

令和元年6月19日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14981

研究課題名(和文) がん幹細胞におけるGPNMBの機能解析と特殊環状ペプチドを用いた医療応用

研究課題名(英文) Roles of GPNMB in cancer stem cells and development of therapeutic agent targeting GPNMB

研究代表者

沖田 結花里 (Okita, Yukari)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：30743710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がんの根治を妨げる原因として、腫瘍中に低い割合で存在するがん幹細胞の存在が挙げられる。それはがん幹細胞が自己複製可能で治療抵抗性があり、治療後の再発や転移の原因になると考えられているからである。本研究課題は、がん幹細胞に特異的な因子を解明することを目的として行われた。その結果、I型膜タンパク質Glycoprotein nmb (GPNMB) が、ある条件化で細胞表面に存在し、幹細胞性特性の誘導に関与していることを明らかにした。またGPNMBによる腫瘍形成誘導には、Krigle-like domain (KLD) が重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題によりGPNMBが、がん幹細胞性特性の誘導に関与していることが示された。またGPNMBによる腫瘍形成誘導には、細胞外領域に位置するKrigle-like domain (KLD) が重要であることが初めて明らかになった。がん幹細胞は治療後の再発や転移の原因になると考えられている。そのため、がん幹細胞に特異的な因子が解明できれば、それを標的としたがんの根本的な治療が可能になると期待される。そのため、本研究課題により得られた新規知見をもとに、GPNMBを標的とした新規がん治療薬が開発に成功すれば、その意義は学術的にも社会的にも大きい。

研究成果の概要(英文)：Cancer tissue is recognized as heterogeneous, and it contains a small proportion of cancer stem cells (CSCs), which is thought to be the root cause of cancer metastasis and relapse. Glycoprotein NMB (GPNMB) is a transmembrane protein, which highly expressed in many types of cancers including breast cancer, especially aggressive triple-negative type. Previously we showed that GPNMB contributes to breast cancer initiation and progression through induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT). In this study, we found that GPNMB is exposed on the cell surface and induces CSC-like properties in breast cancer cells. Furthermore, we identified the important region in the extracellular domain, krigle-like domain (KLD), for its tumorigenic potential. Therefore, we believe that GPNMB and/or KLD of GPNMB should be promising target for cancer therapy.

研究分野：腫瘍生物学、実験病理学

キーワード：GPNMB 乳がん がん幹細胞 EMT 特殊環状ペプチド 抗体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 1997年に白血病においてがん幹細胞が発見され、正常組織と同様に数%ほどのがん幹細胞と幹細胞ではないその他の細胞で構成されていることが報告された。その後、乳がんや大腸がんなどの固形がんでもがん幹細胞の存在が示唆されている。がん幹細胞は、それ自体は数が少なく増殖頻度も低いが、抗がん剤や放射線などの治療に対して抵抗性が高く、治療後の再発や転移の原因になると考えられている。したがって、がん幹細胞に特異的な因子が解明できれば、それを標的としたがんの根本的な治療が可能になると期待される。

(2) I型膜タンパク質である Glycoprotein nmb (GPNMB) は乳がん、神経膠腫や悪性黒色腫など様々ながん種での発現亢進が報告されている。我々は、乳がんの発生・進展に強く寄与する MafK-GPNMB 経路を独自に見出し、GPNMB を恒常的に発現させることで非腫瘍性乳腺上皮細胞が形質転換し、腫瘍形成能を持つようになることを明らかにした。そのメカニズムの1つとして、上皮間葉転換 (EMT) の誘導が重要であることを示した。EMT はがん細胞の浸潤転移だけでなく、幹細胞性の獲得に寄与することが報告されており、がん幹細胞性の獲得における GPNMB の役割について検討したいと考えた。

2. 研究の目的

がん幹細胞に特異的な因子の解明を目指して、膜たんぱく質である GPNMB に着目し以下3項目を大きな柱として研究を行うこととした。

- (1) がん幹細胞様特性獲得における GPNMB の作用
- (2) 腫瘍形成またはがん幹細胞様特性獲得に関与する GPNMB のドメイン解析
- (3) GPNMB 結合特殊環状ペプチドのスクリーニングと抗体作製

3. 研究の方法

(1) 細胞株および細胞培養

American Type Culture Collection (ATCC) により購入したヒト乳がん細胞株 (Hs-578T、BT-474、MDA-MB-468) およびマウス乳がん細胞株 (4T1) GPNMB (WT 野生型) GPNMB (YF 変異体) GPNMB (KLD 欠損変異体) を恒常的に発現させた NMuMG 細胞株を用いた。通常2次元単層培養には、10%ウシ血清、1%ペニシリン・ストレプトマイシン (Wako 社) を添加した DMEM 培地 (Sigma 社) を用い、37℃、5%CO₂ 環境下で培養した。ただし、Hs578T 細胞は 5 µg/mL インスリン (Wako 社) NMuMG GPNMB 恒常発現細胞は 1 µg/mL ピューロマイシン (Wako 社) をそれぞれ添加した培地を用いた。3次元スフェア培養は、DMEM と F-12 混合培地に 2%B-27 (Invitrogen 社) 2 ng/mL EGF (Sigma 社) および b-FGF (Wako 社) を添加した培地を用い、低接着培養皿 (Corning 社) を用いて浮遊状態にて培養した。この場合も Hs578T 細胞用には 5 µg/mL インスリンを加えた培地を用いた。

(2) RNA 抽出および定量的 RT-PCR (qPCR)

Total RNA は ISOGEN II (Nippongene 社) または少量の RNA は、NucleoSpin RNA XS (TaKaRa 社) を用いて抽出した。High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems 社) を用いて、total RNA 2 µg を逆転写して cDNA を合成後、GeneAmp SYBR qPCR Mix α Low ROX 試薬 (Nippongene 社) を用い、定量的 RT-PCR 法により mRNA 発現量を調べ、β-actin の発現量により補正した。

(3) 蛍光活性化細胞選別 (FACS)

3次元培養したスフェアは Accutase - Enzyme Cell Detachment Medium (Invitrogen 社) により、単細胞に分離した。また 4T1 腫瘍は、1 mg/mL collagenase (Wako 社) 中で 37℃ に加温しながら 2 時間、続けて 0.25% trypsin (Sigma 社) 5 分間、0.1 mg/mL DNase I (Roche 社) と 5 mg/mL Dispase (Gibco 社) の混合溶液中で 5 分間インキュベーションし、単細胞に分離した。細胞は抗 GPNMB 抗体 (R&D 社) および Alexa488 付加抗ヤギ IgG 抗体 (Molecular Probe 社) で染色後、BD SORP (BD 社) にて細胞表面 GPNMB 陽性細胞と陰性細胞を分取した。

(4) 動物実験

Balb/c マウスまたは ICR ノードマウス (6 週令、雌、CLEA 社) の皮下に細胞を移植し、移植片の増殖を調べた。腫瘍の大きさは、長径 × 短径² × 0.5 により計算した。移植腫瘍の継時的な観察を行い、体重の減少が認められる場合もしくは移植腫瘍サイズが体重の 10% に達する前に安楽死させた。

4. 研究成果

(1) がん幹細胞様細胞単離法の確立

幹細胞を濃縮する方法としても知られる 3次元スフェア培養を行い、2次元単層培養した場合との遺伝子発現について比較検討した。乳がん細胞 Hs578T、BT-474、MDA-MB-468、4T1 をそれぞれの培養法で培養し、幹細胞マーカーとして知られる SOX2、NANOG、OCT4、CD44

の mRNA 発現レベルを調べた。すると、これらの遺伝子発現がスフェアで有意に亢進していることが明らかになった。また CD44 陽性/CD24 陰性細胞が乳がんの幹細胞集団の指標として使われているので、*CD24* の mRNA 発現についても調べたところ、スフェアではその発現が 2 次元培養細胞に比べて有意に低かった。また興味深いことに *GPNMB* の mRNA 発現量も 3 次元スフェア培養により有意に亢進することが明らかになった。

そこで *GPNMB* は膜たんぱく質であることから、*GPNMB* の発現の高い細胞群と低い細胞群を FACS により分離できると考えた。FACS により分取後、各細胞群の遺伝子発現を調べたところ、*GPNMB* 陽性細胞群では、幹細胞マーカー *SOX2*、*NANOG* よび EMT 関連遺伝子である *SNAIL*、*SLUG* の mRNA 発現が高かった。また増殖の指標として、増殖マーカー遺伝子の発現についても検討したところ、*MKI67* および *TPX2* は *GPNMB* 陽性細胞群で低く、増殖していない休眠期にある細胞が多く含まれていることが示唆された。加えて、細胞表面 *GPNMB* 陽性/陰性細胞群の 2 次スフェアおよび 2 次腫瘍形成能について検討すると、細胞表面 *GPNMB* 陽性群で有意に 2 次スフェアおよび 2 次腫瘍形成能が高いことが示された。これらの結果より、細胞表面 *GPNMB* 発現ががん幹細胞様細胞のマーカーになり得ると考えた(発表論文 、)。

(2) がん幹細胞様特性の誘導におけるチロシン残基の重要性

GPNMB による EMT 誘導および腫瘍形成能誘導には、細胞内領域にあるチロシン残基が重要であることを示している。*GPNMB* によるがん幹細胞様特性の誘導にもこのチロシン残基が重要であるのかについて検討した。NMuMG-*GPNMB*(WT)細胞と NMuMG-*GPNMB*(YF)細胞をそれぞれ 2 次元単層培養法または 3 次元スフェア培養法にて培養し、遺伝子発現を比較した。すると、チロシン残基をフェニルアラニン残基に置換した変異体 *GPNMB*(YF)発現細胞では、幹細胞マーカー *Sox2* および *Nanog* の発現亢進が認められなかった。よって、腫瘍形成に重要なチロシン残基は、幹細胞マーカー遺伝子の発現誘導など幹細胞様特性の誘導に関与すると考えられた(発表論文 、)。

(3) *GPNMB* の腫瘍形成に重要な領域の検討

GPNMB による腫瘍形成能誘導に関与する領域について、いくつかのドメイン欠損変異体を用いて検討した。その結果、細胞外領域に存在する Kringle-like domain (KLD) が腫瘍形成能誘導に重要であることが明らかになった。*GPNMB* の KLD 欠損変異体を恒常的に発現させた NMuMG 細胞を樹立し、スフェア形成や腫瘍形成に与える影響について検討した。すると、KLD 欠損変異体発現細胞では、スフェア形成および腫瘍形成が有意に抑制された(図 1、発表論文)。今後、幹細胞様特性誘導に KLD が寄与しているのかについては検討を行う予定である。

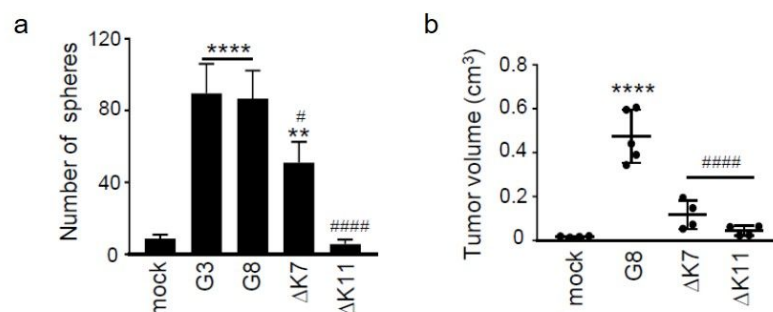


図1 *GPNMB*によるスフェア形成および腫瘍形成誘導におけるKLDの重要性

a) NMuMG-mock細胞(mock)、*GPNMB*野生型発現細胞(G3、G8)、*GPNMB*-KLD欠損変異体発現細胞(ΔK7、ΔK11)のスフェア形成能を調べた。n=3、一元配置分散分析(one-way ANOVA) Turkey's 比較試験を用いて統計処理を行った。**p<0.01、**** p<0.0001 vs mock、#p<0.05、#### p<0.0001 vs G3、G8

b) NMuMG-mock細胞(mock)、*GPNMB*野生型発現細胞(G3、G8)、*GPNMB*-KLD欠損変異体発現細胞(ΔK7、ΔK11)をヌードマウスに移植し、腫瘍形成能を調べた。摘出した移植片の体積を示した。n=5、一元配置分散分析(one-way ANOVA) Turkey's 比較試験を用いて統計処理を行った。**** p<0.0001 vs mock、#### p<0.0001 vs G3、G8

(4) 抗 *GPNMB* リン酸化抗体作製

上記のように腫瘍形成および幹細胞様特性の誘導に重要であることが示されたチロシン残基のリン酸化抗体の作製を試み、*GPNMB* のリン酸化チロシンを特異的に認識する抗体酸性ハイブリドーマを得た。今後この抗体の特異性、親和性、有用性などについて検討を重ねる予定である。

(5) GPNMB-KLD 領域結合ペプチドのスクリーニング

GPNMB による腫瘍形成能に重要であることが分かった KLD 領域に結合するペプチドのスクリーニングを行い、候補ペプチドをいくつか得ることができた。今後、その特異性、親和性について検討し、抗腫瘍効果などについても検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Rudy Xie, Yukari Okita, Yumu Ichikawa, Muhammad Ali Fikry, Huynh Dam Kim Tuyen, Sophie Thi PhuongDung Tran, and Mitsuyasu Kato. Role of the kringle-like domain in Glycoprotein NMB for its tumorigenic potential. *Cancer Science*. 2019, *in press*. 査読有

Yukari Okita, Chen Chen, and Mitsuyasu Kato. Cell-surface GPNMB and induction of stemness. *Oncotarget*. 2018; 9(99): 37289-37290. DOI: 10.18632/oncotarget.26472. 査読無

Chen Chen, Yukari Okita, Yukihide Watanabe, Fumie Abe, Muhammad Ali Fikry, Yumu Ichikawa, Hiroyuki Suzuki, Akira Shibuya, and Mitsuyasu Kato. Glycoprotein nmb is exposed on the surface of dormant breast cancer cells and induces stem cell-like properties. *Cancer Research*. 2018; 78(22): 6424-6435.

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0599. 査読有

〔学会発表〕(計12件)

沖田結花里他「乳がん細胞における GPNMB の幹細胞性誘導作用」、第 77 回日本癌学会学術総会、2018 年

沖田結花里他「Glycoprotein nmb とがん幹細胞性」、第 107 回日本病理学会総会、2018 年

沖田結花里他「乳がんの発生・進展における GPNMB の役割」、第 1 回がん三次元培養研究会、2017 年

沖田結花里他「乳がんの発生・進展における GPNMB の役割」第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年

Yukari Okita「Norvel therapeutic strategy targeting GPNMB expressing dormant cancer cells」TGF-β meeting in Uppsala 2017 (国際学会)、2017 年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

研究成果を筑波大学ホームページにてプレスリリースした。

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>

筑波大学医学医療系ホームページ 研究トピックス

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/top/current/>

筑波大学医学医療系実験病理学研究室ホームページ

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：加藤光保

ローマ字氏名：Mitsuyasu Kato

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。