

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590342

研究課題名(和文) ワールブルグ効果代謝低分子産物が、がん-間質相互作用を介してもたらす影響の解析

研究課題名(英文) Analyses of influence by Warburg Effect small molecular Metabolites via Cancer-Stroma interactions

研究代表者

藤井 元 (FUJII, GEN)

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：90321877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍組織周辺ではワールブルグ効果等による乳酸他の代謝低分子産物濃度の局所的変動が確認されている。本研究では、このような濃度変化が、がん間質相互作用を介して腫瘍組織の維持・成立・増悪にもたらす分子的影響に関して解析を行った。

腫瘍細胞/間質細胞という2種の細胞が混在した共培養モデル実験系での発現データを新規手法で解析し、複合的プロフィールを半独立的に紐解くことに成功した。そこで代謝低分子産物濃度変化に応じて発現を変化させる応答分子群をそれぞれ複数個選り出し、これら分子の実際の発現変動を確認した。構造類似物質・阻害剤/活性化剤などを共培養系に添加した時の発現を解析し、分子シグナル経路の推定も行った。

研究成果の概要(英文)：Local fluctuations of small molecular metabolic products concentration, like lactate or pyruvate produced with Warburg effect, were frequently seen in and around cancer tissue. In this research plan, we investigate molecular influences and mechanism of unique expression due to these metabolites concentration changes, via cancer - stroma interaction, for organization, maintenance, and exacerbation of cancer.

Using co-cultured cell model system composed with cancer cell and stroma cell, we successfully perused semi-independent expression profiles of each cell group from integrated DNA chip expression data with novel bio-informatics techniques. Several gene products were extracted, and certified as these expressions were specifically responded to those metabolite concentration changes. Molecular signal transduction pathways were presumed by experiments using reagents showing resembled molecular - structure with small molecular metabolites, inhibitors, and activators for Warburg effect.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学/人体病理学

キーワード：がん間質相互作用 ワールブルグ効果

1. 研究開始当初の背景

多くの腫瘍組織において、腫瘍の悪性化は腫瘍細胞のみに依存しているのではなく、周辺微小環境などの影響を大きく受けていることが研究開始時期に明らかになってきていた。(* 現在に於いてもこの課題は解明されているとはいいがたい) がん周辺微小環境には、周囲に存在している細胞外基質などの物質自体や、酸素濃度といった物理化学的環境といった要素も含まれるが、がん組織の成立において近年より重要視されているのは、血管細胞・免疫細胞・線維芽細胞といった間質細胞との相互作用である。がん細胞と間質細胞は成長因子やサイトカインなどを通じて相互に影響を及ぼしあっており、またこれが細胞レベルでなく組織レベルでも腫瘍組織が成立・維持される上で重要な条件となっていることが判明してきていた。

一般的ながん-間質相互作用に加え、がん細胞ではワールブルグ効果という特異的な解糖系の代謝変動増進が従前より知られている。ワールブルグ効果の結果として、腫瘍組織周辺では特定の代謝低分子産物の濃度変化が観察されていた。この代謝低分子産物の濃度変化が間質細胞を活性化し、そしてそれらががん細胞との更なる相互作用を起こすことでフィードバック的に再びがん細胞自らに影響を及ぼしている可能性は、細胞生理活動で生み出された物理化学的な環境要因変化が新たな細胞間相互を引き起こすという複合的現象であり、要素を単離して解析的に行われてきたこれまでの学術研究では殆ど手付かずの研究領域であった。

申請者は 2005 年以降がん間質相互作用の解析を行ってきており、近年はがん細胞における悪性化マーカーの一つであるラミニン 5 2 の発現が間質細胞存在下の共培養環境で発現が増大することを見だし、その原因機構(誘導因子やシグナル伝達分子)の解明を行ってきていた(Yamanashi et al. 2009)。その過程中的ある追加実験において、間質細胞との共培養によってがん細胞で増大するラミニン 5 2 分子発現が、この共培養の培養液中にワールブルグ効果による代謝低分子産物の一つである乳酸を生理学的濃度で添加することにより、更に飛躍的な増大を示すことを発見していた。

2. 研究の目的

前項で述べた様に、ワールブルグ効果などによって腫瘍組織周辺では乳酸などの代謝低分子産物濃度が局所的に上昇している。この濃度変化が、がん間質相互作用を介して腫瘍組織の維持・成立・増悪にもたらす分子的影響に関して、代謝低分子産物の生理的濃度変化が腫瘍細胞・間質細胞に引き起こす発現変動の網羅的探索を行い、その分子群発現までのシグナル経路の解析と周辺環境因子変

動を解明することを目的とした。副次的目的として、分子群の臨床検体における発現変化や濃度変動がもたらすマウス移植モデルでの腫瘍組織への影響の検討を想定した。当研究の遂行により、環境要因と細胞要因の双方に関連した事象の理解を深めると共に、今後の展開に必要な基礎的な知見を得ることを将来的目的とした。

3. 研究の方法

具体的に研究計画を詳述する前に、まず研究計画の基礎となっている発見に関する実験手法について、再度簡単に記載しておく：口腔がん由来の培養がん細胞 Ho1-u1 細胞ではがん悪性度マーカーの一つであるラミニン 5 2 分子がネイティブに少量発現しており、その発現は間質細胞である MRC-5 線維芽細胞と共培養することによって増大する(Yamanashi et al. 2009)。この共培養環境下で培養液に乳酸やピルビン酸などのワールブルグ効果による代謝低分子産物を生理的な濃度で添加することで、ラミニン 5 2 分子の発現が更に顕著に上昇すること、そしてその発現上昇ががん細胞のみの培養では見受けられず、また塩酸などの無機酸や乳酸イオンの添加でもこの効果が見られないことから、ワールブルグ効果の下流としてがんの悪性化を昂進させる<一価カルボン酸の濃度上昇を特異的シグナル起点とし、間質細胞活性化を引き起こす事でのがん-間質相互作用を介して機能するメカニズム>が存在しているもの、と予想していた。

そこでまず前述の乳酸・ピルビン酸などの一価カルボン酸濃度の上昇に特異的な発現変動を示す遺伝子群の網羅的探索・抽出を行った。実験手法としては上記モデル系の細胞群を培養細胞として共培養し、その培養細胞から調整した RNA 標品をラベルして、遺伝子の網羅的発現変動を解析可能な DNA チップに供する事で行った。

DNA チップ解析を行う具体的なサンプルとしては、前提実験で用いた乳酸/ピルビン酸などの一価カルボン酸を培養液に添加した標品を用い、副対照標品として 1) 培養液だけのコントロール標品 2) 一価カルボン酸のイオン体試薬(乳酸ナトリウムやピルビン酸ナトリウム)を添加したもの 3) 同程度の濃度/pH まで無機酸を加えたもの、の 3 標品を利用することで、単に pH 変化やイオン変動が引き起こしたのではない、精度の高い網羅的解析を施行した。

この系において解析を複雑にしているのは、サンプルが共培養系由来であり、二つの細胞の発現プロファイルが混在して得られてしまう為である。そこで以前九州大学・遺伝子環境資源学科と共同研究ベースで検討を行った、単独サンプルで特徴的な発現を示すユニーク遺伝子の発現レベルを手がかりに、細胞群の混在割合を推定し、その複合的

な発現プロフィールを得られる手法を利用して、信憑性の高いデータとして個々の遺伝子レベルでの発現比較を行った。

このチップデータ解析をもとに代謝低分子産物濃度変化に応じてその発現を変化させる応答分子遺伝子を腫瘍細胞・間質細胞、それぞれで複数個選り出し、その後定量的逆転写 PCR、ならびに培養細胞に対する *in situ* hybridization などを施行して発現変動の詳細な解析を行った。

さらに代謝低分子産物（乳酸）濃度変化が間質細胞の＜活性化＞をもたらし、さらにそれが腫瘍細胞での発現応答を引き起こしているのかを、シグナル伝達阻害剤や、阻害抗体、乳酸の分子構造アナログなどを利用して検討し、どのようなシグナル経路・シグナル分子を利用しているのかの概略を捉える解析を行い、環境変化から細胞変化への変換機構をおおまかに捕捉／分析した。

4. 研究成果

乳酸／ピルビン酸などの一価カルボン酸を培養液に添加した標品、これらの一価カルボン酸のイオン体となる試薬（乳酸ナトリウムやピルビン酸ナトリウム）を添加した標品、同程度の濃度・pH まで無機酸を加えた標品、以上三種標品の遺伝子の網羅的発現変動を無添加標準培地標品での発現と DNA チップ実験により比較し、乳酸・ピルビン酸などの一価カルボン酸濃度の上昇に特異的な発現変動を示す遺伝子群の網羅的探索・抽出を行った。当初、共培養系由来サンプルの発現が研究開始前の推定より複雑で、細胞混在比率を推定しての発現解析に困難が招じ、精度の高い結果を得づらい展開が見られたが、イルミナ社の DNA チップを用いた網羅的発現解析実験自体は良好に推移したので、更に精度の高い追実験を行い、この結果にバイオインフォマティクス手法を加味して、ワールブルグ効果がもたらす遺伝子変動を解析した。

この結果、腫瘍細胞／間質細胞の共培養系下、さらに周辺微小環境でのワールブルグ効果代謝低分子産物濃度が高い時に、この共培養条件下での発現が変動する候補遺伝子を複数確認する事が出来た。

そこでこれらの遺伝子群が多様な培養環境下で実際どのような発現変動を示すかについて、mRNA での発現レベルを定量的 RT-PCR や *in situ* hybridization で、蛋白質発現レベルでは抗体を使用した Western Blotting や免疫組織化学で確認を行い、その変動が確かに起こることやその発現契機となりうる条件を確認した。

更に代謝低分子産物構造類似物質や、ワールブルグ効果の様な細胞内の基本的代謝活性に変化をもたらし事が期待される阻害剤・活性化剤と言った薬剤を共培養系に添加した時の発現変動を仔細に解析した結果、代謝低分子産物応答性の分子発現に関するシグ

ナル伝達経路上流に関する知見を得ることが出来た。

上記の発現解析／発現確認／シグナル伝達経路確認実験を複合的に実施する事で、腫瘍における特徴の1つとして近年とみに着目されているがん組織に特異的な代謝変化であるワールブルグ効果によって産生される乳酸などの代謝低分子産物が、がん-間質相互作用を介して、腫瘍組織の維持・成立・増悪にどのような関与／影響を持ちうるのかという、がんの生物学における重要な分子メカニズム解明への手がかりの一端が明らかできたと考えている。

今回の研究遂行の副産物として、実験に利用した H01-u1 がん細胞と線維芽細胞の共培養系では、線維芽細胞側での活性化も起こっていること（ α -smooth muscle actin < α -SMA> の発現を活性化マーカーとして利用）、そしてがん細胞の種類を変える事により逆に線維芽細胞の不活性化をも起こしうることを見いだした。この時のそれぞれの網羅的発現プロファイルを前述のバイオインフォマティクスを利用した発現解析にかけることで、半独立的な発現プロファイルを得る事が出来た。そこでそれぞれの共培養系で特異的な発現変化遺伝子群を抽出し、全体を Pathway 解析にかけたところ、炎症関連のシグナル経路がこの現象（通常の線維芽細胞からがん活性化（がん関連）線維芽細胞（Cancer Activated Fibroblast <CAF>）への変化）に大きく関与している事が明らかになった。

がん細胞／線維芽細胞が、ワールブルグ効果により産生される代謝低分子産物のある種の情報伝達分子として利用して、相互依存的にがん組織を形成／成長／増悪させて行く過程の一端を明らかにする事が出来たので、今後はこの知見を上手く利用して、がん組織の本態解明、さらには発がん予防への展開を目指して更に研究を進めたいと考えている。

5. 主な発表論文等（研究代表者には下線）

〔雑誌論文〕(計 13 件)

- 1) Komiya M, Fujii G, Takahashi M, Shimura M, Noma N, Shimizu S, Onuma W, Mutoh M. Bi-directional regulation between adiponectin and plasminogen activator-inhibitor-1 in 3T3-L1 cells. IN VIVO, 28:13-19, 2014. 査読有り
- 2) Shimizu S, Fujii G, Takahashi M, Nakanaishi R, Komiya M, Shimura M, Noma N, Onuma W, Yano T, Mutoh M. Sesamol suppresses cyclooxygenase-2 transcriptional activity in colon cancer cells and modifies intestinal polyp development in Apc^{Min/+} mice. J

- Clin Biochem Nutr. 54:95-101 (2014). 査読有り
- 3) Tamura M, Mutoh M, Fujii G, Matsui H. Involvement of mitochondrial reactive oxygen species in gastric carcinogenesis. J Gastroint Dig Syst 3:150 (2013). Doi: 10. 4172/2161-069X. 1000150. 査読有り
 - 4) Komiya M, Fujii G, Takahashi M, Iigo M, Mutoh M. Prevention and intervention trials for colorectal cancer. Japanese J Clin Oncol. 43:685-94 (2013). 査読有り
 - 5) Fujimoto K, Fujii G, Mutoh M, Mochida Y, Tanaka H, Wada M. Suppression of intestinal polyp development through inhibition of P-glycoprotein by verapamil in Apc^{Min/+} mice. Eur J Cancer Prev. 22:8-10 (2013). 査読有り
 - 6) Takahashi M, Mutoh M, Ishigamori R, Fujii G, Imai T. Involvement of inflammatory factors in pancreatic carcinogenesis and preventive effects of anti-inflammatory agents. Semin in Immunopathol, 35: 203-227 (2013) 査読有り
 - 7) Miyanaga A, Honda K, Tsuta K, Masuda M, Yamaguchi U, Fujii G, Miyamoto A, Shinagawa S, Miura N, Tsuda H, Sakuma T, Asamura H, Gemma A, Yamada T. Diagnostic and prognostic significance of the alternatively spliced ACTN4 variant in high-grade neuroendocrine pulmonary tumours. Ann Oncol., 24 :84-90 (2013) 査読有り
 - 8) Shimura M, Yamamoto M, Fujii G, Takahashi M, Komiya M, Noma N, Tanuma S, Yanaka A, Mutoh M. Novel compound SK-1009 suppresses IL-6 expression through modulation of activation of NF-kappaB pathway. Biol Pharm Bull, 35: 2186-2191 (2012). 査読有り
 - 9) Ueno T, Teraoka N, Takasu S, Nakano K, Takahashi M, Yamamoto M, Fujii G, Komiya M, Yanaka A, Keiji Wakabayashi K, Mutoh M. Suppressive effect of pioglitazone, a PPAR gamma ligand, on azoxymethane-induced colon aberrant crypt foci in KK-A^y mice. Asian Pac J Cancer Prev, 13:4067-4073 (2012). 査読有り
 - 10) Mutoh, M., Fujii, G., Yamamoto, M., Takahashi, M. Searching for effective colon cancer prevention methods targeting adipocytokines. Ulcer Res., 39, 80-84 (2012). 査読有り
 - 11) Nakano, K., Yamamoto, M., Takahashi, M., Fujii, G., Hifumi, Y., Shimura, M., Nakanishi, R., Komiya, M., Yanaka, A., Mutoh, M. Effects of triglyceride on colon epithelial cells during colon carcinogenesis. Ulcer Res., 39: 196-200 (2012). 査読有り
 - 12) Hifumi, Y., Fujii, G., Takahashi, M., Yamamoto, M., Nakano, K., Nakanishi, R., Shimura, M., Ishigamori, R., Yanaka, A., Mutoh, M. Synergistic suppression of mice intestinal tumorigenesis by angiotensin II receptor blocker and metformin. Ulcer Res., 39: 201-206 (2012). 査読有り
 - 13) Fujii, G., Yamamoto, M., Takahashi, M., and Mutoh, M. Role of adipocytokines in colorectal carcinogenesis. Curr. Res. in Cancer, 5: 39-48 (2011). 査読有り
- 〔学会発表〕(計 35 件)
- * 詳細全て記載すると指定記述量を大幅に越えてしまうので、国際学会、及び筆頭演者としての学会発表に限定して記載する。
- Akinori YANAKA, Yoshie HIFUMI, Gen FUJII, Mami TAKAHASHI, Masafumi YAMAMOTO, Katsuya NAKANO, Misato SHIMURA, Michihiro MUTOH: Combination effects of angiotensin II receptor blocker and metformin on suppression of intestinal polyp formation in Min mice. Digestive Disease Week, San Diego, California, USA. (May, 2012)
- 藤井 元、山本真史、高橋真美、野間寛陽、志村美聖、武藤倫弘。Min マウス腸ポリープ生成抑制に対するロサルタン+メトホルミンの相乗的効果。第 71 回日本癌学会総会、札幌 (2012 年 9 月)
- Michihiro Mutoh, Gen Fujii, Masami Komiya, Mami Takahashi, Hitoshi Nakagama, Role of hyperlipidemia in intestinal carcinogenesis in association with lipoprotein receptor. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, Maui, Hawaii, USA (Feb., 2013)
- 藤井 元、武藤倫弘、小宮雅美、中西るり、志村美聖、野間寛陽、清水聡美、尾沼若奈、中釜 斉。Global (All-over) なメチル化状

態のスクリーニング的定量方法の確立。 第 20 回日本がん予防学会、渋谷(2013年7月)

藤井 元、中西るり、小宮雅美、高橋真美、志村美聖、野間寛陽、清水聡美、尾沼若奈、武藤倫弘。大腸がん細胞増殖における低密度リポ蛋白受容体の役割。 第 24 回日本消化器癌発生学会、金沢(2013年9月)

藤井 元、武藤倫弘、小宮雅美、高橋真美、志村美聖、野間寛陽、清水聡美、中釜斉。LDL受容体遺伝子のノックダウンは大腸がん培養細胞株の増殖を抑制する。第 72 回日本癌学会総会、横浜(2013年10月)

他 共同発表 29 演題 詳細省略

〔図書〕(計 3 件)

武藤倫弘、藤井元、高橋真美。大腸がんとアディポサイトカイン、脂質異常。 The Lipid, 23(3), 82-89 (2012).

武藤倫弘, 藤井元。分子スポーツ医学を利用したがん予防の可能性。週刊医学のあゆみ 243(8); 694-700, (2012)

武藤倫弘、藤井元。アディポネクチンと大腸がん。 分子消化器病, 10(4), 52-57 (2013).

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)特に無し

取得状況(計 0 件)特に無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 元 (FUJII, Gen)
独立行政法人・国立がん研究センター・
研究所・主任研究員
研究者番号: 90321877

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし