

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17018

研究課題名（和文）骨肉腫発症における新規 グルタミン回路調節因子の役割

研究課題名（英文）Oncogenicity of Ggct, gamma-glutamylcyclotransferase in osteosarcomagenesis

研究代表者

大谷 昇平 (Otani, Shohei)

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教

研究者番号：90823336

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：Ggctは グルタミン回路で機能する新規酵素タンパク質である。Ggctは骨肉腫で高発現を認め、Ggct抑制は骨肉腫細胞の増殖、遊走および浸潤能を抑制させる。そこで本研究では、ヒト骨肉腫のマウスモデルである骨芽細胞特異的p53遺伝子欠損マウス(Sp7Cre; p53f/fマウス;以下OSマウス)を利用し、骨肉腫発症におけるGgctの役割をマウス生体レベルで検討した。その結果、Ggct遺伝子欠損OSマウス(OS;Ggct^{-/-} or Ggct^{-/+})はOSマウスと比べ、骨肉腫発症抑制および寿命延長を認めた。また、GgctがMycの標的であることを見出し、Ggct遺伝子上のMyc結合部位を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨肉腫の好発年齢は10代で、治療法は未だに外科的切除が第一選択であるため、若くしてADL/QOL低下をもたらす。しかし、その発症分子機構はほとんど解明されていない。そこで本研究は、新規がん関連因子Ggctの骨肉腫発症における役割の解明を目的とした。その結果、骨肉腫発症において「がん遺伝子」MycがGgctを直接ターゲットにしており、Ggct欠損OSマウスは骨肉腫発症抑制および寿命の延長をもたらすことが明らかになった。本研究成果は、Ggctが骨肉腫治療に有効な創薬ターゲットとなる可能性を示唆しており、その機能解析を通して治療薬の開発へとつながる「橋渡しとなる知見」を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：Ggct is an enzyme involved in γ -glutamyl cycle that is essential for GSH homeostasis and has been frequently reported for its oncogenicity. Actually, Ggct is upregulated in osteosarcoma. In human osteosarcoma, suppression of Ggct reduces proliferation, migration, and invasion of osteosarcoma cell. Therefore, in this study, we used osteoprogenitor-specific p53-detected mice (Sp7Cre p53f/f; OS mice) that have been widely used as an animal model of human osteosarcoma and evaluated the oncogenic role of Ggct in osteosarcomagenesis. Deletion of Ggct prolonged life span of OS mice and reduced the incidence of osteosarcoma in OS mice. Furthermore, we identified the Myc-consensus sites in the Ggct promoter, deletion of which reduced expression of Ggct and tumorigenicity. These results demonstrate that Ggct is an attractive target for anti-cancer drug discovery.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：骨肉腫 Ggct p53 Myc

1. 研究開始当初の背景

Ggct は最初、ヒト膀胱がん組織において高発現している機能未知の新規タンパク質として発表された。その後、Oakleyら (J. Biol. Chem. 283; p22031-22042, 2008) によって γ グルタミル回路で長年未同定であった γ -glutamyl cyclotransferase (Ggct) として報告された酵素タンパク質と同一であることが判明した。Uejimaら (Anticancer Research 31; 1297-1306, 2011) の報告によると、骨肉腫手術標本 40 例全例において、Ggct の mRNA 発現は正常骨芽細胞より高値 (平均 8.7 倍) を示し、骨肉腫細胞株で Ggct の発現をノックダウンすると、細胞の増殖、遊走、および浸潤能が抑制された。これは骨肉腫において、Ggct のがん化促進機能を報告した最初の報告であるが、もっぱら *in vitro* 解析が中心で、生理的条件下での Ggct の関与については検討されていない。そこで申請者らは、Ggct のノックアウトマウスを作製し、骨肉腫発症における Ggct の役割をマウス生体レベルで検討することにした。当研究グループと他大学との共同研究によって、Ggct の活性中心特異的インヒビターの開発がすすめられ、最近になって特異的阻害剤候補が同定された。また Ggct は、細胞内へのアミノ酸の取り込みに関与する代謝系で機能し、細胞膜近傍に存在することから、投与された阻害剤の効果も出やすいと考えられる。しかしこれまで、Ggct の機能を評価できる動物モデルが存在しなかったため、その効果は生体レベルで検討できていない。遺伝子改変マウスを用いた本研究により、Ggct の機能が明確になることによって、Ggct をターゲットにした抗骨肉腫創薬が促進されるだろう。さらに、Ggct の関与は骨肉腫に限らず、他の「メジャーながん」においても明らかになりつつある。したがって、本研究成果は、幅広く様々ながん種への応用が期待できる。

2. 研究の目的

骨肉腫は、わが国では毎年 100 万人に 2 人程度の発症が報告される代表的な「希少がん」である。主に小児をはじめ若年層に発症が認められる悪性腫瘍で (75% の骨肉腫患者が未成年)、生存できても四肢の切除手術など、若くして失うものの影響は大きい。しかし「希少がん」ゆえに、国内外で骨肉腫の研究者人口は少なく、その発症機序が分子レベルでほとんど明らかになっていない。そこで本研究では骨肉腫制圧を目指し、新規がん関連因子 Ggct の骨肉腫発症における役割を明らかにすることを目的とした。

「果たして Ggct は骨肉腫発症・進展における促進因子か？」本研究の意義は、この問いにマウスレベルの解析を通して答えることである。骨肉腫の治療に有効な創薬のターゲットとなる新規因子を同定し、その機能解析を通して治療薬の開発へとつながる「橋渡しとなる知見」を提供したいと考える。

3. 研究の方法

(1). 骨肉腫発症モデルマウスの持つ骨肉腫発症能を、Ggct 機能欠失で抑制できるか。

骨芽細胞特異的 p53 遺伝子欠損マウス ($Sp\pi Cre; p53^{fl/fl}$, 以下 OS マウス) は、ヒト骨肉腫と性状が酷似した骨肉腫を発症するので、ヒト骨肉腫モデルとして確立され、広く使用されている。ほぼ 100% の個体が生後 1 年前後で骨肉腫を発症し死亡する。そこで、この OS マウスから Ggct 遺伝子が欠損したマウスを作出し、OS マウスの造腫瘍性がレスキューされるかどうか観察した。Ggct 遺伝子の第 2 エクソンを *Loxp* 配列で挟んだ遺伝子改変マウスを作製し、それを CAG-Cre マウスと交配させて、全身性に Ggct 遺伝子を欠損する Ggct^{-/-} マウスを作出した。この Ggct^{-/-} マウスをさらに OS マウスと交配させ、Ggct 欠損 OS マウス ($Sp\pi Cre; p53^{fl/fl} Ggct^{-/-}$ or $Sp\pi Cre; p53^{fl/fl} Ggct^{+/-}$) を作出し、骨肉腫発症における Ggct の役割を検証した。

Ggct^{-/-} マウスそのものは野生型と変わらず見かけ上健康である。これは治療戦略を考えると大変好都合で、正常細胞において Ggct を阻害しても副作用は極めて低いことを意味する。このことから、Ggct が創薬ターゲットとして有益であるか、Ggct 抑制による骨への影響を Ggct^{-/-} マウスを利用し、 μ CT による骨量解析を用いて、野生型マウスと比較・検討した。

(2). Ggct は「がん遺伝子」Myc のターゲットか。

OS マウスの骨肉腫発症は、強力な「がん遺伝子」c-Myc (Myc) の機能に依存していることが、申請者の所属するグループによって明らかになった。米国 NIH のデータベース (TARGET) に登録された 86 症例の小児骨肉腫患者を解析すると、GGCT は Myc と同様、骨肉腫における予後不良因子であり、さらに相互に高い発現相関が確認された。さらに、OS マウス由来の骨肉腫細胞において Myc をノックダウンすると、それに比例して Ggct の発現量が低下した。ChIP 解析によって、ヒトおよびマウス骨肉腫細胞において Ggct プロモーターへの Myc の有意な結合が確認され、Ggct は Myc の新規ターゲット遺伝子である可能性が示唆された。そこで本研究では、これらの知見をもとに、ChIP-seq (Myc, H3K4me3) と ATAC-seq により Ggct

プロモーター上の重要なMyc結合配列の同定を行った。また、同定したMyc結合配列に変異を加えた骨肉腫細胞の造腫瘍能への影響を担癌実験にて検証した。

4. 研究成果

(1). 骨肉腫発症モデルマウスの持つ骨肉腫発症能を、Ggct機能欠失で抑制できるか。

Ggct欠損OSマウス (*Sp7Cre; p53^{f1/f1} Ggct^{-/-}* or *Sp7Cre; p53^{f1/f1} Ggct^{+/-}*) を作出し、OSマウス (*Sp7Cre; p53^{f1/f1}*) との骨肉腫発症率および生存期間の比較・検討を行った。その結果、OSマウスにおけるGgct欠損は、骨肉腫発症を抑制し、さらには寿命を有意に延長させることが明らかになった(図1)。また、野生型マウスのGgct欠損は、少なくとも観察期間(600日)においては、生存率に影響を示さなかった(図1)。μCTによる骨量解析では、骨梁体積率(BV/TV)、骨梁数(Tb.N)、骨梁幅(Tb.Th)皮質骨体積比(Ct.Ar/Tt.Ar)、および皮質骨幅(Ct.Th)に減少傾向を認め、骨梁間距離(Tb.Sp)は増加傾向を示した(図2)。しかし、骨梁の骨密度(Tb.BMD)に変化はなかった(図2)。これらのことから、Ggctの抑制により骨肉腫発症は有意に抑制されることが判明した。また、Ggctは正常な骨形成において、骨塩の沈着には影響がなく、骨形成に関与していることが示唆された。

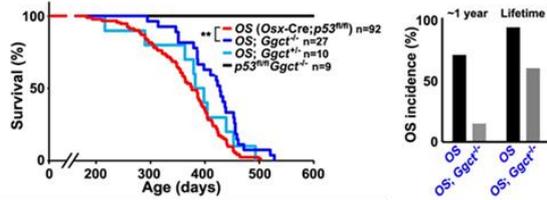
(2). Ggctは「がん遺伝子」Mycのターゲットか。

MycがGgctを直接ターゲットにしていることが示唆されたため、Mycおよび活性化ヒストン(H3K4me3)のChIP-seqとオープンクロマチンの検出を目的にATAC-seqを行い、Ggct遺伝子上の重要なMyc結合領域の同定を行った。その結果、Ggctのプロモーター上に、ChIP-seq(Myc, H3K4me3)およびATAC-seqに共通してピークを認める領域G-proを検出した(図3)。骨肉腫細胞のMyc結合領域G-proに、CRISPR/Cas9にて変異を加えると、Mycの遺伝子結合が抑制され、Ggctのタンパク質およびmRNA発現量の減少を認めた(図3)。また、ヌードマウスへの担癌実験においても、G-Proに変異を加えた骨肉腫細胞は、有意に造腫瘍性の低下を認めた(図4)。

(1)(2)の結果から、Ggctは骨肉腫において、腫瘍促進因子として機能しており、強力な「がん遺伝子」MycがGgctプロモーター上のMyc結合配列を介し、Ggctの発現を過剰に誘導していることが判明した。そのため、Ggctの抑制は、顕著な抗腫瘍効果をもたらした。したがって、この研究成果はGgctが有望な創薬ターゲットとなり得ることを生体レベルで示している。

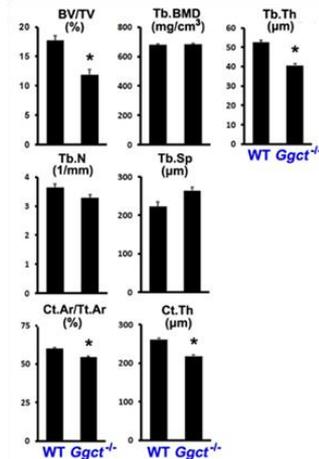
近年、様々ながん種でGgctの高発現が認められ、また予後不良因子であるとの報告がなされている。したがって、本研究成果は骨肉腫以外のがん種においても応用でき、Ggctをターゲットにした革新的な抗がん戦略の創出が期待される。

図1



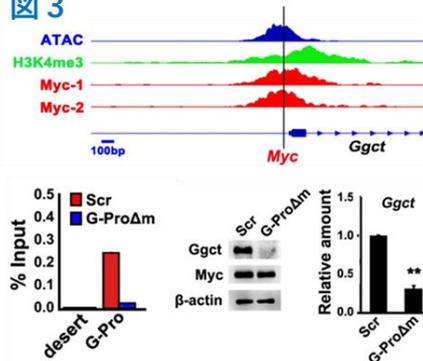
Ggct欠損は骨肉腫発症を抑制し、OSマウスの寿命を延長させる。

図2



Ggct欠損は骨量の減少傾向をもたらす。

図3



骨肉腫細胞において、同定したGgctのプロモーター上のMyc結合領域G-Proに変異を加えると、Mycの結合が抑制され、Ggctのタンパク質およびmRNAの発現量が減少する。

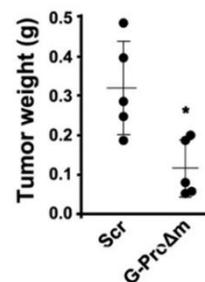


図4

骨肉腫細胞において、GgctのMyc結合領域G-Proへの変異は造腫瘍性を抑制する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kosei Ito, Tomoya Ueno, Shohei Otani, Yuki Date
2. 発表標題 TGF signaling facilitates Myc upregulation by Runx in p53-deficient osteosarcoma development
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------