

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18410

研究課題名(和文) がん幹細胞におけるグルタミンの代謝性シグナル分子としての機能解明

研究課題名(英文) Elucidation of the role of glutamine as a metabolic signaling molecule in cancer stem cells.

研究代表者

倉元 謙太 (KURAMOTO, Kenta)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：80768755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞は、自己複製能と腫瘍創始能を持つがん細胞であり、二次腫瘍やがん再発の原因であると考えられている。がん幹細胞性維持におけるグルタミンとその代謝産物の役割は、不明であった。本研究において申請者は、膵がん幹細胞をグルタミン欠乏条件下で培養することにより、がん幹細胞マーカーの発現量やsphere形成能が低下し、がん幹細胞性が失われることを示した。本研究結果は、がん幹細胞のグルタミン代謝を標的とした新たながん幹細胞治療の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells, which possess both self-renewal capacity and tumor initiation capacity, are thought to be involved in secondary tumor development and cancer recurrence. The roles of glutamine and its metabolites in the stemness of cancer stem cells are poorly understood. In this study, I demonstrate that glutamine depletion leads to a decrease in both expression levels of cancer stem cell markers and sphere forming capacity in pancreatic cancer stem cells. These results indicate that glutamine metabolism in cancer stem cells could be a target for cancer stem cells therapy.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん幹細胞 グルタミン代謝

1. 研究開始当初の背景

がん細胞では、グルコースのみならずグルタミンの取り込み量も増加している。グルコースは、主に好氣的解糖のエネルギー基質として重要である。申請者が所属していた研究室では、世界に先駆け、がん幹細胞の幹細胞性(= 自己複製能・腫瘍創始能)の維持には、グルコーストランスポーター 1 (GLUT1) を介したグルコースの取り込みが重要であることを報告している (*Oncotarget*, 2015, 6.2: 651)。

一方、グルタミンは、エネルギー源としてだけでなく炭素・窒素源としても重要であり、グルタミン代謝もまたグルコース代謝と同様にがん幹細胞性の維持に重要な役割を担っていると考えられる。

本研究開始当初、“代謝性シグナル分子”という概念が芽吹きつつあった。例えばグルコースは、単なるエネルギー代謝基質としての役割だけでなく、代謝性シグナル分子としてグルコースの中間代謝産物のアセチル CoA が遺伝子発現制御に関わり、幹細胞性の維持に関与していることや (*Cell Metab.*, 2015, 21.3: 392-402)、中性脂質であるトリグリセリドの分解産物群が代謝性シグナル分子として、脂質代謝関連遺伝子の発現制御に関与していることが (*Nat. Med.*, 2011, 17.9: 1076-1085) 報告されていた。しかしながら、グルタミンが“代謝性シグナル分子”としてどのような分子機構でがん幹細胞性の維持に関与しているかは、不明であった。

2. 研究の目的

グルコースとその代謝産物は、“エネルギー基質”としてだけでなく“代謝性シグナル分子”としても機能し、幹細胞性の維持に関与していることが報告されている。一方で、グルタミンとその代謝産物の代謝性シグナル分子としての機能や幹細胞性との関係は不明な部分が多い。そこで本研究は、『グルタミンとその代謝産物が、代謝性シグナル分子としてがん幹細胞性維持に関与する』という作業仮説に基づき、ヒストンのアセチル化修飾およびタンパク質の O-GlcNAc 修飾などに着目し、がん幹細胞性維持におけるグルタミン代謝の必要性とその分子機構の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培地中のグルタミンの欠乏ががん幹細胞性に与える影響の確認

グルタミン欠乏が、がん幹細胞性に与える影響を調べる為に、膵がん幹細胞をグルタミン欠乏培地で一定期間培養し、その後、ウエスタンブロッティングによりがん幹細胞性マーカーである Sox2、Nanog、Oct4 の発現量を確認した。またグルタミン欠乏条件下における膵がん幹細胞の Sphere 形成能の変化も調べた。

(2) グルタミン欠乏が、膵がん細胞の増殖に与える影響の確認

膵がん細胞をグルタミン欠乏培地中で一定期間培養し、細胞数を計測することにより、グルタミン欠乏が膵がん幹細胞の増殖に与える影響を確認した。

(3) 膵がん幹細胞において、グルタミンの欠乏がヒストンアセチル化に与える影響の確認

グルタミン欠乏培地中で培養した膵がん幹細胞から、ヒストンタンパク質を抽出した後、ヒストンタンパク質の修飾状態を、各ヒストン修飾特異的抗体を用いて、ウエスタンブロッティングにより確認した。

(4) 膵がん細胞において、グルタミンの欠乏がタンパク質のグルコシル化に与える影響の確認

グルタミン欠乏培地中で培養した膵がん幹細胞から、タンパク質を抽出し、小麦胚レクチン (WGA) を用い、グリコシル化タンパク質量を確認した。

(5) グルタミン欠乏が細胞内活性酸素種 (ROS) 量に与える影響の確認

グルタミン欠乏培地中で膵がん幹細胞を培養し、その後、ROS 感受性蛍光プローブを用いて細胞内 ROS 量の変化を確認した。

(6) 各種代謝中間産物の添加による、救援実験

グルタミン欠乏によるがん幹細胞性の低下が、酢酸、グルコサミン、または脂肪酸添加により回避されるかを確認した。

4. 研究成果

1) 培地中のグルタミンの欠乏ががん幹細胞性に与える影響の確認

グルタミン欠乏培地で3日間膵がん幹細胞を培養し、その後各がん幹細胞マーカーの発現量をウエスタンブロッティングにより調べると、Sox2、Oct4、Nanog いずれのがん幹細胞マーカーも発現量は減少していた (図 1)。

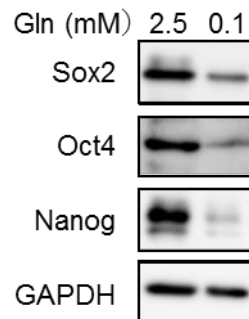


図 1 グルタミン欠乏培地での膵がん幹細胞培養ががん幹細胞性マーカーの発現量に与える影響

グルタミン欠乏が膵がん幹細胞の自己複製能に与える影響を調べるため、グルタミン濃度が 2.5 mM (コントロール) または 0.1 mM (欠乏条件) で 12 日間膵がん幹細胞を培養 (前処理) した。その後、細胞低接着性プレートに細胞を撒き、10 日間の Sphere 形成能試験を行った。グルタミン欠乏培地で膵がん幹細胞を前処理することにより、Sphere 形成能試験時のグルタミン濃度には関係なく Sphere 形成能は低下した。また、Sphere 形成能試験時のみグルタミン欠乏培地でも、Sphere 形成能は低下した (図 2)。

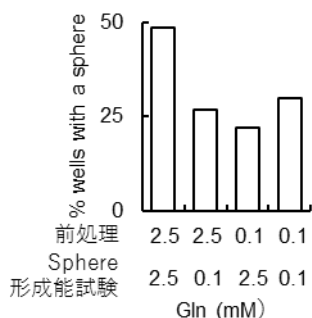


図 2 グルタミンの欠乏が膵がん幹細胞の Sphere 形成能に与える影響

(2) グルタミン欠乏が、膵がん幹細胞の増殖に与える影響の確認

グルタミンの欠乏が、膵がん幹細胞の細胞増殖に与える影響を調べるために、グルタミン欠乏培地で 3 日間膵がん幹細胞を培養し、その後トリパンブルー染色法により細胞数の計測を行った。グルタミン欠乏条件下では、有意に細胞増殖が抑えられた (図 3)。

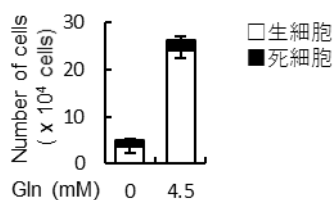


図 3 グルタミン欠乏が膵がん幹細胞の細胞増殖に与える影響

(3) 膵がん幹細胞において、グルタミンの欠乏がヒストンアセチル化に与える影響の確認

グルタミンの代謝中間産物であるアセチル CoA がヒストンのアセチル化修飾を介してがん幹細胞性の維持に関与している可能性を検討した。グルタミン欠乏培地中で培養した膵がん幹細胞から、ヒストンタンパク質を抽出後、ヒストンタンパク質の修飾状態を調べた。グルタミン欠乏によりヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のアセチル化が抑制さ

れていた。

一方、ヒストン H3 の 9 番及び 27 番目のトリメチル化の程度には、グルタミン欠乏の影響は無かった (図 4)。

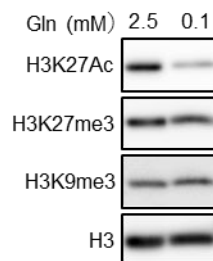


図 4 グルタミン欠乏がヒストン修飾に与える影響

(4) 膵がん幹細胞において、グルタミンの欠乏がタンパク質のグリコシル化に与える影響の確認

グルタミン代謝がタンパク質の糖鎖修飾を介してがん幹細胞性を制御している可能性に関して検討を行った。グルタミン欠乏培地中で膵がん幹細胞を一定期間培養後、タンパク質を抽出し、小麦胚レクチン (WGA) を用い、グリコシル化タンパク質量を調べた。グルタミンの欠乏により、細胞内グリコシル化タンパク質量は減少していた (図 5)。

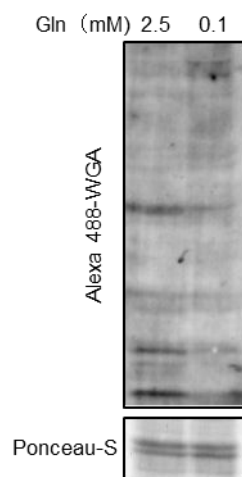


図 5 グルタミン欠乏が細胞内グリコシル化タンパク質量に与える影響

(5) グルタミン欠乏が膵がん幹細胞内活性酸素種 (ROS) 量に与える影響の確認

グルタミンは抗酸化物質の 1 つであるグルタチオンの生合成に重要である。そこで、グルタミンの欠乏が、細胞内活性酸素種 (ROS) 量に与える影響について検討した。

膵がん幹細胞をグルタミン欠乏培地中で一定期間培養後、ROS 感受性プローブを用いて細胞を染色し、フローサイトメトリーを用いて評価した。コントロール群と比較して、グルタミン欠乏培地群では細胞内 ROS 量の増加は引き起こされなかった。

(6) 各代謝中間産物の添加による、救援実験

アセチル CoA の直接の前駆物質である酢酸や、アセチルグルコサミンの前駆物質であるグルコサミンの添加などにより、グルタミン欠乏によるがん幹細胞性の喪失が、抑制されるかを検討した。グルタミン欠乏条件下で酢酸または、グルコサミンを添加し一定期間培養後、タンパク質を抽出し、がん幹細胞マーカーである Sox2, Oct4, Nanog の発現量をウェスタンブロッティングにより確認した。酢酸または、グルコサミン添加によりグルタミン欠乏によるがん幹細胞マーカーの減少は阻止できなかった。

一方、中間代謝産物がアセチル CoA である脂肪酸をグルタミン欠乏条件下で培地に添加すると、各がん幹細胞マーカーの減少は抑えられた(図6)。

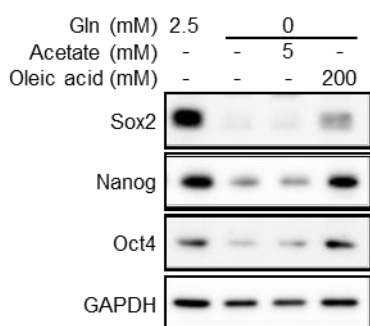


図6 グルタミン欠乏条件下における脂肪酸(オレイン酸)添加が、がん幹細胞マーカーの発現に与える影響

これらの結果より、グルタミンは、膵がん幹細胞のがん幹細胞性の維持に重要であることが明らかとなった。

本研究では、グルタミンが、代謝性シグナル分子としてがん幹細胞性の維持に重要な役割を担っているという仮説に基づき研究を開始した。がん幹細胞をグルタミン欠乏培地で培養することより、ヒストンアセチル化の程度と細胞内グリコシル化タンパク質量は減少した。しかしながら、酢酸やグルコサミンの培地添加による救援実験では、グルタミン欠乏によるがん幹細胞性の低下を抑えられなかったことから、グルタミン代謝がタンパク質のアセチル化や糖鎖修飾を介してがん幹細胞性の維持に関与している可能性は低いことが示唆された。

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12件)

Okada M, Takeda H, Sakaki H, Kuramoto K, Suzuki S, Sanomachi T, Togashi K, Seino S, Kitanaka C.

Repositioning CEP-1347, a chemical agent

originally developed for the treatment of Parkinson's disease, as an anti-cancer stem cell drug.

Oncotarget. 2017 Oct 24;8(55):94872-94882.

doi: 10.18632/oncotarget.22033. eCollection

2017 Nov 7. PubMed PMID: 29212273;

PubMed Central PMCID: PMC5706919. [査読有]

Sanomachi T, Suzuki S, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Togashi K, Seino S, Yoshioka T, Okada M, Kitanaka C.

Olanzapine, an Atypical Antipsychotic, Inhibits Survivin Expression and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents.

Anticancer Res. 2017 Nov;37(11):6177-6188.

doi:10.21873/anticancerres.12067 PubMed

PMID: 29061799. [査読有]

Takeda H, Okada M, Kuramoto K, Suzuki S, Sakaki H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Hirano H, Arita K, Kitanaka C.

Antitumor activity of gemcitabine against high-grade meningioma *in vitro* and *in vivo*.

Oncotarget. 2017 Jun 29;8(53):90996-91008.

doi: 10.18632/oncotarget.18827. eCollection

2017 Oct 31. PubMed PMID: 29207619;

PubMed Central PMCID: PMC5710900. [査読有]

Kuramoto K, Suzuki S, Sakaki H, Takeda H, Sanomachi T, Seino S, Narita Y, Kayama T, Kitanaka C, Okada M.

Licochalcone A specifically induces cell death in glioma stem cells via mitochondrial dysfunction.

FEBS Open Bio. 2017 May 8;7(6):835-844.

doi: 10.1002/2211-5463.12226. eCollection

2017 Jun. PubMed PMID: 28593138; PubMed

Central PMCID: PMC5458486. [査読有]

Takeda H, Okada M, Suzuki S, Kuramoto K, Sakaki H, Watarai H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C.

Rho-Associated Protein Kinase (ROCK) Inhibitors Inhibit Survivin Expression and Sensitize Pancreatic Cancer Stem Cells to Gemcitabine.

Anticancer Res. 2016 Dec;36(12):6311-6318.

doi: 10.21873/anticancerres.11227 PubMed

PMID: 27919951. [査読有]

Watarai H, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Suzuki S, Seino S, Oizumi H, Sadahiro M, Kitanaka C.

Impact of H3K27 Demethylase Inhibitor GSKJ4 on NSCLC Cells Alone and in Combination with Metformin.

Anticancer Res. 2016 Nov;36(11):6083-6092.

doi:10.21873/anticancerres.11198 PubMed

PMID: 27793936. 【査読有】

Suzuki S, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Watarai H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C.

Aripiprazole, an Antipsychotic and Partial Dopamine Agonist, Inhibits Cancer Stem Cells and Reverses Chemoresistance.

Anticancer Res. 2016 Oct;36(10):5153-5161.

doi:10.21873/anticancer.11085 PubMed PMID: 27798875. 【査読有】

Kuramoto K, Wang N, Fan Y, Zhang W, Schoenen FJ, Frankowski KJ, Marugan J, Zhou Y, Huang S, He C.

Autophagy activation by novel inducers prevents BECN2-mediated drug tolerance to cannabinoids.

Autophagy. 2016 Sep;12(9):1460-71. doi:

10.1080/15548627.2016.1187367. Epub 2016

Jun 15. PubMed PMID: 27305347; PubMed

Central PMCID: PMC5082783. 【査読有】

Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Sakaki H, Seino S, Seino M, Suzuki S, Kitanaka C.

The novel JNK inhibitor AS602801 inhibits cancer stem cells in vitro and in vivo.

Oncotarget. 2016 May 10;7(19):27021-32.

doi: 10.18632/oncotarget.8395. PubMed

PMID: 27027242; PubMed Central PMCID:

PMC5053629. 【査読有】

Osumi T, Kuramoto K.

Heart lipid droplets and lipid droplet-binding proteins: Biochemistry, physiology, and pathology.

Exp Cell Res. 2016 Jan 15;340(2):198-204.

doi: 10.1016/j.yexcr.2015.10.031. Epub 2015

Oct 30. Review. PubMed PMID: 26524506.

【査読有】

Seino M, Okada M, Sakaki H, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Kuramoto K, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C.

Time-staggered inhibition of JNK effectively sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel.

Oncol Rep. 2016 Jan;35(1):593-601. doi:

10.3892/or.2015.4377. Epub 2015 Nov 2.

PubMed PMID: 26534836. 【査読有】

Sakaki H, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Seino M, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C.

GSKJ4, A Selective Jumonji H3K27 Demethylase Inhibitor, Effectively Targets Ovarian Cancer Stem Cells.

Anticancer Res. 2015 Dec;35(12):6607-14.

<http://ar.iiarjournals.org/content/35/12/66>

07.long PubMed PMID: 26637876. 【査読有】

6 . 研究組織

(1)研究代表者

倉元 謙太 (Kuramoto Kenta)

山形大学・医学部・助教

研究者番号 : 80768755