138　休眠期がん幹細胞におけるGPNMBの機能解析	沖田　結花里

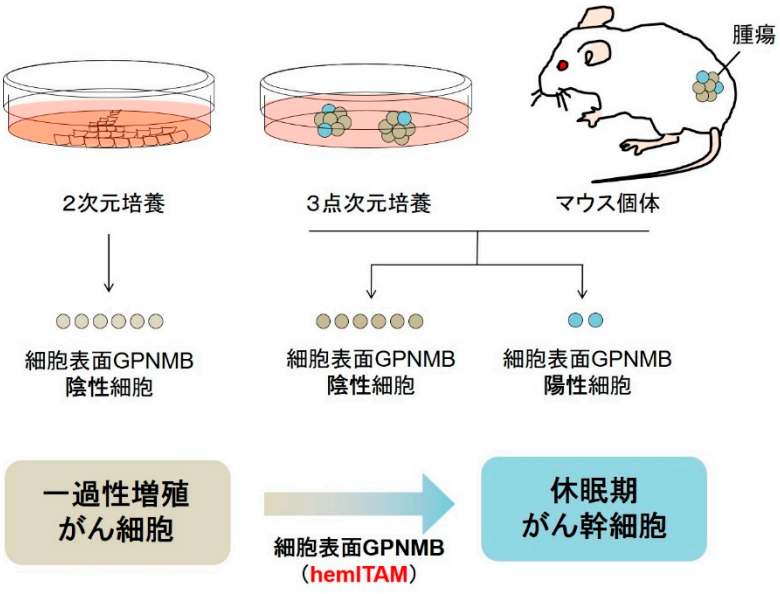
【目的】がんの根絶が難しい原因の 1 つとして、がん幹細胞の存在が挙げられる。がん幹細胞は、それ自体の数は少なく増殖速度も遅いが、抗がん剤や放射線などの治療に対して抵抗性が高く、転移や治療後の再発の原因になると考えられている。そのためがん幹細胞に特異的な因子を解明し、それを標的としたがんの根本的な治療法の開発が求められている。

本研究課題で着目する Glycoprotein NMB（GPNMB）は、上皮間葉転換（EMT）を誘導し、乳がんの発生・進展に寄与することを見出している。EMT は、がん細胞の浸潤転移に加え、がん幹細胞様特性の誘導にも関与すると報告されている。よって、EMT 誘導に関与する GPNMB とがん幹細胞性誘導との関連について検討することで、がん幹細胞についての理解を深め、がん幹細胞を特異的に標的とする治療法の開発につなげることができるのではないかと考えた。

【方法】がん幹細胞を濃縮する方法として、3 次元スフェア培養法を用い、通常の 2 次元単層培養法で培養した細胞、それぞれから RNA を抽出し、cDNA に逆転写後、がん幹細胞マーカー遺伝子（*SOX2*、*NANOG*、*OCT4*、*CD44*）、EMT 関連転写因子（*SNAIL*、*SLUG*、*ZEB1*）および *GPNMB* の mRNA 発現を定量的 RT-PCR 法にて検討した。また、3 次元スフェア培養またはマウス個体に移植し形成された腫瘍より、細胞表面 GPNMB 陽性／陰性細胞を FACS にて分取し、遺伝子発現およびスフェアまたは腫瘍の形成能を検討した。さらに GPNMB による腫瘍形成能に重要である細胞内チロシン残基が、がん幹細胞様性質の誘導にも関与しているのかについて、変異体を用いて検討した。

【結果】乳がん細胞を 3 次元スフェア培養またはマウス個体で形成された腫瘍でのみ、GPNMB が細胞表面に出現してくることを見出した。そこで細胞表面 GPNMB 陽性細胞を分取し、その性質を調べると、幹細胞マーカーおよび EMT 関連転写因子の遺伝子発現量が高い一方、増殖マーカー遺伝子の発現が低いことが明らかになった。さらに細胞表面 GPNMB 陽性細胞は、細胞表面 GPNMB 陰性細胞に比べ、スフェアおよび腫瘍形成能が高いという結果を得ることができた。つまり、GPNMB は休眠期にあるがん幹細胞様細胞でのみ細胞表面に出現してくると考えられた。また幹細胞様性質の獲得には、GPNMB による腫瘍形成能および EMT 誘導に重要な細胞内領域に存在するチロシン残基が重要であることも明らかとなった。

3 次元培養スフェアと腫瘍における細胞表面 GPNMB 陽性細胞とがん幹細胞様特性の誘導



138. 休眠期がん幹細胞における GPNMB の機能解析

沖田　結花里

筑波大学 医学医療系 実験病理学

Key words：GPNMB，がん幹細胞，上皮間葉転換，乳がん，3 次元培養

緒　言

1981 年以降日本人の死因の第 1 位はがんであり、その罹患率、死亡率はいまだに漸増傾向にある。がんを克服することは、医学分野における最重要研究課題の 1 つであることは言うまでもない。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、白血病集団は数%のがん幹細胞とその他のがん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においても、がん幹細胞の存在が報告されている。がん幹細胞は、それ自体の数は少なく増殖速度も遅いが、抗がん剤や放射線などの治療に対して抵抗性が高く、転移や治療後の再発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を解明し、それを標的としたがんの根本的な治療法の開発が求められている。

本研究課題で着目する Glycoprotein NMB（GPNMB）は、上皮間葉転換（EMT）を誘導し、乳がんの発生・進展に寄与することを見出した［1］。EMT は、上皮細胞が細胞接着、細胞極性の保持といった上皮特性を消失し、紡錘形を呈し、細胞運動が盛んになるといった間葉特性を獲得する現象であり、がん細胞の浸潤転移において重要な役割を果たすと考えられている。加えて、上皮間葉転換が幹細胞様特性の誘導にも関与するという報告がなされている。よって、EMT 誘導に関与する GPNMB とがん幹細胞性誘導との関連について検討することで、がん幹細胞について理解を深め、がん幹細胞を特異的に標的とする治療法の開発につなげることができると考えた。

本研究課題では、がん幹細胞を濃縮する方法として、3 次元スフェア培養を行った。すると通常の 2 次元単層培養に比べ、がん幹細胞マーカーの発現および GPNMB の発現が高いことが明らかとなった。さらにスフェアおよびマウス個体で形成された腫瘍中では、特定の細胞でのみ GPNMB が細胞表面に出現してくることが明らかなった。この細胞表面 GPNMB 陽性細胞は細胞表面陰性細胞に比べ、高いスフェアまたは腫瘍形成能を有していることが明らかになった。また、EMT 誘導、腫瘍形成誘導に重要であることを示したチロシン残基が、がん幹細胞様特性の誘導にも関与していることを明らかにした［2，3］。

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）または GPNMB（YF 変異体）を恒常的に発現させた NMuMG 細胞株［1］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%CO_2 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 の混合培地に 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（Nippongenge 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、GeneAce SYBR qPCR Mix α Low ROX 試薬（Nippongenge 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。それぞれの遺伝子に特異的なプライマー情報は文献 2 を参照のこと。

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。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

4T1 細胞を Balb/c マウス（6 週令、雌、CLEA 社）の皮下に移植後 3～4 週間で腫瘍を摘出し、約 1 mm^3 の大きさにした後、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た。単離した腫瘍細胞を遠心して回収後、FACS によって細胞表面 GPNMB 陽性細胞および陰性細胞を分取し、再度 Balb/c マウスの皮下に移植し、33 日後に形成された腫瘍を観察した。

結果および考察

1. 3 次元培養したスフェアにおけるがん幹細胞マーカー遺伝子、EMT 関連遺伝子および GPNMB の発現

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（図 1 には Hs578T の結果のみを掲載）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 *CD24* の発現が 2 次元培養細胞に比べて有意に低かった（図 1a）。また同時に EMT 誘導転写因子として知られる *SNAIL*、*SLUG*、*ZEB1* および *GPNMB* の mRNA 発現レベルもスフェアで有意に高いことを見出した（図 1b、c）。この結果より、3 次元スフェア培養では、幹細胞様性質を持った細胞を濃縮できることが確認された。

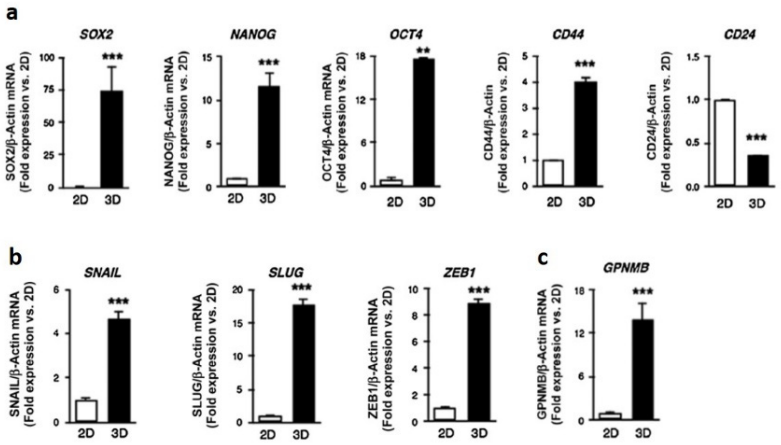


図 1. 2 次元単層培養および 3 次元スフェア培養における遺伝子発現解析

a～c）ヒト乳がん由来 Hs578T 細胞を 2 次元単層培養（2D）、3 次元スフェア培養（3D）し、幹細胞マーカーである *SOX2*、*NANOG*、*OCT4*、*CD44*、*CD24*（a）、EMT 関連転写因子である *SNAIL*、*SLUG*、*ZEB1*（b）、*GPNMB*（c）の mRNA 発現レベルを定量的 RT-PCR 法にて調べた。n = 3、Student ttest を用いて統計処理を行った。** $p < 0.01$、*** $p < 0.001$。

2. 細胞表面 GPNMB 陽性細胞と陰性細胞の分離およびそれぞれの性質

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。AFCS 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* および EMT 関連遺伝子である *SNAIL*、*SLUG* の mRNA 発現が高かった（図 2a、b）。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（図 2c）。さらに興味深いことに、GPNMB の mRNA 発現レベルは、両群で有意な差がなかった（図 2d）。このことは、GPNMB の細胞表面への局在が幹細胞様性質の誘導に関与していることを示唆すると考えられた。GPNMB はリソソームやエンドソーム膜にも局在することが知られている。また、細胞表面 GPNMB 陽性細胞は、高い 2 次スフェア形成能を示した（結果不掲載）。またマウスに形成された腫瘍からも、細胞表面 GPNMB 陽性/陰性細胞群を分取することができ、細胞表面 GPNMB 陽性細胞群では、陰性細胞群に比べ、幹細胞マーカーの発現が高く（結果不掲載）、高い頻度で腫瘍を形成することが明らかになった（図 2e）。これらの結果より、GPNMB は休眠期にあるがん幹細胞様細胞でのみ細胞表面に局在することが示唆された。しかし、GPNMB の細胞内局在がどのように制御されているのかについては、未だ不明な点が多く、今後の研究課題である。

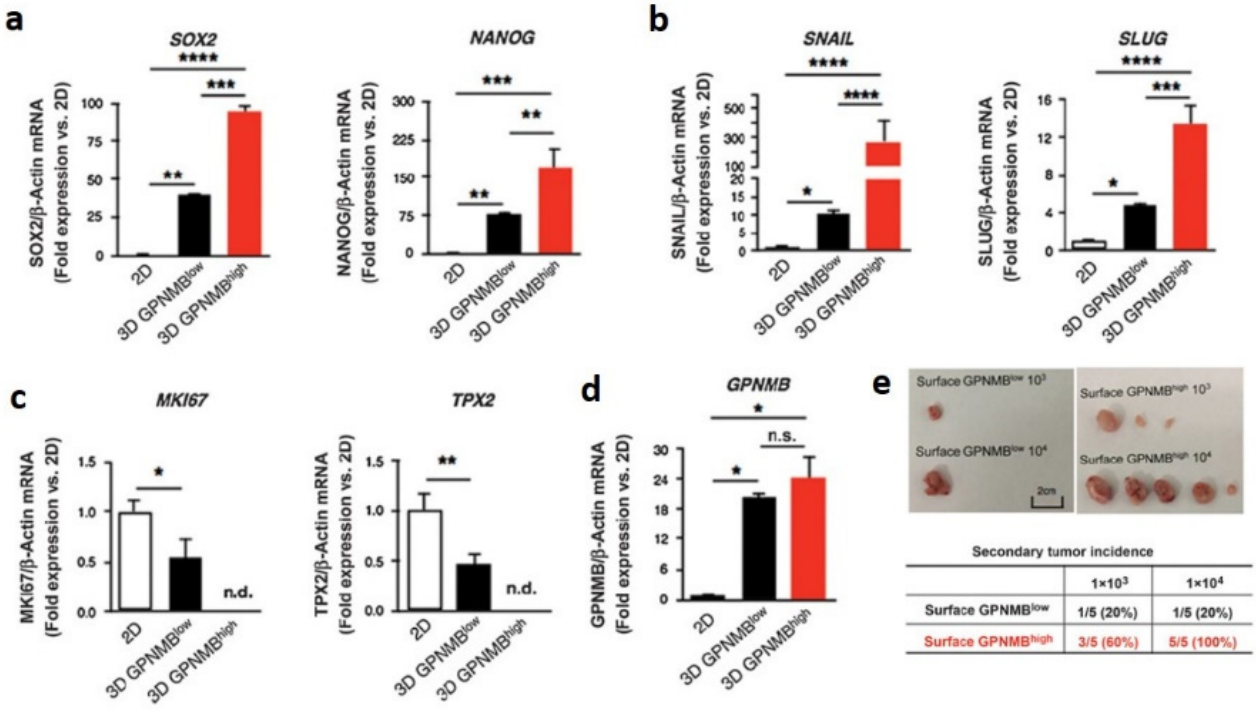


図 2. 細胞表面 GPNMB 陽性/陰性細胞群の性質

a～d）ヒト乳がん由来 Hs578T 細胞を 3 次元スフェア培養後、細胞表面 GPNMB 陽性細胞群および陰性細胞群を FACS により分取し、幹細胞マーカーである *SOX2*、*NANOG*（a）、EMT 関連転写因子である *SNAIL*、*SLUG*（b）、増殖マーカーである *MKI67*、*TPX2*（c）および *GPNMB*（d）の mRNA 発現レベルを定量的 RT-PCR 方にて調べた。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。$*p < 0.05$、$**p < 0.01$、$*** p < 0.001$、$**** p < 0.0001$。

e）マウス乳がん由来 4T1 細胞をマウスに移植し形成された腫瘍を摘出後、細胞表面 GPNMB 陽性細胞群および陰性細胞群を FACS により分取し、それぞれを 1,000 個または 10,000 個マウスの皮下に移植した。形成された腫瘍とその頻度を示した。n = 5、スケールバー = 2 cm。

3. 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［1］。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（図 3）。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。私たちは以前このチロシン残基が、がん遺伝子である Src キナーゼによってリン酸化修飾を受けることを明らかにした［1］。また他の研究グループからは、同じチロシン残基がヘパリン結合型上皮増殖因子（HB-EGF）によってリン酸化されることが報告されている［4］。今後、チロシン残基から伝わる下流シグナル伝達経路を明らかにし、そのシグナル伝達経路を標的とすることで新しい治療法を確立していくことが必要であると考える。

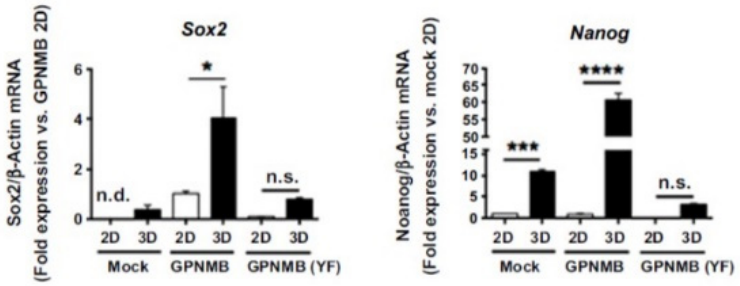


図 3. 幹細胞マーカー遺伝子発現誘導におけるチロシン残基の重要性
NMuMG-GPNMB（WT）細胞と NMuMG-GPNMB（YF）細胞をそれぞれ 2 次元単層培養（2D）、3 次元スフェア培養（3D）を行い、幹細胞マーカー遺伝子 *Sox2*、*Nanog* の mRNA 発現レベルを定量的 RT-PCR 方にて調べた。n＝3、一元配置分散分析（one-way ANOVA ）Turkey's 比較試験を用いて統計処理を行った。* $p < 0.05$、**** $p < 0.0001$。

共同研究者・謝辞

本研究の主な共同研究者は、筑波大学医学医療系実験病理学研究室の加藤光保教授、陳晨博士（現上海交通大学医学院附属新华医院）である。また本研究の遂行にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文　献

1） Okita Y, Kimura M, Xie R, Chen C, Shen LT, Kojima Y, Suzuki H, Muratani M, Saitoh M, Semba K, Heldin CH, Kato M. The transcription factor MAFK induces EMT and malignant progression of triple-negative breast cancer cells through its target GPNMB. Sci Signal. 2017 Apr 11;10（474). pii: eaak9397. doi: 10.1126/scisignal.aak9397.

2） Chen C, Okita Y, Watanabe Y, Abe F, Fikry MA, Ichikawa Y, Suzuki H, Shibuya A, Kato M. Glycoprotein nmb Is Exposed on the Surface of Dormant Breast Cancer Cells and Induces Stem Cell-like Properties. Cancer Res. 2018 Nov 15;78（22):6424-6435. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0599. Epub 2018 Sep 17.

3） Okita Y, Chen C, Kato M. Cell-surface GPNMB and induction of stemness. Oncotarget. 2018 Dec 18;9（99):37289-37290. doi: 10.18632/oncotarget.26472. eCollection 2018 Dec 18.

4） Lin A, Li C, Xing Z, Hu Q, Liang K, Han L, Wang C, Hawke DH, Wang S, Zhang Y, Wei Y, Ma G, Park PK, Zhou J, Zhou Y, Hu Z, Zhou Y, Marks JR, Liang H, Hung MC, Lin C, Yang L. The LINK-A lncRNA activates normoxic HIF1α signalling in triple-negative breast cancer. Nat Cell Biol. 2016 Feb;18（2):213-24. doi: 10.1038/ncb3295. Epub 2016 Jan 11.