

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07600

研究課題名(和文) がん幹細胞のリン酸化シグナルの解析による治療標的分子の探索

研究課題名(英文) Signaling of protein phosphorylation in cancer stem cells for therapeutic target molecules

研究代表者

渡辺 崇 (Watanabe, Takashi)

藤田医科大学・がん医療研究センター・准教授

研究者番号：10402562

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)：がん幹細胞は自己複製能と多分化能、強い造腫瘍性、治療抵抗性といった特徴を有し、がんの再発や転移の原因とされている。近年、がん幹細胞が様々な要因で不均一性を示し、環境の変化に適応できる特定のがん幹細胞が再発や転移を担うことが明らかになっている。本研究では、遺伝子導入により人工的に作製されたがん幹細胞や、ヒト乳がん移植モデル(PDX)のがん幹細胞をモデルとした。リン酸化プロテオミクス、遺伝子発現解析、生化学や細胞生物学的な手法を用いて、がん幹細胞の不均一性を決定するリン酸化タンパク質の同定と、その機能解析を行うことで、がん幹細胞の不均一性がもたらす悪性度についての病理診断マーカーを提案する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの不均一性は遺伝的要因と非遺伝的要因により制御される。昨今の次世代シーケンサーの技術革新により遺伝的要因については研究が進んでいるもの、非遺伝的要因は不明な点が多い。本研究は、がんの再発や転移の原因とされているがん幹細胞の不均一性を制御するリン酸化シグナルの一端を明らかにした点で学術的意義が高い。

がん幹細胞はがんの再発や転移の元とされているため、がん幹細胞を駆逐することががんの根治の鍵となる。本研究で明らかになったがん幹細胞の不均一性を制御するリン酸化シグナル、リン酸化タンパク質ががんの悪性度についての病理診断マーカー、治療標的となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells are characterized by their self-renewal and multilineage potential, robust tumorigenicity, and therapy resistance, and are thought to be responsible for cancer recurrence and metastasis. Recently, it has been shown that cancer stem cells exhibit heterogeneity due to various factors and that a subset of cancer stem cells that can adapt to the transformation of their surrounding environment are responsible for cancer recurrence and metastasis. Here, we employed cancer stem cells artificially engineered by introducing genes and cancer stem cells from a human breast cancer transplantation model (PDX) as research models. By combined approaches from phosphoproteomics, gene expression analysis, and biochemical and cell biological methods, we identify phosphoproteins that determine the heterogeneity and characteristics of cancer stem cells and analyze their functions for therapeutic targets in cancer stem cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：がん幹細胞 リン酸化 シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

転移または再発がんの治癒は依然困難であり、再発例では外科的・内科的治療を行ってもその生存率は低い (Greenberg et al J Clin Oncol 1996, Rahman et al Cancer 1999)。がんの転移や再発には、腫瘍中に少数存在するがん幹細胞が関与すると考えられている (Beck and Blanpain Nat Rev Cancer 2013)。がん幹細胞は自己複製能と多分化能、強い造腫瘍性、治療抵抗性といった特徴を有し、腫瘍形成の大元となる。がん幹細胞は治療終了後も緩徐な細胞周期の進行と高い抗アポトーシス能で長い期間に渡って休眠状態で体内に潜伏し、数年あるいは数十年後に再発巣あるいは転移巣で腫瘍組織を再び形成すると考えられている (Aguirre-Ghiso Nature Rev Cancer 2015)。そのため、がん幹細胞を死滅させることが、がんの増殖、再発や転移を防ぎ、がん克服の鍵となる。しかしながら、がん幹細胞の性状がどのようなシグナル基盤で制御されているのか、その分子機構は不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

がん幹細胞の特性や再発・転移に関与する分子はこれまでに数多く同定され、精力的に研究が行われてきた。その結果、我々のがんに対する理解は飛躍的に進んだものの、残念ながらがんの根治に至っていない。そこで本研究では分子活性に着目し、がん幹細胞を特徴づけるリン酸化シグナルを同定、その制御機構を分子レベルで解明することを目的とした。

本研究は細胞内で活性を有するリン酸化シグナルに焦点を絞り、がん幹細胞の「がん幹細胞」としての性質と生存を制御する分子機構を解明し、病理診断マーカーや新規治療標的を提案することを目指す。本研究の成果は、がん幹細胞に対する分子標的治療薬の開発や治療方針を考案する上で有用な基礎情報を提供することができる。

### 3. 研究の方法

我々は、がん患者手術検体を用いた乳がん異種移植マウスを樹立し、肝臓に転移する実験系を確立していた。さらに、原発巣と転移巣のがん幹細胞の遺伝子発現の違いを解析したところ、S100A4 遺伝子の発現が転移巣のがん幹細胞で10倍以上誘導されることを見出していた。その結果をもとに、本研究ではS100A4 過剰発現によるがん幹細胞の特性の変化を、リン酸化シグナルに焦点を絞り、細胞生物学や生化学的に解析した。

さらに、がん幹細胞の大量調整が可能な人工がん幹細胞の不均一性を制御するリン酸化シグナルを、リン酸化プロテオミクスの手法を用いて解析した。

### 4. 研究成果

#### (1). 転移性乳がん幹細胞のリン酸化シグナル解析

我々は、がん患者手術検体を用いて乳がん異種移植マウス (Patient Derived Xenograft) モデルを樹立し、がん細胞の潜在転移を解析する実験系を確立していた。原発巣と転移巣 (肝臓) のがん幹細胞の遺伝子発現パターンを解析したところ、S100A4 の発現量が転移巣のがん幹細胞で30倍近く強く発現していることが明らかになった。そこで、S100A4 を強発現する乳がん細胞 (MDA-MB-231) を作製し、マウスの皮下に移植したところ、肝臓への転移が増強し (図1)、S100A4 ががん幹細胞性を制御することが示唆された。その分子機構を明らかにする目的で、S100A4 の新規結合タンパク質をS100A4 精製タンパク質と組織破砕液を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーによりS100A4 の結合タンパク質を探索したところ intestine cell kinase (ICK) やタンパク質脱リン酸化酵素 LAR などを同定した。さらに、腫瘍形成能を *in vitro* 検討できるがん幹細胞を用いたオルガノイド培養で、S100A4 の過剰発現の影響を解析したところ、S100A4 の過剰発現によって、オルガノイドの増大、すなわち腫瘍形成能が増加することが明らかになった。

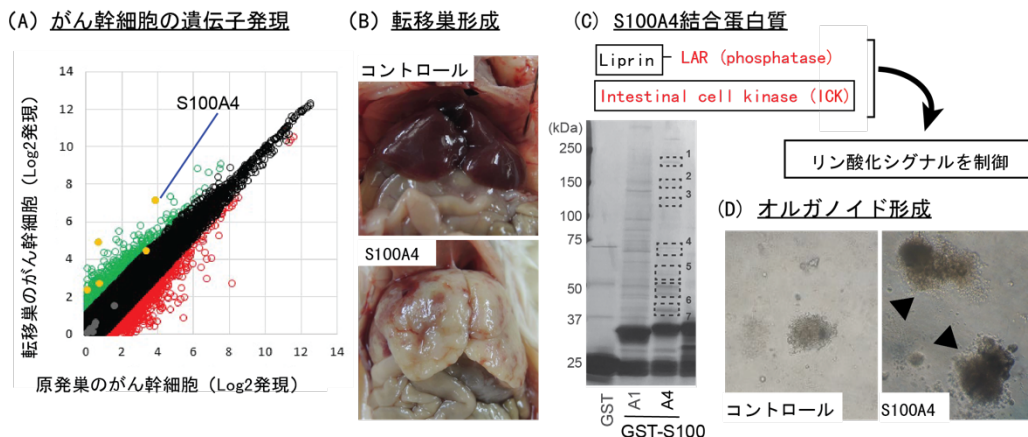


図1 転移性乳がん幹細胞のリン酸化シグナル解析

S100A4 が ICK、LAR をどのように制御するのか明らかにするため、S100A4 と ICK、LAR が複合体を形成するかどうか、精製タンパク質を用いた Pull down、免疫沈降実験、アフィニティーサンプルのイムノブロットを行ったところ、全ての実験系で複合体形成を示唆するデータは取得できなかった。さらに、それらの分子の細胞内局在を細胞の免疫染色やデータベースで比較したが顕著な関連が認められなかった。以上のことから、S100A4 が ICK や LAR を介して、細胞内タンパク質のリン酸化レベルを調整することで、がん幹細胞の腫瘍形成能や転移能を制御していることが考えられた。しかしながら、その分子機構は更なる解析が必要である。

## (2). 人工がん幹細胞を用いたリン酸化シグナル解析

がん幹細胞のリン酸化シグナルの解析をプロテオミクス的手法で解析するために、がん幹細胞を大量に培養することが容易な人工がん幹細胞を利用する研究を展開した。Ink4a/Arf 遺伝子をノックアウトしたマウスから単離した骨髄間質細胞に c-Myc 遺伝子、神経幹細胞に Ras V12 遺伝子を導入することで、骨肉腫がん幹細胞、脳腫瘍がん幹細胞が樹立されている。これらの人工がん幹細胞は特性の異なる亜集団から形成されていることが判明しており、がん幹細胞の不均一性を解析する良いモデルとなる。そこで、質量分析計を用いた網羅的プロテオミクスを用いて、人工がん幹細胞の特性や不均一性を制御するリン酸化シグナルの解析を行なった。

### I. 骨肉腫がん幹細胞のリン酸化シグナル解析

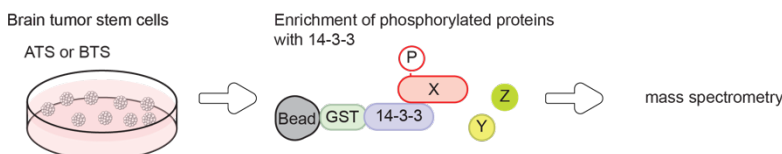
骨髄間質細胞に c-Myc 遺伝子を導入し、Ink4a/Arf 遺伝子を欠損することで、間葉系幹細胞様 A0 細胞と骨・軟骨前駆細胞様 AX 細胞が樹立されている。A0、AX 細胞は腫瘍形成を同様に有するがん幹細胞であるが、A0 細胞は、AX 細胞と比較し、腫瘍形成能が低い反面、高い薬物耐性を示す。これら A0、AX 細胞それぞれの細胞抽出液を準備し、リン酸化セリン・スレオニンに特異的に結合するタンパク質 14-3-3 を用いてリン酸化タンパク質を濃縮し、質量分析計によりリン酸化ペプチド、リン酸化タンパク質を検出した。それにより、A0 細胞と AX 細胞を特徴づける可能性のあるリン酸化タンパク質を多数同定することに成功した。

### II. 脳腫瘍がん幹細胞のリン酸化シグナル解析

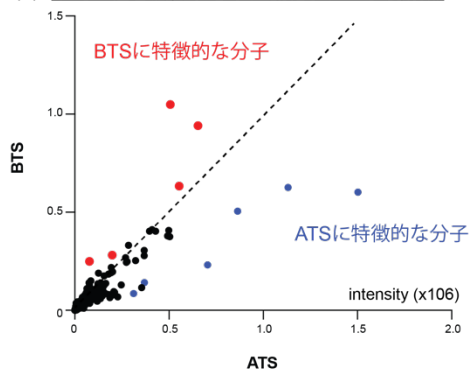
神経幹細胞に恒常的活性化型 Ras V12 を遺伝子導入し、Ink4a/Arf 遺伝子をノックアウトした細胞は、人工脳腫瘍がん幹細胞として機能し、マウス脳内に移植すると多様な細胞種を特徴とするグリオブラストーマを形成する。この脳腫瘍がん幹細胞は、シングルセルクローニングにより代謝特性の異なる 2 種類の細胞、ATS、BTS に大別されることが明らかになっている。ATS、BTS 細胞それぞれの細胞抽出液を準備し、リン酸化セリン・スレオニンに特異的に結合するタンパク質 14-3-3 を用いてリン酸化タンパク質を濃縮し、質量分析計によりリン酸化ペプチド、リン酸化タンパク質を検出した。それにより、ATS 細胞と BTS 細胞を特徴づける可能性のあるリン酸化タンパク質を多数同定することに成功した (図 2)。

その後、得られたリン酸化タンパク質のうち、BTS に特徴的な分子 X について、詳細な解析を進めた。脳腫瘍がん幹細胞内での分子 X の機能を解析するため、分子 X 遺伝子発現を抑制した ATS、BTS 細胞を樹立した。脳腫瘍がん幹細胞の自己複製能と腫瘍形成能を *in vitro* で検証することができるスフェア形成試験を行なったところ、ATS は分子 X の遺伝子発現抑制により影響を受けないものの、BTS では分子 X の遺伝子発現抑制によりスフェアの形成能が著しく減弱することが明らかになった。

#### (A) 脳腫瘍がん幹細胞のリン酸化プロテオミクス解析



#### (B) 不均一性を制御するリン酸化タンパク質候補



#### (C) 候補分子XのKOによるBTSのスフェア形成能の減弱

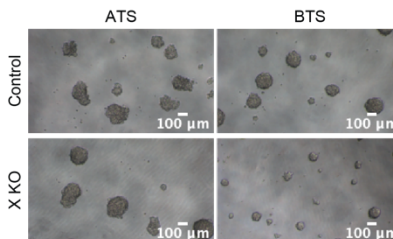


図 2 脳腫瘍がん幹細胞のリン酸化シグナル解析

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizuno Masahiro, Khaledian Behnoush, Maeda Masao, Hayashi Takanori, Mizuno Seiya, Munetsuna Eiji, Watanabe Takashi, Kono Seishi, Okada Seiji, Suzuki Motoshi, Takao Shintaro, Minami Hironobu, Asai Naoya, Sugiyama Fumihiko, Takahashi Satoru, Shimono Yohei	4. 巻 13
2. 論文標題 Adipsin-Dependent Secretion of Hepatocyte Growth Factor Regulates the Adipocyte-Cancer Stem Cell Interaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4238 ~ 4238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13164238	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yanagi Hisano, Watanabe Takashi, Nishimura Tatsunori, Hayashi Takanori, Kono Seishi, Tsuchida Hitomi, Hirata Munetsugu, Kijima Yuko, Takao Shintaro, Okada Seiji, Suzuki Motoshi, Imaizumi Kazuyoshi, Kawada Kenji, Minami Hironobu, Gotoh Noriko, Shimono Yohei	4. 巻 111
2. 論文標題 Upregulation of S100A10 in metastasized breast cancer stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4359 ~ 4370
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14659	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡辺 崇
2. 発表標題 Metabolically distinct glioma stem cells differentially require Girdin for stem cell behavior and tumor development
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柳久乃
2. 発表標題 Investigation of druggable protein phosphorylation in heterogeneity of glioma stem cells
3. 学会等名 第19回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳久乃
2. 発表標題 転移乳がん幹細胞におけるS100A10の発現上昇
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 渡辺崇、柳久乃、船橋靖広	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 5
3. 書名 Medical Technology, 蛍光染色のあれこれ	

〔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
研究分担者	柳 久乃 (Yanagi Hisano)  (40868949)	藤田医科大学・医学部・助教  (33916)	
研究分担者	天野 睦紀 (Amano Mutsuki)  (90304170)	名古屋大学・医学系研究科・准教授  (13901)	
研究分担者	下野 洋平 (Shimono Yohei)  (90594630)	藤田医科大学・医学部・教授  (33916)	

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