

No.	25-1161	
Project Title	トリプルネガティブ乳癌における膜内在型セリンプロテアーゼの発現制御機構の解明と創薬開発	
Principal Investigator	豊雅 片桐 (National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition ・ Professor)	
Project Member(s)	IMSUT Host Researcher	Yoichi Furukawa (The Institute Of Medical Science, The University Of Tokyo ・ Professor)
	Project Member (s)	松下 洋輔 (医薬基盤健康・栄養研究所 医薬基盤研究所 ・ 研究員)

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書（年次終了・研究完了）【国内】

共同研究報告（年次終了）

がん細胞の異常増殖は、エネルギー代謝の変化を通じて低栄養・低酸素といった微小環境に適応することで維持されている。このような代謝リプログラミングは、がんの主要な特徴であり、特にグルタミン代謝による同化作用の亢進は、腫瘍の悪性化や薬剤耐性に関与することから、その分子機構の解明は新規がん治療薬開発において重要である。申請者らは、生物学的悪性度の高いトリプルネガティブ乳がん（TNBC）を対象とした網羅的遺伝子発現解析により、膜内在型セリンプロテアーゼRhomboid-like 2（RHBDL2）を高頻度に発現亢進する遺伝子として同定している。公共データベース解析では、RHBDL2高発現TNBC症例は予後不良と相関し、複数のTNBC細胞株においてsiRNAによる発現抑制は増殖能を著明に低下させた。一方、RHBDL2の過剰発現は増殖能に加え、スフェロイド形成能や遊走能の有意な亢進を示した。さらに、機能解析として実施したプロテオーム解析により、主要なグルタミントランスポーターであるASCT2をRHBDL2の相互作用分子として同定した。さらに、RHBDL2の酵素活性がASCT2の細胞膜へのトラフィッキングと安定化およびグルタミン取り込み亢進に重要であること、ならびにRHBDL2野生型の過剰発現により細胞増殖のグルタミン依存性が高まることを明らかにした。加えて、RHBDL2がタキサン系抗がん剤に対する感受性に関与する可能性も示された。以上より、RHBDL2はASCT2制御を介したグルタミン代謝の促進を通じて、腫瘍の悪性化および薬剤耐性に寄与することを示してきた。

そのため、本研究では、RHBDL2を標的とした創薬開発を進めるために、TNBCにおけるRHBDL2発現亢進の分子機構の解明を目的としており、本年度は下記項目を進めた。

① TNBC患者サンプルのCNV解析に向けたゲノムDNAの抽出

RHBDL2はTNBCにおいて高頻度に発現亢進を認めるが、その発現亢進の詳細な機序は不明である。これまでに、公共のがんNGSデータベースを用いた解析を通じて、RHBDL2遺伝子を含む染色体領域のコピー数増加を明らかにしている。本研究では、発現亢進を認めたTNBC患者サンプルにおいてCNV解析を実施することで、その発現亢進機序の一端を解明することを目的とした。CNV解析には高品質なゲノムDNAの取得が極めて重要であることから、gDNAの分解度を評価するためにDIN（DNA Integrity Number）値の解析を行った。

② ASCT2細胞膜移行の制御機構解析

ASCT2の細胞膜へのトラフィッキングおよび安定化にはN型糖鎖修飾が関与することが知られている。本研究では、RHBDL2の酵素活性がASCT2のN型糖鎖修飾の維持に寄与することを、N型糖鎖修飾特異的切断酵素であるPNGase F（Peptide N-glycosidase F）およびTunicamycinを用いて確認した。一方、RHBDL2はセリンプロテアーゼであるが、相互作用分子であるASCT2の切断は検出されなかった。このことから、直接的な切断制御の可能性は低いと考えられた。加えて、RHBDL2は細胞膜以外に、小胞体（膜）にも局在することを、小胞体内腔に発現するタンパク質との共染色により確認した。以上のことから、糖鎖修飾関連因子を介した間接的制御の可能性が示唆された。

続いて、RHBDL2過剰発現TNBC細胞株をホルマリンで固定した後、FLAGタグ付きRHBDL2にて免疫沈降を行い、そのサンプルを用いたプロテオーム解析を実施することで、細胞膜および小胞体における相互作用分子の同定を試みた。その結果、小胞体に局在する複数のオリゴ糖転移酵素を同定した。これらの因子の中には、乳がんにおける高発現や薬剤耐性との関連が報告されている酵素も含まれていたことから、RHBDL2の基質候補であるだけでなく、がんの悪性化に関与する可能性も考えられる。

現在は、ASCT2のN型糖鎖修飾を介した細胞膜へのトラフィッキングおよびグルタミン取り込み亢進におけるRHBDL2-オリゴ糖転移酵素複合体の関与について機能解析を進めている。さらに、これらオリゴ糖転移酵素複合体構成因子自身のTNBCにおける役割についても解析を行う予定である。

③ 抗RHBDL2抗体の樹立と機能解析

これまでに作製したRHBDL2特異的ポリクローナル抗体はTNBC細胞増殖およびグルタミン取り込みを有意に抑制することを認めたが、その活性は限定的であった。そこで、より高い中和活性を有するモノクローナル抗体作製を進めた。具体的には、全長RHBDL2プラスミドを複数回免疫後、追加免疫（ブースト）を実施し、脾細胞を回収した後、ハイブリドーマを作製して複数のクローンを樹立した。その結果、これらの抗体は細胞膜に発現するRHBDL2の細胞質側、あるいは小胞体に局在する細胞質側エピトープを認識するものであったが、中和活性は有していなかった。現在は、改良した免疫方法により新たなハイブリドーマの取得を進めており、今後、継続して得られた抗体に関する機能評価を実施する予定である。