

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06942

研究課題名（和文）がん細胞の持続的増殖における幹細胞性誘導メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the stemness induction mechanism in sustained proliferation of cancer cells

研究代表者

渡邊 幸秀（Watanabe, Yukihide）

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：40618534

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）：がん組織中には、治療抵抗性の高いがん幹細胞が存在し、がんの発生や再発、転移に中心的な役割をはたしている。本研究では、高輝度化学発光タンパク質Nano-Lanternを用いて、幹細胞や増殖マーカーの発現を生細胞で可視化し、その動態解析を行うこと、およびがん幹細胞を単離し、オミックス解析を行うことで、がん幹細胞の誘導や維持に重要な分子やシグナル系を同定することを試みた。さらに、TGF-シグナルもがん幹細胞の維持に重要なシグナルとして知られていることから、その標的遺伝子であるTMEPAIに着目し、TMEPAIがどのように腫瘍形成に関与し、がん幹細胞性の誘導を行うか、そのメカニズムを解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん組織中にも、がん幹細胞が存在し、それらは難治性であることから、休眠期がん幹細胞は再発や転移の原因となっている。増殖の亢進したがん組織中で、どのようにがん幹細胞が維持制御されているのか、そのメカニズムについては明らかでないため、動態やその制御メカニズムを明らかにすることは今後の治療戦略の上でも重要な意義がある。

TGF- は、がん幹細胞の維持に関わることが報告されているが、実際にどのTGF-シグナル標的遺伝子が重要であるか明らかではない。本研究によりTMEPAIががん幹細胞の誘導に関与することが示唆されたことは、がん幹細胞を標的とした新規抗がん剤の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In cancer tissues, treatment-resistant cancer stem cells exist, playing a central role in the initiation, recurrence, and metastasis of cancer. In this study, we attempted to visualize the expression of stem cell marker genes and proliferation marker genes in living cells using the highly bright chemiluminescent protein Nano-Lantern to perform dynamic analysis and to identify molecules and signaling pathways that are crucial for the induction and maintenance of cancer stem cells by isolating cancer stem cells and conducting omics analysis. Furthermore, considering that the TGF- signal is also known as an important signal for maintaining cancer stem cells, we focused on TMEPAI, its target gene of TGF- , and analyzed how TMEPAI is involved in tumorigenesis and induces cancer stemness.

研究分野：実験病理学

キーワード：がん幹細胞 休眠期 TGF-bシグナル TMEPAI

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん組織中には、がん幹細胞が存在し、それらは従来の抗がん剤に対して治療抵抗性を示し、がんの再発や転移に関与することが示されている。その細胞増殖動態については、がん幹細胞分画から非がん幹細胞が生じることや、非がん幹細胞のみを分取しても、その中にはがん幹細胞が新たに生まれてくることから、がん幹細胞と非がん幹細胞の間にはスイッチ機構が存在することが示唆されているが、詳細なメカニズムやそれらスイッチの現象を可視化することは未だできていない。また、がん幹細胞のマーカーとして現在、CD44 や CD133 等の膜タンパク質が広く使われているが、これらの膜抗原の陽性分画は幹細胞を豊富に含むものの、がん幹細胞特異性は十分ではなく、純度の高いがん幹細胞の単離はできていない。がん幹細胞の維持に関しては、Wnt や Notch シグナル、TGF- β シグナルが重要であることを示した論文報告が多数存在するが、さらにその下流標的遺伝子がどのようにがん幹細胞の維持に関与しているのかについては未だ全体像は明らかになっていない。がんの治療については、細胞増殖の盛んな細胞を障害する従来の抗がん剤に加え、様々な分子標的医薬が新規に承認されているが、がん免疫に作用するものの他は、増殖因子の受容体や細胞内シグナル分子のキナーゼ阻害など、多くの標的は細胞増殖に関連したものが主流となっており、がん幹細胞を標的とした治療法は確立されていない。したがって、がん細胞における幹細胞性誘導に関わるメカニズムを明らかにすることは、今後の治療戦略にあらたな選択肢をもたらす、再発頻度の低減や転移のあるステージの進んだがんの治療など、今まで治療が困難であったがんにも効果が期待できると考える。

2. 研究の目的

本研究では、がん幹細胞の増殖動態の解明、およびがん幹細胞の維持、誘導に関わる分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) がん幹細胞ライブイメージングシステムの開発

未分化細胞のマーカーとして知られる NANOG、SOX2、OCT4 は、がん幹細胞において発現が増加していることが報告されている。また、私たちの先行研究においても、生体内に近いスフェア培養にすることで、平面の接着培養と比べ、それらの遺伝子の発現が増加することを示している、さらに増殖マーカーである Ki67 により増殖盛んな細胞と G0 期休眠細胞が判別できると考え、それらの幹細胞マーカーと増殖マーカーのプロモーターの活性化を可視化できるレポーターシステムを構築する。その際、高輝度化学発光タンパク質である Nano-lantern を用いることで、励起光を必要とせず、光毒性を伴わない長期観察が可能のため、がん幹細胞の分裂や幹細胞性の誘導など、低頻度の現象を捉えることができ、がん幹細胞の増殖動態を解析する。加えて、がん幹細胞を単離し、遺伝子プロファイリングを解析することで、がん幹細胞の維持・誘導に重要なシグナル系や遺伝子を同定する。

(2) がん幹細胞の維持、誘導メカニズムの解明

単離されたがん幹細胞の遺伝子発現解析により、がん幹細胞の維持や誘導に関わる遺伝子およびシグナルパスウェイを解析すると同時に、申請者等は TGF- β シグナルに注目をする。TGF- β は、細胞増殖を抑制するサイトカインであり、増殖因子と一緒に働くことで、正常細胞の腫瘍様形質転換を誘導する因子として発見された。TGF- β により活性化される細胞内シグナルは、様々な幹細胞の維持に重要であることが報告されており、がんの再発・転移にも関与することが知られている。長年に渡り TGF- β シグナルの個々の標的遺伝子の機能を解析する中で、腫瘍形成を促進する働きを持つ TMEPAI (transmembrane androgen induced-protein, 遺伝子名 PMEPA1) を同定している。TMEPAI は、遺伝子増幅や転写の亢進により、様々ながん組織において発現が亢進している膜タンパク質であり、細胞内シグナル伝達を制御することで腫瘍形成に関わることを報告している。TGF- β の標的遺伝子である TMEPAI とがん幹細胞との関連を明らかにし、どのような細胞内シグナルを介して、非がん細胞が幹細胞性を獲得するか、そのメカニズムを検討する。

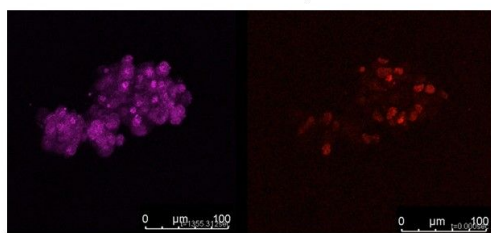
4. 研究成果

(1) がん幹細胞ライブイメージングシステムの開発

はじめに、レポーターの作製を行った。すべての細胞の核を染色するため、CMV プロモーター下で Cyan-NL を発現するベクター (CMVp-Cyan-NL) Ki67 の発現をモニターするため、Ki67 プロモーター下で Green-NL もしくは Red-NL を発現するベクター (Ki67p-Green/Red-NL) 幹細胞マーカーをモニターするため、NANOG プロモーター下で Green-NL もしくは Red-NL を発現するベクター (NANOGp-Green/Red-NL) を作製した。また、各 NL は、核に局在するように H2B 融合タンパク

質とし、半減期を減少させるため PEST 配列を挿入した。乳がん細胞 Hs578T 細胞を用いて、それらのレポーターベクターを安定に発現する細胞株を樹立し、発光顕微鏡および共焦点顕微鏡で確認したところ、Cyan-NL ではすべての核が染色されたが、Green 波長を観察するフィルターにおいても Cyan-NL の強い発光が検出された。Ki67p-Green/Red-NL では、通常の接着培養下において、60%程度の陽性細胞が存在し、陽性細胞、陰性細胞を分取しても、その後の培養を行うことで、60%程度の陽性率に戻ることを確認した。また、スフェア培養下では陽性率が減少し、20%程度であり、スフェアの外側に Ki67 陽性細胞が配置する傾向があった。また、Ki67p-Green/Red-NL が内在性 Ki67 の発現をモニター出来ている確認するために、細胞を血清飢餓培養、血清を添加した培地で再培養することで、内在性 Ki67 とレポーターの発現変動の一致性を確認したところ、内在性 Ki67 は血清飢餓で発現が減少し、血清添加培地によって発現が回復し、Ki67p-Red-NL (Green-NL でも同様の結果) の発現もそれと一致していた。

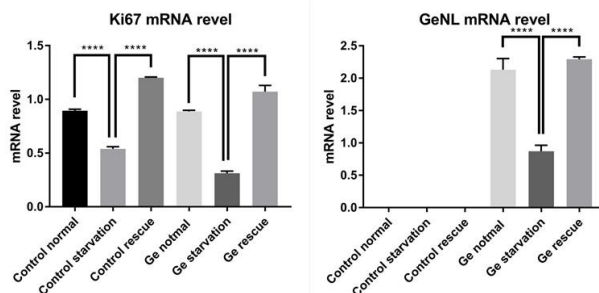
スフェア培養におけるKi67p-Red-NLの発現



NucRed-647
(生細胞核染色)

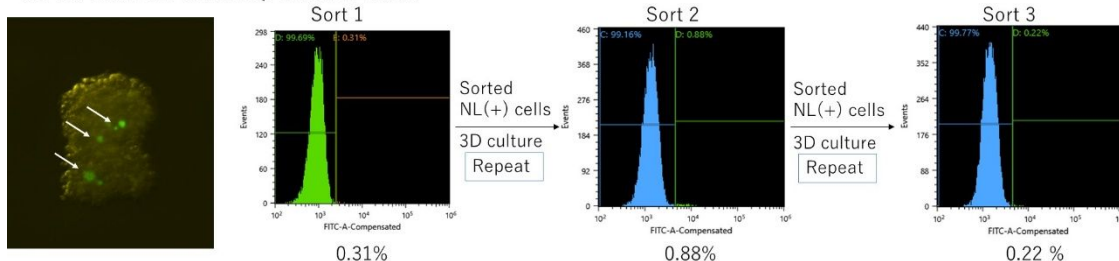
Ki67p-Red-NL

血清飢餓における内在性Ki67とレポーターの発現



NANOGp-Green-NL の安定発現株については、通常の接着培養時にはほとんど陽性細胞は検出できなかったものの、スフェア培養にすることで陽性細胞が1%弱の割合で検出された。先行研究により、接着培養と比べスフェア培養では NANOG の発現が誘導されることと一致していた。さらにスフェア培養において NANOG 陽性細胞を分取し、再びスフェア形成を繰り返したところ、NANOGp-Green-NL 陽性細胞は常に1%未満に保たれていた。

スフェア培養におけるNANOGp-Green-NLの発現



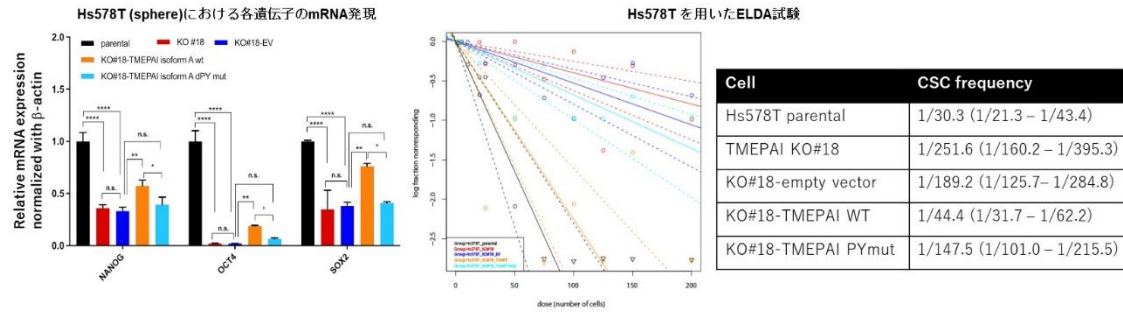
現在、これらのレポーター細胞を用いて、長期の細胞動態解析を行っているが、機械の不具合等により、計画が遅れている。また、レポーター陽性、陰性細胞の遺伝子発現解析を行っており、休眠期幹細胞の維持、誘導のメカニズムの解析を今後も継続する。がん幹細胞特異的に高発現する遺伝子は臨床検体におけるがん幹細胞の検出にも有用であり、今後、予後や薬剤耐性との相関を検討する。さらに、がん幹細胞イメージングシステムは、がん幹細胞を標的とした新規抗がん剤の薬効評価にも応用が可能であるか検討する。

(2) がん幹細胞の維持、誘導メカニズムの解明

TGF-βシグナルがどのようにがん幹細胞の維持に関わるか検討するため、その下流標的遺伝子である TMEPAI に着目した実験を行った。TMEPAI は、がん細胞において発現が行進している朴タンパク質で、その分子内に短い細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、細胞内領域に Smad interaction motif (SIM) と2つの PPxY (PY) モチーフを有しており、現在までの研究により SIM は TGF-βシグナルの抑制に、PY モチーフは PI3K/AKT シグナルの活性化に重要であることを示している。TMEPAI ノックアウトした乳がん細胞 Hs578T 細胞 (KO clone#18) では、スフェア培養における NANOG、OCT4、SOX2 といった幹細胞マーカー遺伝子の発現が著しく低下していた。また、TMEPAI ノックアウト細胞に TMEPAI (WT) を再発現させると幹細胞マーカーの発現が一部回復したが、TMEPAI の PY モチーフ機能欠損変異体 (PYmut) を再発現させても幹細胞マーカー遺伝子の発現は回復しないことから、PY モチーフを介したシグナル制御が、がん幹細胞の誘導に重要であることが示された。加えて、Extreme limiting dilution assay (ELDA) によってスフェア形成を開始する能力のあるがん幹細胞の頻度を算出したところ、Hs578T 親株細胞では、約30個の細胞に1つのがん幹細胞を含むのに対して、TMEPAI ノックアウト細胞では252個の細胞に1つのがん幹細胞と、その頻度が著しく減少していた。さらに、ノックアウト細胞に TMEPAI を再発現さ

せた実験において、TMEPAI (WT) ではがん幹細胞の頻度が回復するのに対し、TMEPAI (PYmut) ではあまり回復しないことから、TMEPAI は PY モチーフを介してがん幹細胞の誘導に關与する機能があることを示した。加えて、様々な阻害剤を用いた実験をおこない、PI3K/AKT シグナルががん幹細胞の誘導に重要であることを示す結果が得られている。

TMEPAIによる幹細胞マーカー遺伝子の発現と幹細胞頻度への影響



現在、がん幹細胞を標的とした新規作用機序の抗がん剤は承認されていない。本研究によって得られたがん幹細胞の誘導に関する知見は、今後新たな薬剤の開発や診断の標的として応用するため、今後も研究を継続する。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Md Anwarul Haque, Mohammed Abdelaziz, Meidi Utami Puteri, Thanh Thao Vo Nguyen, Kosei Kudo, Yukihide Watanabe, Mitsuyasu Kato	4. 巻 13
2. 論文標題 PMEPA1/TMEPA1 Is a Unique Tumorigenic Activator of AKT Promoting Proteasomal Degradation of PHLPP1 in Triple-Negative Breast Cancer Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4934
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13194934	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Puteri Meidi Utami, Wardhani Bantari W.K., Amalia Riezki, Yukihide Watanabe, Mitsuyasu Kato
2. 発表標題 TMEPA1 functions via its PY and a Smad Interaction motif (SIM) for tumorigenic activities of breast cancer cells
3. 学会等名 The 1st International Conference on Pharmaceutical Sciences and Military Pharmacy (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

筑波大学実験病理学研究室ホームページ https://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/

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