

令和元年6月5日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15622

研究課題名(和文) がん幹細胞の代謝特性を標的とした新規がん治療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel cancer therapeutics targeting metabolic characteristics of cancer stem cells

研究代表者

後藤 信治 (GOTO, Shinji)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：50186889

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：CD133陽性・陰性細胞を用いた本研究により、CD133陽性大腸がん細胞は、低糖状態において、解糖系での代謝を抑制して、ペントースリン酸回路への代謝フローを確保することが明らかとなった。この代謝リモデリングにより、脂肪酸やコレステロール合成に必須のNADPHの産生を保ちつつ、核酸の合成に必要なリボースの産生も維持することで、低糖状態下でも細胞増殖を可能にしていると考えられた。さらに、グルコース枯渇状態では、グルコースの代わりに乳酸を利用することが示唆された。CD133陽性細胞は、生存には厳しい環境を生き抜くために細胞内代謝を変化させて環境の栄養状態に適応する潜在的能力を持つことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、がん幹細胞がいかなる環境下でも生存するために、環境の栄養状態に適応して細胞内の代謝をリモデリングする能力を有することが示唆された。残念ながら本研究では、その機構の詳細を解明するには至らなかった。しかし、本研究で得られた知見を基にその機構を明らかにすることで、がん幹細胞とそのニッチを標的とした新規のがん治療薬(法)の開発が期待される。また、がん幹細胞が有する代謝特性に基づく細胞培養法を樹立することで、がん幹細胞を濃縮、同定する方法の開発や応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study indicated that CD133 positive colon cancer cells suppressed glycolytic pathway and promoted metabolic flow to the pentose phosphate pathway under the low glucose condition. It was shown that this metabolic remodeling allowed cell proliferation under the low glucose condition by maintaining the production of NADPH essential for fatty acid and cholesterol synthesis and the production of ribose for nucleic acid synthesis. Furthermore, it was shown that CD133 positive cancer cells used lactic acid instead of glucose under the glucose-depleted condition. These findings suggest that CD133 positive cells have the potential ability to alter cellular metabolism and adapt to environmental nutritional status for cell survival.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：がん幹細胞 CD133 CD44 糖代謝 ペントースリン酸回路

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 一般に、がん幹細胞は、治療に対する抵抗性が高く、転移や再発にも深く関与すると考えられている。その為、根治を目指す治療法を確立するには、がん幹細胞の生物学的特性を明らかにし、治療の標的となる分子を定める必要がある。研究代表者は、大腸がん由来の株化細胞 HCT8 から、がん幹細胞マーカーである CD44 と CD133 を発現している細胞を分離し、抗がん剤暴露をはじめとする、種々のストレスに対する細胞応答と幹細胞マーカー発現の有無との関連性について研究を進めてきた。その結果、CD133 陽性細胞 (CD44+/CD133+) は陰性細胞 (CD44+/CD133-) に比べて、ドキシソルビシンやシスプラチンなどの抗がん剤に対して耐性を有することを見出した。

(2) また、通常濃度のグルコースでは増殖能や死細胞の割合等にほとんど差が無い CD133 陽性細胞と陰性細胞を低糖状態に暴露すると、CD133 陰性細胞は、時間経過と共に細胞の状態が悪化し、やがてほとんど死滅するのに対し、CD133 陽性細胞は長時間生存することを見出した。CD133 陽性細胞は、糖飢餓状態のような生存には厳しい環境を生き抜くために、細胞内代謝を変化させて環境の栄養状態に適応している可能性が高いことが示唆された。

### 2. 研究の目的

本研究開始時までの研究成果から、がん幹細胞が微小環境の栄養状態の変化に応じて、いかに細胞内代謝を変化させるのかを明らかにすることが、がんの根治を目指す治療法を確立するための重要なアプローチであると考えた。そこで、本研究では、その足がかりを得るために、糖飢餓状態での CD133 陽・陰性大腸がん細胞の代謝産物をメタボローム解析により網羅的に解析し、糖飢餓状態下での細胞生存に寄与する代謝機構などの候補を絞り込むこととした。次に、候補となった代謝系を制御する酵素の発現量や活性を解析すると共に、メタボローム解析では判断できない、細胞内グリコーゲン量や培地中の乳酸量を測定することにより、糖飢餓状態下での CD133 陽・陰性大腸がん細胞の糖代謝の特性を解析することを目指した。これらの解析により、がん幹細胞が持つ糖飢餓耐性機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

細胞培養には、RPMI1640 培地に牛胎児血清(最終濃度 10%)を加えたものを用いた。8x10<sup>5</sup>個/10ml に細胞濃度を調整した CD133 陽性細胞 (CD44+/CD133+) と陰性細胞 (CD44+/CD133-) を 18 時間培養し、細胞が培養器に十分接着した後、グルコース量を 2g/L(通常糖濃度)または 1g/L(低糖濃度)に調整した培地にそれぞれ交換して 96 時間まで培地を交換せず培養した。

#### (2) 糖飢餓状態における細胞状態の観察

細胞状態は、培養開始後 24 時間毎に位相差顕微鏡下で観察し、同時に細胞数を測定した。また、ヘキスト 33342 で核を染色し、蛍光顕微鏡下で核の形態を観察すると共に、PI 染色を行い細胞周期の変化をフローサイトメーターで観察した。

#### (3) メタボローム解析

低糖濃度培地に交換して 48 時間後、培地を除いて洗浄した細胞に直接、超純水を加えて抽出操作を行った後に直ちにエタノールを加えて再度抽出操作を行い、これらの操作で得た抽出液を混合して試料とした。これを、Human Metabolome Technologies 社(山形県鶴岡市)に委託し、メタボローム解析を行った。

#### (4) 低糖状態下での細胞生存に寄与する代謝機構と関連酵素の同定

上記のメタボローム解析の結果とその他の観察結果から、低糖状態下での細胞生存に寄与する代謝機構を推定した。その後、候補となった代謝経路を制御する酵素の発現量をイムノプロット法で解析した。また、酵素活性を測定するキットが入手できるものに関しては、その活性を測定した。

#### (5) 細胞のグルコースとグリコーゲン消費量および乳酸産生量の測定

細胞のグルコース消費量は、培地中の残存グルコース量を酵素法によって定量することで評価した。細胞内グリコーゲン量はキットを用いて、また乳酸産生量は培地中の乳酸量を酵素法で定量することで、それぞれ評価した。

### 4. 研究成果

(1) CD133 陽性細胞 (CD44+/CD133+) と陰性細胞 (CD44+/CD133-) を 2g/L(通常糖濃度)または 1g/L(低糖濃度)のグルコース含有培地を用い、培地を交換せずに 96 時間まで培養した。通常糖濃度培地での培養では両細胞群とも目立った変化は見られなかったが、低糖濃度培地で培養した CD133 陰性細胞では、48 時間後以降から委縮する細胞が相当数認められた。さらに、96 時間経過後には、培養器に接着できなくなり培地中に浮遊する細胞が多数観察された。核をヘキス

ト 33342 で染色し蛍光顕微鏡で観察したところ、CD133 陰性細胞では、48 時間後から 72 時間後にかけて核が凝集した細胞が多数観察された。PI 染色を行い細胞周期の変化をフローサイトメーターで観察したところ、CD133 陰性細胞は CD133 陽性細胞と比較して、48 時間後以降から G2/M 期の細胞が有意に減少していた。このように、低糖濃度培地で培養した CD133 陰性細胞は、CD133 陽性細胞と比較して、時間経過と共に細胞障害が顕著に表れた。

(2) CD133 陽性細胞と陰性細胞を低糖濃度培地を用いて 48 時間培養後、メタボローム解析に供した。中心炭素代謝経路では、ペントースリン酸回路中のリブローズ 5-リン酸が CD133 陰性細胞では全く検出されなかった。また、リブローズ 5-リン酸を経て合成される、核酸の土台となるホスホリボシルピロリン酸 (PRPP) 量が、CD133 陽性細胞では陰性細胞と比較して有意に高かった。このように、CD133 陽性細胞は陰性細胞と比較して、低糖状態でもペントースリン酸回路の代謝が維持されていることが示唆された。さらに、解糖系の 3-ホスホグリセリン酸 (3PG) 量は両細胞群で差がなかったのに対し、3PG が代謝されて生じる、2-ホスホグリセリン酸 (2PG) は、CD133 陽性細胞では全く検出されなかった。3PG からはセリン合成経路が分岐しているが、CD133 陽性細胞では、そのセリン合成を維持するために、2PG 産生が低く抑えられたと考えられた。セリンは、グリシンに相互変換され、その後グルタミン、アスパラギン酸と共に、プリン塩基合成に利用されることから、CD133 陽性細胞は、陰性細胞と比較して、核酸塩基の合成も維持されていることが示唆された。つまり、CD133 陰性細胞では、低糖状態では核酸の合成が維持できないことから、結果的に細胞障害が誘導される可能性が高いと考えられた。

(3) 解糖系の代謝を抑制して、ペントースリン酸回路へ代謝フローを迂回させる機構に関して検討した。その一つとして、解糖系の律速酵素である、ホスホフルクトキナーゼ 1 (PFK1) の発現量をイムノプロット法で解析した。CD133 陽性細胞と陰性細胞で発現している PFK1 は、血小板タイプ (PFKP)、筋肉タイプ (PFKM) であった。このうち、PFKM の発現量が高かったが、糖濃度や培養時間に関係なく発現量は常に CD133 陽性細胞でより低い状態であった。また、3PG の代謝が、2PG 生成よりセリン合成の方に傾いていると示唆されたが、その機構として、3PG から 2PG の代謝を触媒するホスホグリセリン酸ムターゼ (PGAM) の関与を想定し、その発現量をイムノプロット法で解析した。PGAM には、PGAM1 と PGAM2 の二つのサブタイプがある。このうち両細胞群で発現していたのは PGAM1 であったが、糖濃度に関係なく発現量は常に CD133 陽性細胞でより低値であった。CD133 陰性細胞と比較して、陽性細胞において核酸の合成が維持されている要因として、PFKM の発現量低下によるペントースリン酸回路への代謝フローの迂回と PGAM1 の発現量低下による 3PG からのセリン合成経路への代謝フローの増強が示唆された。しかし、PFKM と PGAM1 の発現量低下がどのような機構で行われているのかは解析できなかった。また、PFKM は、N-アセチルグルコサミンの修飾によって活性が低下することが知られているが、この修飾に関しても解析できなかった。

(4) CD133 陽性細胞と陰性細胞を培地交換無しで培養すると、糖濃度に関係なく培地中のグルコース、グルタミンは 48 時間から 72 時間経過後に枯渇し、細胞内のグリコーゲン量も極度に低下した。一方、培地中の乳酸量は、両細胞群とも 48 時間までは供給された糖濃度に応じて増加したが、それ以後は、CD133 陰性細胞はさらに乳酸量が増加するのに対し、CD133 陽性細胞では、培地中の乳酸量が急激に低下した。この結果からだけでは説明できないが、CD133 陽性細胞は、培地中の糖濃度が枯渇した場合、培地中の乳酸を細胞内に取り込み利用するのではないかと考えられた。

CD133 陽性細胞は、陰性細胞に比べて低糖状態でも核酸の合成を維持するように糖代謝を調節していることが示唆されたが、その調節役として、PFK や PGAM の発現量 (活性) が関与する可能性が考えられた。また、CD133 陽性細胞は、糖の枯渇状態においては、細胞外の乳酸を取り込み利用することが考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

Yan, C., Luo, L., Urata, Y., Goto, S., Li, T.-S. : Nicaraven reduces cancer metastasis to irradiated lungs by decreasing CCL8 and macrophage recruitment, *Cancer Letters*, 査読有, 418 巻 1 号, 2018, 204-210

DOI: 10.1016/j.canlet.2018.01.037

Guo, C.-Y., Yan, C., Luo, L., Goto, S., Urata, Y., Xu, J.-J., Wen, X.-M., Kuang, Y.-K., Tou, F.-F., Li, T.-S. : Enhanced expression of PKM2 associates with the biological properties of cancer stem cells from A549 human lung cancer cells, *Oncology Reports*,

査読有, 37 卷 4 号, 2017, 2161-2166

DOI: org/10.3892/or.2017.5438

Yan C, Luo L, Goto S, Urata Y, Guo CY, Doi H, Kitazato K, Li TS, Enhanced autophagy in colorectal cancer stem cells does not contribute to radio-resistance, Oncotarget, 査読有, 7 卷 29 号, 2016, 45112-45121

DOI: org/10.18632/oncotarget.8972

Yan C, Luo L, Guo CY, Goto S, Urata Y, Shao JH, Li TS, Doxorubicin-induced mitophagy contributes to drug resistance in cancer stem cells from HCT8 human colorectal cancer cells, Cancer Letter, 査読有, 388 号, 2016, 34-42

DOI: 10.1016/j.canlet.2016.02.022

〔学会発表〕(計 1 件)

Yan Chen, Goto Shinji, Li Tao-Sheng, Enhanced autophagy in colorectal cancer stem cells does not contribute to radio-resistance, 第 75 回日本癌学会学術総会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。