

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07335

研究課題名(和文) 上皮間葉転換と細胞運命制御因子を標的にした難治性癌治療法の開発

研究課題名(英文) Development of therapeutic strategy targeting epithelial-mesenchymal transition and cell-fate determination factor for malignancy

研究代表者

吉川 清次 (Yoshikawa, Kiyotsugu)

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：40333562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：分子標的治療の開発が急務である癌上皮間葉転換(EMT)標的治療開発を目指して、EMTを可視化する独自スクリーニング系を開発、上皮化誘導shRNAを得た。CD73・PPAR γ 高発現を認めたH-Ras導入乳腺間葉細胞のみPPAR γ 作動薬依存的CD36発現、脂肪的取込み活性の上昇を認めた。肺癌細胞EMTとPPAR γ 刺激により細胞内顆粒の顕著な増加を認めた。メタボローム解析の結果、乳腺上皮細胞での解糖系活性化、EMTによる乳酸発酵抑制、ペントースリン酸経路・ソルビトール経路活性化を認めた。癌幹細胞特性を持つ癌遺伝子導入間葉細胞は上皮と間葉の両方の特徴を併せ持つ細胞であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間葉転換は由来臓器を超えて悪性腫瘍の治療抵抗性、不均一性の原因であるが、分子標的薬・免疫チェックポイント阻害薬が多数開発されてきた現在においても、間葉転換を標的にした治療は未だなく、喫緊の課題である。我々はこれまでの研究で、複数の有望な分子・経路・治療候補を同定してきている。これまでに、上皮化誘導shRNA、細胞運命制御決定因子の間葉転換への関与、脂肪分化誘導の可能性、間葉転換癌細胞に特徴的な代謝経路を見出してきた。さらに独自に開発したEMT/METレポーターを駆使し、上記のアプローチの有効性を検証することによって、未だ根治が達成できない、不均一な悪性腫瘍の根治をもたらす可能性がある。

研究成果の概要(英文)：To develop a molecular-targeted therapy for epithelial-mesenchymal transition (EMT), which is urgently needed, we developed an original screening system to visualize EMT and obtained two epithelialization-inducing shRNAs. Lipid uptake and CD36 expression increased upon PPAR γ activation only in H-Ras-transfected mammary mesenchymal cells, which showed high expression of CD73 and PPAR γ . Lung cancer cells showed a marked increase in intracellular granules upon EMT and PPAR γ stimulation. Metabolomic analysis showed activation of glycolytic pathway in mammary epithelial cells, suppression of lactate fermentation and activation of pentose phosphate pathway and sorbitol pathway by EMT. Oncogene-introduced mesenchymal cells with cancer stem cell properties were found to have both epithelial and mesenchymal metabolic features.

研究分野：分子腫瘍学、薬物治療学

キーワード：上皮間葉転換 間葉転換解除 脂肪分化 メタボローム 上皮化誘導shRNA

1. 研究開始当初の背景

難治性癌 [ホルモン受容体・HER2陰性乳癌 (Triple-Negative Breast Cancer: TNBC)、神経膠芽腫 (Glioblastoma Multiforme: GBM)、膵癌、肉腫] での転移・浸潤・治療抵抗性の原因として上皮の形質が間葉系細胞に転換する上皮間葉転換 (EMT) があり、その制御は喫緊の課題である。申請者は、EMTを巻き戻す間葉上皮転換 (MET) 誘導による上皮分化能と腫瘍増殖抑制効果を併せ持つshRNAの一種、shH1を同定した (平成27 - 28年度科研費・挑戦的萌芽研究)。また、EMTに伴い、発生初期の分化に関わる細胞運命X制御因子であるX遺伝子のRNAスプライシングの変化を同定し、それを抑えることで間葉系難治乳癌の造腫瘍性を抑えることを発見した (論文準備中)。本研究により、由来臓器によらない幅広い分化誘導能をもつMETと、X遺伝子の制御による難治癌の根治療法の治療戦略をぜひ創出したい。2008年からEMTレポーター系の構築を試み、EMT/METの状態をGFP/RFP蛍光タンパクで容易に同定できるdualレポーターを独自に確立した (「高感度人工レポーターを用いた乳癌幹細胞治療標的遺伝子の発現クロニング」 挑戦的萌芽研究, 平成24-26年度)。shRNAライブラリーの大規模スクリーニングにより2種類のshRNA (shP1, shH1) を単離し、shH1にはMET誘導能と増殖抑制能のある事を見出した (「トリプルネガティブ乳癌幹細胞に対するluminal分化誘導療法の確立」 挑戦的萌芽研究 平成27-28年度)。また乳癌幹細胞増殖抑制効果のある遺伝子標的としてX遺伝子の間葉系バリエーションを同定した (論文準備中)。

shP1, shH1 については学会にて定期的に発表している。

2. 研究の目的

治療抵抗性・悪性進展の機序として EMT の報告が多数あるが、間葉系癌細胞に対する分子標的治療は未だ有効なものがない。TNBC では EGFR・MEK 阻害により EMT に特化したシグナル伝達が増強し、抵抗性を獲得する。EMT による足場非依存的増殖能・NFkB シグナル・脱メチル化等の変化は、TNBC・膵癌・膠芽腫 (GBM) 等の難治性の癌に共通する癌幹細胞特性である (Bhat K, et al, Cancer Cell, 24: 331-346)。EMT は、エピゲノム・RNA スプライシング・シグナル伝達経路の点で、神経分化と共通の分子機構を持っている可能性がある。X 遺伝子は、神経発生において非対称細胞分裂 (ACD) との関連が報告されている (Pham K. et al, Frontiers in Immunol., 5:1-14, 2014) が、間葉バリエーションと ACD の機能的関係は未知であり、本研究により EMT・ACD・細胞運命制御・癌幹細胞特性の相互関係の学術的解明が進むと期待される。 MET 誘導・癌幹細胞分化が可能になれば、治療感受性が回復し、浸潤・転移も制御可能となる。これまで同定した shP1・shH1 と X 遺伝子間葉バリエーションは、膠芽腫・膵癌・肉腫等の間葉系癌に対する分化誘導・標的効果が期待できる。昨今癌治療は個々の腫瘍別・遺伝子変異別に細分化されつつあるが、由来組織によらない幅広いスペクトラムで癌細胞を分化誘導し治療に結びつけることが期待できる点で独創的である。

3. 研究の方法

悪性度の指標である間葉転換を来した癌細胞に対して、増殖抑制効果のある short hairpin RNA (shH1)、X 遺伝子について作用機序を解明することを当初の目標としていた。しかし新型コロナウイルス感染症に伴う、研究環境・教育環境の制限に伴い、当初の計画の変更を余儀なくされた。遺伝子組換え実験の遂行についても時間的制限から実験を限定的にせざるを得なくなった。以前の我々の解析では、間葉系乳癌細胞は CD73 陽性であり、間葉系幹細胞の特徴をもつことから、間葉系幹細胞と同様、多系統分化がおこる可能性がある。PPAR γ は脂肪細胞分化に關与する転写因子で、Basal B・間葉系乳癌細胞で高いことから間葉系細胞が脂肪分化能を有する可能性がある。さらに不死化乳癌細胞に上皮間葉転換を誘導すると CD73・PPAR γ 遺伝子発現が上昇することを確認している。そこで乳癌幹細胞モデルを用いて多系統分化誘導を検証することにした。また以前に取得済みである上皮間葉転換と癌遺伝子 H-RasG12V の有無の 4 条件に加えて 2D、3D 培養下に取得した、メタボロームのデータの解析を進め、間葉系癌細胞の代謝的弱点を探索することとした。

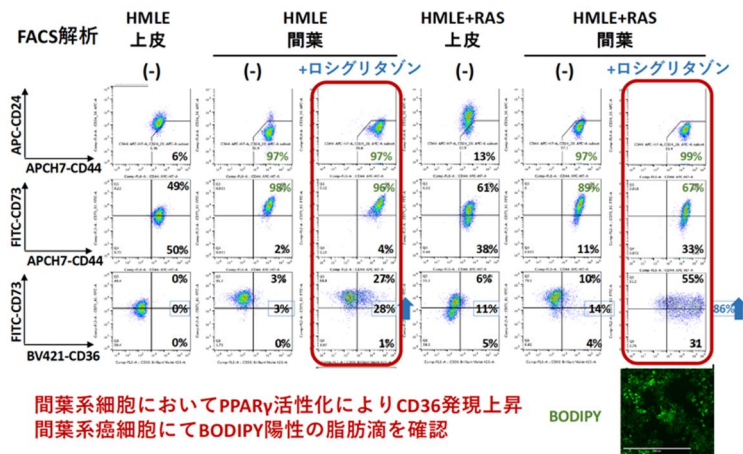
4. 研究成果

癌幹細胞モデルを用いて多系統分化誘導を試み、表面マーカーのフローサイトメーター解析を行った。CD24・CD44・CD73・PD-L1の分化表面マーカーの多重染色フローサイトメーター解析方法を確立し、分化マーカープロファイルの解析より、骨分化・軟骨分化・脂肪分化各培地各細胞のCD44/CD73/CD24プロファイルが変化し、分化状態が変化した可能性が示唆された。

乳癌幹細胞モデル系を用いて脂肪分化誘導を試みたところ、H-Ras癌遺伝子導入間葉系細胞

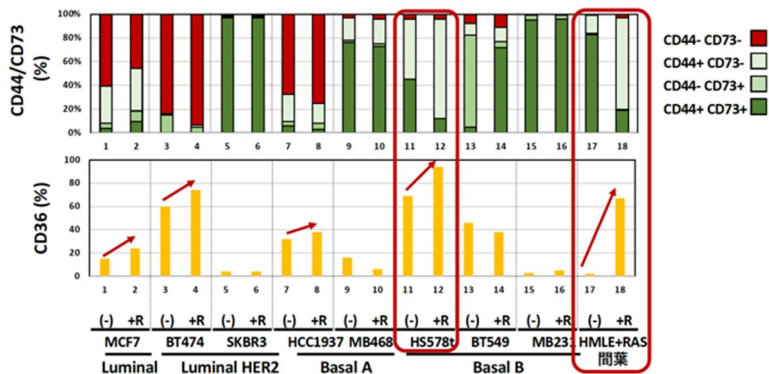
(Ras-Mes細胞)にのみ脂肪酸の取込に関わるCD36陽性細胞の出現とともに脂肪酸取込能力を反映するBODIPY取込み増加を認めた(図1)。現在CD36陽性細胞の表現型を解析中である。CD36陽性細胞での細胞増殖抑制効果を認めた場合は、トリプルネガティブ乳癌の脂肪分化療法への可能性を開くものと考えられる。以上の内容を第18回日本乳癌学会近畿地方会にて演題名「間葉系乳癌細胞の分化制御療法の探求」として発表、優秀賞を受賞した。

【図1】 ヒト乳癌間葉系細胞におけるCD36発現増加

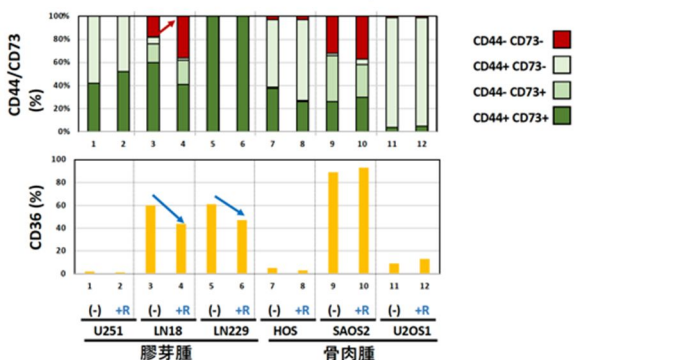


次に乳癌幹細胞モデル HMLE/HMLER 細胞の系で見つかった、EMT 依存性脂肪分化能について、間葉転換を起こすことが知られている膠芽腫・骨肉腫・乳癌・肺癌で調べた。PPAR 作動剤 Rosiglitazone 依存的に脂肪酸受容体 CD36 の発現が上昇するのは、乳癌の中でも限られた間葉系乳癌細胞であることが判明した(図2)。膠芽腫においては、Rosiglitazone によって間葉系マーカー陽性細胞の減少を認めた(図3)。肺癌細胞においては EMT 依存的に CD44/CD73 陽性細胞の増加を認めたが、Rosiglitazone 投与前後で CD36 に変化ない一方、細胞内顆粒の顕著な増加を認めた。

【図2】 乳癌細胞株におけるPPAR γ 活性化の影響



【図3】 膠芽腫・骨肉腫におけるPPAR γ 活性化の影響

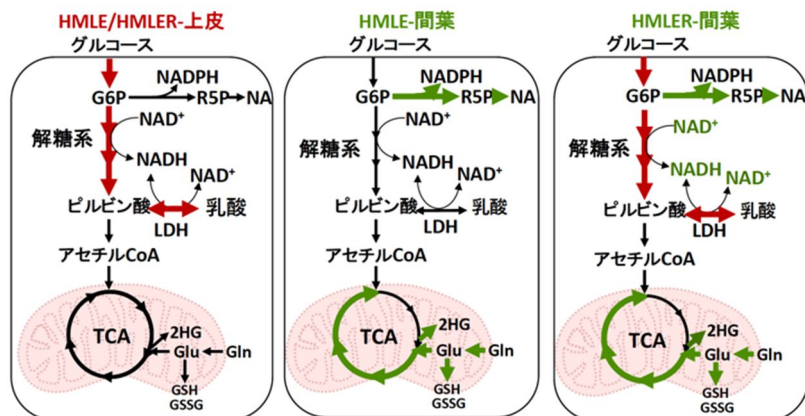


文献検索では、脂肪酸受容体CD36と癌の転移との関係、間葉系乳癌細胞におけるグルタミンの代謝依存性、急性骨髄性白血病における上皮間葉転換の意義、新型コロナウイルス感染症における肺

線維化抑制の意義等を調べ、いずれも癌のみならず、非上皮細胞悪性腫瘍や、新型コロナウイルス感染症の急性炎症と上皮間葉転換に共通し働く分子の関与が疑われた。

上皮間葉転換と H-Ras 癌遺伝子の有無による細胞内代謝の変化をメタボローム解析した。乳癌幹細胞モデル HMLE/HMLER 細胞の上皮細胞と間葉細胞、HMLE 間葉細胞、HMLER 間葉細胞の代謝物解析から、HMLE/HMLER 上皮細胞では、グルコースから乳酸へ向かう経路が活性化されている一方、HMLE 間葉細胞では、乳酸発酵が抑制され、ペントースリン酸経路・ソルビトール経路の活性化を認めた。HMLER 間葉細胞は、HMLE/HMLER 上皮細胞の特徴 (乳酸発酵) と HMLE 間葉細胞の特徴である、ペントースリン酸経路・ソルビトール経路の活性化の両方を認めた。癌幹細胞特性を持つ HMLER 間葉細胞は、代謝的に上皮細胞と間葉細胞の両方の特徴を併せ持つ hybrid 細胞であることが判明した (図 4)。以上の内容は、第 80 回 日本癌学会学術総会にて発表した。

【図4】 乳癌幹細胞代謝モデル



CSCのような細胞であるHMLER-間葉系細胞は、ハイブリッドな代謝状態を持っている

上皮間葉転換と H-Ras 癌遺伝子の有無による大規模な代謝の変化を認めたため、各細胞のトランスクリプトーム解析を RNA シークエンスにより行った。現在、代謝データとの関係を解析中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉川 清次
2. 発表標題 間葉系乳癌細胞の分化制御療法の探求
3. 学会等名 第18回日本乳癌学会近畿地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉川 清次
2. 発表標題 Dynamic metabolic change during epithelial-mesenchymal transition in human mammary epithelial cells.
3. 学会等名 第80回 日本癌学会 学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

同志社女子大学 薬学部 医療薬学科 研究室紹介 薬物治療学研究室 https://www.dwc.doshisha.ac.jp/faculty_dep_info/pharmacy/clinical/lab/clinical_02 「治らないがんのメカニズム解明に向けて」吉川 清次先生 https://www.youtube.com/watch?v=0pQcpgVb1U 教員の紹介（吉川 清次） https://www.nagahama-i-bio.ac.jp/research/ 長浜バイオ大学 教員の紹介（吉川 清次） https://www.nagahama-i-bio.ac.jp/research/

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

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
---------	---------