

研究報告書
令和4年度：A課題

2024年 4月 8日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 国立がん研究センター研究所

住 所 東京都中央区築地 5-1-1

研究者氏名 山本 雄介

(研究課題)

セリン代謝酵素を標的としたがん特異的エクソソーム分泌抑制手法の開発

令和5年 1月 23日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

【研究目的】

細胞が分泌する細胞外小胞エクソソームによって、細胞同士で様々な情報を交換することは、細胞間コミュニケーションにおいて重要な要素として知られている。エクソソームの分泌量は正常細胞と比較してがん細胞で多いことが知られており、がん細胞が出すエクソソームはがんの発生、浸潤、転移など様々な段階に影響を与えるとされている。申請者らは、これまでのがん特異的なエクソソームの分泌機構を解明するための研究を行ってきた。全マイクロRNAによるスクリーニングにより、エクソソームの分泌に関与するmiR-891bを同定した。さらに、miR-891bの直接の標的遺伝子としてPSAT1 (Phosphoserine Aminotransferase 1)が同定された。PSAT1の発現量はがん細胞で亢進しており、その発現を抑制することで、様々ながん種においてエクソソームの分泌量が抑制された。PSAT1はアミノ酸の1つであるセリンの合成に関わるタンパク質であることから、セリン合成経路が、がん細胞特異的なエクソソーム分泌機構であることが示唆された。本研究では、がん細胞で選択的に活性化しているセリン合成経路を対象とすることで、がん細胞のエクソソームの分泌を抑制する。さらに、がん特異的なエクソソーム分泌阻害が新規のがん治療法となることを検証する。

【研究方法】

1. がん細胞特異的なエクソソーム分泌の抑制と悪性度の評価

先行研究において同定されたセリン-セラミド合成経路においては、PSAT1の上流の因子であるPHGDHを抑制するセリン合成阻害剤NCT-503や、PSAT1の下流のPSPHのさらに下流の

セラミド合成経路を阻害する Fumonisin B1 が存在する。それらの化合物を用いることで、培養がん細胞においてエクソソーム分泌の変化を検証する。

2. 担癌マウスモデルを用いたがん細胞特異的なエクソソーム分泌の抑制効果の検証

申請者はこれまでに乳がん細胞株 MCF7 細胞などを用いた担がんマウスモデルを構築している。この細胞株移植による担がんマウスモデルにおいて、PSAT1 の遺伝学的抑制や強制発現ががん細胞の転移に与える影響について検証する。In vivo imaging により PSAT1 の発現変化ががん転移に与える影響について経時的に明らかにする。主として、尾動注投与による骨転移モデルを用いるが、尾静注による肺転移モデルを用いて同様の解析を行う。

3. がん細胞特異的なエクソソーム分泌の抑制ががん微小環境に与える影響の評価

エクソソームは細胞間でのコミュニケーションの道具であり、がん細胞はエクソソームをがん微小環境内の細胞へと受け渡すことによって、自身の生存に有利な環境を作り出している。そこで、セリン合成阻害が、がん細胞自身でなく、周囲の細胞に与える影響を評価する。上記の骨転移モデルを用いて、化学組織染色によって、がん微小環境の細胞の変化を解析する。

【結果】

PSAT1 遺伝子が制御しているセリン合成経路に関連する遺伝子として、PSAT1 の上流遺伝子である PHGDH と下流に位置する PSPH 遺伝子を siRNA で抑制し、大腸がん細胞株 HCT116、肺がん細胞株 A549 においてエクソソームの分泌量を測定した結果、予想通り、エクソソームの分泌量が減少していた。また、セラミド合成に関与する遺伝子 SPTLC1、KDSR、CERS6、DEGS1 を siRNA で抑制したところ、同様にエクソソーム分泌量が有意に減少することが確認された。さらに、セリン-セラミド合成経路を阻害する NCT-503、Fumonisin B1、GW4869 で処理することで、同様にエクソソームの分泌量が減少することが確認された。

乳がん細胞株 MCF7 細胞とその骨転移株である MCF7-BM02 細胞を用いたがん細胞の骨転移実験を行った。PSAT1 の発現量が低い MCF7 細胞に PSAT1 を強制発現させることで、尾動注投与による骨転移モデルが有意に増加することを確認した。また、PSAT1 の発現量が高い MCF7-BM02 細胞に PSAT1 shRNA を用いて、PSAT1 の発現を抑制すると、移植実験によって、骨転移が減少することを確認した。さらに、MDA-MB-231 細胞を用いた肺転移モデルにおいても、PSAT1 の強制発現が肺転移を有意に増加させることを確認した。

骨転移モデルにおいて、PSAT1 を強制発現させた細胞が与える影響について、破骨細胞を染色する TRAP 染色を行うことで、in vitro での解析と同様にエクソソームの分泌量が増えることで、破骨細胞の分化が顕著に進むことが明らかになり、そのため骨転移の増加が生じたことを明らかにした。

【考察】

遺伝子抑制ならびに薬剤投与実験から、がん細胞で亢進しているエクソソーム分泌にはセリン-セラミド合成経路が重要であることを明らかにした。さらに、PSAT1 を介したエクソソーム分泌ががん転移等のがんの悪性化に関与していることを動物実験から証明した。実際ががん細胞が分泌しているエクソソームががん微小環境に影響を与えることを示した。これらのことから、がん細胞のエクソソーム分泌機構を抑制することが新たな治療標的となりうると考えられた。

【本助成金関連の査読付き論文】

現在、論文投稿改定中

【本研究関連の代表的学会発表】

1. 山元 智史, 中山 淳, 山本 雄介, 落谷 孝広. PSAT1 の発現亢進による細胞外小胞を介したがん転移促進機構 第 82 回日本癌学会総会 2023 年 9 月
2. 山本 雄介. Elucidating Molecular Mechanisms on Metastasis via Cancer-Selective Extracellular vesicles. 第 46 回日本分子生物学会年会 2023 年 12 月