

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14442

研究課題名（和文）cGMP の癌幹細胞抑制作用の機構解明

研究課題名（英文）The mechanism of the inhibitory effect of cGMP on cancer stem cell properties

研究代表者

熊添 基文（Kumazoe, Motofumi）

九州大学・農学研究院・学術研究員

研究者番号：70737212

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）：これまで数多くの研究から、がん細胞の集団は不均一であり、高い再生能と強い抗がん剤耐性を有するがん幹細胞が、化学療法後の再発や転移に重要であることが示唆されている。しかしながら、このがん幹細胞に対する有効な治療法は未だ確立されておらず、新たな治療法戦略の確立が強くもとめられている。cGMPが、がん幹細胞性を抑制する機構についてスフェロイドアッセイや、コロニーアッセイに基づき解析していった。その結果代謝関連遺伝子xが、関与していることを発見した。さらに、膵臓癌患者データベースに基づく解析を進めたところ、cGMPの関連因子と生存期間に関連があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで数多くの研究から、がん細胞の集団は不均一であり、高い再生能と強い抗がん剤耐性を有するがん幹細胞が、重要であることが示唆されている。しかしながら、このがん幹細胞に対する有効な治療法はない。cGMPが、がん幹細胞性を抑制する機構についてスフェロイドアッセイや、コロニーアッセイに基づき解析していった。その結果代謝関連遺伝子xが、関与していることを発見した。さらに、膵臓癌患者データベースに基づく解析を進めたところ、cGMPの関連因子と生存期間に関連があることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Several studies indicate that cancer stem cells play a important role in the cancer progression and drug resistance.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：cGMP CD44 がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国において増加傾向であるすい臓がんは早期における発見が難しく、発見時にはすでに転移を有しているため、手術や放射線療法といった局所療法に加え、有効な全身療法の確立が強く望まれている。

一方で、すい臓がんにおいて 5-FU・イリノテカン・オキサリプラチンなどを用いた多剤併用などの数々の試みがなされているが、一時的な腫瘍の縮退ののち再発が生じるとされ根治に至ることは少ない。実際に長い間、5 年生存率はほとんど改善しておらず、有効な治療戦略の確立が強く望まれている。

近年がんの治療においてがん細胞中の不均一性が着目されており、がんの転移や、抗がん剤耐性といった治療上の問題は一部の細胞に起因すると考えられている。その中でも、がん幹細胞は薬剤耐性遺伝子とともに高い腫瘍形成能を有し、ごく少数の細胞を移植するだけで腫瘍形成能を示すこと、スフェロイド形成能など、非接着環境下でも生存しうることから、これらの細胞の生残が化学療法後におけるがんの再発や転移の原因と考えられており、すい臓がんにおいても、がん幹細胞に特化した治療戦略の確立が急務とされている。

このようなことから、がん幹細胞に重要な機構について精力的な研究がなされ、beta-カテニンや Oct-4 (octamer-binding transcription factor 4)、ヘッジホッグシグナル伝達経路など、様々な分子機構が提案され、さらにそれらの阻害剤の使用が試みられているが、これらの機構は通常の細胞においても重要であり、その毒性が問題となることが多い。このことから、正常細胞に影響を与えることなく、がん幹細胞を阻害することが出来る、新たな標的及び有効な阻害戦略の確立が必要である。

2. 研究の目的

当研究室ではこれまでに、血管の維持や血圧制御、性的興奮による勃起などに関与しているセカンドメッセンジャーである環状グアノシン-リン酸 cGMP ががん幹細胞性を阻害することを発見し、またその機構としてヒアルロン酸受容体である CD44 の抑制が関与していることを見出している。またその作用機構として、cGMP がこれまでがん抑制遺伝子として報告されていた Forkhead box O3 (FOXO3) の阻害によることで、CD44 の発現が抑制され、結果として、がん幹細胞性の指標であるスフェロイド形成能や転移能が抑制されることを報告している。さらに、腫瘍移植モデルにおいて cGMP 産生を誘導することで、顕著な転移抑制作用を発揮できることを確認している。

しかしながら、その具体的な機構はいまだ不明である。また、全身に対する cGMP 産生誘導は血圧低下などの問題が生じうるが、がん細胞において高発現する 67 kDa laminin receptor を標的とすることで、がん細胞選択的に cGMP 産生誘導を行えることを発見している。しかし、その詳細な機構は不明である。

そこで、今回は 67LR を起点とする cGMP 産生経路における抗がん作用メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

cGMP 産生誘導剤添加時のがん幹細胞性に対する影響について評価するために cGMP 産生誘導剤を添加したすい臓がん細胞における各種メッセンジャーRNA の発現量を DNA microarray により評価を行った解析データから、cGMP のがん幹細胞制御に関連する遺伝子群の抽出を行った。また、ヒトすい臓がん細胞株を cGMP 産生誘導剤で処理したのち、一定時間後にトライリジェントにて mRNA を回収し、cDNA を合成後 Real time PCR にて cGMP 産生によって上昇する遺伝子を評価した。

さらに候補遺伝子 X を siRNA を用いてノックダウンし、X ノックダウン時におけるがん幹細胞性阻害作用をスフェロイドアッセイにて評価した。

具体的にはヒトすい臓がん細胞株を無血清培地に EGF 及び FGF 及び B27 を添加したロズウェルパーク記念研究所 (RPMI) 1640 培地に播種し、低接着性のプレートに播種して、一定期間後にスフェロイド数を評価した。

また、cGMP 産生に高感受性を示す細胞株に、阻害剤ライブラリーによる網羅的スクリーニングを実施するべく、cGMP 産生誘導を行う物質と様々な阻害剤を添加し、細胞内 ATP level を指標に生細胞数を評価することが可能である ATPlite 法によりプレートリーダーを用いて生細胞数への影響を評価した。

4. 研究成果

様々な遺伝子の中で cGMP ががんの代謝酵素群の発現を制御することでがん幹細胞性を抑制することを見出していたので、代謝関連酵素に着目して評価を行ったところ、すい臓がん細胞において cGMP が誘導する糖代謝関連酵素 X を見出した。X を siRNA にてノックダウンした場合に、cGMP によって誘導されるがん幹細胞阻害作用がキャンセルされることから、X が cGMP のがん幹細胞性抑制作用に重要であることを見出した。また、腫瘍組織における X の発現と生存期間について解析を行ったところ、X の発現が高い患者では比較的予後が良好であることを見出した。

さらに、阻害剤ライブラリーに基づく cGMP 産生誘導の抗がん作用を担う因子の探索を行

った結果、新規因子 Y 及び Z を見出した。Y は脂質の代謝に関連する因子であり、脂質関連のシグナルメディエーターを作る機能を有する分子であることから、その機能に着目し、酵素活性に対する影響を評価するとともに、その機能の関与について阻害剤を用いて検証を実施し、有効な結果を得ている。本分子が cGMP によって酵素活性が情報制御されること自体が、我々の調べた限りでは全く新しい知見であり、癌のみならず、他の生理機能への関与についても検討を進めたい。

一方で、Z についてはイオンチャンネルに関係する分子であり、これまでの実験結果から、cGMP の細胞致死機構において重要な機能を果たすことは推察されていたため、阻害剤を用いて検討を行ったが、予想とは全く逆の結果が得られており、慎重な検討が必要とされる。当該イオンは瞬時に動くことが知られており、今後は時間依存的な変化について検討する予定である。

これまでのがん幹細胞における標的は重篤な毒性を伴うものが多く、十数年にわたり実際の治療において多く使われるような薬剤は開発されていない。一方、今回我々が見出した機構は特定の代謝メカニズムの活性化であり、大きな毒性は伴わないことが予想される。今後はより詳細な作用機構の探索を行うとともに、病態モデルを用いて、同様の経路が動くのか研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4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 Bae J, Kumazoe M (Equal contribution), Takeuchi C, Hidaka S, Fujimura Y, Tachibana H.	4. 巻 26
2. 論文標題 Epigallocatechin-3-O-gallate induces acid sphingomyelinase activation through activation of phospholipase C	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 186-1991
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.bbrc.2019.09.102.	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 Bae J, Kumazoe M, Murata K, Fujimura Y, Tachibana H.	4. 巻 64
2. 論文標題 Procyanidin C1 Inhibits Melanoma Cell Growth by Activating 67-kDa Laminin Receptor Signaling.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Nutr Food Res.	6. 最初と最後の頁 e1900986
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/mnfr.201900986.	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 Kumazoe M, Hiroi S, Tanimoto Y, Miyakawa J, Yamanouchi M, Suemasu Y, Yoshitomi R, Murata M, Fujimura Y, Takahashi T, Tanaka H, Tachibana H.	4. 巻 525
2. 論文標題 Cancer cell selective probe by mimicking EGCG.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 974-981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.021.	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 Bae J, Kumazoe M, Fujimura Y, Tachibana H.	4. 巻 64
2. 論文標題 3 Diallyl disulfide potentiates anti-obesity effect of green tea in high-fat/high-sucrose diet-induced obesity.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nutr Biochem.	6. 最初と最後の頁 152-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.10.014.	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
--	---------------------------	-----------------------	----