

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32660

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20732

研究課題名（和文）ALDH1A3陽性乳癌幹細胞の非対称分裂能依存的な癌代謝不均一性獲得機構の解明

研究課題名（英文）Regulation of metabolic heterogeneity by asymmetric cell divisions in ALDH1A3-positive cancer stem cells

研究代表者

多森 翔馬（Tamori, Shoma）

東京理科大学・薬学部生命創薬科学科・助教

研究者番号：90909483

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ALDH1陽性癌幹細胞の非対称分裂による解糖系能の不均一性獲得の一端を明らかにした。具体的には、ALDH1A3遺伝子の改変により、乳癌細胞株でALDH1A3発現を追跡するためのクローンを作製し、解析した。その結果、乳癌幹細胞が非対称分裂を介して解糖系能が高い癌幹細胞を維持しながら、解糖系能の低い非癌幹細胞を新たに生みだすことが示唆された。さらに、膵臓癌細胞株でもALDH1陽性癌幹細胞の非対称分裂を見出し、乳癌に限らず他の癌種でも同様の仕組みによって不均一性が獲得される可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、癌治療において克服すべき重要な課題である癌細胞の代謝不均一性がどのように獲得されるのか、その仕組みの一端を明らかにした。特に、癌幹細胞の非対称分裂制御が代謝不均一性の獲得過程に重要な役割を果たしていることを示した。これにより、遺伝子変異の蓄積に差がない細胞集団からなる癌であっても、異なる性質を持つ癌細胞が生まれる仕組みに関する新たな知見を提供した。これらの知見は、癌の治療抵抗性を克服するための新しいアプローチの開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：This study revealed a part of the mechanism by which metabolic heterogeneity is acquired in cancer cells through the asymmetric division of ALDH1-positive cancer stem cells. Specifically, by genetically modifying the ALDH1A3 gene, we established clones to track ALDH1A3 expression in breast cancer cell lines and conducted analyses. The results suggested that breast cancer cells maintain highly glycolytic cancer stem cells through asymmetric division while generating low-glycolytic non-cancer stem cells. Furthermore, we identified the asymmetric division of ALDH1-positive cancer stem cells in pancreatic cancer cell lines, indicating the possibility of similar mechanisms contributing to heterogeneity acquisition in cancers other than breast cancer.

研究分野：癌幹細胞

キーワード：癌幹細胞 非対称分裂 代謝不均一性

## 1. 研究開始当初の背景

癌組織が様々な性質を持った癌細胞から構成される不均一な細胞集団であることは病理学的に古くから知られており、この癌の不均一性は治療抵抗性の原因の一つと考えられている。近年のシークエンス技術やオミックス解析技術の発展により、この癌の不均一性が“どのような”ものであるかということは、遺伝子変異のみならず、遺伝子発現やタンパク質発現、代謝能といった細胞の性質の違いまで明らかになってきている。一方で、この不均一性が“どのように”生じるかという点は依然として不明な点が多い。この癌の不均一性が生じる仕組みについては、従来、様々な異なる遺伝子変異を有する癌細胞の蓄積による観点から議論されてきたが、遺伝子発現やタンパク質発現、代謝能といった癌組織内の癌細胞の性質の違いは非遺伝子性にも生じることがわかってきている。特に、正常組織における幹細胞と分化細胞を生み出す非対称分裂が、癌組織にも保存され、非遺伝子変異性に不均一な癌細胞集団を生み出すことも明らかとなりつつある。しかしながら、癌幹細胞における非対称分裂メカニズムと癌の代謝不均一性への関与は不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、非非遺伝子変異性に生じる癌の不均一性の解明における重要な「問い」である癌幹細胞の非対称分裂を軸とした癌の代謝不均一性獲得機構の解明することを目的とした。具体的には、ALDH1 陽性癌幹細胞の非対称分裂を介して癌細胞の代謝不均一性がどのように獲得されるのか、また癌幹細胞マーカー遺伝子である ALDH1A3 の追跡を通じて、癌幹細胞の非対称分裂を介した代謝不均一性の獲得過程を詳細に調べた。加えて、申請者らが以前に明らかにした ALDH1A3 陽性乳癌幹細胞の PKC に依存する非対称分裂メカニズムと、癌細胞の代謝能との関連性について、詳細な解析を行うことで、非遺伝子変異性による癌の代謝不均一性獲得の一端を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

乳癌幹細胞マーカーALDH1A3 の発現を追跡するためのレポーター細胞を樹立し、乳癌細胞株の ALDH1A3 発現を蛍光タンパク発現によって不均一性獲得過程を顕微鏡下で可視化・追跡した。さらに、この細胞を用いて、癌細胞の中でも特に癌幹細胞で亢進している解糖系能が ALDH1A3 陽性癌幹細胞の非対称分裂依存的に分配されるか否かについて調べた。加えて、この非対称分裂による解糖系能分配とその後の分裂と獲得された解糖系能の不均一化との関係を調べた。

次に、ALDH1A3 陽性癌幹細胞の非対称分裂とその後の不均一化への関わりについて細胞極性分子 PKC の関与を調べた。乳癌以外の癌細胞においても同様のメカニズムが存在するかについての検証も行った。

## 4. 研究成果

癌幹細胞マーカーALDH1A3 の発現を追跡するためのレポーター細胞を複数種類樹立することを目的に乳癌細胞株の ALDH1A3 遺伝子の改変を試みた。その結果、2 種類の乳癌細胞株で ALDH1A3 発現を蛍光タンパク発現によって追跡することが可能なクローンを樹立した(図1)。さらに、このクローンをを用いることで、癌細胞の中でも特に癌幹細胞で亢進している解糖系能が ALDH1A3 陽性癌幹細胞の非対称分裂依存的に分配されることを示唆する結果を得た。加えて、この非対称

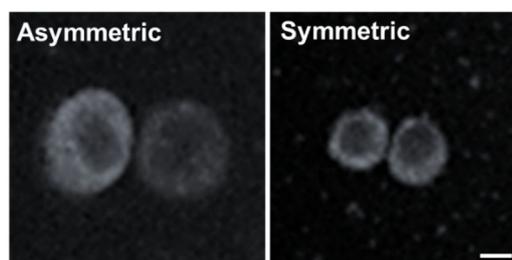


図1 ALDH1A3遺伝子改変乳癌細胞株

分裂による解糖系能分配とその後の分裂により獲得される解糖系能の不均一化との相関関係を示す結果を得た。従って、乳癌における ALDH1A3 陽性癌幹細胞の非対称分裂は解糖系能の高い癌幹細胞を維持しつつ、解糖系能の低い非がん幹細胞を新たに生み出すことで解糖系能の不均一性獲得の一因となることが示唆された。今後はこの ALDH1A3 陽性癌幹細胞の非対称分裂依存的な解糖系能の分配と解糖系能の不均一化の因果関係とその制御メカニズムの詳細について調べていく予定である。また、この非対称分裂を司る細胞極性分子 PKC と癌で高発現する解糖系代謝酵素 GLO1 が ALDH1 陽性癌幹細胞において共に働いていることを示唆する結果を得た。このことから、ALDH1 陽性癌幹細胞における解糖系の亢進と PKC の高発現の関わりを明らかにするとともに非対称分裂後の細胞でこれらの分子がどのように関割っているのかについて明らかにすることが今後の課題である。

これまでの研究により、乳癌幹細胞において細胞極性分子 PKC が ALDH1A3 陽性癌幹細胞の非対称分裂を制御することを明らかにしてきた。この制御が他の癌種でも起こるのか否かについて調べるために膵臓癌細胞株を用いた検証を行った。膵臓癌細胞株に癌幹細胞マーカーALDH1A3と蛍光タンパク質をつないだベクターを導入し、ALDH1A3 癌幹細胞を可視化した。その結果、膵臓癌の癌幹細胞が非対称・対称に分裂する現場をタイムラプス撮影で捉えることに成功した。この挙動は乳癌における ALDH1A3 遺伝子改変細胞と同等であった。

一方、これらの分裂の詳細な解析により ALDH1A3 の非対称・対称分裂と PKC の分配が必ずしも一致しない (ALDH1A3 と共分配しない) 10 通りもの多様な分配パターンが存在することを見出した (図 2)。この結果は、ALDH1A3 の対称・非対称分裂に伴う様々な分子の多様な分配パターンが癌の不均一性獲得に関わっていることを示唆するものである。

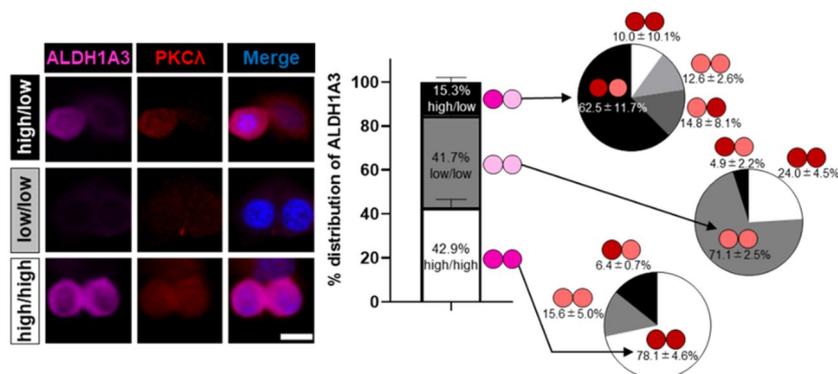


図2 膵臓癌細胞株由来ALDH1A3陽性癌幹細胞が生み出す多様な分裂パターン

さらに PKC の機能を siRNA 用いたノックダウンにより抑制した結果、ALDH1A3 陽性癌幹細胞の非対称分裂パターンが減少した (図 3)。このことから、膵臓癌においても乳癌と同様に ALDH1A3 陽性癌幹細胞の非対称分裂は PKC によって制御されていることが示唆された。従って、膵臓癌においても ALDH1A3 陽性癌幹細胞の非対称分裂を介して多様な癌細胞が生み出されており、その制御には PKC 依存的なメカニズムが存在することが示唆された。今後はこのメカニズムの詳細と膵臓癌の代謝との関わりを明らかにすることが課題である。

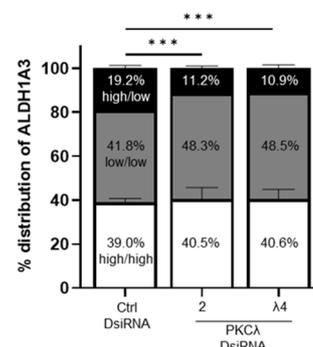


図3 ALDH1A3陽性膵臓癌幹細胞の非対称分裂はPKCλによって制御されている

これらの結果を受けて、膵臓癌患者由来の癌ゲノミクスデータを解析した結果、PKC と ALDH1A3 を共に高発現する膵臓癌患者は予後が不良であることを明らかにした (図 4)。このことから、乳癌だけでなく膵臓癌においても PKC が ALDH1A3 陽性癌幹細胞の非対称分裂を介した不均一性獲得機構に関与し、患者の予後不良に寄与していることが示唆された。

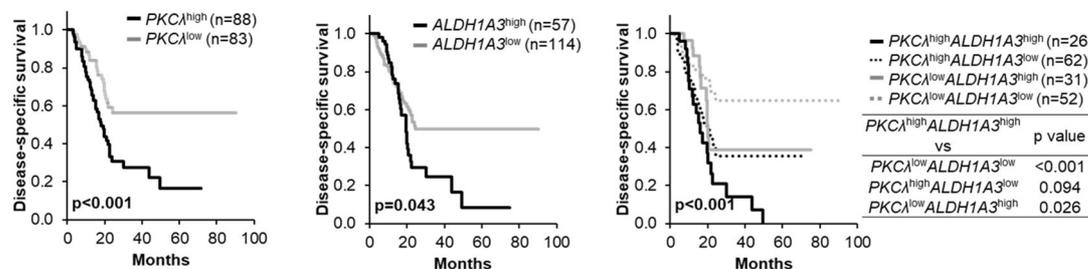


図4 ALDH1A3とPKCλを共高発現する膵臓癌患者は予後不良である

今後はこの分子メカニズムを調べることで、癌の不均一性獲得機構の詳細な分子機構を解明していくことが課題となる。本研究で用いた癌幹細胞の非対称分裂イメージングとその制御は癌の不均一性が生じる仕組みの理解への新規アプローチとなると考えられる。この解析を通じて、癌治療の問題となる治療抵抗性と癌代謝不均一性が生じるメカニズムを理解することによって、癌幹細胞の非対称分裂を制御する新しい癌治療コンセプトの提唱へと繋がることを期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 MOTOMURA HITOMI, TAMORI SHOMA, YATANI MASA-AKI, NAMIKI AYANO, ONAGA CHOTARO, OZAKI AYAKA, TAKASAWA RYOKO, MANO YASUNARI, SATO TSUGUMICHI, HARA YASUSHI, SATO KEIKO, XIONG YUYUN, HARADA YOHISUKE, HANAWA TAKEHISA, TANUMA SEI-ICHI, SASAKI KAZUNORI, OHNO SHIGEO, AKIMOTO KAZUNORI	4. 巻 41
2. 論文標題 GLO 1 and PKC Regulate ALDH1-positive Breast Cancer Stem Cell Survival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5959 ~ 5971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.15415	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 Onaga Chotaro, Tamori Shoma, Matsuoka Izumi, Ozaki Ayaka, Motomura Hitomi, Nagashima Yuka, Sato Tsugumichi, Sato Keiko, Xiong Yuyun, Sasaki Kazunori, Ohno Shigeo, Akimoto Kazunori	4. 巻 17
2. 論文標題 High expression of SLC20A1 is less effective for endocrine therapy and predicts late recurrence in ER-positive breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0268799
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0268799	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 OZAKI AYAKA, MOTOMURA HITOMI, TAMORI SHOMA, ONAGA CHOTARO, NAGASHIMA YUKA, KOTORI MAHO, MATSUDA CHIKA, MATSUDA AKARI, MOCHIZUKI NANAKO, SATO TSUGUMICHI, HARA YASUSHI, SATO KEIKO, MIYAGI YOHEI, NAGASHIMA YOJI, HANAWA TAKEHISA, HARADA YOHISUKE, XIONG YUYUN, SASAKI KAZUNORI, OHNO SHIGEO, AKIMOTO KAZUNORI	4. 巻 42
2. 論文標題 High Expression of p62 and ALDH1A3 Is Associated With Poor Prognosis in Luminal B Breast Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3299 ~ 3312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.15818	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 ONAGA CHOTARO, TAMORI SHOMA, MATSUOKA IZUMI, OZAKI AYAKA, MOTOMURA HITOMI, NAGASHIMA YUKA, SATO TSUGUMICHI, SATO KEIKO, TAHATA KOUJI, XIONG YUYUN, NAKANO YOSHIO, MANO YASUNARI, MIYAZAKI SATORU, SASAKI KAZUNORI, OHNO SHIGEO, AKIMOTO KAZUNORI	4. 巻 2
2. 論文標題 High SLC20A1 Expression Is Associated With Poor Prognosis for Radiotherapy of Estrogen Receptor-positive Breast Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Diagnosis & Prognosis	6. 最初と最後の頁 429 ~ 442
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/cdp.10126	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 XIONG YUYUN, MOTOMURA HITOMI, TAMORI SHOMA, OZAKI AYAKA, ONAGA CHOTARO, HARA YASUSHI, SATO KEIKO, TAHATA KOUJI, HARADA YOHSUKE, SASAKI KAZUNORI, ZHENG YUN-WEN, OHNO SHIGEO, AKIMOTO KAZUNORI	4. 巻 42
2. 論文標題 High Expression of CD58 and ALDH1A3 Predicts a Poor Prognosis in Basal-like Breast Cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5223 ~ 5232
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.16029	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 Kasai Takahiro, Tamori Shoma, Takasaki Yuta, Matsuoka Izumi, Ozaki Ayaka, Matsuda Chika, Harada Yohsuke, Sasaki Kazunori, Ohno Shigeo, Akimoto Kazunori	4. 巻 669
2. 論文標題 High expression of PKC and ALDH1A3 indicates a poor prognosis, and PKC is required for the asymmetric cell division of ALDH1A3-positive cancer stem cells in PDAC	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 85 ~ 94
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.05.086	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 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tamori S., Nozaki Y., Motomura H., Onaga C., Ozaki A., Sasaki K., Ohno S., Akimoto K.
2. 発表標題 High PKC expression is required for asymmetric cell division of ALDH1-positive cancer stem cells and indicates poor clinical outcome in late-stage breast cancer patients
3. 学会等名 International Research Network Initiative (IRNI) & International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences (IPoPS) 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多森 翔馬、野崎 優香、本村 瞳、翁長 朝太郎、尾崎 綾菜、佐々木 和教、大野 茂男、秋本 和憲
2. 発表標題 PKC 高発現はALDH1A3陽性乳癌幹細胞の非対称分裂能に関与する
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 多森 翔馬、秋本 和憲
2. 発表標題 がん幹細胞の非対称分裂制御機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会 一般シンポジウムS55
4. 発表年 2023年

〔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

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