

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08704

研究課題名(和文) Warburg制御因子MPCによる早期脳転移機序の解明と応用

研究課題名(英文) Elucidation and application of early brain metastasis mechanism by Warburg regulator MPC

研究代表者

工藤 敏啓 (KUDO, Toshihiro)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター(研究所)・その他部局等・腫瘍内科副部長

研究者番号：20593859

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)：脳転移巣は強い治療抵抗性を示し、現在の抗がん剤や分子標的治療薬および放射線療法では根本的な有効性が得られないのが現状である。私たちの研究成果により、Warburg効果の鍵分子MPC(ミトコンドリア・ピルビン酸輸送体)による嫌気性解糖系の制御は、上皮間葉形質転換(EMT)を誘導してがん幹細胞化させ、複数の抗がん剤への治療抵抗性を獲得することが明らかになった。機構として脳転移を比較的きたしやすいがん細胞を対象として、血液脳関門(BBB)を構成する細胞群の三次元再構築から、シングル細胞により早期脳転移におけるMPCの役割を究明し、臨床応用を目指した研究を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

より精密な診断のためのバイオマーカーの探索や、新たな治療標的を提示することができるようになり、がん代謝を介したMPCと細胞の形質転換の関連性を通じて、創薬の標的化、機序の解明、抵抗性の予測を通じて、難治がんの精密医療に貢献することができた。手術切除試料を用いた動物モデル(PDX: patient derived xenograft)と、三次元組織構築を構成する細胞群の解析から、早期の転移浸潤における責任分子の役割を究明し、創薬の標的化、機序の解明、抵抗性の予測を通じて、難治がんの精密医療に貢献することができた。

研究成果の概要(英文)： Brain metastases show strong treatment resistance, and the current situation is that current anticancer drugs, molecular-targeted therapies, and radiation therapy do not provide fundamental efficacy. Therefore, it is essential to elucidate the treatment resistance rooted in the true nature of cancer and to develop a treatment method. According to our research results, the regulation of anaerobic glycolysis by the key molecule MPC (mitochondrial pyruvate transporter) of the Warburg effect induces epithelial-mesenchymal transformation (EMT) to make cancer stem cells, and multiple It was revealed that the treatment resistance to the anticancer drug was acquired. For cancer cells that are relatively prone to brain metastasis as a mechanism, the role of MPC in early brain metastasis is investigated by single cells from the three-dimensional reconstruction of the cell group that constitutes the blood-brain barrier (BBB) toward the future clinical application.

研究分野：医学

キーワード：化学療法 癌 シングル細胞

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) がん幹細胞と脳転移

固形がんが脳転移を来すと運動感覚障害を発症するだけでなく、生命予後を著しく低下させる。体循環系の支配を受けるほぼ全てのがんが脳転移を来す可能性があるが、疾患の発症頻度としては、肺がん(がん転移の50%)、大腸がん、乳がん、メラノーマのそれぞれ進行期における脳転移が解決すべき焦眉の課題である(国立がん研究センターの統計資料)。固形がんの遠隔臓器への転移においては、がん幹細胞を含む血液循環中の遊離がん細胞(Circulating Tumor Cell [CTC])が直接関わるものとして、臨床的に重要視されている。

### (2) CTC と Warburg 効果

CTC の性状は完全に解明されていないが、CTC は上皮性悪性腫瘍が上皮の性質を喪失して、間葉系の性質に移行した状態(上皮間葉形質転換[Epithelial Mesenchymal Transition, EMT])であると考えられており、E-Cadherin 分子発現の減少を来しているために表面抗原を指標として捕捉するのが困難である。そこで私たちは、新たな EMT マーカーとして Plastin3 を同定して高転移性を示す CTC の特徴を研究し、嫌気性解糖系が優位であるがん代謝特性を明らかにした(Cancer Res, 2012; Cell Stem Cell, 2011; PNAS, 2014)。悪性度の高いがん細胞の嫌気性解糖系の活性化状態は、Warburg 効果として知られている(1931 年、ノーベル生理学賞)。Warburg 効果が、EMT の関わる転移や浸潤の現象だけでなく、抗がん剤や放射線照射に抵抗性を誘導する機構として重要であることを明らかにされた。

Warburg 効果を直接誘導する分子としては、PKM2, PDK, MPC の3つが挙げられる。第一の PKM2 は、PK(ピルビン酸キナーゼ)遺伝子の選択的スプライシングの結果生じるバリエーションである。PKM2 は多くの悪性腫瘍のほか胎生幹細胞でも発現が高く、一方で PKM1 は脳などの正常細胞で発現が優位である。私たちを含む内外の研究で、PKM2 は PKM1 に比較してピルビン酸をミトコンドリアの酸化的リン酸化のクエン酸に送り込む反応が弱く、また 2 量体分子が核内に移行して EMT における E-Cadherin の発現を制御することが明らかとなった。その PKM2 の機能は多様性に富み、アロステリックな効果などはよくわかっていない。第二の PDK(ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ)はピルビン酸からアセチル CoA の反応を触媒する酵素 PDH(ピルビン酸デヒドロゲナーゼ)を抑制的に制御して Warburg 効果を誘導し、前立腺がんの骨転移などにおいて重要であるが、前立腺がんの脳転移は稀である。第三の MPC(ミトコンドリアピルビン酸輸送体[Mitochondrial Pyruvate Carrier])は、肺がん、乳がん、大腸がん、胆道がん、膵がんなどの難治性固形がんの多くで発現が低下または変異をきたしており、Warburg 効果を直接誘導する分子として重要である。2014 年に結晶構造も解明されて、創薬の標的としてはたいへん有望である。

### (3) 脳転移と治療抵抗性

脳転移を来すがん細胞は、微小環境との相互作用の中で、抗がん剤や放射線照射に対する強い抵抗性を獲得していると考えられる。したがって、脳転移病巣が増大する前の早

期段階において、これから転移巣を形成しようとするがん細胞が標的組織にタッチダウンするごく早期段階において、画期的な医療技術を創出することが重要である。

高分子の抗がん剤では EPR ( enhanced permeability and retention ) 効果が知られている。すなわち、がん病巣での血管構築の破綻により薬剤が病巣に流れ出すことにより、またがん病巣に特徴とされるリンパ流れなどのドレナージの停留により、結果としてがん病巣に特異的に薬剤が長い時間留まり抗がん作用を発揮するというものである。脳の血液脳関門 ( Blood-Brain Barrier [BBB] ) では内皮細胞、周皮細胞、アストロサイトと基底膜により中分子以上の物質の透過性が厳密に制御されているので、がんの脳転移においてはこれらの組織構築が破綻していると考えられる。このように、脳転移の抗がん剤治療では強い EPR 効果が期待できる筈であるのに、実施に臨床で遭遇する転移病巣は治療抵抗性である。以上のように、がんの脳転移においてはがんの脳転移の本態を掘り下げて究明し、画期的な脳転移の制御技術を開発することが必要である。

## 2 . 研究の目的

研究課題の核心をなす問いは、『Warburg 効果の鍵分子 MPC が関わる早期脳転移の機序を明らかにすること』であり、さらに治療学としてその知見の応用を目指した基盤を構築することを目的とする。

## 3 . 研究の方法

術後 1 年以内に脳転移を来した原発病巣の切除試料(肺がん、乳がん、大腸がん年間各 5 例)を対象とした PDX モデルとゲノム情報解析により、がんの脳転移の早期段階で、血液循環中の遊離がん細胞(CTC)と脳の血液脳関門 ( BBB ) の直接相互作用が、腫瘍の抗がん剤抵抗性にどのように関わるか、Warburg 効果の機序を中心に据えて研究を実施した。

三次元組織培養法や PDK モデルを用いたシングル細胞解析により、MPC の研究を中心として進め、PKM2 および PDK の関与を明らかにした。一細胞レベルの解析から標的分子の POC を明確にして、創薬の標的化、機序の解明、抵抗性の予測技術の開発を進め、難治がんの精密医療に貢献することができた。本研究の実施に必要な予備データや基本技術などはそろっており、継続した開発研究として大きく発展させることができた。

## 4 . 研究成果 ( 図 1 )

(1)脳転移のモデル：  
MPC を発現しているがん細胞を用いて、ノックダウンの実験を行い、「MPCの発現は、転移性がん細胞の浸潤性質に重要な役割を担う」ことが明らかとなった。さらに三次元の組織培養法で内皮細胞、周皮細胞、アストロサイトと基底膜を再構築し、また患者由来細胞の PDXモデル、BMTによるヒト化マウス、自然発がんモデルを活用して検討を進めている。

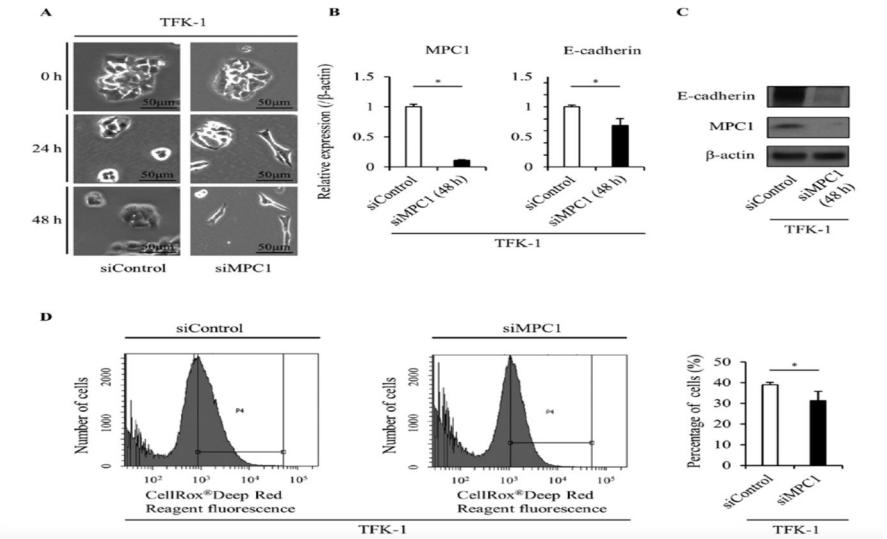


図1 MPCの発現は、転移性がん細胞の浸潤性質に重要な役割を果たす

(2)がん幹細胞の代謝解析により MPC に主眼を据えて PKM2, PDK を検討 (Flux 解析)、解糖系解析(ECAR 計測)、ミトコンドリア解析(OCR 計測)、活性酸素解析(DCFDA 計測)、EMT 解析(次世代シーケンス)を実施した結果、MPC と転移脳が相関することを明らかにした。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Konno Masamitsu, Koseki Jun, Asai Ayumu, Yamagata Akira, Shimamura Teppei, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Kawamoto Koichi, Mizushima Tsunekazu, Eguchi Hidetoshi, Takiguchi Shuji, Satoh Taroh, Mimori Koshi, Ochiya Takahiro, Doki Yuichiro, Ofusa Ken, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Distinct methylation levels of mature microRNAs in gastrointestinal cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-11826-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ueda Yuji, Kawamoto Koichi, Konno Masamitsu, Noguchi Kozo, Kaifuchi Satoru, Satoh Taroh, Eguchi Hidetoshi, Doki Yuichiro, Hirotsu Takaaki, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 10
2. 論文標題 Application of C. elegans cancer screening test for the detection of pancreatic tumor in genetically engineered mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 5412 ~ 5418
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27124	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsushita Katsunori, Konno Masamitsu, Eguchi Hidetoshi, Koseki Jun, Satoh Taroh, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ishii Hideshi, Obika Satoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 A Hydrogen Peroxide Activatable Gemcitabine Prodrug for the Selective Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 ChemMedChem	6. 最初と最後の頁 1384 ~ 1391
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cmdc.201900324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toshiyama Reishi, Konno Masamitsu, Eguchi Hidetoshi, Asai Ayumu, Noda Takehiro, Koseki Jun, Asukai Kei, Ohashi Tomofumi, Matsushita Katsunori, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Asaoka Tadafumi, Wada Hiroshi, Kawamoto Koichi, Gotoh Kunihito, Kudo Toshihiro, Satoh Taroh, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 15
2. 論文標題 Association of iron metabolic enzyme hepcidin expression levels with the prognosis of patients with pancreatic cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 8125 ~ 8133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.8357	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamoto Koichi, Ohashi Tomofumi, Konno Masamitsu, Nishida Naohiro, Koseki Jun, Matsui Hidetoshi, Sakai Daisuke, Kudo Toshihiro, Eguchi Hidetoshi, Satoh Taroh, Doki Yuichiro, Mori Masaki, Ishii Hideshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Cell-free culture conditioned medium elicits pancreatic cell lineage-specific epigenetic reprogramming in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 3255 ~ 3259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2018.9008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 太郎 (SATOH Taroh) (40368303)	大阪大学・医学系研究科・寄附講座教授  (14401)	
研究分担者	小関 準 (KOSEKI Jun) (20616669)	大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)  (14401)	
研究分担者	坂井 大介 (SAKAI Daisuke) (10621071)	大阪大学・医学部附属病院・特任講師  (14401)	
研究分担者	石井 秀始 (ISHII Hideshi) (10280736)	大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)  (14401)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------