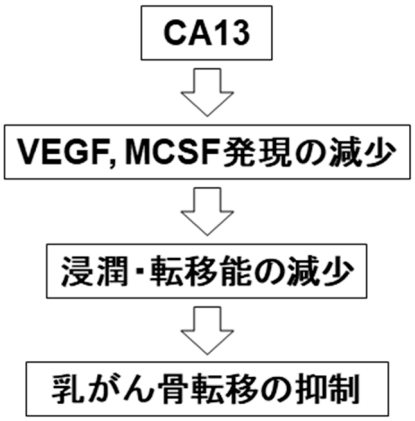
16　脂質代謝による栄養状態制御を介した乳がん骨転移機構	吉田　清嗣

【目的】近年、乳がん、大腸がん、卵巣がんなど様々ながん細胞において脂質代謝の亢進が認められ、化学療法の標的として期待されている。しかしながら、がん細胞やその低栄養微小環境における脂質代謝やその制御機構は、未だ不明な点が多く残されている。我々は、これまで乳がん幹細胞株 iCSCL-10A を用いて、乳がんの骨転移機構の解析を行ってきた。iCSCL-10A 細胞は、リプログラミング因子（OCT4、SOX2、Klf4、c-Myc）を乳腺上皮細胞株 MCF-10A に導入することによって樹立された細胞株である。本細胞株は、自己再生能、多分化能、薬剤耐性能、造腫瘍能などのがん幹細胞の性質を保持しているが、その転移能、分子機序については不明であった。そこで、*in vivo* 蛍光イメージングにより iCSCL-10A 細胞の転移の有無およびその分子機序に関わる新規因子を同定し、乳がんの転移の効果的治療法や診断マーカーの開発を目指した基礎的知見を得ることを目的とした。

【方法】近赤外蛍光タンパク質 iRFP713 を iCSCL-10A 細胞に安定発現させ、免疫不全マウスに心腔内投与し、*in vivo* 蛍光イメージングにより転移の有無を調べた。次に、iCSCL-10A 細胞の骨転移に関与する遺伝子を探索するため、骨転移巣から iCSCL-10A 細胞を単離し、網羅的遺伝子発現解析により移入前後での遺伝子発現変化を調べた。さらに、iCSCL-10A 細胞の骨転移に関わる新規候補遺伝子を過剰発現させた iCSCL-10A 細胞を作製し、浸潤能、転移能について検討した。また、乳がん患者における全生存期間、無病生存期間の検討を行った。

【結果】iCSCL-10A 細胞は、移植 4 週間後から高率に骨転移を認めた。また、骨転移巣から単離した iCSCL-10A 細胞において、細胞質型炭酸脱水酵素（CA）ファミリーの一つである carbonic anhydrase 13（CA13）の顕著な発現減少が認められた。CA ファミリーは細胞質、膜結合型などに分類され、その機能は局在により異なる。膜結合型 CA は、細胞外 pH 調節を介してがん微小環境を酸性化し、がん細胞の脂質代謝リプログラミングを活性化することにより、がんの進展・転移促進に働くことが知られている。このことから、細胞質型 CA13 は、細胞内 pH 調節を介して脂質代謝を減少させ、細胞内を低栄養状態にすることで、乳がん細胞の浸潤・転移能を抑制するというモデルの提唱に至っている。そこで、CA13 の乳がん細胞における機能を調べるため、CA13 を過剰発現させた iCSCL-10A 細胞（CA13 細胞）を作製し、検討したところ、CA13 細胞において浸潤能、骨転移能の有意な減少が認められた。次に、細胞外酸性化により発現誘導され、癌の浸潤・転移を亢進する VEGF-A、破骨細胞の分化、溶骨に関与する M-CSF の発現を調べたところ、CA13 細胞において VEGF-A、M-CSF の発現減少が認められた。さらに、CA13 高発現乳がん患者では、全生存期間、無病生存期間の延長を認めた。以上のことから、CA13 は、細胞内酸性化と VEGF-A、M-CSF の発現減少を介して、乳がん細胞の浸潤能、骨転移能の抑制、溶骨に関与する新規分子であることが明らかとなった。さらに、CA13 は、乳がんの新規診断マーカーとなりうることが示唆され、新たな治療法開発にもつながることが期待される。

CA13 による新規骨転移抑制機構



16. 脂質代謝による栄養状態制御を介した乳がん骨転移機構

吉田　清嗣

東京慈恵会医科大学 生化学講座

Key words：乳がん，CA13，骨転移，浸潤能，蛍光イメージング

緒　言

がんの生存、増殖、転移において、がん細胞は低酸素・低栄養状態という過酷な微小環境で活発な活動をするため、ダイナミックな代謝リプログラミングを発動し、ATP 産生に加え、細胞構造の材料となるタンパク質、脂質、核酸を大量に作り出している。この代謝リプログラミングはがん細胞に特徴的な現象であり、がんの進展・転移や治療抵抗性を促進している要因の一つである。この代謝リプログラミングがどのようにがんの病態に関与しているのかということは、近年のがん研究における重要なトピックとなっており、その分子機構や制御因子の解明に注目が集まっている［1］。

近年、乳がん、大腸がん、卵巣がんなど様々ながん細胞において脂質代謝の亢進が認められ、化学療法の標的として期待されている。しかしながら、がん細胞やその低栄養微小環境における脂質代謝やその制御機構は、未だ不明な点が多く残されている。我々は、これまで乳がん幹細胞株 iCSCL-10A を用いて、乳がんの骨転移機構の解析を行ってきた。iCSCL-10A 細胞は、リプログラミング因子（OCT4、SOX2、Klf4、c-Myc）を乳腺上皮細胞株 MCF-10A に導入することによって樹立された細胞株である。本細胞株は、自己再生能、多分化能、薬剤耐性能、造腫瘍能などのがん幹細胞の性質を保持しているが、その転移能、分子機序については不明であった。そこで、*in vivo* 蛍光イメージングにより iCSCL-10A 細胞の転移の有無およびその分子機序に関わる新規因子を同定し、乳がんの転移の効果的治療法や診断マーカーの開発を目指した基礎的知見を得ることを目的とした。

近赤外蛍光タンパク質 iRFP713 を iCSCL-10A 細胞に安定発現させ、免疫不全マウスに心腔内投与し、*in vivo* 蛍光イメージングにより転移の有無を調べたところ、移植 4 週間後から高率に骨転移を認めた。また、免疫不全マウスの骨転移巣から単離した iCSCL-10A 細胞を用いて、移入前後での遺伝子発現の変化を調べたところ、細胞質型炭酸脱水酵素ファミリーの一つである carbonic anhydrase 13（CA13）の顕著な発現減少が認められた。そこで、CA13 の乳がん細胞における機能を調べるため、CA13 を過剰発現させた iCSCL-10A 細胞を作製した。まず、CA13 過剰発現 iCSCL-10A 細胞の浸潤能、転移能を検討したところ、コントロールに比して、浸潤能、骨転移能の有意な減少が認められた。さらに、細胞外酸性化により発現誘導され、癌の浸潤、転移を亢進する VEGF-A、破骨細胞の分化、溶骨に関与する M-CSF の発現を調べたところ、CA13 過剰発現細胞において VEGF-A、M-CSF の発現減少が認められた。また、乳がんにおける *CA13* 遺伝子の臨床的意義を検討したところ、CA13 高発現乳がん患者では、全生存期間、無病生存期間の延長を認めた［2］。以上のことから、CA13 は、細胞内酸性化と VEGF-A、M-CSF の発現減少を介して、乳がん細胞の浸潤能を低下させ、骨転移能の抑制、溶骨に関与する新規分子であることが明らかとなった。さらに、CA13 は、乳がん細胞の骨転移抑制に関与する新規因子、診断マーカーとなりうることが示唆され、新たな治療法開発にもつながることが期待される。

方　法

1. 乳がん幹細胞株 iCSCL-10A 細胞の転移能の解析

近赤外蛍光タンパク質 iRFP713 を乳腺上皮細胞株 MCF-10A および iCSCL-10A 細胞に安定発現させた細胞（iRFP-MCF-10A および iRFP-iCSCL-10A）を作製した。これら細胞（2×10^5個）を免疫不全マウスに心腔内投与し、

4〜5 週間後に *in vivo* 蛍光イメージングにより主要組織への転移の有無を調べた。また、CT 撮影により骨転移部の溶骨の程度を調べた。

2. 骨転移巣から単離した iCSCL-10A 細胞の網羅的遺伝子発現解析

セルソーターを用いて、骨転移巣から iRFP-iCSCL-10A 細胞を単離した。移入前と骨転移した iRFP-iCSCL-10A 細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。得られた変動遺伝子を用いて Gene Ontology 解析を行った。さらに、その遺伝子から、乳がん細胞の転移に関係することが知られていない遺伝子 4 種を抽出し、定量 PCR 法により、骨転移した iRFP-iCSCL-10A 細胞における遺伝子発現レベルを調べた。

3. CA13 過剰発現乳がん細胞の浸潤・転移能の解析

iCSCL-10A 細胞の骨転移に関わる新規候補遺伝子を過剰発現させた iCSCL-10A 細胞を作製し、浸潤能、転移能について検討した。浸潤能に関しては、基底膜マトリックス溶液でコートされ、8μm 孔のポリカーボネート膜を付着した 24 ウェルプレートに 5×10^4個の細胞を上チャンバーに加え 24 時間培養し、下面に移動した細胞数をカウントした。転移能に関しては、方法 1 と同様に行った。また、定量 PCR 法により、CA13 過剰発現 iRFP-iCSCL-10A 細胞における *VEGF-A*、*M-CSF* 遺伝子発現レベルを調べた。

4. 乳がんにおける *CA13* 遺伝子発現と臨床的意義の検討

乳がん患者における全生存期間、無病生存期間の検討を行った。全生存期間に関しては、TCGA 乳がん患者データセット（high : n＝961、low : n＝130）、無病生存期間に関しては、GSE4922 乳がん患者データセット（high : n＝196、low : n＝53）を用いて検討した。

結果および考察

1. 乳がん幹細胞株 iCSCL-10A 細胞の転移能の解析

iRFP-MCF-10A および iRFP-iCSCL-10A 細胞を免疫不全マウスに心腔内投与し、*in vivo* 蛍光イメージングにより主要組織への転移能を調べた。その結果、iRFP-MCF-10A 細胞を移入したマウスでは全く転移を認めなかったが、iRFP-iCSCL-10A 細胞を移入したマウスでは、移入 4 週間後から、大腿骨（80%）、肝臓（80%）、副腎（80%）、卵巣（50%）、肺（33%）に転移を認めた（図 1A、B）。特に高率に大腿骨・脛骨転移を認めた。また、iCSCL-10A 細胞を移入したマウスの脛骨部に溶骨病変も認めた（図 1C）。以上のことから、iCSCL-10A 細胞は、骨転移能を有することが見出された。

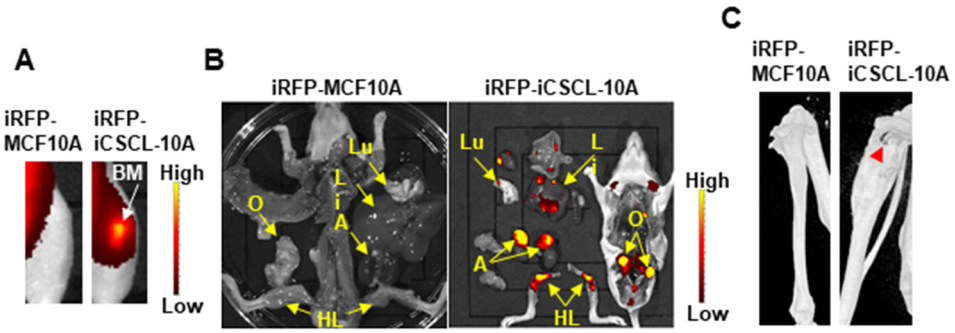


図1. iRFP-iCSCL-10A 細胞の転移能の解析

iRFP-iCSCL-10A 細胞を心腔内投与したマウスの投与5週間後の蛍光イメージング。

A) iRFP-MCF-10A（左図）、iRFP-iCSCL-10A 細胞（右図）。骨転移部（矢印）。

B) iRFP-MCF-10A（左図）、iRFP-iCSCL-10A 細胞（右図）。矢印は転移組織を示す。肺（Lu）、肝臓（L）、副腎（A）、大腿骨（HL）、卵巣（O）。

C) CT 解析結果。矢頭は溶骨部位を示す。

2. 骨転移巣から単離した iCSCL-10A 細胞の網羅的遺伝子発現解析

iCSCL-10A 細胞の骨転移に関与する遺伝子を探索するため、骨転移巣から iRFP 陽性細胞を単離し、移入前後での遺伝子発現の変化を調べた。移入前の iCSCL-10A 細胞に比べ、骨転移巣から単離した iCSCL-10A 細胞では、760 遺伝子の発現亢進、438 遺伝子の発現減少を認めた。これら発現変動した遺伝子の Gene Ontology 解析結果の一部を示した（図 2A）。その中から、乳がん細胞の転移に関係することが知られていない遺伝子を抽出し、骨転移した iCSCL-10A 細胞で発現が減少していることを見出した（図 2B）。これら遺伝子 4 種は、骨転移巣において、有意に発現減少しており、乳がん骨転移を抑制する新規候補遺伝子となりうることが示唆された。

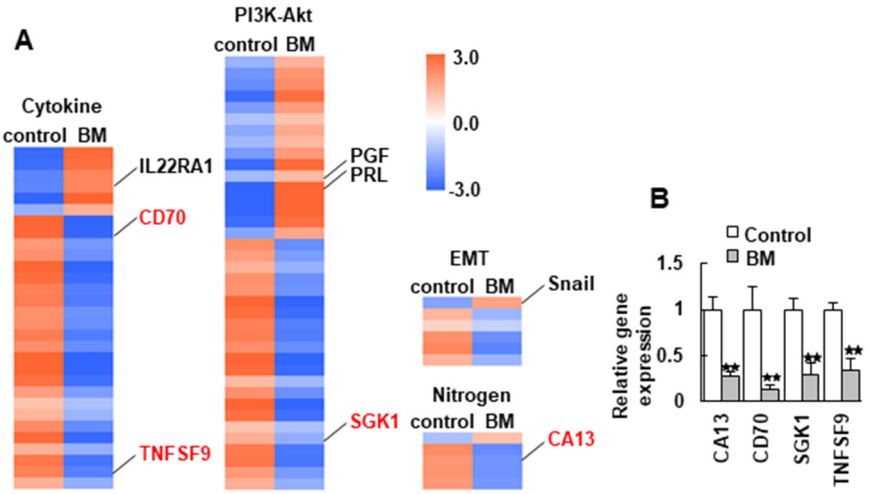


図2. 骨転移iCSCL-10A 細胞の網羅的遺伝子発現解析

A) 網羅的遺伝子発現解析のヒートマップ。

B) 骨転移 iCSCL-10A 細胞における候補遺伝子発現。

n＝3～5、**p＜0.01、Student's t-test。

3. CA13 過剰発現 iCSCL-10A 細胞の浸潤・転移能の解析

候補遺伝子の乳がん細胞における機能を調べるため、まず、候補遺伝子を過剰発現させた細胞を作製し、浸潤能、骨転移能を調べたところ、*carbonic anhydrase 13（CA13）* 過剰発現細胞において浸潤能、骨転移能の減少が認められた（図 3A～C）。これらの解析から、*CA13* は乳がん骨転移を抑制する新規候補遺伝子であることが示唆された。CA13 は、炭酸脱水素酵素（CA）ファミリーの一つであり、細胞質に局在し、細胞内 pH 調節に関わる遺伝子であるが、癌における機能がほとんどわかっていない［3］。CA ファミリーはその局在によって細胞質、膜結合型などに分類され、その機能は局在により異なる。膜結合型 CA ファミリーは、細胞外 pH 調節を介してがん微小環境を酸性化し、がん細胞の脂質代謝リプログラミングを活性化することにより、がんの進展・転移促進に働くことが知られている。このことから、細胞質型 CA13 は、細胞内 pH 調節を介して脂質代謝を減少させ、細胞内を低栄養状態にすることで、乳がん細胞の浸潤・転移能を抑制するというモデルの提唱に至っている。そこで、CA13 による骨転移抑制に関与する遺伝子を調べた。近年、VEGF-A が細胞外酸性化により発現誘導され、癌の浸潤・転移を亢進すること、また、細胞内酸性化は、VEGF-A 発現を減弱させることが知られている。このことから、CA13 が、VEGF-A を介して、骨転移抑制に関与する可能性が考えられる。そこで、CA13 過剰発現細胞における *VEGF-A* 発現を調べてみると、*VEGF-A* の発現減少が認められた（図 3D）。また、破骨細胞の分化、溶骨に関与する *M-CSF* の発現減少が認められた（図 3E）。これらの結果から、CA13 は、細胞内酸性化と *VEGF-A*、*M-CSF* の発現減少を介して、乳がん細胞の浸潤能を低下させ、骨転移能の抑制、溶骨に関与する新規分子であることが明らかとなった。

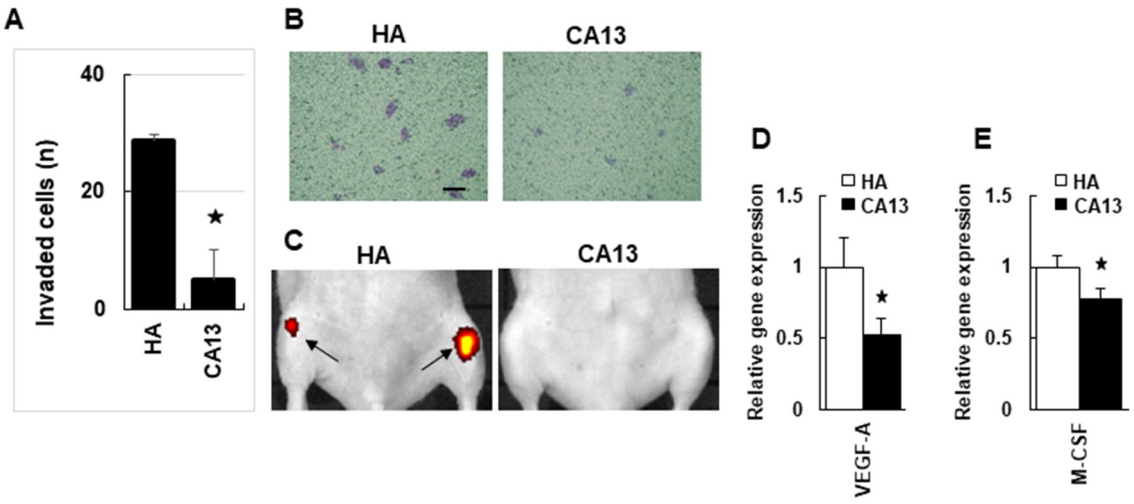


図3. CA13過剰発現iCSCL-10A 細胞の浸潤・転移能の解析

A、B）CA13 過剰発現 iCSCL-10A 細胞（CA13）の浸潤能の解析（スケールバー：100μm）。

C） CA13 過剰発現 iCSCL-10A 細胞（CA13）の転移能の解析。

D、E）CA13 過剰発現 iCSCL-10A 細胞（CA13）における *VEGF-A*、*M-CSF* 遺伝子発現解析。*: $p<0.05$, Student's t-test.

4. 乳がんにおける *CA13* 遺伝子発現と臨床的意義の検討

さらに、乳がんにおける *CA13* 遺伝子の臨床的意義を検討したところ、CA13 高発現乳がん患者では、全生存期間、無病生存期間の延長を認めた。以上のことから、CA13 は、乳がん細胞の骨転移抑制に関与する新規因子、診断マーカーとなりうることが示唆され、新たな治療法開発にもつながることが期待される。

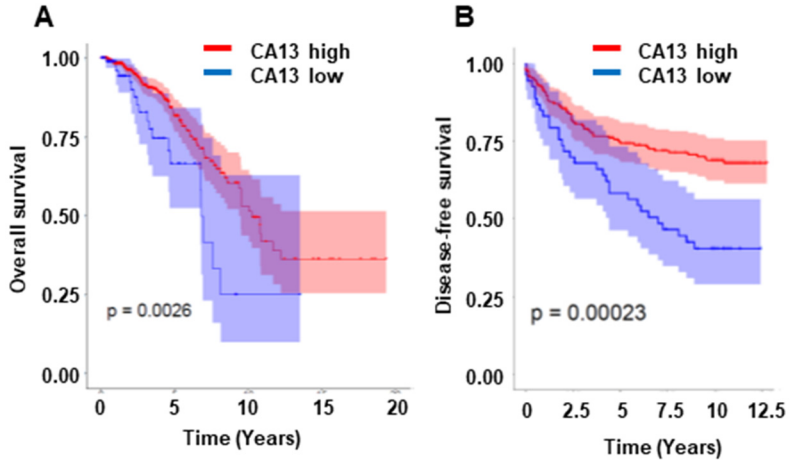


図4. *CA13*遺伝子発現と乳がん患者予後との相関性

CA13 高発現乳がん患者（赤線）と *CA13* 低発現乳がん患者（青線）における全生存期間（A）、無病生存期間（B）。Log-rank test.

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学生化学講座の與五沢里美講師、国立がん研究センター研究所細胞情報学分野の中山淳研究員、横浜市立大学医学部微生物学教室の梁明秀教授、西真由子助教である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. Cell. Cell Metab. 2016 Jan 12;23(1):27-47. PMID: 26771115 DOI: 10.1016/j.cmet.2015.12.006.

2) Yogosawa S, Nakayama J, Nishi M, Ryo A, Yoshida K. Carbonic anhydrase 13 suppresses bone metastasis in breast cancer. Cancer Treat Res Commun. 2021 Feb 9;27:100332. PMID: 33588197 DOI: 10.1016/j.ctarc.2021.100332.

3) Kummola L, Hämäläinen JM, Kivelä J, Kivelä AJ, Saarnio J, Karttunen T, Parkkila S. Expression of a novel carbonic anhydrase, CA XIII, in normal and neoplastic colorectal mucosa. BMC Cancer. 2005 Apr 18;5:41. PMID: 15836783 DOI: 10.1186/1471-2407-5-41.