH 陽性細胞の増殖を誘導する分子の探索を網羅的に行った。その結果、リゾホスファチジン酸 (Lysophosphatidic acid; LPA) 刺激により濃度依存的に ALDH 陽性細胞の増殖が認められ、10 μM で最大の効果が得られた (図 1)。

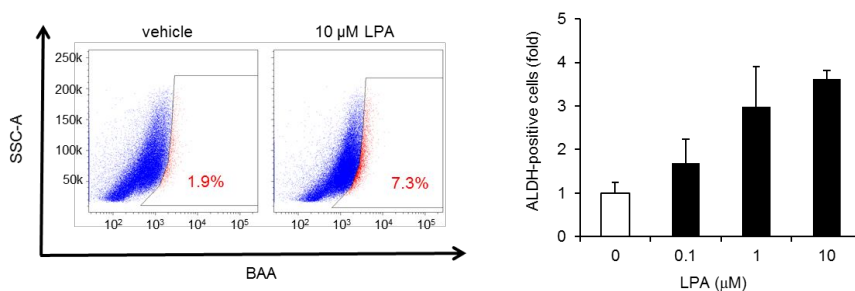


図 1. LPA 刺激による ALDH 陽性細胞の増加

ALDH アッセイの結果を確認するために、別の乳癌幹細胞の評価法であるマンモスフィアアッセイを行い、LPA 刺激によってマンモスフィア形成の亢進が認められた (図 2)。

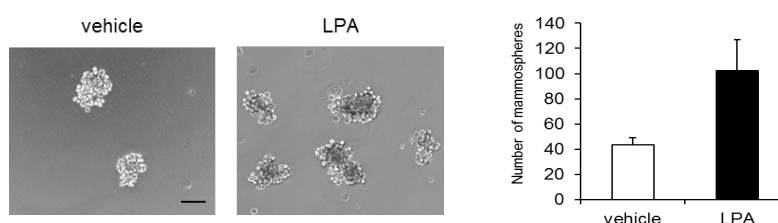


図 2. LPA 刺激によるマンモスフィア形成能の亢進

2) ALDH 陽性細胞における LPA 代謝酵素の解析

ALDH 陽性細胞における LPA の作用を確認するため、LPA 産生酵素である Autotaxin (ATX) と LPA 分解酵素 (LPPs) にフォーカスをあてて、その遺伝子発現を解析した。その結果、ALDH 陽性細胞において ALDH 陰性細胞と比較して、ATX の発現が亢進し、LPPs の発現が減少することが認められた (図 3)。

従って、LPA による乳癌幹細胞の制御機構が強く示唆された。

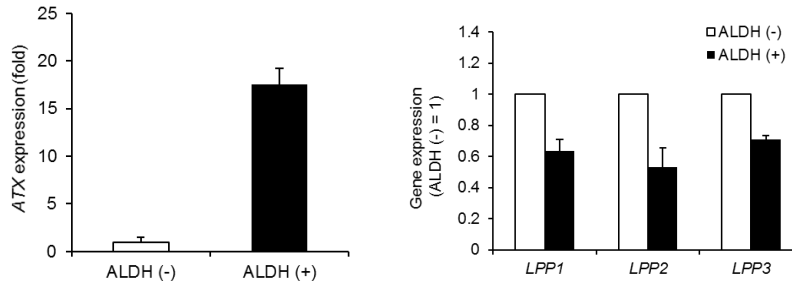


図 3. ALDH 陽性細胞と陰性細胞における LPA 代謝酵素の発現

3) RNA-seq による LPA の標的遺伝子の同定

次に、LPA の下流で亢進する遺伝子の探索を行った。幹細胞シグナルである Notch, Hedgehog, Wnt の標的遺伝子として、それぞれ Hes1, Gli1, Dkk1 の遺伝子発現を解析したところ、LPA 刺激による影響は特に認められなかった (図 4)。同様に、幹細胞の自己複製に関する転写因子である Oct3/4, Nanog, Sox2, c-Myc の遺伝子発現に対する影響を検討したが、LPA 刺激によって発現上昇するような因子は認められなかった (図 4)。すでにスフィンゴシン-1-リン酸によって Notch の活性が誘導されること明らかにしてきたが (Nature Communications, 2014)、LPA は別のシグナルを介して癌幹細胞の増殖を誘導することが示唆された。

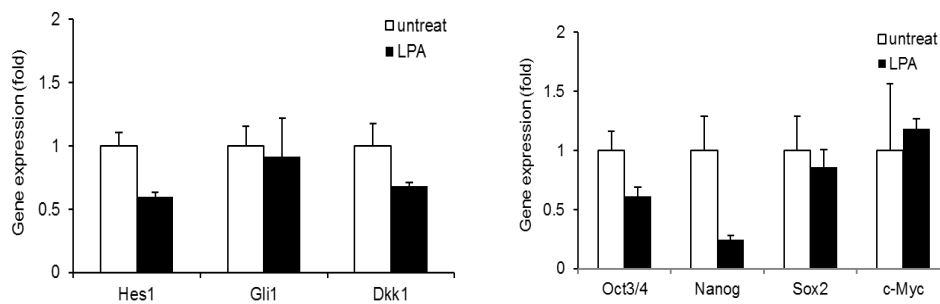


図 4. LPA 刺激による幹細胞シグナルの発現

そこで、LPA に選択的な下流の標的分子を探索するために、次世代シーケンサーを用いて RNA-seq を行った。LPA 刺激によって発現が 2 倍以上亢進した遺伝子を選択して、Gene Ontology (GO) 解析を行った結果、細胞増殖、炎症、遊走、免疫応答などに関わる遺伝子が多く含まれていることが明らかになった (図 5)。

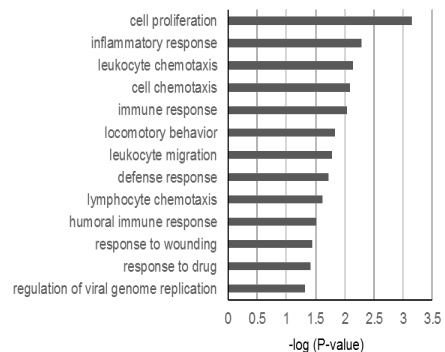


図 5. LPA 刺激により亢進した遺伝子の GO 解析

さらに、LPA 刺激によって亢進している遺伝子の中からオートクリン・パラクリンとして作用する液性因子を選定し、最も発現が亢進していたサイトカイン IL-8 に着目した。RNA-seq の結果をリアルタイム PCR および ELISA で確認したところ、LPA 刺激によって IL-8 の亢進が認められた。

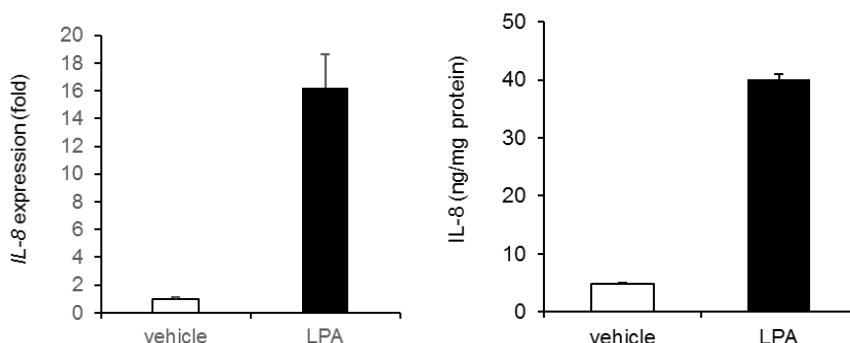


図 6. LPA 刺激による IL-8 の遺伝子発現と ELISA による検証

IL-8 が乳癌幹細胞の増殖に関与していることを確認するために、MDA-MB-231 細胞を IL-8 で刺激し、ALDH アッセイを行った。その結果、予想通り、濃度依存的に ALDH 陽性細胞の増殖が認められた。また、LPA 刺激による ALDH 陽性細胞の増殖は、IL-8 受容体のアンタゴニストによって阻害された。従って、LPA の下流で IL-8 の産生が乳癌幹細胞の増殖に関与していることが示唆された。これらの結果により、LPA/IL-8 シグナルはトリプルネガティブタイプの乳癌に対して新たな治療薬の標的分子であることが示唆された。

現在、乳癌幹細胞において IL-8 の発現制御機構を検討している。

4) LS/MS による新たな脂質の探索

上記の結果ならびに癌と脂質に関する既存の報告などをもとに、乳癌幹細胞に豊富に存在する他の脂質があるのではないかと考えて、ALDH 陽性細胞と ALDH 陰性細胞を用いて網羅的な Lipidomics を実施した。その結果、ALDH 陽性細胞に選択的に発現している新たな脂質の同定に成功した。また、ルミナルタイプの乳癌幹細胞と比べて、トリプルネガティブタイプの乳癌幹細胞に選択的に発現している結果を得ており、非常に興味深い。

現在、その代謝酵素や受容体などの検証を進めている。これらの分子やそのシグナル経路をもとにして、革新的な医薬品の創製につながることを期待される。

5 . 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 0 件)

(学会発表)(計 10 件)

1. 平田尚也、山田茂、諫田泰成: リゾホスファチジン酸によるトリプルネガティブ型乳癌幹細胞の増殖機構、第 136 回日本薬理学会関東部会、東京、2017. 7. 8
2. 平田尚也、山田茂、中林一彦、秦健一郎、諫田泰成: リボソームプロファイル法を用いた乳癌幹細胞の増殖制御因子の探索、第 137 回日本薬理学会関東部会、東京、2017. 10. 28

3. Yasunari Kanda, Naoya Hirata, Shigeru Yamada, and Daiju Yamazaki. Translational Control of Cancer Stem Cells. 62nd Biophysics Annual Meeting, San Francisco, USA, 2018.02
4. 平田尚也、山田茂、中林一彦、秦健一郎、諫田泰成: リボソームプロファイル法による乳癌幹細胞の増殖制御の解析、第 17 回日本再生医療学会総会、横浜、2018. 3. 21.
5. Naoya Hirata, Shigeru Yamada, Kazuhiko Nakabayashi, Kenichiro Hata, Yasunari Kanda: Global analysis of translational regulation in cancer stem cells using ribosome profiling. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (WCP2018), Kyoto, 2018. 7. 5.
6. 諫田泰成: 癌幹細胞を用いたドラッグ・リプロファイリングの可能性、第 20 回応用薬理シンポジウム、東京、2018.8.4.
7. 平田尚也、山田茂、諫田泰成: 乳癌幹細胞の翻訳制御をもとにしたドラッグリポジショニングに向けた取り組み、第 4 回次世代を担う若手のためのレギュラトリーサイエンスフォーラム、東京、2018.9.15.
8. Naoya Hirata, Shigeru Yamada, Yasunari Kanda: Novel mechanism of lung cancer stem cells growth by tobacco-specific nitrosamine NNK. CBI 学会 2018 年大会、東京、2018.10.9.
9. Naoya Hirata, Shigeru Yamada, Kazuhiko Nakabayashi, Kenichiro Hata, Yasunari Kanda: Drug Repositioning approaches for breast cancer stem cells. 第 92 回日本薬理学会年会、大阪、2019. 3. 16.
10. Naoya Hirata, Shigeru Yamada, Yasunari Kanda: Translational control of breast cancer stem cells. Gordon Research Conference – Stem Cells and Cancer. Ventura, CA. 2019.03.25.

〔図書〕(計 0 件)

〔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

<http://www.nihs.go.jp/phar/phar-j.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

なし