

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07598

研究課題名（和文）癌幹細胞の命運を決定する代謝物質の同定とその機能解析

研究課題名（英文）Identifying functional metabolites that decide cell fates of cancer stem cells

研究代表者

北島 正二郎（KITAJIMA, Shojiro）

慶應義塾大学・政策・メディア研究科（藤沢）・特任講師

研究者番号：00452590

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん幹細胞がその生存・増殖や進展のために選択的に取り込んで利用する代謝物質の同定を目的とし、代謝物質ライブラリーを応用したスクリーニングや、マルチオミクス解析を行った。卵巣がん幹細胞モデルを用いた代謝物質スクリーニングの結果、がん幹細胞が特定の代謝物質に依存し生存・増殖している現象は確かめられなかった。一方、非幹細胞性（分化型）がん細胞ではATPやUTPなどのヌクレオチド3リン酸に依存して生存・増殖していることが明らかとなった。がん幹細胞において核酸類の含有量が多かったことを考え合わせると、がん幹細胞が周囲の分化型がん細胞に核酸類を供給してその制御を行なっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がん幹細胞の代謝様式の新たな側面を明らかにすると共に、周囲のがん細胞との間の細胞間相互作用の可能性を示した。核酸類による細胞間・細胞内シグナル伝達はすでに知られていたが、がん幹細胞に着目し微小環境におけるその役割が示唆される結果は新しい。また本研究で用いた代謝物質ライブラリーや細胞モデル系ががん幹細胞研究において有用であることを示した意義は大きい。本研究では、がん幹細胞そのものの代謝的脆弱性を詳らかにすることはできなかったが、微小環境における細胞間相互作用をターゲットとした新たな治療法につながり得る提案をしたことで、社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The project aims to identify functional metabolites that regulate cell fates in cancer stem cells (CSCs). While non-stem cancer cells relied their survival and proliferation on nucleotide triphosphates, CSCs were not responsible to those metabolites. Combined with the finding that cellular nucleotide level were higher in CSCs, those results collectively suggest that CSCs regulate surrounding cancer cells by providing nucleotides. This could provide new insights on cell to cell interactions in tumour microenvironment and a potential roles of CSCs in it.

研究分野：がん幹細胞の代謝

キーワード：がん幹細胞 細胞代謝

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は正常細胞と比べ、グルコースを多量に使う一方でグルタミンへの依存度が高いなど、特異な代謝様式をとることで高い増殖能などを獲得していることが分かっている。中でもがん幹細胞は、高い抗酸化能で細胞を活性酸素種によるダメージから守り、環境に応じて代謝の様相を大きく変えることのできる性質(代謝可塑性)の獲得によって環境変化によるストレスの中でも高い生存力を維持していると考えられている。がん幹細胞のこうした代謝特性は、抗がん剤耐性や転移・再発と密接な関連があることが分かかってきており、がん幹細胞を死滅させることができれば、より効果の高い治療法開発につながる (Peiris-Page's et al., *Breast Cancer Research* 18, article # 55, 2016)。しかし、幅広く使われているがん細胞株などとは異なり、がん幹細胞の実験モデルは非常に限られていることから、がん幹細胞の代謝特性に関する研究は進んでいなかった。そこで申請者は最近、有用で再現性の高いがん幹細胞の培養モデルを確立し、代謝調節による環境ストレス適応の機序や幹細胞性の制御機序を明らかにしてきた (Kitajima et al., *Oncotarget* 8, 114481-114494, 2017, Kitajima et al., *Oncotarget* 9, 19123-19135, 2018)。近年、がん幹細胞が高い抗酸化能を得るために、シスチンの取り込みによりグルタチオンの生合成を促進していることが報告されたことから (Ishimoto et al., *Cancer Cell* 19, 387-400, 2011)、がん幹細胞の代謝特性は、リソースとしての代謝物質の選択的取り込みと、細胞内での代謝制御の両輪によって獲得されていると考えられる。がん幹細胞の特性がある代謝物質の取り込みに依存するのであれば、その依存性はすなわちがん幹細胞の脆弱性として治療の標的となり得る。さらには、がん幹細胞の命運を代謝物質が決めるという新しい概念が想起される。しかしこれまでがん幹細胞による代謝物質の取り込みと利用に注目し網羅的に解析した研究はなかったため、がん幹細胞が限られたリソースの中で何をどのように利用し、生存や増殖につなげているのかは依然大きな謎である。そこでがん幹細胞が選択的に取り込み、利用している物質を同定しその分子機序を解明することで、がん幹細胞の代謝的脆弱性を標的としたより効果の高いがん治療への道が開ける。

2. 研究の目的

本研究は、がん幹細胞が厳しい微小環境の中で生存・増殖するために選択的に取り込み利用する代謝物質を、独自の代謝物質ライブラリーを用いたスクリーニングによって同定し、その分子機序を解明することを目的とする。またこの成果をもとに、がん幹細胞を死滅させるための創薬標的となり得る代謝脆弱性を見出したい。

生体内でがん細胞がおかれる微小環境では、特に栄養が欠乏しがちで利用できる代謝的リソースは限られているが、そのような環境でもがん幹細胞は高い適応力を維持している。従来は代謝遺伝子の変異、代謝酵素の発現や機能異常に着目した研究がほとんどであったが、本研究ではがん幹細胞の適応力の源が代謝物質の選択的取り込みと利用にあると考え、その機序を解明する点に独自性がある。またこれまでに蓄積した12万検体を超える大規模メタボロームデータに基づいて構築した独自の代謝物質ライブラリーを用いての網羅的解析は類を見ない。

代謝反応は酵素が触媒するものであるが、多くの場合、反応の方向や速度には基質の量的バランスが大きく影響する。微小環境においてがん幹細胞が選択的に取り込む物質は、このバランスを変えることで、がん幹細胞の代謝特性や生存などの機能と密接に結びつくと考えられる。またキヌレニンのように、本来の代謝経路とは独立した、受容体を介した遺伝子発現調節作用を持つものも見つかっている (Opitz et al., *Nature* 478, 197-203, 2011)。これらの知見から申請者は、代謝産物は単に細胞活動の終末産物というだけではなく、積極的に細胞の機能を制御し命運を決定しているという概念を提唱しており、その検証には大きな学術的意義がある。特にがん幹細胞による代謝物質の取り込みに着目し網羅的解析を行う本研究は、その基本概念の検証やスクリーニング系の確立を通して、新しい研究分野の創生となる。

3. 研究の方法

本研究では、がん幹細胞が生存や増殖のために選択的に取り込み、利用する代謝物質を同定し、取り込まれた代謝物質が細胞内で機能する分子機序を明らかにすることで、がん幹細胞の代謝脆弱性を見出し、死滅させる方法を開発する(図1)。スクリーニングには、申請者がこれまでに確立した卵巣がん幹細胞モデルである PE01-SL 細胞を中心に用いる。比較対照として、同一親株由来の非幹細胞性がん細胞である PE01-NS 細胞を用いる。加えて、得られた知見のさら

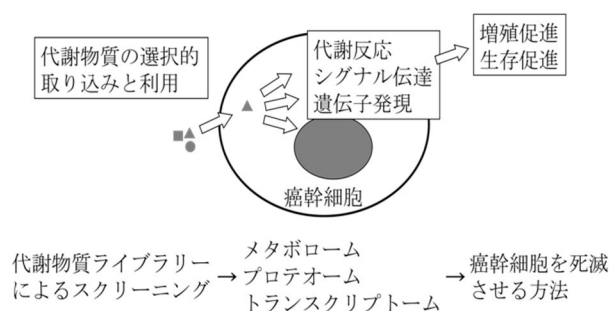


図1 本研究課題の概要

なる検証のために、研究協力者のサンペトラ・オルテア博士（慶應義塾大学）が樹立した脳腫瘍幹細胞モデルである Ras-NSC 細胞を用いる。スクリーニングのための代謝物質は、研究協力者の曾我朋義博士がこれまでに解析・蓄積した約 12 万検体のがんメタボロームデータを基に統計処理を行い、がんの代謝特性に関連する 179 物質を選別しライブラリーとしてすでに構築しており、これを用いる。

4. 研究成果

(1) 機能性代謝物質のスクリーニング

代謝物質ライブラリーを用い、細胞の増殖を指標に機能性代謝物質を検索した。事前に様々な基礎データのコンピューター解析により絞り込まれた 179 種類の代謝物質ライブラリーを、がん幹細胞 (PEO1-SL) および非幹細胞性がん細胞 (PEO-NS) に投与し、細胞生存率を測定した。なお、培養条件として、生体内の腫瘍の微小環境である低栄養状態を再現するため、代謝物質投与は無血清で培養を行なった。対照群と比較した相対的な生存率を図 2 に示す。PEO1-SL および NS は、同一患者由来の細胞株であるが、がん幹細胞である SL 細胞と非幹細胞性の NS では、代謝物質に対する応答が大きく異なることが分かった。興味深いことに、このスクリーニングの中には核酸類が複数含まれていたことから、がん幹細胞では非幹細胞と比べ、核酸代謝に特徴があることがわかった。しかし予想に反して、これら核酸類は低栄養状態で PEO-NS 細胞の増殖をより促進する結果となった。核酸代謝は細胞の生存や増殖に直結することが知られているため、がん幹細胞は腫瘍内部の厳しい微小環境変化の中で、核酸代謝を有利に制御する生存戦略をとっていることが示唆された。

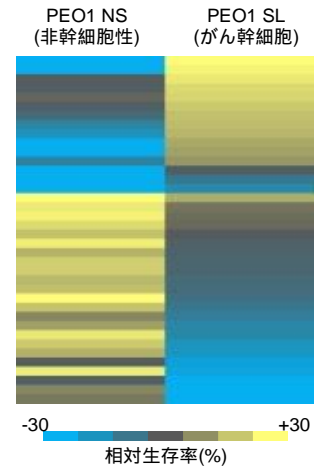


図 2. 機能性代謝物質のスクリーニング結果。179 物質中、15%以上の生存率増減が見られたもののみを選択し表示。

(2) 種々の核酸による増殖促進作用の網羅的検討

前項の結果を受け、種々の核酸による濃度依存的な増殖促進作用について詳細な検討を行なった。最も強い作用が見られたのは ATP および UTP の 3 リン酸ヌクレオチドであったが、細胞内には ADP, AMP など 2 および 1 リン酸ヌクレオチドが存在し、またリン酸基を有さないヌクレオチドやその前駆物質などがある。そこでこれら 18 物質の核酸類を用い、PEO1-SL および NS 細胞における増殖促進作用を比較検討した (図 3)。スクリーニングから予想された通り、ATP および UTP は PEO1-NS 細胞において最も強い増殖促進を示した。また GTP, CTP によってもその作用は見られた。一方、UDP は一定の増殖促進を示したものの、ヌクレオチド 2 リン酸ではその作用は著しく低下し、1 リン酸やヌクレオシドでは完全に消失した。核酸類はレセプターを介した作用や、細胞外で分解された上でトランスポー

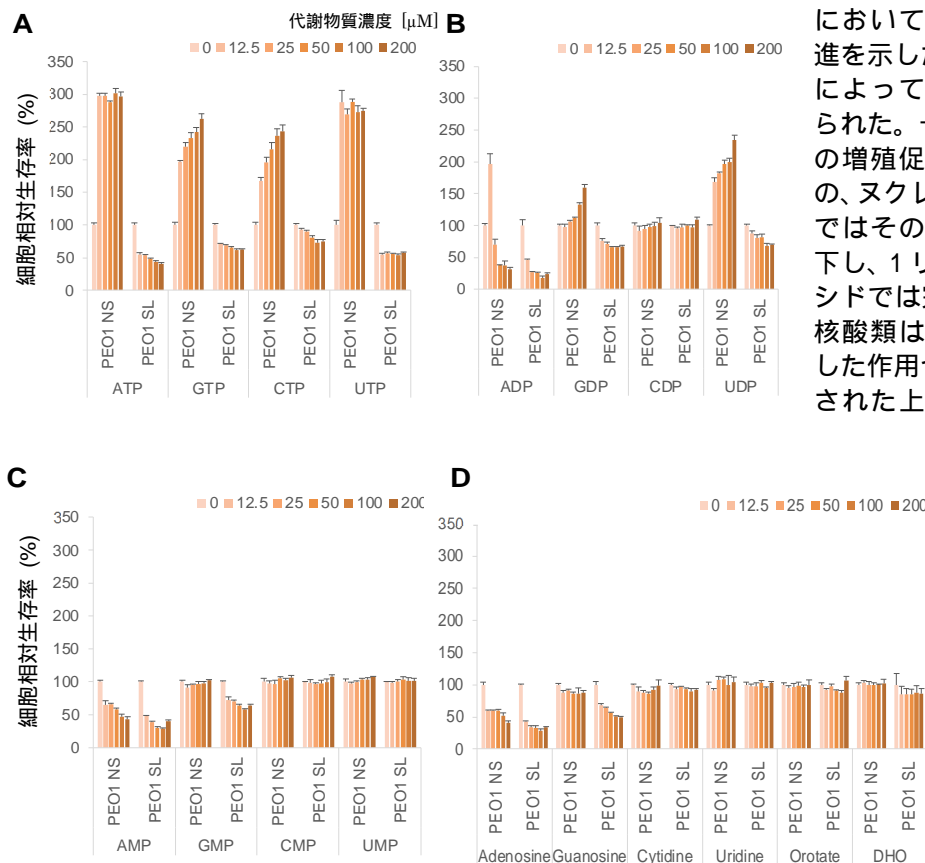


図 3. 種々の核酸による増殖促進作用の検討。A, B, C, それぞれヌクレオチド 3-, 2-, 1-リン酸。D, ヌクレオシドと前駆物質。対照群に対する細胞相対生存率を%で表示。

ターにより取

り込まれて細胞内で代謝される経路などが知られているが、上述の結果から、ATP や UTP は直接細胞に作用していることが考えられた。

(3) 核酸投与による細胞内メタボロームの変動解析

作用の分子メカニズムを探索するため、CE-MS による質量分析を行い、細胞内の代謝変動を網羅的に解析した。最も増殖促進作用の強かった ATP および UTP を投与し、経時的に細胞のメタボローム情報を取得し、主成分分析を行なった(図4)。興味深いことに、PEO1-SL 細胞は NS 細胞と比べ、無血清培養に対する応答が著しく異なることがわかった。このことは、低栄養ストレスに積極的に応答して細胞内代謝様式をリモデリングしていることを示唆している。一方で、無血清状態で ATP, UTP を投与した時の変動は、SL 細胞では主に第二主成分(PC2)が大きく変動したのに対し、NS 細胞では第一主成分(PC1)の変動が主であり、この差が両者の反応性の違いを反映していることが考えられた。また個々の代謝物質のうち、PRPP(核酸合成経路)、Gln(グルタミン)、3PG(解糖経路)に着目すると、PEO-SL と NS 細胞では ATP, UTP 投与に対する反応が大きく異なる、あるいは正反対の動態を示すなど、主成分分析の結果をよく反映していた(図5)。これらの経路はいずれも細胞増殖に重要な代謝反応系であり、細胞外からの核酸シグナルが細胞内同化反応を促進し、細胞増殖に繋がっている可能性がある。さらに、PEO1-SL 細胞では無血清培養によって細胞内 ATP 量が著しく増加した(図5)。より詳細な検討が必要であるが、低栄養な微小環境においては、がん幹細胞が ATP などの核酸を供給し、周囲のがん細胞の増殖や生存を助けている可能性が考えられた。

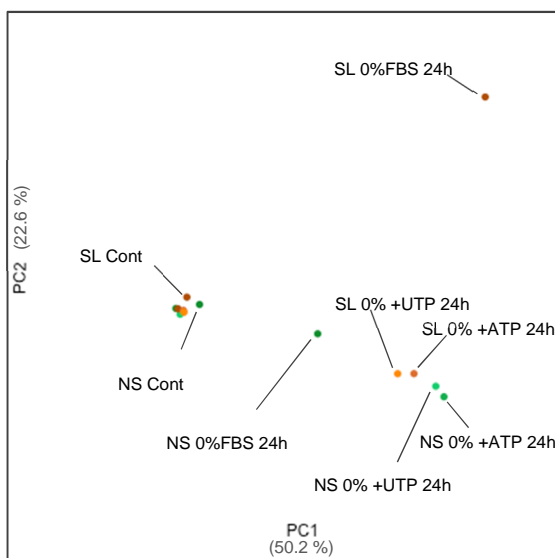


図4. 細胞内メタボロームの主成分分析.

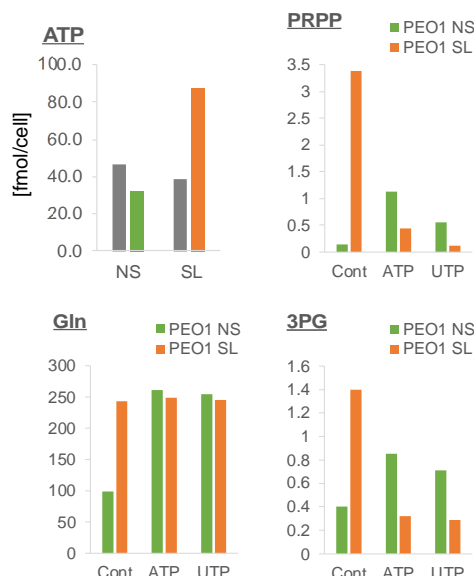


図5. 細胞内代謝物質の変動.

(4) P2Y レセプターを介した増殖促進作用の検討

これまでの検討により、特に PEO1-NS 細胞において、無血清培養条件で ATP, UTP が増殖促進することがわかってきた。上述のように、これらの核酸類は細胞に直接作用している可能性が考えられたが、実は ATP や UTP に対しては特異的に結合して細胞内にシグナルを伝えるレセプターファミリー、P2Y が知られている。そこで次に、レセプターの発現抑制によって代謝物質投与の作用が影響されるか検討するため、ATP や UTP と結合することが知られている P2RY4, P2RY11 遺伝子の mRNA を shRNA によって抑制(ノックダウン)した細胞を作製した(図6)。驚くべきことに、PEO1-NS 細胞では、P2RY4, P2RY11 遺伝子をノックダウンしただけで細胞の生存が困難となった。PEO1-SL 細胞は同様にノックダウンしても問題なく生存していたことから、PEO1-NS 細胞はこれらのレセプターからのシグナルに依存して生存・増殖していること、一方でがん幹細胞である SL 細胞はそれらに依存していないことが示唆された。またこの結果は

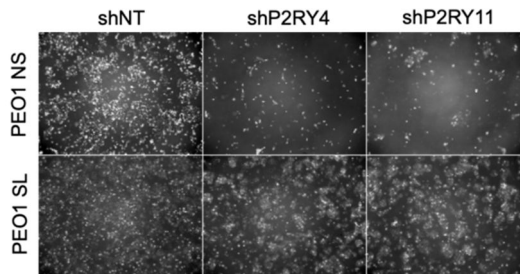


図6. P2Y レセプターノックダウンの作用. shNT はコントロール群.

ATP, UTP 投与の結果とも一致しており、がん細胞は特に低栄養状態では ATP や UTP による刺激が増殖・生存に必要なものに対し、がん幹細胞はそれらには依存せず生存できる可能性がある。次に、P2Y レセプターの関与をさらに検証するため、PEO1-NS 細胞に無血清培養で ATP, UTP を投与した時の細胞内シグナルの動きをタンパク質レベルで検討した。P2Y レセプターは G タンパク質共役型受容体であり、その細胞内シグナルは MEK, ERK といった、いわゆる MAP キナーゼ経路を介して伝達され、それが FOS などの因子による転写活性化につながるということが知られている。図 7 に示すように、特に UTP 投与で ERK のリン酸化が顕著に上昇しており、また ATP, UTP それぞれが c-FOS, FOSL1 の活性化につながっていることがわかった。さらにこの経路を遮断するため、ERK の上流である MEK に対する阻害剤を用いたところ、ATP や UTP による細胞増殖促進作用が消失した（図 7 下）。これらの結果はいずれも、ATP, UTP による増殖促進作用が、細胞内における MAP キナーゼ経路の活性化によることを示しており、ロックダウンの結果や先行研究に照らして、それが P2Y レセプターを介した機序であると考えて矛盾はない。

(5) まとめ

本研究で実施してきた、がん幹細胞モデルを用いた代謝物質スクリーニングとメタボローム解析、分子細胞生物学的検討により、腫瘍の微小環境におけるがん幹細胞とがん細胞の代謝制御の違いや相互作用の実態が理解されてきた。生体内の腫瘍ではしばしば生じる低栄養ストレス状態では、ATP や UTP をはじめとする核酸ががん細胞の生存や増殖を助けていることが分かり、それらががん幹細胞によって供給される可能性が示唆された。また阻害剤を用いてそうした機序を遮断できたことから、微小環境中の細胞間相互作用をターゲットとした新しい治療戦略にもつながり得る知見を得た。

一方、本来の目的であったがん幹細胞自身の代謝的依存性の発見には至らず、今後代謝物質ライブラリーの規模を拡大して探索していく必要があった。しかしながら、詳細の更なる検討が必要ではあるが、本研究成果は、がん幹細胞による周囲のがん細胞の生存・増殖制御の一端を捉えていると考えられることから、その機能を遮断することができれば、がん幹細胞に対する治療法につながることも考えられる。がん幹細胞の維持や分化の制御、また細胞機能や微小環境中での細胞間相互作用など、がん幹細胞に関して理解・解明が進んでいない側面が多々残されており、今後の課題である。またそのためにも、本研究成果である代謝特性や本研究課題で用いたがん幹細胞モデル系は有用であり、研究分野の発展につながるものと考えられる。

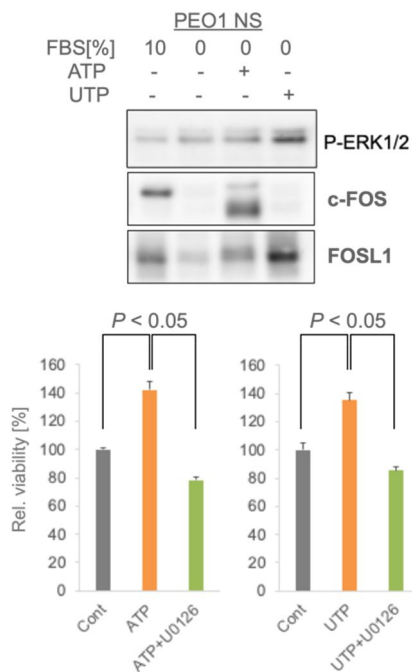


図 7 .PEO1-NS 細胞における MAP キナーゼ経路の検討 . 上は細胞から抽出したタンパク質のウエスタンブロット解析 . 下は ATP, UTP 投与と MEK 阻害剤 U0126 を組み合わせた時の細胞生存率の検討 .

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Zhang Chujing, Amanda Stella, Wang Cheng, Tan Tze King, Ali Muhammad Zulfaqar, Leong Wei Zhong, Ng Ley Moy, Kitajima Shojiro, Li Zhenhua, Yeoh Allen Eng Juh, Tan Shi Hao, Sanda Takaomi	4. 巻 105
2. 論文標題 Oncorequisite role of an aldehyde dehydrogenase in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3324/haematol.2019.245639	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 該当する
1. 著者名 Kitajima Shojiro, Sun Wendi, Lee Kian Leong, Ho Jolene Caifeng, Oyadomari Seiichi, Okamoto Takashi, Masai Hisao, Poellinger Lorenz, Kato Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 A KDM6 inhibitor potently induces ATF4 and its target gene expression through HRI activation and by UTX inhibition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-83857-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ikizawa Takeshi, Ikeda Kazutaka, Arita Makoto, Kitajima Shojiro, Soga Tomoyoshi, Ichijo Hidenori, Naguro Isao	4. 巻 299
2. 論文標題 Mitochondria directly sense osmotic stress to trigger rapid metabolic remodeling via regulation of pyruvate dehydrogenase phosphorylation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102837 ~ 102837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102837	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kadonosono Tetsuya, Miyamoto Kotaro, Sakai Shiori, Matsuo Yoshiyuki, Kitajima Shojiro, Wang Qiannan, Endo Minoru, Niibori Mizuho, Kuchimaru Takahiro, Soga Tomoyoshi, Hirota Kiichi, Kizaka-Kondoh Shinae	4. 巻 12
2. 論文標題 AGE/RAGE axis regulates reversible transition to quiescent states of ALK-rearranged NSCLC and pancreatic cancer cells in monolayer cultures	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-14272-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 北島正二郎、山口裕々、富田勝、曾我朋義
2. 発表標題 Metabolic responses and fate-metabolite screening under conditions of nutrition stress in ovarian cancer stem-like cells
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔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
研究協力者	曾我 朋義 (SOGA Tomoyoshi)	慶應義塾大学・大学院政策・メディア研究科、先端生命科学研究所・教授 (32612)	

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		
シンガポール	National University of Singapore		