

平成30年6月16日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14605

研究課題名(和文) 低pH腫瘍微小環境による悪性化機構の解明

研究課題名(英文) Understanding mechanism of acidic pH induced tumor progression

研究代表者

大澤 毅 (Osawa, Tsuyoshi)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授

研究者番号：50567592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍微小環境はがんの悪性化に重要な役割を果たすが、低pH環境におけるがん悪性化機構は未だ不明な点が多い。本研究は低pH細胞培養法を樹立し、低pH異存的な誘導転写因子代謝経路の同定および癌の悪性化機構の解明を目的とし研究を行った。

本研究の成果として、長期間安定的に低pHを持続することのできる培養系を樹立し、網羅的な遺伝子発現解析や転写因子モチーフ解析から低pHで鍵となる転写制御因子としてSREBP2を同定し論文に報告をした(Cell Reports, 2017)。また、低pH特異的な代謝物の蓄積や代謝経路が明らかになりつつある。

研究成果の概要(英文)：The tumor microenvironment plays an essential role in cancer progression, however, the mechanism of cancer progression induced by acidic pH microenvironment is still largely unknown. In this study, acidic pH cell culture system was established to identify the transcriptional-metabolic pathways for cancer progression under acidic pH tumor microenvironment.

As a result of this research, we established a simple model culture system to maintain acidic pH for at least 3 days and identified SREBP2 as a key transcriptional regulator under acidic pH using integration of comprehensive gene expression analysis and transcription factor motif analysis and we published our findings (Cell Reports, 2017). Moreover, accumulation and metabolic pathway specific to acidic pH are under investigation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん微小環境 低pH がん代謝 転写・代謝制御

1. 研究開始当初の背景

癌の悪性化には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者は、低酸素・低栄養という腫瘍微小環境が癌の悪性化を促進することを報告してきた(Osawa et al. Cancer Sci. 2009, Science Transl Med. 2010, BCJ 2011, Cell Death Dis. 2011, PNAS 2011, Nature Commun. 2012, Cancer Res. 2013, Cell cycle 2013, Cell Reports 2013, Oncogene 2014)。また、低酸素の結果として腫瘍組織内が pH6.8 まで低下するが(図1)、低 pH 微小環境が癌にどのような影響があるか未解明であった。

2. 研究の目的

癌の悪性化には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者は、低酸素・低栄養という腫瘍微小環境が癌の悪性化を促進することを報告してきた。また、腫瘍内で pH6.8 まで低下することが知られているが、低 pH 環境における細胞応答メカニズムは未だ不明であった。その理由として、細胞培養で pH を長時間安定的に保つことが難しいことがあげられる。そこで本研究は、新たに(1)低 pH 細胞培養法を樹立し、(2)低 pH 誘導転写因子や(3)低 pH 依存性の代謝経路の同定、さらに、(4)低 pH・低酸素・低栄養の「組み合わせ」による癌の悪性化機構の解明を目的とした。本研究成果は、低 pH を基軸とした腫瘍微小環境の本質的な理解に繋がり、新たな癌治療法の開発のみならず、アシドシス疾患治療薬への応用が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 低 pH 培養法の樹立

腫瘍内では pH6.8 まで低下するという報告をもとに(Cancer Res. 2000, JBC 2002)、低 pH 培養として pH6.8、通常培養条件として pH7.4 を設定し、ヘンダーソン・ハッセルバルヒの式及び実測値を用いて、CO₂ 5%下、37 度で低 pH を維持できる培地を調整する。低 pH 培養培地作成に用いる緩衝剤として、通常培養培地に様々な緩衝剤①HEPES、②HCl、③NaHCO₃ や④癌代謝物の添加量を調節する事で培養培地の pH を 6.8 に調整し、CO₂ インキュベーター内で 24~72 時間細胞培養した後の pH を測定し、長期間安定的に低 pH を持続することのできる培養系を樹立する。また、低 pH マーカーとして報告のある VEGF や IL-8 の発現を指標として低 pH の安定性を確認する。

(2) 低 pH に誘導される転写因子の解明

(1) で樹立した低 pH 培養系を用いて、低 pH で誘導される転写因子(pHIF)を同定する。癌細胞を通常 pH7.4 培養条件、及び、低 pH6.8

培養条件で培養し、RNA-Seq を用いた遺伝子発現解析を行い、通常 pH7.4 に比べて低 pH6.8 で発現変動する遺伝子を同定する。

申請者は、膵癌(PANC-1, AsPC-1)細胞を用いて低酸素培養後の発現誘導遺伝子を、Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いて解析し、上流制御因子の予測から、低酸素誘導因子(HIF1A, HIF2A)が同定された。低 pH において同様の解析を行う。

さらに、FAIRE-Seq を用いた転写モチーフ解析からも、低 pH における上流転写因子の予測を行う。予測された転写因子を siRNA の抑制系を用いて、低 pH で発現上昇する標的因子の発現に影響があるか確認する。既に、申請者は少なくとも 24 時間安定的に低 pH を保つ緩衝剤を発見しており、低 pH 誘導因子の候補を見出している。その転写因子に関して解析を行う。

(3) 低 pH における機能と代謝経路の解明

低 pH 腫瘍微小環境は、低酸素で解糖系が亢進した「結果」の現象として考えられており、低 pH 依存的な転写・代謝機構は知られていない。本研究では、低 pH 環境の模倣培養系を用いて、低 pH 誘導転写因子(pHIF)の下流標的遺伝子の同定、及び、その意義を pHIF に対する siRNA を用いて検討する。

また、低 pH で亢進する代謝経路をコントロール(pH7.4) vs 低 pH (pH6.8) のメタボローム解析から同定する。既に申請者は低酸素、低栄養やそれらの「組み合わせ」により亢進する代謝経路、及び、蓄積する代謝物を見出しており、低酸素の癌細胞に共通して解糖系が亢進し、オンコメタボライト(2HG)が蓄積すること、また、低栄養や低酸素・低栄養の「組み合わせ」では、脂質分解系が亢進し、キガリン酸というオンコメタボライトが蓄積することを見出している。低 pH において亢進する代謝経路や蓄積する代謝物を低酸素や低栄養と同様の解析を用いて同定する。

(4) 低 pH を基軸とした癌悪性化機構の解明

腫瘍微小環境において一部の癌細胞は低酸素・低栄養に陥るが、これがどのように癌悪性化の促進に寄与するかは知られていない。申請者はエピゲノム修飾因子(JMJD1A, JHDM1D)が低酸素・低栄養で相乗的に発現誘導され癌悪性化に寄与することを報告してきた(Osawa et al. PNAS 2011, Cancer Res. 2013)。

また、低 pH に対する癌細胞の応答機構にもエピゲノム変化を伴う転写制御の関与が重要と考えらる。そこで本研究は、低 pH (アシドシス)「単独」、もしくは、低酸素・低栄養・低 pH (アシドシス)の「組み合わせ」で変動するエピゲノム修飾と転写因子の解明を試みる。

既に申請者らは、低酸素・低栄養・低 pH (ア

シドシス)の「組み合わせ」が低酸素におけるマスター転写因子 HIF1 α の下流として知られる血管内皮増殖因子 (VEGF) の遺伝子発現を低栄養単独と比較して10倍以上も相乗的に発現上昇させることを見出している。

このことから低 pH は低酸素や解糖系亢進による乳酸などの蓄積の「結果」起こるだけでなく、低 pH 依存的な感知・応答機構が存在する可能性が示唆される。

また、低 pH が癌幹細胞維持、増殖・転移能、薬剤耐性能などの癌悪性化に関与するかを検討する。

4. 研究成果

腫瘍微小環境はがんの悪性化に重要な役割を果たすが、低 pH 環境におけるがん悪性化機構は未だ不明な点が多い。本研究は低 pH 細胞培養法を樹立し、低 pH 異存的な誘導転写因子代謝経路の同定および癌の悪性化機構の解明を目的とし研究を行った。

本研究の成果として、(1) NaHCO₃, HCL, 乳酸などの緩衝剤濃度をヘンダーソンバルヒの式、および、実測値を用いて長時間 (24~72時間) 安定的に低 pH (pH6.8) を維持する培養系の樹立に成功した。さらに、

(2) 網羅的な遺伝子発現解析や転写因子モチーフ解析から低 pH で鍵となる転写制御因子として SREBP2 を同定し論文に報告した (Cell Reports, 2017)。また、(3) 低 pH の変動遺伝子発現解析から低 pH 誘導因子の標的遺伝子、及び、メタボローム解析から代謝経路を見出しつつある。さらに (4) 低 pH・低酸素・低栄養の「組み合わせ」における遺伝子変動や pH による癌幹細胞維持、増殖・転移能、薬剤耐性能の癌悪性化への影響を及ぼすことを確認した。

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6件)

1. Yamamoto R, Osawa T, Sasaki Y, Yamamoto S, Anai M, Izumi K, Matsumura Y, Sakai J, Aburatani H, Mizokami A, Kodama T, Tanaka T. Overexpression of p54nrb/NONO induces differential EPHA6 splicing and contributes to castration-resistant prostate cancer growth. *Oncotarget*, 2018, 9(12), 10510-10524.
2. Kondo A & Osawa T. Establishment of an extracellular acidic pH culture system. *JoVE*, 2017, 129, e56660.
3. Kondo A, Nonaka A, Shimamura T, Yamamoto S, Yoshida T, Kodama T, Aburatani H and Osawa T. Long non-coding

RNA JHDM1D-AS1 promotes tumor growth by regulating angiogenesis in response to nutrient starvation. *Molecular and Cellular Biology*, 2017, 37(18). pii: e00125-17.

4. Yamamoto S, Muramatsu M, Azuma E, Ikutani M, Nagai Y, Sagara H, Koo BN, Kita S, O'Donnell E, Osawa T, Takahashi H, Takano K, Dohmoto M, Sugimori M, Usui I, Watanabe Y, Hatakeyama N, Iwamoto T, Komuro I, Takatsu K, Tobe K, Niida S, Matsuda N, Shibuya M, Sasahara M. A subset of cerebrovascular pericytes originates from mature macrophages in the very early phase of vascular development in CNS. *Scientific Reports*. 7(1):3855.
5. Kanki Y, Nakaki R, Shimamura T, Matsunaga T, Yamamizu K, Katayama S, Suehiro J, Osawa T, Aburatani H, Kodama T, Wada Y, Yamashita J and Minami T. Dynamically and epigenetically coordinated GATA/ETS/SOX transcription factor expression is indispensable for endothelial cell differentiation. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(8):4344-4358.
6. Kondo A, Yamamoto S, Nakaki R, Shimamura T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Yoshida T, Aburatani H* and Osawa T*. Extracellular Acidic pH Activates the Sterol Regulatory Element-binding Protein 2 to Promote Tumor Progression. *Cell Reports*, 2017, Feb 28, (18), 2228-2242.

[学会発表] (計8件)

招待講演

1. 大澤毅、「ニュートリオミクスから迫るがんの病態解明と治療戦略」、第4回血管生物医学若手研究会、2018年3月2日-3日、熊本
2. 大澤毅、「ニュートリオミクスから迫るがんの病態解明と治療戦略」第1回がん代謝・若手研究会、2018年1月16日-17日、東京
3. 大澤毅、「ニュートリオミクスから迫るがんの病態解明と治療戦略」、ConBio2017、2017年12月6日、神戸
4. 大澤毅、「腫瘍微小環境における細胞膜リン脂質代謝の役割」、第5回がん代謝研究会、2017年7月13~14日、北海道
5. 大澤毅、「日本分子生物学会、11月30

日～12月2日、横浜

6. 大澤毅、「マルチオミクスが解き明かす腫瘍微小環境とがん代謝」、第89回日本生化学会大会、2016年9月25日～27日、仙台
7. 大澤毅「がん微小環境と代謝エピエノム制御の研究」日本がん転移学会、2016年7月20日～22日、米子
8. 大澤毅「腫瘍微小環境から捉えたがんの代謝戦略」第4回がん代謝研究会、2016年7月7日～8日、鹿児島

[図書] (計2件)

1. 大澤毅、「酢酸代謝」、実験医学 がん代謝 ワールブルグを超えて全容解明に挑む、60-64頁、2017年
2. 大澤毅、「栄養・代謝物シグナルのメタボローム解析」、実験医学 遺伝子制御の新たな主役 栄養シグナル、19-24頁、2016年

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等
www.lsbm.org

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大澤 毅 (OSAWA Tsuyoshi)
東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授
研究者番号：50567592

(2) 連携研究者

島村徹平 (SHIMAMURA Teppei)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任准教授
研究者番号：00623943

神吉康晴 (KANKI Yasuharu)
東京大学・アイソトープ総合センター・助教
研究者番号：00534869

白石友一 (SHIRAISHI Yuichi)
東京大学・医科学研究所・助教
研究者番号：70516880