

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430110

研究課題名(和文) 病因性mtDNA変異を有するがん細胞による寄生性代謝の解析とその制御

研究課題名(英文) Analysis and regulation of parasitic metabolism by cancer cells harboring pathogenic mitochondrial DNA mutation

研究代表者

竹永 啓三 (Takenaga, Keizo)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：80260256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：病因性ミトコンドリアND6及びCOI遺伝子変異を有するため試験管内では低いATP産生しかできないが、生体内では高い増殖性と転移性を示すマウス肺がん由来P29mtB82M細胞の特徴をエネルギー代謝の面から検討した。その結果、解糖系の亢進、乳酸トランスポーターMCT4による乳酸の積極的排出、間質細胞との寄生性がん代謝、低酸素下における高いグルコースの取込み、高い腫瘍血管新生能による血中グルコースの効率的利用が増殖・転移におけるエネルギー(ATP)確保にとって重要であることが示唆された。また、MCT4を抑制すると細胞死が起こることも判明し、mtDNA制御の転移を抑制するための糸口が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the characteristics of mouse lung carcinoma P29mtB82M cells from the aspect of energy metabolism that produce a low level of ATP in vitro due to a frame-shift mutation in the mitochondrial ND6 gene and a missense mutation in the COI gene while show high tumor growth and metastatic potential. The results indicated that P29mtB82M cells produced a higher level of ATP in vivo through higher levels of glycolysis, lactate production via lactate transporter MCT4, parasitic metabolism, glucose uptake under hypoxic conditions, and glucose uptake via stimulation of angiogenesis. In addition, we found that knockdown of MCT4 resulted in cell death of P29mtB82M cells, implying the strategy to suppress mtDNA-regulated metastasis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：ミトコンドリアDNA 病因性変異 肺がん 転移 寄生性がん代謝 ATP 乳酸トランスポーター

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトがん組織中の多くのがん細胞ではランダムに多種多様なミトコンドリア DNA (mtDNA) 変異が頻繁に起きていることが古くから知られているが、変異の種類が主であり、それらががん細胞の生物学的性状にどのような影響を及ぼすかの研究は極めて少ない。我々は、マウス由来の転移能の異なる肺がん細胞株及び繊維肉腫細胞株を用いて、mtDNA 変異と転移能との関連を検討し、高転移性細胞特異的に呼吸鎖複合体 I を構成する NADH 脱水素酵素 6 (ND6) 遺伝子で病理性ミスセンス変異あるいはナンセンス変異が起きていることを明らかにした (1)。また、高転移性ヒト乳がん細胞株においても mtDNA 変異が転移能の亢進に関与していることを見出した (1)。Cybrid 細胞を用いた解析から、この病理性変異が原因で複合体 I 活性が低下し、いわゆる偽低酸素状態が細胞内に生じるとともに活性酸素種 (ROS) が過剰に産生され、低酸素誘導転写因子 HIF-1 と抗アポトーシス MCL-1 の発現が亢進し、その帰結として細胞が高転移能を示すようになることを報告した (筑波大学及び千葉県がんセンターとの共同研究) (1~3)。また、ヒト肺がん及び大腸がんの原発巣と転移巣における ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、ND6 遺伝子の変異を比較し、ミトコンドリア病関連変異やアミノ酸置換が過激なミスセンス変異の頻度が転移巣において有意に高いこと、また興味深いことに、ND6 遺伝子にナンセンス変異が生じている症例も見出している (未発表)。これらのがん細胞では ATP 産生は約 50% に低下しているが、完全には呼吸鎖活性が失われておらず、おそらく複合体 II を介した酸化的リン酸化 (OXPHOS) の経路が動いていると推察している。興味深いことに、病理性 mtDNA 変異を有するがん細胞の *in vitro* 増殖は野生型 mtDNA を有する対照がん細胞よりも遅いが、*in vivo* での増殖は速いという現象を観察している。これらの結果は、病理性 mtDNA 変異を有するがん細胞は、がん微小環境において、何らかの機序によって ATP 産生を補填することで増殖、転移のためのエネルギーを得ている可能性を示唆する。しかし、そのメカニズムの全貌は全く明らかではない。

最近、寄生性がん代謝 (parasitic cancer metabolism) という現象が報告された (4)。この報告によると、がん組織内のがん細胞は自身が産生した ROS を間質細胞に作用させることで酸化ストレスをかけ、間質細胞内で HIF-1 を安定化させ、解糖系やオートファジー/マイトファジーを活性化させる。その結果生成された乳酸、ケトン体などの高エネルギー代謝産物やグルタミンなどをがん細胞が取り込み、ミトコンドリア OXPHOS による ATP 産生を増加させ、増殖や転移のために利用する。また、間質細胞での排出トランスポーター MCT4 の発現亢進とがん細胞での取り

込みトランスポーター MCT1 の発現亢進が関わり、がん細胞と間質細胞間で代謝カップリングが形成されるとされている。しかし、この現象が本当なのかどうかの検証はまだこれからである。

### 2. 研究の目的

活性酸素種 (ROS) を多量に生成する病理性 mtDNA 保有がん細胞が、ROS の関与が示唆されている寄生性がん代謝 (ROS に暴露された間質細胞が産生する高エネルギー代謝産物のがん細胞への供給による ATP 産生) を亢進させることによって、自己及び共存する野生型 mtDNA 保有がん細胞の増殖、転移に影響を与えるかどうかを検証する。このために、

- (1) 病理性 mtDNA 保有及び野生型 mtDNA 保有がん細胞と間質細胞との共培養系を樹立、
- (2) がん細胞中での ATP 濃度を ATeam センサーを用いてリアルタイムに可視化、
- (3) 寄生性がん代謝に関わる分子の発現変化を *in vitro* 及び *in vivo* での検討、
- (4) 寄生性がん代謝の阻害でがんの増殖、転移が抑制できるかどうかの検討、を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞

マウス肺癌由来でミトコンドリア ND6 遺伝子に病理性変異 (13885insC) を有し ROS を高産生する P29mtB82M 細胞と、対照として野生型 mtDNA を有し ROS 低産生である P29mtP29 細胞を用いた。また、間質細胞として線維芽細胞 BALB/c3T3 とがん関連線維芽細胞 WA-moFib を用いた。

#### (2) 腫瘍増殖と転移能の測定

動物実験は島根大学動物実験専門委員会の承認を得た後に行った。P29mtB82M 細胞及び P29mtP29 細胞を C57BL/6 マウスの皮下に移植し、経時的に腫瘍の大きさを計測した。転移能は、実験終了時に肺を摘出し、ブアン固定した後、肺表面の転移巣数を計測した。

#### (2) 共培養系

単層培養した間質細胞上に Cyt-ID Red long-term cell tracer で赤色蛍光標識したがん細胞を播いて共培養を行った。

(4) 共培養系におけるがん細胞での ATP 生成の観察

生細胞内の ATP 濃度をリアルタイムに可視化できる ATeam ベクターをがん細胞に導入し、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) により細胞内 ATP 濃度の変化をリアルタイムで観察した。

#### (5) 遺伝子発現の定量

解糖系酵素、グルコーストランスポーターや乳酸トランスポーター遺伝子の発現は RT-qPCR で行った。

(6) グルコースや遊離脂肪酸の細胞内取込みの測定

グルコース及び遊離脂肪酸の取込みは、それぞれ蛍光性 2-deoxyglucose 誘導體である 2-NDBG 及び蛍光性 TF2-C12 の取込みで測定し

た。

#### (7) 免疫組織化学染色

腫瘍血管は腫瘍組織の凍結切片を CD31 抗体で染色して観察した。ヒト腫瘍組織での MCT4 発現は、パラフィン切片を MCT4 抗体で染色して観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) P29mtB82M 細胞の増殖能と転移能

P29mtB82M 細胞は *in vitro* における増殖速度は遅いが、同系マウス皮下における増殖速度は P29mtP29 細胞とほぼ同程度であり、高い肺転移能を示した。このことから、*in vivo* においては、腫瘍内微小環境中の何らかの影響が P29mtB82M 細胞のエネルギー代謝や増殖、転移に影響を及ぼしていることが推測された。

#### (2) P29mtB82M 細胞での解糖系の亢進

P29mtB82M 細胞は、P29mtP29 細胞と比較して、乳酸を高産生することから解糖系が顕著に亢進していることが推測された。そこで解糖系酵素である HK1、PFK1、PGK1、PKM1 の発現を調べたところいずれも高いことが判った。また、グルコーストランスポーターの一つである Glut3 及び乳酸トランスポーター (エキスポーター) の一つである MCT4 を高発現していることも明らかになった。すなわち、グルコースを多く取込み、乳酸を多く排出する系が発達していることが明らかになった。

さらに、低酸素下でのグルコース (蛍光性 2-NDBG) の取込みを検討したところ、P29mtP29 細胞と比較して、P29mtB82M 細胞で顕著な取込みの亢進が認められた。次に、間質細胞との共培養下での 2-NDBG の取込みを検討した。その結果、P29mtB82M 細胞は単独培養よりも共培養下で 2-NDBG の取込みが亢進されることが明らかになった。遊離脂肪酸の取込みには変化は認められなかった。

#### (3) P29mtB82M 細胞での ATP 産生能

共培養系において P29mtB82M 細胞中での ATP 濃度を ATeam を用いてリアルタイムに可視化する FRET 解析を行なった。しかし、予期に反して、顕著な細胞内 ATP 濃度の変動は観察されなかった。従って、解糖系の亢進している P29mtB82M 細胞中では、共培養系によって取込みが増加したグルコースを効率よく代謝するが、ATP 消費速度も早く、顕著な細胞内 ATP 濃度上昇には至らないのではないかと推察された。

(4) P29mtB82M 細胞は、P29mtP29 細胞と比較して、血管新生因子 VEGF を高産生しており腫瘍血管新生能が高いことが分かった。このことから、P29mtB82M 細胞は腫瘍血管からグルコースを効率よく利用できることが推察された。

(5) P29mtB82M 細胞で高発現している MCT4 をノックダウンすると細胞死が誘導されることが明らかになった。

(6) 興味深いことに、MCT4 が細胞膜上のみ

でなく核内にも存在することが判明した。そこで、mtDNA 病因性変異を有するヒト肺がんや大腸がんにおいて MCT4 の細胞内局在を調べたところ、高率に核内にも存在することが明らかになった (千葉県がんセンター研究所との共同研究)。

(7) これらの結果から、P29mtB82M 細胞におけるグルコースの取込みと解糖系の亢進、乳酸の積極的排出、間質細胞との寄生性がん代謝及び高い腫瘍血管新生能による血中グルコースの効率的利用が増殖・転移におけるエネルギー (ATP) 確保にとって重要であることが示唆された。また、病因性 mtDNA 変異を有するがん細胞が、血管の近傍で OXPHOS を行うがん細胞に対して乳酸の供給源になる共生性代謝が存在する可能性も示唆された。さらに、MCT4 をノックダウンすると細胞死が誘導されることが明らかになったことから、mtDNA 病因性変異による転移の抑制さらには寄生性代謝の抑制が可能である可能性が示唆された。また、本研究で MCT4 の核内局在が明らかになったが、mtDNA 病因性変異による転移の促進においてこれがどのような意味を持つのかの解明が今後の課題である。

#### <引用文献>

- ① Ishikawa K, Takenaga K. *et al.* ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science* 2008; 320: 661-664.
- ② Ishikawa K, Koshikawa N, Takenaga K. *et al.* Reversible regulation of metastasis by ROS-generating mtDNA mutations. *Mitochondrion* 2008; 8: 339-344.
- ③ Koshikawa N, Hayashi J, Nakagawara A, Takenaga K. Reactive oxygen species-generating mitochondrial DNA mutation up-regulates hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  gene transcription via phosphatidylinositol-3-kinase-Akt/protein kinase C/histone deacetylase pathway. *J. Biol. Chem.* 2009; 284: 33185-33194.
- ④ Martinez-Outschoorn UE, Pessel RG, Howell A, *et al.* Energy transfer in "parasitic" cancer metabolism. *Cell Cycle*. 2011; 10: 4208-4216.

#### 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 8 件)

- ① Akimoto M, Hayashi JI, Nakae S, Saito H, Takenaga K. Interleukin-33 enhances programmed oncosis of ST2L-positive low-metastatic cells in the tumour microenvironment of lung cancer. *Cell Death Dis.* 査読有、7:e2057, 2016. doi: 10.1038/cddis.2015.418.
- ② Akimoto M, Iizuka M, Kanematsu R, Yoshida M, Takenaga K. Anticancer Effect

- of Ginger Extract Against Pancreatic Cancer Cells Mainly Through Reactive Oxygen Species-Mediated Autotic Cell Death. *PLoS ONE*. 査読有、10(5):e0126605, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0126605.
- ③ Ochiya T, Takenaga K, Asagiri M, Nakano K, Satoh H, Watanabe T, Imajoh-Ohmi S, Endo H. Efficient inhibition of tumor angiogenesis and growth by a synthetic peptide blocking S100A4-methionine aminopeptidase 2 interaction. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 査読有、2: 15008, 2015. doi:10.1038/mtm.2015.8.
- ④ Shimizu A, Mito T, Hayashi C, Ogasawara E, Koba R, Negishi I, Takenaga K, Nakada K, Hayashi J. Transmitochondrial mice as models for primary prevention of diseases caused by mutation in the tRNA(Lys) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有、111(8): 3104-3109, 2014. doi: 10.1073/pnas.1318109111.
- ⑤ Ochiya T, Takenaga K, Endo H. Silencing of S100A4, a metastasis-associated protein, in endothelial cells inhibits tumor angiogenesis and growth. *Angiogenesis*. 査読有、17(1): 17-26, 2014. doi: 10.1007/s10456-013-9372-7.
- ⑥ Akimoto M, Nagasawa H, Hori H, Uto Y, Honma Y, Takenaga K. An inhibitor of HIF- $\alpha$  subunit expression suppresses hypoxia-induced dedifferentiation of human NSCLC into cancer stem cell-like cells. *World J Med. Genet*. 査読有、3, 41-54, 2013. doi: 10.5496/wjmg.v3.i4.41.
- ⑦ Imanishi H, Takibuchi G, Kobayashi T, Ishikawa K, Nakada K, Mori M, Kikkawa Y, Takenaga K, Toyama-Sorimachi N, Hayashi J. Specific mtDNA mutations in mouse carcinoma cells suppress their tumor formation via activation of the host innate immune system. *PLoS One*. 査読有、8(9): e75981, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0075981.
- ⑧ Takibuchi G, Imanishi H, Morimoto M, Ishikawa K, Nakada K, Toyama-Sorimachi N, Kikkawa Y, Takenaga K, Hayashi J. Polymorphic mutations in mouse mitochondrial DNA regulate a tumor phenotype. *Mitochondrion*. 査読有、13(6):881-887, 2013. doi: 10.1016/j.mito.2013.07.117.
- [学会発表] (計 12 件)
- ① 竹永啓三、秋元美穂. 膵がん細胞に対する生姜抽出物の autosis を介した抗腫瘍効果. 第 74 回日本癌学会総会、2015. 10. 08. 名古屋国際会議場 (名古屋).
- ② 秋元美穂、竹永啓三. 膵がん細胞に対する
- アディポネクチン受容体アゴニストの抗腫瘍効果. 第 74 回日本癌学会総会、2015. 10. 09. 名古屋国際会議場 (名古屋).
- ③ 原嶋奈々江、秋元美穂、竹永啓三、原田守. HIF-2 $\alpha$  はヒト膵がん細胞の TRAIL や T 細胞による細胞障害に対する感受性を survivin を介して制御する. 第 74 回日本癌学会総会、2015. 10. 10. 名古屋国際会議場 (名古屋).
- ④ 秋元美穂、竹永啓三. IL-33 は腫瘍微小環境下において programmed oncosis 耐性高転移性肺癌細胞を選別する. 第 13 回がんとハイポキシア研究会、2015. 06. 05. 国立遺伝学研究所 (三島).
- ⑤ 原嶋奈々江、秋元美穂、竹永啓三、原田守. HIF-2 $\alpha$  の阻害はヒト膵がんの TRAIL 感受性を増強する. 第 12 回がんとハイポキシア研究会、2014. 11. 21~22. ホテルマリタール創世佐賀 (佐賀).
- ⑥ 秋元美穂、竹永啓三. 可溶性 ST2 は炎症性のがん微小環境を修飾し膵がんの増殖を抑制する. 第 12 回がんとハイポキシア研究会、2014. 11. 21~22. ホテルマリタール創世佐賀 (佐賀).
- ⑦ 原嶋奈々江、波里瑤子、門馬浩行、秋元美穂、竹永啓三、原田守. HIF-2 $\alpha$  の阻害はヒト膵がんの TRAIL 感受性を増強する. 第 73 回日本癌学会総会、2014. 09. 25~27. パシフィコ横浜 (横浜).
- ⑧ 竹永啓三、秋元美穂. 間質細胞との共培養によるミトコンドリア DNA 変異を有する膵がん細胞での解糖系と生存の促進. 第 73 回日本癌学会総会、2014. 09. 25~27. パシフィコ横浜 (横浜).
- ⑨ 秋元美穂、原田守、竹永啓三. 可溶性 ST2 は炎症性のがん微小環境を修飾し膵臓がんの腫瘍血管新生と増殖を抑制する. 第 73 回日本癌学会総会、2014. 09. 25~27. パシフィコ横浜 (横浜).
- ⑩ 兼松里衣、秋元美穂、竹永啓三. 膵臓がん細胞に対する生姜抽出物の抗腫瘍効果. 第 61 回日本生薬学会、2014. 09. 13~14. 福岡大学 (福岡).
- ⑪ Akimoto M, Honma Y, Takenaga K. Soluble ST2 inhibits tumor growth and metastasis of colon carcinoma cells by modulating inflammatory microenvironment. 第 72 回日本癌学会総会、2013. 10. 03~05. パシフィコ横浜 (横浜).
- ⑫ 秋元美穂、竹永啓三. 可溶性 IL-33 受容体 sST2 による炎症性修飾を介した大腸がんの転移の抑制. 第 22 回日本がん転移学会、2013. 07. 11~12. ブエナビスタ松本 (松本).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹永 啓三 (TAKENAGA, Keizo)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：80260256