

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650060

研究課題名(和文)代謝の時空間的協調を介した細胞と微小環境の相互作用制御メカニズム

研究課題名(英文)Regulation of interaction between cells and microenvironment by metabolic cooperation

研究代表者

小野寺 康仁(Onodera, Yasuhito)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90435561

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)：これまでの研究から、糖代謝の制御はシグナル経路の制御と深く関与しており、組織構造の形成および維持に多大な影響を与えることが明らかとなった。本研究では、異なる細胞間の代謝協調が細胞-細胞間、細胞-微小環境間の相互作用を調節し、細胞の振る舞いを規定すると仮定して、そのメカニズムを明らかにするための新たな解析系の確立を試みた。第一に、異なる細胞から乳腺組織のような二層構造を得る方法の確立を試みた。第二に、特定の細胞のみに、標識したグルコース(13Cグルコースなど)を取り込ませることのできる新たなシステムを確立した。これらを用いて乳腺組織における筋上皮および管腔上皮間の代謝協調の解析を進めている。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported that regulation of glucose metabolism is tightly connected to that of signaling cascades, which is fundamental for the establishment and maintenance of tissue architecture. In order to examine whether and how metabolic cooperation between different types of cells regulates the cell-cell and cell-microenvironment interaction and orchestrates cell behaviors, we have investigated new techniques to obtain double-layered structure made of different types of cells, which resembles acinar and tubular structures of mammary gland. We have also established a novel method to incorporate stable isotope-labeled glucose (e.g. 13C glucose) into only specific cells, which enables us to examine and manipulate metabolic cooperation between different types of cells in the microenvironment. Using these methods, the metabolic cooperation between luminal epithelial and myoepithelial cells of mammary gland is now investigated.

研究分野：細胞生物学

キーワード：代謝 細胞間相互作用 微小環境 シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、乳腺上皮細胞の3次元培養系を用いて、グルコース代謝は細胞の生存や増殖ばかりではなく、多細胞から構成される組織構造を規定する重要な制御経路であることを明らかにした。たとえば3次元培養環境下の乳癌細胞においてグルコース代謝を抑制すると、細胞内のシグナル活性も広範に抑えられ、正常細胞と同様の管腔構造を形成する。反対に、正常乳腺上皮細胞のグルコース代謝を強制的に亢進させると、乳癌での関与が知られている様々なシグナル経路が広く活性化され、腫瘍塊様の構造を形成する (Onodera et al, J Clin Invest. 2014 124(1):367-84)。

一方、3次元培養環境下では、管腔上皮細胞による腺房構造の形成や維持にはグルコースが不要であることも明らかとなった。乳腺は筋上皮と管腔上皮から構成される2層構造であり、電子顕微鏡等で観察すると、後者の細胞表面の大部分は前者で覆われていることがわかる。すなわち、管腔上皮は元来、細胞外微小環境からのグルコース取込みにおいて不利な場所に配置されている。

したがって、正常細胞による管腔構造の形成および維持において、グルコースが必要とされないことは、非常に理にかなっていると言える。また、乳癌でしばしばみられる筋上皮細胞の消失は、それまで管腔上皮細胞で低く抑えられていたグルコース代謝が急激に活性化する原因となることも考えられ、研究代表者が3次元培養系で明らかにした「グルコース代謝の亢進による形質転換」とも言える現象は、実際にそのようなコンテキストにおいて、表現型の悪性化に寄与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

前項で述べた背景および研究結果を俯瞰すると、『多細胞構造の形成や維持において、代謝はシグナルの一部として機能しており、細胞間の協調を通じて厳密な時空間的制御がなされている』というモデルが想定される。たとえば乳腺においては、筋上皮細胞は管腔上皮細胞における解糖系でのグルコース代謝を制限する役割があるのかもしれない。たとえば、解糖系でピルビン酸とATPを産生するPKM2が、ATPからcAMPを産生する可溶性アデニル酸シクラーゼ (sAC) と相互作用しながらATP産生を行い、cAMPシグナルを惹起することは、悪性形質の誘導に必須であることがわかっているが、筋上皮細胞でグルコースがピルビン酸まで代謝されて管腔上皮に渡されたのち、さらに下流の代謝 (ミトコンドリアのクエン酸回路など) が行なわれるとすれば、管腔上皮細胞内では、悪性形質を誘導し得る代謝を行う必要がなく、より「安全」であると言える。筋上皮細胞のみならず、周囲に存在する脂肪細胞などが、

さらに上流の制御に関与している可能性も想定される。本研究では、このような仮説に基づく新しい知見の導出を最終的な目標として、その検証を進めるために必要となる新規解析技術の確立を行った。より具体的には、乳腺をモデルとして、組織構造中に存在する管腔上皮細胞および筋上皮細胞において、それぞれ特異的に代謝経路を操作して組織構造の形成および維持への影響を観察できるような実験系のデザインおよび確立を行った。

## 3. 研究の方法

(1) 3次元培養環境下における乳腺管腔上皮および筋上皮の2層構造形成

乳腺組織を構成する管腔上皮細胞および筋上皮細胞の性質を保持した細胞株 (HMT-3522-S1、NMuMGおよびHs578Bst細胞)、条件検討に用いたがん細胞HMT-3522-T4-2および293T細胞は、それぞれ推奨される培養条件にて2次元培養を行った。

3次元培養環境中での組織構造再構築は、以下のように行った。まず始めに、管腔上皮細胞をコラーゲンでコートされたデキストランビーズ (Cytodex 3、GEヘルスケア・ジャパン) の表面に接着させ、「球体」を形成したのち、筋上皮でさらに外側を覆う方法である。これは、管腔上皮単独ではコラーゲンゲル中では逆方向の上皮極性を獲得する (すなわち外側が基底面となる) ことが報告されているため (Gudjonsson et al, J Mammary Gland Biol Neoplasia. 2005 10(3):261-72)、ビーズへの接着面が本来の管腔構造と同様の内腔側の性質を持つと期待して行ったものである。細胞およびビーズの接着を防ぐため、細胞およびビーズの懸濁液をシリコナイズチューブ (ザルスタット) 中で10~15分毎に2時間、攪拌し、そのうち低接着ディッシュ (EZ-BindShut, IWAKI) 中に移してビーズ上での培養を行った。十分な数の上皮細胞がビーズ表面を覆ったことを確認したのち、遠心分離にてビーズを回収して基底膜由来のECM溶液 (Matrigel, BD) を5%含む培地に懸濁し、シリコナイズチューブ中で10~15分毎に1時間攪拌した。ここに2層目の細胞の懸濁液を加えてさらに1時間攪拌し、ビーズの外側へ細胞を接着させた。

(2) 3次元培養環境下の任意の細胞に標識グルコースを取り込ませる技術の確立

細胞間の代謝産物のやり取りを解析するために、目的の細胞集団のみに標識グルコースを取り込ませることのできる方法の確立を試みた。安定同位体等で標識したグルコースは非標識のものと殆ど全く同等に振る舞うため標識そのものを利用した特異性は期待できない。そこで自然界に幾つか存在するグ

ルコース前駆体のうち哺乳類で殆どあるいは全く代謝されないものを幾つか選び、それぞれに特異的なトランスポーターおよび酵素を発現させて細胞内にグルコースを産生し、解糖系によって代謝されるか検討を行った。それぞれの前駆体に対応する複数のトランスポーターおよび酵素をコードするcDNAを人工遺伝子合成(ユーロフィンジェノミクス、フナコシ等)にて作成し、哺乳類細胞用の遺伝子発現ベクター(pcDNA3、pcDNA3.1 His C など)にクローニングした。これを293T細胞にトランスフェクションして24時間後にタンパク質を可溶化し、ウエスタンブロットで発現を確認した。同時にトランスフェクションした細胞の免疫染色も行い、細胞内局在を確認した。

また、上記のようにトランスポーターおよび酵素のトランスフェクションを行い、24時間後にグルコース不含の、それぞれの前駆体を特定の濃度で含む培地に交換した。さらに24時間後および48時間後に培地の一部を回収して凍結保存した。乳酸測定キット(Cayman Chemical)を用いて、それぞれの培地に含まれる乳酸濃度を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 3次元培養環境下における乳腺管腔上皮および筋上皮の2層構造形成  
様々な方法を試みた結果、上述の方法にて、細胞の2層構造を持つ球状構造が形成できることを確認した。現在、この構造を基点として、乳腺組織培養と同様の分岐管腔構造等を形成させるための適切な条件(液性因子の種類や濃度など)の決定を試みている。なお、上記の球体そのもので、免疫染色による上皮極性の確認を試みたが、ビーズが光を遮るために明確な結果は得られなかった。分岐構造が形成されれば、ビーズから十分離れた部位において確認できるものと思われる。

(2) 3次元培養環境下の任意の細胞に標識グルコースを取り込ませる技術の確立  
幾つかの前駆体および対応するトランスポーター、酵素をコードするプラスミドを細胞に導入し、タンパク質発現をウエスタンブロットにて確認することができた。各タンパク質にはN末またはC末にXpressやV5、HAタグ等を融合しており、これらに対する抗体を用いて検出を行った。酵素はほぼ予想通りの大きさのバンドがみられたが、トランスポーターについては、哺乳類細胞のグルコーストランスポーター(GLUT)のバンドパターンと同様に、糖鎖修飾またはユビキチン化と思われるスマアがみられた。また、免疫染色の結果、酵素は細胞質に均一に分布し、トランスポーターについては細胞膜表面に多く局在することが確認できた。ただし一部の画分は細胞質内に顆粒状に存在していた。

上記のプラスミドを用いて機能解析を

行ったところ、これまでに2種類の前駆体で、グルコース不含培地において細胞の生存・増殖および乳酸の産生を持続させる効果を確認することができた。この結果は、それぞれの前駆体が想定していた通りに細胞内に取り込まれ、解糖系での代謝を経て乳酸へと変換されていることを示唆している。また、それぞれの前駆体が、相対するトランスポーターおよび酵素によってグルコースに変換されないことも確認した。従って、これらの前駆体の一方のみを<sup>13</sup>Cで標識したものとのおき、グルコース不含培地に加えると、その前駆体を代謝することのできる細胞のみが<sup>13</sup>C標識グルコースを細胞内に産生し、代謝することが可能となる。

現在、それぞれの前駆体について、生理的濃度のグルコースが存在する場合と同等の細胞内グルコース濃度となる条件の決定を行うために、トランスポーターおよび酵素を安定に発現する細胞を作成している。具体的には、トランスポゾン型ベクター等、安定発現株の得やすいプラスミドベクターによって上記のトランスポーター、酵素を発現させ、加えて細胞内グルコース濃度に感受性のFRETプローブ等を用いて、通常のグルコース含有培地と同等になるよう、条件を設定する。

このシステムが完成したのち、上述の乳腺管腔上皮細胞および筋上皮細胞にそれぞれトランスポーター、酵素を発現させて、それぞれの細胞に特異的な代謝がみられるか、または上記の仮説のような、筋上皮から管腔上皮への代謝産物の供与があるかについて、検討を進めていく予定である。

#### 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 5 件)

- 1) Hashimoto A, Oikawa T, Hashimoto S, Sugino H, Yoshikawa A, Otsuka Y, Handa H, Onodera Y, Nam JM, Oneyama C, Okada M, Fukuda M, Sabe H.: P53- and mevalonate pathway-driven malignancies require Arf6 for metastasis and drug resistance. *J. Cell Biol.* 213: 81-95, 2016. (査読有) doi: 10.1083/jcb.201510002
- 2) Hashimoto S, Mikami S, Sugino H, Yoshikawa A, Hashimoto A, Onodera Y, Furukawa S, Handa H, Oikawa T, Okada Y, Oya M, Sabe H.: Lysophosphatidic acid activates Arf6 to promote the mesenchymal malignancy of renal cancer. *Nat. Commun.* 7: 10656, 2016. (査読有) doi: 10.1038/ncomms10656
- 3) Kinoshita R, Nam JM, Ito YM, Hatanaka KC, Hashimoto A, Handa H, Otsuka Y, Hashimoto S, Onodera Y, Hosoda M,

Onodera S, Shimizu S, Tanaka S, Shirato H, Tanino M, Sabe H.: Co-Overexpression of GEP100 and AMAP1 Proteins Correlates with Rapid Local Recurrence after Breast Conservative Therapy. *PLoS One* 8: e76791, 2013. (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0076791

- 4) Nam JM, Ahmed KM, Costes S, Zhang H, Onodera Y, Olshen AB, Hatanaka KC, Kinoshita R, Ishikawa M, Sabe H, Shirato H, Park CC.: Beta1-integrin via NF-kappaB signaling is essential for acquisition of invasiveness in a model of radiation treated in situ breast cancer. *Breast Cancer Res.* 15: R60, 2013 (査読有) doi: 10.1186/bcr3454
- 5) Onodera Y, Nam JM, Sabe H.: Intracellular trafficking of integrins in cancer cells. *Pharmacol Ther.* 140: 1-9, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.05.007

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) 小野寺康仁, ミトコンドリア分布の調節による酸化ストレスの制御, 第 32 回臨床床フリーラジカル会議, 2016 年 1 月 30 日, 里山の休日 京都・烟河(京都府・亀岡市)
- 2) 小野寺康仁, 糖代謝と小胞輸送の相互作用を介したがん形質の誘導, 第 3 回がん代謝研究会・金沢大学がん進展制御研究所 共同利用・共同研究拠点シンポジウム, 2015 年 7 月 17 日, 石川県立音楽堂交流ホール(石川県・金沢市)
- 3) 小野寺康仁, Arf6-AMAP1 経路によるミトコンドリア分布調節を介した ROS 制御, 第 7 回シグナルネットワーク研究会, 2015 年 6 月 19 日~21 日, 沖縄科学技術大学院大学(OIST)(沖縄県・那覇市)
- 4) 小野寺康仁, Arf6-AMAP1 経路による活性酸素制御メカニズム, 第 9 回北海道大学医学研究科連携研究センター研究成果発表会, 2014 年 11 月 5 日, 北海道大学(北海道・札幌市)
- 5) 小野寺康仁, Robust redox homeostasis mediated by Arf6-AMAP1 pathway confers resistance to ionizing radiation in breast cancer, 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 25 日~27 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)
- 6) 小野寺康仁, 乳癌の ROS 制御における Arf6-AMAP1 経路の役割, 第 6 回シグナルネットワーク研究会, 2014 年 5 月 9 日~10 日, 慶應義塾大学(東京都・新宿区)
- 7) 小野寺康仁, Roles and mechanisms of "glycolytic signaling" in breast cancer, 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 11 日~13 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

なし

○取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~g21001/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野寺 康仁 (ONODERA, Yasuhito)

北海道大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 9 0 4 3 5 5 6 1

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし