

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18404

研究課題名(和文) Pgamによるグルコース代謝リプログラミングを標的としたがん幹細胞克服法の開発

研究課題名(英文) Analysis of reprogrammed metabolism by PGAM in cancer stem cell model

研究代表者

河野 晋 (Kohno, Susumu)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：30625463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制遺伝子RBの不活性化は、がん悪性進展課程において、高頻度に観察される。これまでに、RB追加欠損モデルの解析を行い、RB・p53複合欠損マウス甲状腺C細胞は高度な未分化性を獲得することや、p53欠損したがん細胞では、RBの追加欠損によりがん幹細胞様集団が出現することを見出している。本研究では、がん幹細胞様集団の代謝に着目し、その動態を解析することで、PGAMががん幹細胞様集団の未分化性の維持に必要であることを明らかにした。さらに、RBによるPGAMの発現調節はヒストン脱メチル化酵素を介して行われることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Inactivation of the tumor suppressor gene RB is frequently observed in cancer progression. We analyzed the model lacking RB additionally and found that thyroid C cells of RB・p53-deficient mice acquire high undifferentiated property. In addition, we also found that cancer stem cell-like populations appear due to the additional deficiency of RB in p53 deficient cancer cells. In this study, we focused on the metabolism of cancer stem cell-like population and analyzed its dynamics, revealing that PGAM is necessary for maintaining the undifferentiated state of cancer stem cell-like population. Furthermore, it was revealed that regulation of PGAM expression by RB is mediated through histone demethylase.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：PGAM 糖代謝 RB がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

がん組織は、均一な細胞集団ではなく、がん幹細胞を頂点とするヒエラルキー構造をとると考えられている。これは組織幹細胞の分化構造と同じで、前駆細胞群は短い細胞周期で分裂し、がん幹細胞は長い細胞周期で分裂を行う。このため、DNA複製に伴う遺伝子変異の確率が減少し、がんのクローン性が保たれると同時に、細胞周期を標的とした抗がん剤に対する抵抗性も高くなると考えられている。つまり、長い細胞周期が安定に維持されるがん幹細胞の特性は、治療抵抗性や再発を特徴とする悪性腫瘍特性の本態と言える。したがって、長い細胞周期を安定に維持するメカニズムや、それに連動する細胞特性を解明することが、がん幹細胞特性の破綻を目指したがん幹細胞治療標的分子の同定につながる。

がん抑制遺伝子 RB は、転写因子 E2F を介して、細胞周期進行を制御している。細胞周期進行上、DNA複製などに伴い細胞を構成する分子の需要が増大する。従って、これらの分子を生合成するには、その基本骨格を構成している炭素源、グルコースやグルタミンの動員する必要がある。実際に、がん細胞では、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異などにより、解糖系の亢進や脂肪酸合成の亢進が認められる。一方で、遺伝子欠損などによる RB の不活性化は、網膜芽細胞腫や小細胞肺がんの一部を除いて、癌の悪性進展課程において高頻度に観察される。RB の不活性化により、腫瘍に与える影響は、上皮間葉転換、血管新生、炎症、未分化性の発現など様々な悪性形質の誘導である。しかしながら、RB 不活性化によって獲得する悪性形質に細胞内代謝がどのように関わっているのか、また中心炭素代謝と RB の関係については、未だ不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

これまでに、がん抑制遺伝子 RB の追加欠損モデルの解析より、甲状腺 C 細胞が高度な未分化性を獲得することを見出してきた。また、特定のコンテキストにおいて、RB の不活性化は解糖系酵素 PGAM の発現を低下させることも見出している。しかし、RB 不活性化により出現するがん幹細胞様集団における PGAM 発現調節機序や PGAM 発現低下による代謝変化がどのようにして幹細胞機能維持に寄与するのか不明である。本研究では、RB 不活性化により出現するがん幹細胞様集団のグルコースおよびグルタミン代謝動態の解析、グルコース・グルタミン代謝動態と細胞機能の関係の解析することにより、PGAM 発現低下による代謝が幹細胞機能の維持に果たす役割と PGAM 発現調節メカニズムを明らかにする。

また、これまでのがん幹細胞仮説における議論は、専ら組織幹細胞学・分化の視点から語られがちであった。本研究では、がん幹細胞

の可塑性について議論はあるが、幹細胞の本質が半永久的な自己保存システムであると考え、がん幹細胞は自己複製以外の細胞活動に要求される自由エネルギーが低い細胞と推測した。これを踏まえ、低栄養条件下で培養(スフィアアッセイ)した場合でも増殖できる細胞群に着目し、細胞内代謝の観点からがん幹細胞を理解することを試みる。以上により、PGAM を介した代謝リプログラムを標的として、がん幹細胞が制御できることを証明する。

3. 研究の方法

悪性腫瘍の本態である治療抵抗性や再発には、がん幹細胞の特性が深く関わっている。しかしながら、その成立維持の機構は明確になっていない。本研究では、p53 欠損マウス由来肉腫細胞を用いて、無血清条件下で、がん幹細胞が形成するスフィアを比較的長期間の培養後に解体し、2次元培養において再増殖する細胞を解析した(スフェア法)。スフェア法により収集された細胞は、20%酸素・10%血清存在下でも極めて遅い細胞周期進行を示しつつ、高い造腫瘍能を保持すること、ヒトがん幹細胞と同様に胚性幹細胞特異的遺伝子の発現が高い。本研究では、以下に記した4つの項目に研究計画を分けて、研究を進め、モデルがん幹細胞における PGAM 発現低下の生理的役割およびメカニズムを細胞分化・代謝的観点から明らかにした。

(1) モデルがん幹細胞に特異的なグルコース・グルタミン代謝の解明

¹³C ラベルしたグルコース・グルタミンの細胞内代謝物の蓄積量を GC-MS と LC-MS 法により絶対定量した。培地に放出された代謝物および消費された栄養源の変化を解析し、代謝の比速度を算出した。また、RNA シーケンスおよびマイクロアレイのデータの系統解析を行い、RB 不活性化により変化する代謝経路を網羅的に解析した。

(2) モデルがん幹細胞のグルコース・グルタミン代謝動態と細胞機能の関係の解析

PGAM 発現低下によって、グルコースから供給されるアセチル CoA 量が減少した結果、ミトコンドリアでの代謝(酸素消費量)が低下していると推測された。そこで、RB 不活性化モデル細胞に PGAM を強制発現させた場合に、細胞内代謝の再モデリングが起こり、がん幹細胞性が失われるかどうかについて検討した。

(3) PGAM 発現調節機構の解析

これまでに、RB 依存的に細胞分化する実験系において、細胞の分化に伴い代謝が変化することが報告されている。この実験系の細胞分化過程では、RB と組織特異的転写因子が協

調して転写を活性化していることから、Rb-ChIPを行い、沈降産物を解析した。

(4) モデル細胞における代謝様式のヒトがん幹細胞への外挿と生理的意義の解明

マウスモデルで得られた知見をヒトがんへ応用できるか検討した。In vitro モデル細胞の遺伝子発現データを用いて、GSEAなどの解析を行いヒトがん細胞への外挿を行った。外挿したヒトがんに関して、RB ノックダウンによる PGAM 発現の変化、がん幹細胞の維持に対する PGAM 発現の影響を検討、患者データセットの解析を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞内代謝物プールの網羅的定量的結果、モデルがん幹細胞集団では、 α -ケトグルタル酸の蓄積が観察された。また、モデルがん幹細胞では、解糖系後半の代謝物プールの低下や、酸素消費速度や細胞外酸性化速度の低下が認められた。[5- ^{13}C]グルタミンを用いた解析より、グルタミン由来の α -ケトグルタル酸を還元的に代謝していることが判明した。

(2) PGAM を p53 欠損平滑筋肉腫細胞に発現させ、C57BL/6 を宿主に同所移植したところ、コントロールと比較して、小さい腫瘍を形成した。また、PGAM 発現細胞は、通常培養条件下では、増殖に変化が無いが、スフェア形成能が低下しており、スフェア中の NANOG などの遺伝子発現も低下していた。また、RB 欠損細胞では、新規脂肪酸合成に利用されるグルコースが低下していたが、PGAM を過剰発現させることによりレスキューされた。これらの結果から、RB 不活性化に伴う PGAM の発現低下は、代謝リモデリングを引き起こし、がん幹細胞機能の維持に寄与することが示唆された。

(3) 筋芽細胞 C2C12 では、RB は筋分化マスターレギュレーター MyoD と協調して分化をコントロールする。C2C12 細胞を低結成条件下で培養し、分化誘導すると PGAM2 の発現が分化に伴い増加した。PGAM2 転写開始点上流には、MyoD 結合コンセンサス配列が存在していたが、MyoD ノックダウン C2C12 細胞でも PGAM2 の発現が分化に伴い誘導された。RB-chIP を行い、定量 PCR で PGAM2 転写開始点上流を解析した結果、MEF2 結合領域において蓄積が認められた。そこで、MyoD を発現しない p53 欠損マウス由来平滑筋肉腫細胞の MEF2A および MEF2D をノックダウンしたところ、PGAM2 の発現が低下した。さらに、MEF2 結合領域のヒストン H3K4 トリメチル化およびジメチル化を ChIP-qPCR にて定量した結果、RB ノックダウン細胞では、この領域のメチル化レベルが低下していた。そこで、RB の結合パートナーであり、ヒストン脱メチル化酵素

KDM5A を阻害すると、RB ノックダウン細胞における PGAM2 の発現が回復した。以上のことから、RB は MEF2 および KDM5A と協調して MyoD 非依存的に PGAM の発現を制御していることが示唆された。

(4) p53 欠損平滑筋肉腫細胞の GSEA 解析より、ヒト早期がんシグネチャーとの関連が認められた。TCGA データセットの解析より、CIN および GS 型の胃がんにおいて PGAM および RB の発現がその他のサブタイプと比べて低いことが判明した。ヒト胃がん細胞 SNU 6 3 8 に PGAM1 を発現すると、スフェア形成が抑制された。

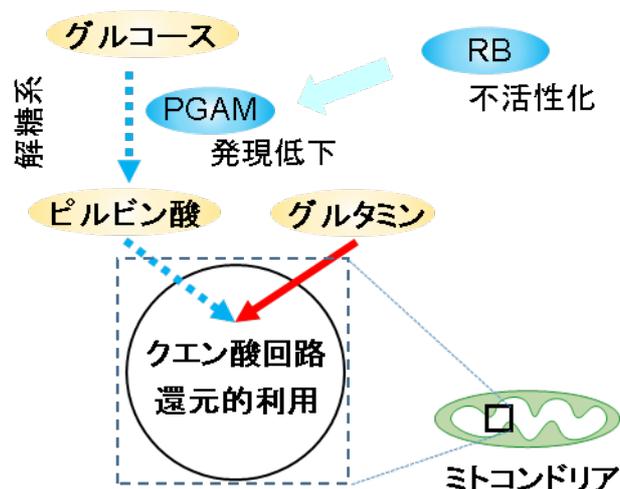


図1：モデルがん幹細胞の代謝様式

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

Kitajima S, Kohno S, Kondo A, Sasaki N, Nishimoto Y, Li F, Mohammed SA, Muranaka H, Nagatani N, Suzuki M, Kido Y and Takahashi C. Undifferentiated state induced by Rb-p53 double inactivation in mouse thyroid neuroendocrine cells and embryonic fibroblasts. *Stem Cells*, 33: 1657-1669, 2015, doi:10.1002/stem.1971. (査読有)

Okahashi N, Kohno S, Kitajima S, Matsuda F, Takahashi C and Shimizu H. Metabolic characterization of cultured mammalian cells by mass balance analysis, tracer labeling experiments and computer-aided simulations. *J Biosci Bioeng*, 120:725-731, 2015, doi: 10.1016/j.jbiosc.2015.04.003. (査読有)

Kohno S, Kitajima S, Sasaki N and Takahashi C. RB tumor suppressor functions shared by stem cell and cancer cell strategies. World J Stem Cells, 8:170-184, 2016, doi: 10.4252/wjsc.v8.i4.170. (査読有)

Salah M, Nishimoto Y, Kohno S, Kondoh A, Kitajima S, Muranaka H, Nishiuchi T, Ibrahim A, Yoshida A, Takahashi C. An in vitro system to characterize prostate cancer progression identified signaling required for self-renewal. Mol Carcinog, 55(12):1974-1989, 2016, doi: 10.1002/mc.22444. (査読有)

Hegazy AM, Yamada D, Kobayashi M, Kohno S, Ueno M, Ali MA, Ohta K, Tadokoro Y, Ino Y, Todo T, Soga T, Takahashi C and Hirao A. Therapeutic strategy for targeting aggressive malignant gliomas by disrupting their energy balance. J Bio Chem, 291(41):21496-21509, 2016. (査読有)

〔学会発表〕(計8件)

河野晋, 北嶋俊輔, 鈴木佐和子, 田中知明, 岡橋伸幸, 松田史生, 清水浩, 高橋智聡. RB不活性化によって誘導される代謝リワイヤリング機構の解明. 日本癌学会シンポジウム / 共同利用・共同研究拠点シンポジウム がん幹細胞・微小環境・分子標的〜がん進展制御への挑戦, 石川県立音楽堂(金沢), 2015年1月21日

河野晋, 岡橋伸幸, 北嶋俊輔, 鈴木佐和子, 田中知明, 松田史生, 清水浩, 高橋智聡. Rb不活性化による代謝リワイヤリング機構の解明. 第3回がん代謝研究会, 石川県立音楽堂(金沢), 2015年7月16日

河野晋, 岡橋伸幸, 北嶋俊輔, 鈴木佐和子, 田中知明, 松田史生, 清水浩, 高橋智聡. Rb不活性化による代謝リワイヤリング機構の解明. 平成27年度がん若手研究者ワークショップ. 蓼科グランドホテル滝の湯(蓼科), 2015年9月3日

Kohno S. Control of cellular metabolism by tumor suppressors. 2015 Kanazawa University Cancer Research Institute Fudan University Shanghai Cancer Center Joint Symposium. 金沢大学 医学部記念館(金沢), 2015年9月11日

河野晋, 北嶋俊輔, 鈴木佐和子, 田中知明, 佐々木信成, 村中勇人, 高橋智聡. RB不活性化に伴うメタボリックワイヤリング機構の解明. 第74回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場(名古屋), 2015年10月10日

河野晋, 岡橋伸幸, 北嶋俊輔, 鈴木佐和子, 田中知明, 松田史生, 清水浩, 高橋智聡. Rb不活性化による代謝リワイヤリング機構の解明. 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会(BMB2015)神戸ポートアイランド(神戸), 2015年12月4日

Kohno S, Okahashi N, Kitajima S Suzuki S, Tanaka T, Matsuda F, Shimizu H and Takahashi C. Metabolic rewiring in Rb deficient cells during cancer progression. AACR Annual Meeting 2016, Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans USA), 2016年4月17日

Kohno S, Takahashi C. Control of glucose metabolism by RB. Translational research in cancer cell metabolism, Palacio Euskalduna Jauregia (Bilbao SPAIN), 2016年10月5日

〔図書〕(計1件)

河野晋, 北嶋俊輔, 佐々木信成, 高橋智聡. 生化学 『代謝変化とエピジェネティクス制御』「RBがん抑制遺伝子産物による細胞未分化性制御」88巻3号 p335-341, 2016.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 晋 (KOHNO Susumu)
金沢大学・がん進展制御研究所
特任助教
研究者番号: 30625463

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし