

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：82601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04107

研究課題名(和文) 癌幹細胞の新たな翻訳制御機構と創薬への展開

研究課題名(英文) Translational control in cancer stem cells and drug discovery

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) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、既存の薬剤に対して抵抗性を示す「癌幹細胞」の存在が明らかになり、癌を根治するためには癌幹細胞を標的とした新たな治療薬の開発が期待されているが、いまだ実現していない。そこで我々はALDH活性を指標に乳癌幹細胞のアッセイ系を開発し、リボソームフットプリント法により翻訳が亢進している分子を網羅的に探索した。その結果、癌幹細胞において翻訳の亢進が誘導される新規因子を明らかにした。この分子を過剰発現させると癌幹細胞の増殖が起こり、逆にノックダウンすると癌幹細胞の増殖が抑制された。さらに、乳癌患者由来の臨床検体でも同様の結果を得た。以上の結果から、癌幹細胞を標的とする治療薬開発の技術基盤を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌は遺伝子発現などによる分類が確立され、ルミナル型とHER2型は受容体に対する分子標的治療薬が確立しているのに対して、トリプルネガティブ型は有用な分子標的治療薬が開発されておらず予後も悪い。他の癌に比べて罹患年齢も若く、社会的にも重要な課題である。そこで本研究では、癌の源となる癌幹細胞を用いて、翻訳制御の観点から治療薬の標的分子の探索を行った。リボソームフットプリント法を用いて、トリプルネガティブ型乳癌における癌幹細胞の翻訳制御を詳細に解析し、癌幹細胞において翻訳が亢進している因子を新たに同定することに成功した。以上の結果から、翻訳制御に基づき新たな抗癌剤の技術基盤を構築した。

研究成果の概要(英文)：Cancers are originated from a small population which is called cancer stem cells (CSCs). CSCs can be identified by aldehyde dehydrogenase (ALDH) assay. However, growth regulation of CSCs is not fully understood. In the present study, we examined translational control of CSCs. To explore the genes which translation is upregulated in ALDH-positive cells in breast cancer cell line, we performed ribosome profiling that provides genome-wide maps of protein synthesis by quantifying ribosome-protected mRNA using the deep sequencing. As a result, we determined approximately 1000 translation products in ALDH-positive cells. Especially, we identified gene X in the ALDH-positive cells. Overexpression of gene X induced increase in ALDH-positive cells. Conversely, knockdown of gene X inhibited the ALDH-positive cells. In addition, gene X was enhanced in ALDH-positive cells from patients with breast cancer. These data suggest that gene X plays a role in translational regulation in CSCs.

研究分野：薬理学

キーワード：がん がん幹細胞 翻訳 リボソームフットプリント 次世代シーケンス ALDH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌は、日本人女性が罹患する癌の中で最も多く、生涯に乳癌に罹患する女性は10人に1人となっており、罹患数、死亡数共に年々増加している。他の癌に比べて罹患年齢も若く、社会的にも重要な課題である。

乳癌は、エストロゲン受容体とプロゲステロン受容体が陽性なルミナル型、ヒト上皮成長因子受容体タイプ2 (HER2) が過剰発現している HER2 型、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2 すべてが陰性なトリプルネガティブ型に分類される。ルミナル型と HER2 型は受容体に対する分子標的治療薬が確立しているのに対し、トリプルネガティブ型は有用な分子標的治療薬が開発されておらず、予後が悪い。

この原因の一つとして、トリプルネガティブ型には、既存の薬剤に対して抵抗性を示す「癌幹細胞」が多く存在し、抗がん剤による治療後も数パーセントの癌幹細胞が残存して癌が再発あるいは転移することが考えられている。従って、癌幹細胞を直接標的にする医薬品が期待されるが、いまだ実現していない。

がんにおいて、mRNA の翻訳異常やタンパク質合成の亢進が起こることがよく知られている。例えば、Ras の下流では特定の分子の翻訳が選択的に亢進してがんの悪性化を促進することが報告されており、翻訳制御機構をもとにすれば、がんの新たな治療薬や診断薬の開発につながる可能性が考えられる。

そこで、本研究では、乳癌幹細胞で機能している分子を網羅的に観察するため、リボソームに結合する RNA を次世代シーケンズで網羅的に解析する「リボソームフットプリント法」を用いて、乳癌幹細胞において翻訳が亢進するタンパク質を検討した。その結果、乳癌幹細胞の増殖に関わる新規因子を見出した。今後、癌幹細胞を標的とする治療薬を開発できればトリプルネガティブ型の治療や再発・転移の改善につながることを期待される。

2. 研究の目的

これまで乳癌幹細胞の解析を進めて、翻訳制御因子 X が乳癌幹細胞に高発現していることを明らかにしている (未発表)。そこで、本研究では、リボソームフットプリント法を用いて乳癌幹細胞において翻訳が亢進する分子を同定し、新規の治療標的としての有用性を明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

乳癌細胞株 MCF-7、MDA-MB-231 は American Type Culture Collection (ATCC) より購入し、10%FBS を添加した DMEM 培地 (Sigma) で培養した。正常ヒト乳腺上皮細胞は Lonza より購入し、MEGM 培地 (Lonza) で培養した。患者由来乳癌細胞は Celther から購入し、EpiCult-C Human Medium (Stem Cell Technologies) で培養した。

遺伝子過剰発現株は、プラスミドを FuGENE HD (Promega) でトランスフェクションし、G418 でセレクションして作製した。また、ノックダウン株は shRNA レンチウイルスパーティクル (Sigma) を MCF-7 にインフェクションし、ピューロマイシンでセレクションして、実験に用いた。

(2) 癌幹細胞

細胞株や臨床検体に含まれる乳癌幹細胞は、ALDEFLUOR kit (Stem Cell Technologies) を用いて、ALDH (アルデヒド脱水素酵素) の陽性細胞として検出・単離した。具体的には、ALDH の基質である BODIPY-アミノアセトアルデヒドを細胞に添加し、37℃、30 分間処理後に代謝産物である BODIPY-アミノアセートの蛍光を BD FACSAria II (BD Bioscience) で解析した。ALDH 阻害剤であるジエチルベンズアルデヒド存在下で処理した細胞の蛍光と比較することによりゲートを設定し、ALDH 陽性細胞の単離を行った。

(3) 定量的 PCR

Trizol (Thermo) を用いて細胞から RNA を抽出した。リアルタイム PCR は、Quantitect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen) を用いて反応液を調製し、Quantstudio 7 flex (Thermo) で行った。発現量は GAPDH で補正した。

(4) リボソームフットプリント

TruSeq Ribo Profile Kit (Illumina) を用いてリボソームに結合している RNA を調製し、ライブラリを作製後、次世代シーケンズ解析を行った。翻訳効率は、リボソームに結合している RNA の FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments) 値を RNA シーケンズの FPKM 値で補正することによって算出した。

4. 研究成果

(1) 翻訳制御因子 X による乳癌幹細胞の増殖

乳癌幹細胞の増殖に対する翻訳制御因子 X の影響を確認するために、過剰発現細胞を樹立し、ALDH アッセイによる解析を行った。その結果、ALDH 陽性細胞の増殖が認められた。また、ヌードマウスを用いた腫瘍形成の実験において、翻訳制御因子 X の過剰発現細胞は、親株と比べて腫瘍形成能の亢進が認められた (図 1)。また、過剰発現細胞における ALDH 陽性細胞は、さらに腫瘍形成の亢進が観察された。従って、翻訳制御因子 X が乳癌幹細胞の増殖に関与することが示唆

された。

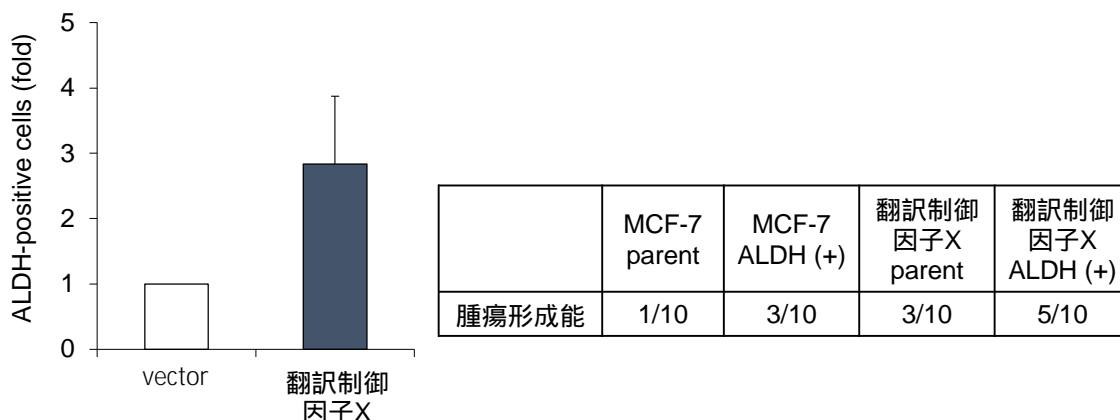


図1. 翻訳制御因子 X による ALDH 陽性細胞の増殖と腫瘍形成能の亢進

(2) 翻訳制御因子 X による翻訳が亢進する因子の探索

翻訳制御因子 X の下流で乳癌幹細胞の増殖に関与する因子を探索するために、リボソームに結合している RNA を網羅的に解析するリボソームフットプリント法を実施した。リボソームに結合している RNA の FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments) 値を RNA シークエンスの FPKM 値で補正する翻訳効率 (Translation Efficiency; TE) を算出して、翻訳が亢進する因子を解析した (図2)。その結果、既存の乳癌に関わる Ras などが含まれていることを確認した。

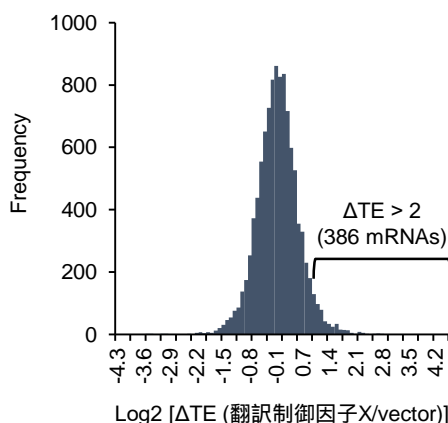


図2. リボソームフットプリント法による標的因子の探索

そこで、翻訳効率 (Translation Efficiency; TE) が亢進していた候補分子を個別に siRNA のノックダウンを行ってスクリーニングした。その結果、4 種類の遺伝子を取得した。その中で、標的因子 A が翻訳制御因子 X の過剰発現による ALDH 陽性細胞の増殖を抑制することを見いだした。逆に、標的因子 A の過剰発現を行ったところ、ALDH 陽性細胞の増殖が認められた (図4)。予想通り、標的因子 A は翻訳制御因子 X の過剰発現細胞ではタンパク質レベルの亢進が認められ、mRNA レベルでは変化が認められなかったことから (図3)、標的因子 A の翻訳が亢進していることを確認した。

以上の結果から、標的因子 A は翻訳制御因子 X によって翻訳が亢進し、癌幹細胞の増殖に関与することを明らかにした。

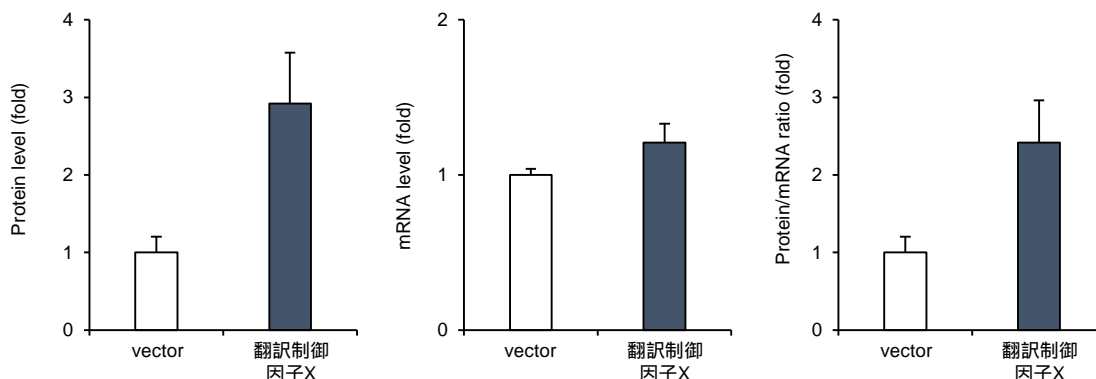


図3. 標的因子 A のタンパク質と mRNA の発現量

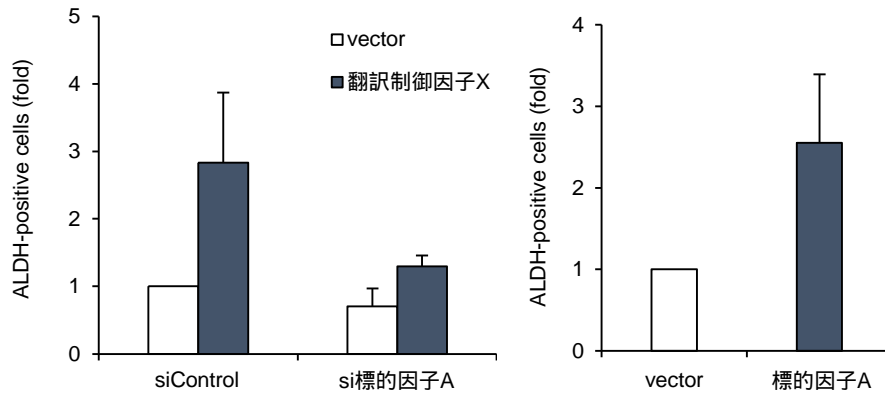


図 4. 標的因子 A による乳癌幹細胞の増殖

(3) 標的因子 A の下流シグナルの解析

標的因子 A の下流で乳癌幹細胞の増殖に関わるシグナルを検討した。癌幹細胞の自己複製には幹細胞シグナルである Notch, Hedgehog, Wnt の経路が関与していることが知られているため、これらの標的遺伝子の発現を解析した。翻訳制御因子 X および標的因子 A の過剰発現細胞株では Notch の標的遺伝子 Hes1、Hedgehog の標的遺伝子 Gli1、Wnt の標的遺伝子 Dkk1 いずれの亢進も認められなかった (図 5)。従って、新たな自己複製シグナルが関与していることが示唆された。

次に、標的因子 A のさらに下流で作用するシグナルを検討するために、翻訳制御因子 X を過剰発現させた細胞、標的因子 A を過剰発現させた細胞、標的因子 A をノックダウンさせた細胞を用いて、RNA シークエンスによる網羅的な遺伝子解析を行った。その結果、共通する遺伝子を 9 種類取得した (図 5)。その中で、一つずつノックダウンによるスクリーニングを行ったところ、最終的に、標的因子 A の下流で乳癌幹細胞の増殖を誘導する遺伝子 B のみ絞り込んだ。実際、遺伝子 B を過剰発現することにより ALDH 陽性細胞の増殖が認められたことから (図 6)、標的因子 A の下流で遺伝子 B が乳癌幹細胞の増殖に関与していることが示唆された。

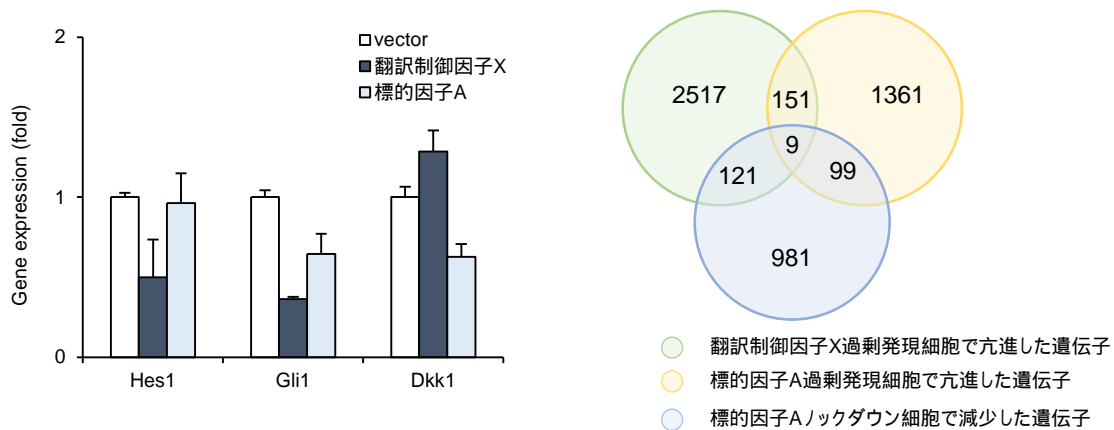


図 5. 標的因子 A の下流で働くシグナルの探索

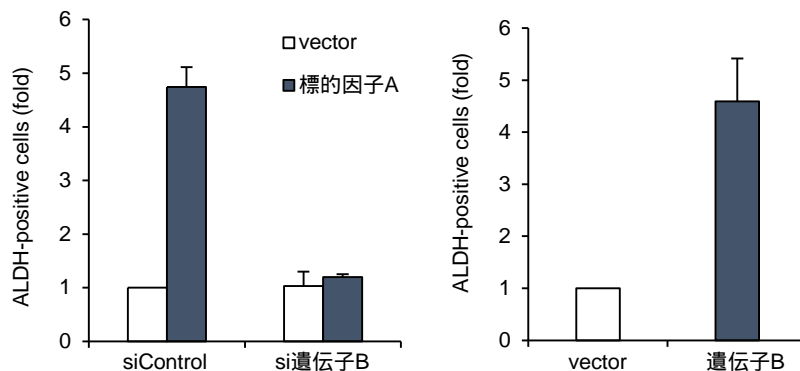


図 6. 遺伝子 B による乳癌幹細胞の増殖

(4) 患者由来の乳癌細胞での遺伝子 B の発現

乳癌細胞における遺伝子 B の発現を解析したところ、興味深いことに、悪性度の高い乳癌細胞株や患者由来の乳癌細胞において選択的な発現亢進が認められた(図7)。さらに、各細胞の ALDH 陽性細胞と ALDH 陰性細胞を単離して遺伝子 B の発現を比較したところ、ALDH 陽性細胞の方が ALDH 陰性細胞よりも発現が亢進することが示唆された(図7)。

以上の結果から、翻訳制御を介して癌幹細胞の増殖を誘導する新たなシグナル伝達経路を明らかにした。

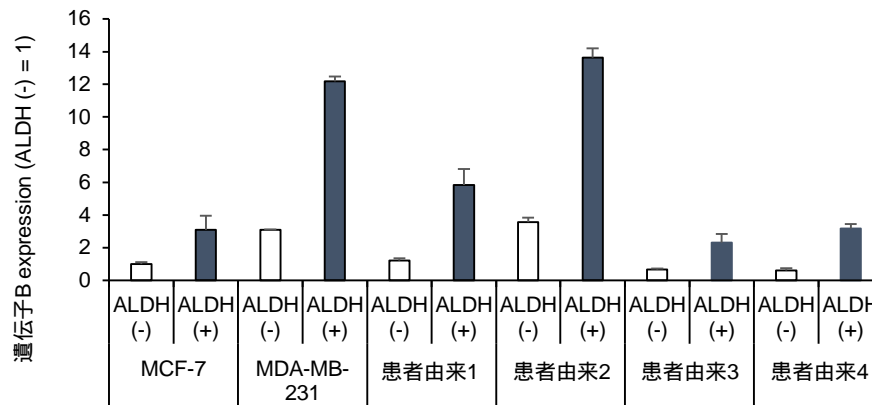


図7. 乳癌細胞株および乳癌患者由来の癌幹細胞における遺伝子 B の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi H, Misawa T, Oba M, Hirata N, Kanda Y, Tanaka M, Matsuno K, Demizu Y.	4. 巻 66
2. 論文標題 Structural Development of Cell-Penetrating Peptides Containing Cationic Proline Derivatives.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem Pharm Bull (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 575-580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-00079	査読の有無 無
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 Misawa T, Kanda Y, Demizu Y.	4. 巻 28
2. 論文標題 Rational Design and Synthesis of Post-Functionalizable Peptide Foldamers as Helical Templates.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Bioconjug Chem	6. 最初と最後の頁 3029-3035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.bioconjchem.7b00621	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 Kobayashi H, Misawa T, Oba M, Hirata N, Kanda Y, Tanaka M, Matsuno K, Demizu Y.	4. 巻 66
2. 論文標題 Structural Development of Cell-Penetrating Peptides Containing Cationic Proline Derivatives.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chem Pharm Bull (Tokyo)	6. 最初と最後の頁 575-580
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/cpb.c18-00079	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 Satsuka Ayano, Kanda Yasunari	4. 巻 20
2. 論文標題 Cardiotoxicity assessment of drugs using human iPS cell-derived cardiomyocytes: From proarrhythmia risk to cardiooncology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Pharmaceutical Biotechnology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1389201020666190628143345	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 Tsukada Kento, Shinki Shono, Kaneko Akiho, Murakami Kazuma, Irie Kazuhiro, Murai Masatoshi, Miyoshi Hideto, Dan Shingo, Kawaji Kumi, Hayashi Hironori, Kodama Eiichi N., Horii Aki, Salim Emil, Kuraishi Takayuki, Hirata Naoya, Kanda Yasunari, Asai Teigo	4. 巻 11
2. 論文標題 Synthetic biology based construction of biological activity-related library of fungal decalin-containing diterpenoid pyrones	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1830
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-15664-4	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11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 平田尚也、山田茂、中林一彦、秦健一郎、諫田泰成
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasunari Kanda, Naoya Hirata, Shigeru Yamada, Daiju Yamazaki
2. 発表標題 Translational Control of Cancer Stem Cells
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of Biophysical Society
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田尚也、山田茂、中林一彦、秦健一郎、諫田泰成
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第137回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田尚也、山田茂、諫田泰成
2. 発表標題 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
3. 学会等名 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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田尚也、山田茂、諫田泰成
2. 発表標題 ドラッグリポジショニングによる乳癌幹細胞に対する薬剤探索への取り組み
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田尚也、山田茂、中林一彦、秦健一郎、諫田泰成
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第17回日本再生医療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasunari Kanda, Naoya Hirata, Shigeru Yamada, Daiju Yamazaki
2. 発表標題 Translational Control of Cancer Stem Cells
3. 学会等名 62nd Annual Meeting of Biophysical Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田尚也、山田茂、中林一彦、秦健一郎、諫田泰成
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第137回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 平田尚也、山田茂、諫田泰成
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第136回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 平田尚也、山田茂、諫田泰成
2. 発表標題 LPA刺激によるカルシウムシグナルを介したトリプルネガティブ型乳癌幹細胞の増殖
3. 学会等名 第141回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平田尚也、山田茂、諫田泰成
2. 発表標題 IL-8の産生を介した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
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----