

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07612

研究課題名(和文) 晩期再発乳がんにおける休眠トリガーと分子機構の解明

研究課題名(英文) dormancy inducers and molecular mechanisms underlying late recurrence of breast cancer

研究代表者

河野 晋 (Kohno, Susumu)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：30625463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん患者の長期予後を悪化させる晩期再発・転移は、治療抵抗性の休眠がん細胞が再増殖することが原因であるとされている。本研究では、RB不活性化により誘導される休眠細胞の誘導機構の解明を細胞シグナルと代謝の観点から明らかにした。RB不活性化は、細胞周期にかかわる分子の発現低下ならびにエネルギー酸性に関わる分子のリン酸化レベルの変動が一部の細胞において起こることを見出した。また、RB不活性化はRAS成熟に関わるFNTBの発現調節を介して、RAS活性を低下させることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

休眠がん細胞は、増殖シグナルに応答しないため、HER2阻害や内分泌療法の効果は低い。そのため、長期治療後に再発・転移した場合、予後は極めて悪い。休眠状態に移行する機構を明らかにし、その機構を阻害することで休眠細胞が除去することができれば、新たな治療法の確立につながる。

研究成果の概要(英文)：Late recurrence and metastasis, which exacerbate the long-term prognosis of breast cancer patients, are hypothesized to arise from repopulation of therapy-resistant dormant cancer cells. This study aimed to elucidate the mechanisms of dormant cell induction triggered by RB inactivation from the perspectives of cell signaling and metabolism. Our findings demonstrate that RB inactivation downregulates the expression of cell cycle-related molecules and alters the phosphorylation levels of molecules involved in energy metabolism in certain cells. Additionally, our results suggest that RB inactivation attenuates RAS activity through modulation of FNTB expression, which participates in RAS maturation.

研究分野：腫瘍分子生物学

キーワード：RB

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

乳がんでは、術後長期治療を経ての再発・転移が臨床上的問題となっている。主なる長期治療として、HER2ならびにエストロゲン受容体の阻害による細胞増殖シグナルの遮断が行われるが、これらは、「増殖しない休眠がん細胞(休眠細胞)」には効果がない。しかし、長期間潜伏した転移先あるいは原発巣の休眠細胞を消滅させることができれば、乳がんの長期予後を改善することができる。

近年、栄養飢餓によって誘導される細胞の休眠は細胞内部に異常タンパクが蓄積されることが原因であることが示された(Himeoka, Y et al., *Physical Review X* 2017)。栄養飢餓や異常タンパクの蓄積は、オートファジーを誘導し、脂肪酸などの分解代謝を促進する。一方、転移先の休眠細胞の生存維持にオートファジーが寄与することが報告された(Vera-Ramirez L et al., *Nature Commun.* 2018)。これは、十分な栄養が供給されるにも関わらず、休眠細胞では飢餓応答の一種であるオートファジーが起こることを示唆する。つまり、細胞外環境に非依存的な機構によって休眠状態が誘導・維持されていることを示唆する。

難治性乳がん患者検体の全ゲノム解析が進み、がん抑制遺伝子 RB の欠失・変異・発現抑制による不活性化が高頻度に観察されており、その不活性化は無病生存期間と相関する(Witkiewicz AK et al., *Breast Cancer Res.* 2014, Ertel A et al., *Cell Cycle* 2010)。

申請者はこれまでに、乳がんにおける RB 不活性化は、オートファジーを促進する AMPK の活性化により脂肪酸合成から脂肪酸分解への代謝切り替えを誘導し、スフェロイド形成を促進すること等を報告した(Kitajima S, Kohno S et al., *Oncogene* 2017; Li F, Kohno S et al., *Cancer Res.* 2019)。さらに申請者は、乳がんや胃がんなど RB の不活性化が観察される幅広いがん種において、RB の発現抑制が解糖系酵素 PGAM1 (Phosphoglycerate mutase 1) の発現低下を引き起こすことを見出した。PGAM1 の発現低下は、脂肪酸合成に必要な炭素を供給する解糖系の抑制を介して、その合成を減少させる。PGAM1 の発現抑制はまた、2D 培養での細胞増殖を抑制する一方、3D 培養ではスフェロイド形成を促進する。以前に、スフェロイドを再度 2D 培養条件下に戻すと、非常に増殖が遅く未分化な状態を維持することを見出していることから、スフェロイド中には休眠細胞が濃縮されていると考えた(Yoshida A and Kohno S et al., *Oncotarget* 2017)。さらに、RB は OCT4 や SOX2 を直接的に抑制していることも報告されている(Kareta MS et al., *Cell Stem Cell* 2015)。以上のことから、『RB 不活性化は、細胞増殖ではなく、PGAM1 の発現抑制によって代謝活動を低下させ、細胞の休眠(非増殖・未分化化)を促すと推測した。

### 2. 研究の目的

本研究は、RB 不活性化を介した PGAM1 発現抑制による代謝変化ならびに休眠細胞の代謝を解析し、環境非依存的な代謝リプログラミング(代謝改変)による休眠状態への導入機構を明らかにする。さらに、休眠細胞において活性化した代謝経路および、その制御因子の阻害による治療効果を検討することによって、長期予後を改善できる治療の基盤構築を目指す。

### 3. 研究の方法

様々な乳がん細胞並びに正常乳腺上皮細胞における RB を shRNA または gRNA-CAS9 を用いて不活性化した際のフェノタイプについて、種々の細胞シグナルならびに代謝パラメータを測定することで休眠細胞の成立機構に対してアプローチした。特に、生細胞イメージング法を用いた休眠細胞に特異的な代謝経路の探索については、種々の乳がん細胞株や正常乳腺細胞株の内在性 KI67 に GFP タグを CRISPR/Cas9 を用いてノックイン付加し、増殖マーカーとして利用した。PGAM1 ノックアウトならびに RB ノックアウト細胞のスフェロイドより KI67 陽性・陰性細胞をそれぞれ FACS で単離すると同時にバルク細胞でも種々の代謝解析を行った。

### 4. 研究成果

#### 1. RB・PGAM1 ノックアウト乳がん細胞の Characterization

これまでに、RB の発現抑制が PGAM1 の発現低下を引き起こすことを見出している。しかしながら、RB1 の発現抑制をしても細胞増殖に影響はないが、PGAM1 単独でノックアウトすると細胞増殖は著明に低下する。そこで、乳がん細胞株の内在性 Ki67 に GFP タグをノックインし、細胞増殖をモニターできる系を構築した。RB や PGAM1 をノックアウトしても Ki67 のシグナルは失われることはなかった。一方で、スフェロイド培養をした場合には、RB ノックアウト細胞はコントロールと比較してスフェロイド数が増加したが、PGAM1 ノックアウトの場合はスフェロイド数が減少した。一方で、いずれの場合においてもスフェロイド内に Ki67 陰性の細胞は認められた。このことから、スフェロイド培養をすることにより、Ki67 陰性の静止状態の細胞が出現することが示唆された。

次に、RB または PGAM1 をノックアウトした際の代謝に与えるインパクトを解析した。RB をノックアウトすると PGAM1 の発現が低下するとともにグルコース刺激をした際の ECAR の応答が低下したが、PGAM1 を過剰発現することによりグルコース刺激による ECAR の応答が回復した。一方で、PGAM1 をノックアウトしても同様に ECAR 応答の低下が認められた。つまり、RB 欠失による

グルコース利用の低下は PGAM1 によるものであるが RB 欠失細胞のステータスは PGAM1 欠失細胞とは根本的に異なることが示唆された。

## 2. 正常乳腺細胞株における RB ノックアウトの効果

正常乳腺細胞株 MCF10A では p16 locus が失われているものの RB はインタクトである。そこで、本細胞株において RB ノックアウトし、細胞の Characterization を行った。RB ノックアウトは MCF10A 細胞の細胞増殖を 2D ならびに 3D 培養で抑制した。正常細胞における RB 不活性化は DNA ダメージを引き起こす可能性があったが、RB ノックアウト細胞では、 $\gamma$ H2AX や CHK1/2 のリン酸化は認められなかった。一方で、種々のサイクリンやジェミニンの発現は低下している反面、p27 の発現が増加していた。加えて、ピルビン酸デヒドロゲナーゼや AMP-activated protein kinase のリン酸化は低下していた。また、 $\beta$  カテニンの局在は RB ノックアウトにより細胞膜から細胞質に移行した。 $\beta$  カテニンの局在の変化は上皮間葉転換 (EMT) の際に観察されることから、EMT マーカーの発現を確認したところ、ZEB1、TWIST、SNAI1、N-カドヘリンの発現はいずれも変化が認められなかった。さらに、細胞老化の指標である senescence-associated  $\beta$ -galactosidase は RB ノックアウト細胞では陰性であり、p21 の発現も認められなかったことから、RB ノックアウトによる細胞周期停止は細胞老化に起因するものではないと示唆された。S 期への細胞周期進行にはサイクリン D1 発現レベルが維持されており、RAS-RAF-MEK-ERK シグナルの活性化が必要である。RB ノックアウト細胞においては、MEK、ERK のリン酸化レベルが低下していると同時に MYC タンパクの発現も減少していた。MYC の発現は ERK によるリン酸化 (pT58) と GSK3 $\beta$  によるリン酸化 (pS62) により制御されており、RB ノックアウト細胞では、pT58 レベルが低下していた。加えて、RAS 活性を RAS-GTP 結合アッセイで評価したところ、RB ノックアウト細胞では RAS 活性が低下していることが明らかになった。そこで、RB ノックアウト細胞に活性型 RAS を過剰発現すると、細胞増殖が認められるようになった。以上のことから、正常のコンテキストにおける RB の不活性化は細胞の静的な状態を引き起こすことが明らかとなった。現在、ドライバー変異を有するがん細胞における休眠トリガーは細胞外環境に依存して起こると考えその因子の同定を試みている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Noguchi Masafumi, Kohno Susumu, Pellattiero Anna, Machida Yukino, Shibata Keitaro, Shintani Norihito, Kohno Takashi, Gotoh Noriko, Takahashi Chiaki, Hirao Atsushi, Scorrano Luca, Kasahara Atsuko	4. 巻 14
2. 論文標題 Inhibition of the mitochondria-shaping protein Opa1 restores sensitivity to Gefitinib in a lung adenocarcinoma-resistant cell line	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-023-05768-2	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 Oo Swe Mar, Oo Hein Ko, Takayama Hiroaki, Ishii Kiyo-aki, Takeshita Yumie, Goto Hisanori, Nakano Yujiro, Kohno Susumu, Takahashi Chiaki, Nakamura Hiroyuki, Saito Yoshiro, Matsushita Mami, Okamatsu-Ogura Yuko, Saito Masayuki, Takamura Toshinari	4. 巻 38
2. 論文標題 Selenoprotein P-mediated reductive stress impairs cold-induced thermogenesis in brown fat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110566 ~ 110566
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110566	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 Pham Loc Thi, Peng Hui, Ueno Masaya, Kohno Susumu, Kasada Atsuo, Hosomichi Kazuyoshi, Sato Takehiro, Kurayoshi Kenta, Kobayashi Masahiko, Tadokoro Yuko, Kasahara Atsuko, Shoulkamy Mahmoud I., Xiao Bo, Worley Paul F., Takahashi Chiaki, Tajima Atsushi, Hirao Atsushi	4. 巻 621
2. 論文標題 RHEB is a potential therapeutic target in T cell acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 74 ~ 79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2022.06.089	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 Sheng Jindan, Kohno Susumu, Okada Nobuhiro, Okahashi Nobuyuki, Teranishi Kana, Matsuda Fumio, Shimizu Hiroshi, Linn Paing, Nagatani Naoko, Yamamura Minako, Harada Kenichi, Horike Shinichi, Inoue Hiroshi, Yano Seiji, Kumar Sharad, Kitajima Shunsuke, Ajioka Itsuki, Takahashi Chiaki	4. 巻 74
2. 論文標題 Treatment of Retinoblastoma 1?Intact Hepatocellular Carcinoma With Cyclin Dependent Kinase 4/6 Inhibitor Combination Therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hepatology	6. 最初と最後の頁 1971 ~ 1993
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/hep.31872	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 Murata Tomiyasu, Hashimoto Kazunori, Kohno Susumu, Takahashi Chiaki, Yamaguchi Masayoshi, Ito Chihiro, Masataka Itoigawa, Kojima Roji, Hikita Kiyomi, Kaneda Norio	4. 巻 12
2. 論文標題 Chemical inducer of regucalcin attenuates lipopolysaccharide induced inflammatory responses in pancreatic MIN6 cells and RAW264.7 macrophages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 175 ~ 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.13321	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 Nomura Naho, Ito Chiaki, Ooshio Takako, Tadokoro Yuko, Kohno Susumu, Ueno Masaya, Kobayashi Masahiko, Kasahara Atsuko, Takase Yusuke, Kurayoshi Kenta, Si Sha, Takahashi Chiaki, Komatsu Masaaki, Yanagawa Toru, Hirao Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Essential role of autophagy in protecting neonatal haematopoietic stem cells from oxidative stress in a p62-independent manner	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-81076-z	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 Kohno Susumu, Linn Paing, Nagatani Naoko, Watanabe Yoshihiro, Kumar Sharad, Soga Tomoyoshi, Takahashi Chiaki	4. 巻 39
2. 論文標題 Pharmacologically targetable vulnerability in prostate cancer carrying RB1-SUCLA2 deletion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 5690 ~ 5707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-1381-6	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 該当する

1. 著者名 Kulathunga Nilakshi, Kohno Susumu, Linn Paing, Nishimoto Yuuki, Horike Shin ichi, Zaraiskii Mikhail I., Kumar Sharad, Muranaka Hayato, Takahashi Chiaki	4. 巻 111
2. 論文標題 Peripubertal high fat diet promotes c Myc stabilization in mammary gland epithelium	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2336 ~ 2348
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14492	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 該当する

1. 著者名 Murata Tomiyasu, Kohno Susumu, Ogawa Kazuma, Ito Chihiro, Itoigawa Masataka, Ito Masafumi, Hikita Kiyomi, Kaneda Norio	4. 巻 72
2. 論文標題 Cytotoxic activity of dimeric acridone alkaloids derived from Citrus plants towards human leukaemia HL-60 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 1445 ~ 1457
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jphp.13327	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 Murata Tomiyasu, Yamaguchi Masayoshi, Kohno Susumu, Takahashi Chiaki, Risa Watanabe, Hatori Kanna, Hikita Kiyomi, Kaneda Norio	4. 巻 10
2. 論文標題 Regucalcin enhances adipocyte differentiation and attenuates inflammation in 3T3 L1 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1967 ~ 1984
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12947	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9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kohno Susumu, Paing Linn, Soga Tomoyoshi, Takahashi Chiaki.
2. 発表標題 Pharmacologically targetable metabolic vulnerability in prostate cancer carrying RB1-SUCLA2 deletion.
3. 学会等名 Keystone symposia tumor metabolism and microenvironment (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kohno Susumu, Paing Linn, Mishiro Kenji, Kunishima Munetaka, Watanabe Yoshihiro and Takahashi Chiaki.
2. 発表標題 Pharmacologically targetable vulnerability in prostate cancer carrying RB1-SUCLA2 loss.
3. 学会等名 AACR Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野晋, 高橋智聡
2. 発表標題 RB1-SUCLA2欠失による代謝脆弱性を標的とした前立腺がん治療法の開発
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 河野晋, 佐々木信成, 高橋智聡
2. 発表標題 RB- コレステロールによる未分化性維持機構の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学大
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野晋、曾我朋義、高橋智聡
2. 発表標題 RB1-SUCLA2 欠損による代謝脆弱性を標的とした前立腺がん治療法 の探索
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河野晋
2. 発表標題 RB欠損に付随する代謝遺伝子欠損を標的とした治療法の探索
3. 学会等名 第2回金沢大学がん進展制御研究所・国立がん研究センター研究所若手研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河野晋
2. 発表標題 RB欠損に付随する代謝遺伝子欠損を標的とした治療法の探索
3. 学会等名 第1回日本癌学会若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋智聡、Paing Linn、曾我朋義、河野晋
2. 発表標題 進行前立腺がんにおけるRB1-SUCLA2遺伝子欠失を標的とする新規治療
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植木ちひろ、辻本剛己、河野晋、高橋智聡、岡田宣宏
2. 発表標題 NFYAによる乳がん悪性化機構への影響
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年



〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 R B 1 陽性癌の治療用医薬組成物及びキット	発明者 高橋智聡、河野晋、 盛金丹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、180429	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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