

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02676

研究課題名(和文) GPNMBによるがん幹細胞性誘導機構

研究課題名(英文) Induction of Cancer Stem Cell Properties by GPNMB

研究代表者

加藤 光保 (KATO, Mitsuyasu)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：20194855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：がんは、細胞数が持続的に増殖し続けることを第一の特徴とする疾患である。近年、腫瘍形成能をもち、薬剤耐性や転移・再発をもたらす、がん患者の予後の悪化を既定する細胞は、ごく一部のがん細胞だけで増殖が止まっている細胞であることが知られるようになり、がん幹細胞と呼ばれている。本研究は、増殖が停止した乳癌細胞の一部でGPNMBが細胞表面に輸送され、幹細胞の特性を誘導することでがん細胞の持続的増殖を誘導することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、増殖が停止したがん細胞が、がん細胞集団の持続的増殖をもたらすことを示している。これによりがん細胞が増殖停止状態と細胞周期を回っている状態を移行しながら持続的増殖を示すという細胞増殖動態が示唆され、転移や再発に寄与する分子機構であることから、進行して転移や再発を起こしたがんの治療も可能にする新たな分子標的治療の開発につながることを期待される。また、この病理発生機序は、多くのがんで共通に働いているため、特定のがん遺伝子産物を標的とする従来のがん治療に比べ多くのがん患者に適用できる治療法となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Cancer is characterized by the continuous increase of total cell numbers. However, drug resistance, metastasis and recurrence, which cause poor outcome of cancer patients, depend on the small numbers of growth-arrested cancer stem cells. In this research, GPNMB was shown to be exposed on the cell surface of growth arrested breast cancer cells and induces stem cell properties. This discovery elucidated the essential role of GPNMB in growth arrested breast cancer cells to promote tumorigenic growth of cancer cells. Therefore, it is expected to contribute the development of a novel cancer therapy which can target cancer cells initiating metastasis and recurrence.

研究分野：病理学、腫瘍学

キーワード：がん がん幹細胞 Glycoprotein NMB 細胞増殖動態 休眠がん細胞 乳癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Glycoprotein NMB (GPNMB)は、メラノサイト(色素細胞)や骨芽細胞などに発現している1回膜貫通型の糖タンパク質で、メラニン色素の合成や骨芽細胞への分化と骨形成能に関わっていることが知られていた。さらに悪性黒色腫、神経膠芽腫、乳癌、遺伝性腎癌の一部などで強く発現が亢進しており、がんの発生進展に関与していることが示唆され、抗GPNMB抗体抗がん剤複合体(antibody-drug conjugate: ADC)の悪性黒色腫と乳癌に対する臨床試験が米国で行われていた。私達は、乳腺上皮細胞に転写因子MAFKを発現させると、マウスへの移植実験で浸潤性増殖を示すがん細胞に形質転換していることを発見して、転写遺伝子であるMAFKがどのような標的遺伝子の発現制御を介して細胞のがん化を誘導しているかを網羅的に解析した結果としてGPNMBにその機能があることを発見した(Okita *et al.* *Science Signal.*, 2017)。しかし、GPNMBがどのような分子機序でがんの発生に関与しているかはほとんど解析されていなかった。さらに私達は、本研究計画を立案する過程で、乳癌細胞におけるGPNMBの機能を予備的に解析したところ、GPNMBがごく一部の増殖が停止した乳癌細胞でのみ細胞表面に輸送され、GPNMBを細胞表面に発現している細胞でのみ幹細胞性が誘導されることを発見して、本研究計画を企画した。また、GPNMBの細胞内ドメインにあるhemi-Immuneceptor Tyrosine based Activation Motif (himITAM)構造中にあるチロシン残基がSRCによってリン酸化されることを見出し、このチロシンのアラニンへの点変異によってGPNMBが腫瘍形成能を失うことも明らかにしていた。

2. 研究の目的

本研究は、GPNMBが休眠期がん細胞で細胞表面に発現し、幹細胞性を誘導することを発見したことに基づき、GPNMBによる腫瘍形成能に関する作用機構を明らかにすることを目的とした。GPNMBが幹細胞性誘導に関わることを示した研究は他に例がない。幹細胞性誘導能を失うGPNMBの変異体を複数作製し、GPNMBのどの分子構造がどのような機序を解して腫瘍形成をもたらすのかを明らかにする。GPNMBを細胞表面に発現している休眠期がん細胞をFACSで分取し、幹細胞性誘導能を解析することも目的とした。将来的には、休眠期のがん幹細胞を特異的に殺傷して、再発のないがん治療法を確立して、すでに転移・再発をきたしているがんの完治をもたらす転移・再発がんの治療法の開発を可能にするための基礎研究を行うことを目指した。また、がん細胞同士の接着性が低下して幹細胞機能に依存するスフェアの増大を示すことができないがん細胞でも幹細胞依存的な増殖を解析することを可能にする細胞培養法の開発を目指した。

3. 研究の方法

- (1) GPNMBの種々の変異体を作製して、乳腺上皮細胞に発現させ、幹細胞性誘導と腫瘍形成能に及ぼす影響を調べて、これらの機能に関わるGPNMBの構造について解析した。
- (2) すでに幹細胞性誘導ならびに腫瘍形成に関与することを明らかにしていたhemITAMのチロシン残基のリン酸化を検出する抗体を作製した。
- (3) GPNMBの細胞内分布と細胞増殖動態、幹細胞性誘導、腫瘍形成能の関係について、スフェア培養した乳癌細胞あるいはマウス移植腫瘍から単離した乳癌細胞のFACS解析、qPCRによる遺伝子発現解析、Extreme Limiting Dilution Assay (ELDA)法などによる幹細胞機能の解析、2次腫瘍形成能の解析によって検討した。
- (4) GPNMBの細胞外にあるKrigle-like domain (KLD)の機能について、細胞培養実験や腫瘍形成能の解析ならびに遺伝子発現検討などによりその作用機序の検討を行なった。
- (5) 幹細胞機能に依存する新たな細胞培養法の必要性を鑑み、Polyvinyl alcohol scaffoldを用いた新たな細胞培養法について検討した。

4. 研究成果

- (1) GPNMBの種々の変異体を作製して、乳腺上皮細胞に発現させて、幹細胞性誘導と腫瘍形成能に及ぼす影響を調べ、hemITAMとKLDを含む4カ所の変異体で、GPNMBの腫瘍形成能が失われることを明らかにした。
- (2) すでに幹細胞性誘導ならびに腫瘍形成に関与することを明らかにしていたhemITAMのチロシン残基のリン酸化を検出する抗体を作製して、このチロシンがSRCによってリン酸化されることを確認した。

(3) 乳癌細胞は、2次元(2D)の単層培養を行うと幹細胞性遺伝子の発現を示さず幹細胞に依存しない持続的な増殖を示すが、3次元(3D)のスフェア培養では、SOX2, NANOG, FOXO3などの幹細胞性遺伝子の発現を伴って増殖する(図1A, B)。スフェア培養やマウス個体内での腫瘍形成条件では、KI67陽性の細胞周期を回っているがん細胞とKI67陰性の細胞周期を停止した癌細胞が混在した状態で全体として総細胞数の持続的増加が起こり(図1C)、GPNMBは増殖が停止している細胞でのみ細胞表面に輸送され、またエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれていることが明らかになった(図1D)。さらに、GPNMBの細胞表面への輸送は、トランスフォーミング増殖因子βの刺激で亢進することも示された。

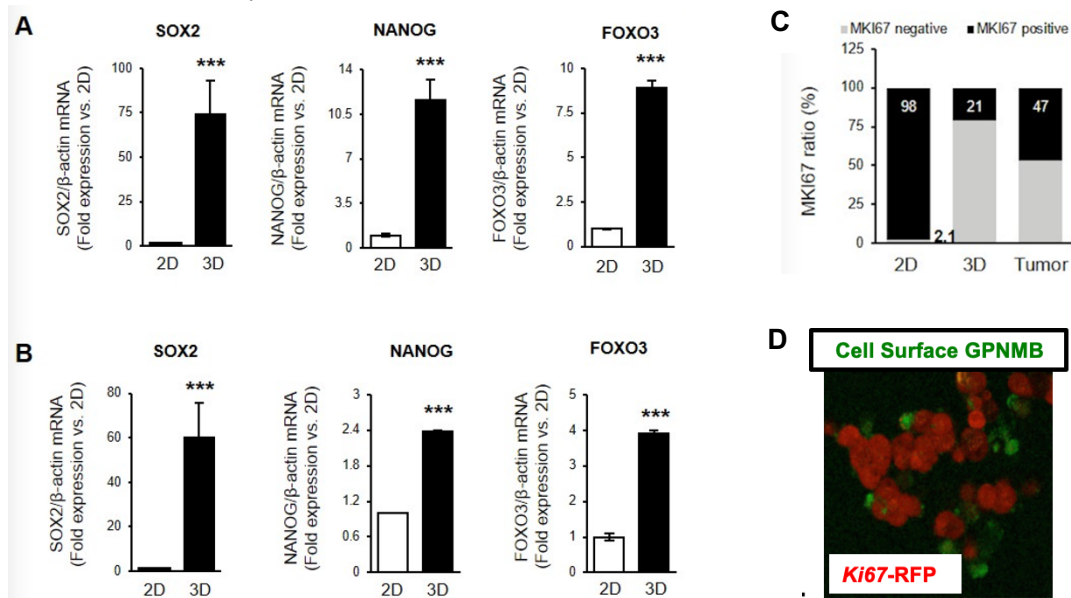


図1 単層培養(2D)とスフェア培養(3D)における幹細胞性遺伝子の発現(A, B)、ならびに単層培養、スフェア培養、移植腫瘍における細胞増殖動態の変化(C)と増殖が停止した乳癌細胞に限局したGPNMBの細胞表面への発現(D)

マウス個体内で腫瘍を形成している乳癌細胞を単離してFACSで解析すると、ごく一部の細胞でのみGPNMBが細胞表面に発現していた(1-10%)。これらの細胞で幹細胞性遺伝子の発現を調べると、GPNMBを細胞表面に発現している細胞でのみ幹細胞性遺伝子(SOX2, NANOG)の発現が誘導されており(図2A)、この細胞群は細胞表面にGPNMBを発現していない乳癌細胞と比較して20倍強い腫瘍形成能を有していた(図2B)。

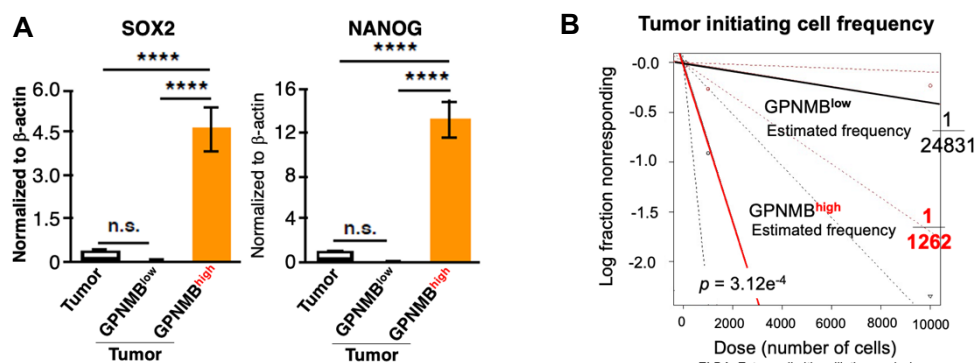


図2 GPNMBを細胞表面に発現している乳癌細胞に特異的に見られる幹細胞性遺伝子の発現(A)と移植腫瘍形成能(B)

さらに、GPNMBによる幹細胞性誘導とスフェア形成能・腫瘍形成能の関係を調べることを目的としてGPNMBの細胞内ドメインにあるhemITAMのチロシン残基をフェニルアラニンに置換して、SRCによってリン酸化されないGPNMBの変異体(YF変異体)を作製したところ、GPNMBを発現している乳腺上皮細胞を3次元培養することで誘導される幹細胞性遺伝子の発現亢進が失われ(図3A)、これに伴い、スフェア形成の誘導能(図3B)と移植腫瘍形成能(図3C)も失われ、GPNMBによる腫瘍形成促進には、hemITAMのチロシンのリン酸化に依存する幹細胞性誘導が必要であることが示された。

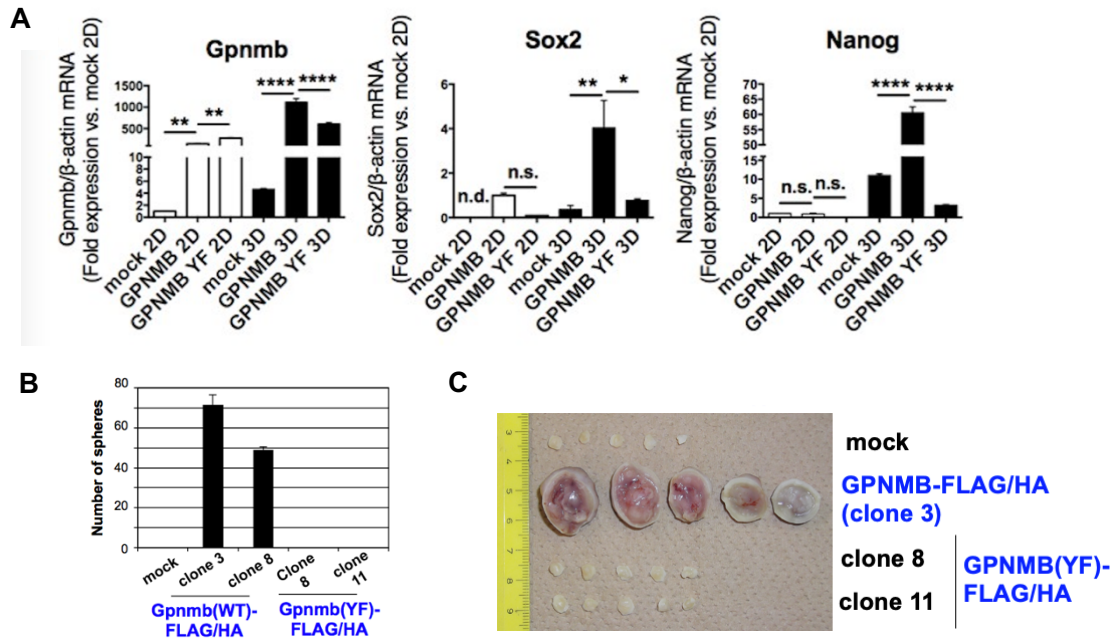


図3 hemITAMの変異(YF)による幹細胞性誘導能の消失(A)とスフェア形成能(B)、移植腫瘍形成能の消失(C)

(4) GPNMBの細胞外にあるKLDの機能についてKLDを欠失させた変異体(Δ K)を作製して解析した。GPNMBのKLDドメインが失われても、細胞内でのGPNMBの発現分布には影響しなかったが、スフェア形成や移植腫瘍の形成能は大きく低下し(図4A-C)、このドメインがGPNMBの腫瘍形成誘導に必須であることが示された。また、GPNMB Δ Kは、細胞遊走促進能も失われていた(図4D)。この Δ K変異体の機能異常について分子レベルで解析したところ、野生型のGPNMBはWNT/ β カテニンシグナルの受容と伝達を亢進させるのに対し、 Δ K変異体ではこの機能が失われていることがWNT/ β カテニンシグナルのレポーターアッセイと標的遺伝子の発現誘導の解析で示された(図4E, F)。

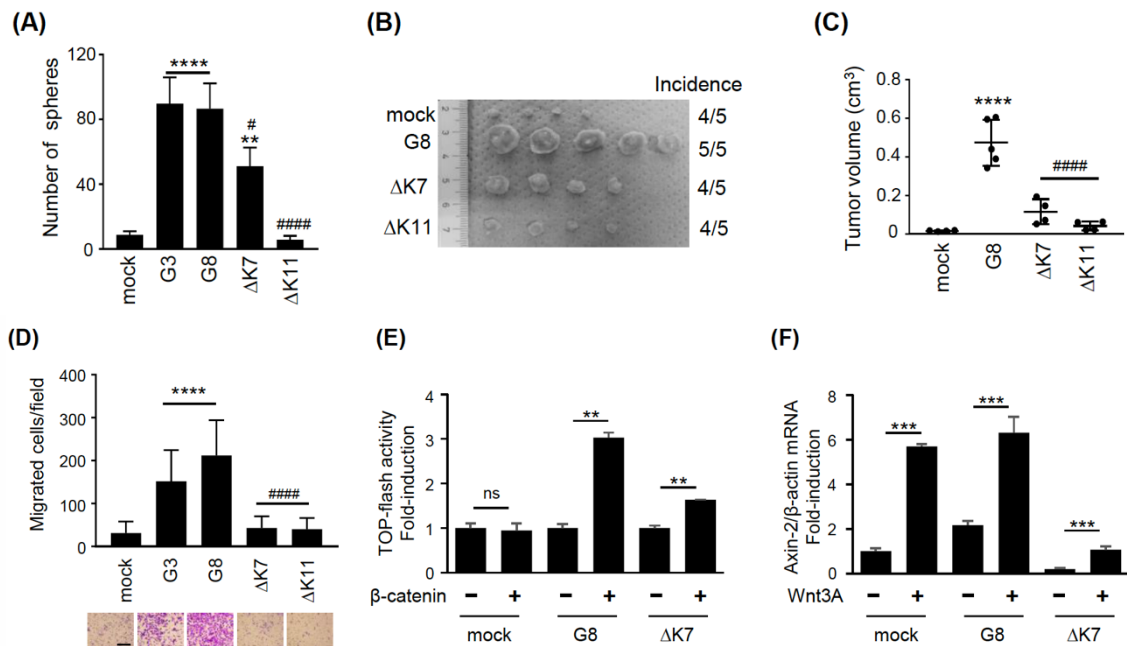


図4 KLDの欠失(Δ K)によるスフェア形成能の低下(A)、腫瘍形成能の低下(B)、細胞遊走能の低下(D)とWNTシグナル伝達促進能の低下(E, F)

GPNMBはメラノサイトや骨芽細胞においては細胞分化に依存した特有の細胞内分布と機能をもつが、上記の研究結果から、乳癌細胞においては、増殖停止に依存して細胞表面に輸送され、

細胞増殖因子刺激による SRC の活性化に依存して WNT シグナルの受容と伝達に関わり、幹細胞性遺伝子の発現を誘導することで腫瘍形成を促進するという、増殖が停止したがん細胞における役割によってがんの持続的な増殖を誘導するユニークな作用機序をもつことが示唆された。また、このような研究結果は、がん細胞の持続的な増殖には、増殖が停止している細胞の役割が必須であり、がん細胞は増殖停止して種々のストレスに耐性を示す状態と細胞周期を回る状態を移行しながら全体としてがん細胞数の持続的な増加をもたらしていることが示唆された (図 5)。

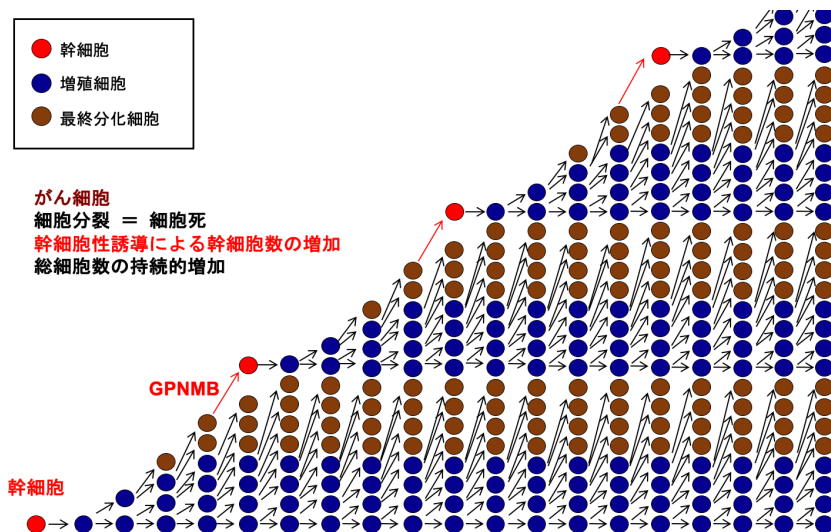


図 5 増殖が停止したがん細胞における幹細胞性誘導によるがんの持続的増殖機構 (モデル)

(5) 多くのがん細胞は、細胞同士の接着能が低下しており、移植腫瘍の形成能が強い細胞でも培養実験で幹細胞機能に依存する細胞増殖を検討する方法のないものが多い。そこで、Polyvinyl alcohol scaffold を用いた新たな細胞培養法を確立した。今後、この方法を用いライブイメージングシステムを構築することで、がん細胞の持続的な増殖動態の長期観察を可能としたい。

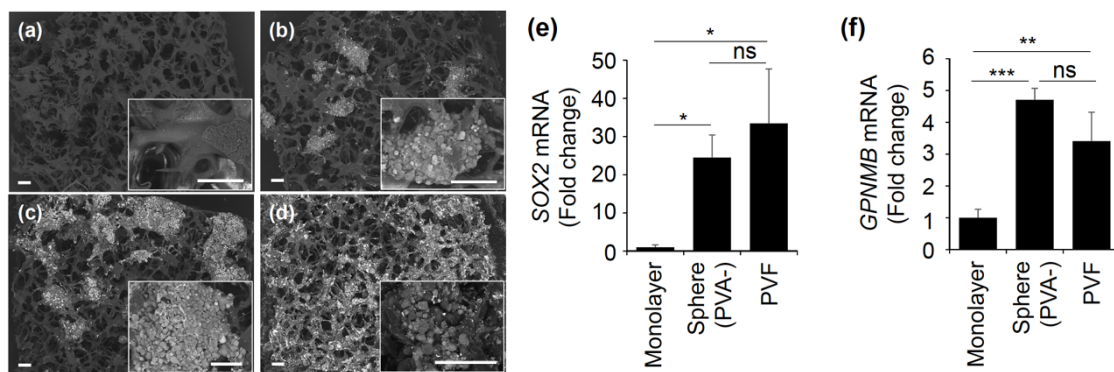


図 6 架橋 Polyvinyl alcohol scaffold (PVF)(a)を用いた乳癌細胞の持続的増加の走査型電子顕微鏡像 (b 10 日、c 20 日、d 30 日、bar 100 μ m) と SOX2 遺伝子 (e) ならびに GPNMB 遺伝子 (f) の発現

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Xie R, Okita Y, Ichikawa Y, Mohammed FA, Huynh Dam KT, Tran SPT, Kato M.	4. 巻 110
2. 論文標題 Role of the kringle-like domain in Glycoprotein NMB for its tumorigenic potential.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2237-2246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14076.	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 Chen C, Okita Y, Watanabe Y, Abe F, Fikry MA, Ichikawa Y, Suzuki H, Shibuya A, Kato M.	4. 巻 78(22)
2. 論文標題 Glycoprotein nmb is exposed on the surface of dormant breast cancer cells and induces stem cell-like properties.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6424-6435
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472	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 Okita Y, Chen C, Kato M.	4. 巻 9(99)
2. 論文標題 Cell-surface GPNMB and induction of stemness.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 37289-37290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.26472.	査読の有無 無
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 1)Okita Y, Zheng L, Kawanishi K, Miyoshi H, Yanagihara K, Kato M.	4. 巻 26(5)
2. 論文標題 Polyvinyl alcohol scaffolds and supplementation support 3D and sphere culturing of human cancer cell lines by reducing apoptosis and promoting cellular proliferation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 336-343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12843.	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9件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 加藤光保
2. 発表標題 幹細胞性誘導によるがん細胞の持続的増殖機構
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤光保、渡邊幸秀、沖田結花里、Meidi Utami Puteri、Mohammed Abdelaziz、市川優矛
2. 発表標題 幹細胞性誘導によるがん細胞の持続的増殖機構
3. 学会等名 第38回分子病理研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Rudy Xie, Yukari Okita, Mitsuyasu Kato
2. 発表標題 GPNMB, the sugar sweetening cancer cells
3. 学会等名 TGF- Signaling LCR Meeting Leiden 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 後藤のはら、Hipolito Chris、鈴木裕之、加藤光保
2. 発表標題 Screening of macrocyclic peptide against CD44.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤光保
2. 発表標題 幹細胞性誘導によるがん細胞の持続的増加機構
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 市川優矛、沖田、結花里、加藤光保
2. 発表標題 乳がん細胞の運動におけるGPNMBとFGF-2の作用
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsuyasu Kato
2. 発表標題 Stemness induction as a mechanism of tumorigenic cancer cell growth
3. 学会等名 The 3rd International Conference on Advance Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Meidi Utami Puteri, Bantari Wisynu Kusuma Wardhani, Riezki Amalia, Mohammed Abdelaziz, Yukihide Watanabe and Mitsuyasu Kato
2. 発表標題 The roles of TMEPAI in breast cancer cells
3. 学会等名 The 3rd International Conference on Advance Pharmacy and Pharmaceutical Sciences (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Meidi Utami Puteri, Bantari Wisynu Kusuma Wardhani, Riezki Amalia, Mohammed Abdelaziz, Yukihide Watanabe and Mitsuyasu Kato
2. 発表標題 The roles of TMEPAI in breast cancer cells
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

乳がんの腫瘍形成・転移形成における新たな仕組みの解明-トリプルネガティブ型乳がんの治療標的を求めて
<https://www.tsukuba.ac.jp/wp-content/uploads/170411kato-1.pdf>
 新しい乳がん幹細胞指標の発見 -膜タンパク質 GPNMB が幹細胞としての特性を誘導する!?-
<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201809281400.html>
 トリプルネガティブ型乳がんの腫瘍形成・転移形成に関わる新たな仕組みを同定 - 筑波大ら
<http://www.qlifepro.com/news/20170414/identification-of-new-mechanisms-related-to-formation-and-metastasis-formation-of-triplenegative-breast-cancer.html>
 乳癌幹細胞の新たな指標として膜タンパク質「GPNMB」を同定
<https://www.m3.com/open/clinical/news/article/632824/>

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
研究協力者	沖田 結花理 (OKITA Yukari) (30743710)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	

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