

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430056

研究課題名(和文)脂質代謝からみた悪性グリオーマの特性と幹細胞性維持機構

研究課題名(英文)Biological characteristics and maintenance of stemness in malignant glioma based on lipid metabolism

研究代表者

鈴木 諭 (Suzuki, Satoshi)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90294917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの悪性腫瘍の中で最も治療が困難なもののひとつに悪性グリオーマと呼ばれる脳腫瘍がある。本研究では悪性グリオーマの特性を知り、新たな治療法の開発の手がかりとするために、腫瘍細胞の代謝動態を調べた。その結果、本腫瘍では脂質の合成も利用も共に活発に行われ、悪性の性質に寄与していると考えられた。また、代謝を調節する薬剤であるメトホルミンの投与により、腫瘍細胞の代謝動態と共に、遺伝子の化学修飾による発現調節(エピジェネティクス)が大きく変動した。これらの結果より、悪性グリオーマ細胞内における代謝とエピジェネティクスとの相方向性の影響が本腫瘍の生物学的特性の基礎にあることが示された。

研究成果の概要(英文)：Malignant gliomas are brain tumors resistant to multimodal therapy, representing the most malignant class of tumor in human. In the present study, we investigated metabolic state of malignant glioma cells to understand biological nature of the tumor and gain a clue to novel therapeutic approach. We found that both synthesis and utilization of lipids are increased in the tumor cells to contribute to the malignant nature. When we applied metoformin, a drug regulating metabolism, to the glioma cells, drastic changes were observed not only in metabolic state but also in the chemical modification of gene expression (epigenetics). These results indicate that the biological characteristics of malignant gliomas are dependent of crosstalk between metabolism and epigenetics.

研究分野：神経病理学

キーワード：グリオーマ 腫瘍幹細胞 代謝 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) グリオーマ幹細胞とその治療標的としての意義

グリオブラストーマに代表される悪性グリオーマは脳実質内に浸潤性に増殖するため外科的全摘出が困難であり、放射線化学療法を加えても多くの場合再発を免れないため、最も難治性の腫瘍のひとつである。最近、さまざまな血液腫瘍や固形腫瘍で腫瘍幹細胞の存在が確認され、グリオーマ組織やグリオーマ細胞株からも腫瘍幹細胞が分離されている。腫瘍幹細胞は発生段階における正常幹細胞を模倣し、非対称性分裂によって自己複製を行うとともに、より分化した腫瘍細胞を産生し続ける能力を有し、放射線化学療法に抵抗性を示すため、腫瘍の発生、転移、再発のいずれの局面においても腫瘍細胞の主たる供給源として働くと考えられる。したがって悪性グリオーマの治療開発のためには、グリオーマ幹細胞の生物学的特性を理解し、治療のための分子標的を探索する必要がある。

(2) 腫瘍細胞の代謝動態の特性と幹細胞性 (stemness) について

本研究では、正常細胞や分化したグリオーマ細胞とグリオーマ幹細胞とを区別する特性として、代謝動態の違いに着目する。

一般に腫瘍細胞では、代謝状態が正常細胞と異なることが知られている。中でも糖代謝に関して、Warburg 効果は腫瘍細胞における代謝の特徴として古くから重視されてきた。Warburg 効果とは、腫瘍細胞では有酸素下においても、元来嫌気的条件下で作動する解糖系によるグルコースの代謝と効率の悪い ATP の産生に偏っており、TCA 回路における酸化リン酸化へのグルコースの供給が少ないという現象である。Warburg 効果はエネルギー産生の観点からは一見不利であり、その意義については長い間定説がなかった。し

かしながら近年、Warburg 効果がペントースリン酸経路における核酸や NADPH の合成や、PI3K/Akt/mTOR 経路、c-Myc、p53 経路といった癌遺伝子、癌抑制遺伝子の経路と連動していることが理解されるようになった。このように Warburg 効果は、腫瘍細胞特有の細胞外環境や旺盛な増殖のための分子の生合成の需要に適応するための、さまざまな遺伝子発現や他の代謝経路の変化を伴った現象であることが明らかになりつつある。

最近、グルコースの欠乏した条件ではグリオーマ幹細胞の生存率が亢進するとともに、より分化したグリオーマ細胞からグリオーマ幹細胞が誘導されることが示された。また、このようにして数を増やしたグリオーマ幹細胞では、グルコーストランスポーターの発現が高く、グルコースの取り込みが亢進していた。さらに、グリオーマ幹細胞ではエネルギー産生の経路として酸化リン酸化と解糖系を状況によって柔軟に使い分けられることができると言う報告もある。これらのことから、腫瘍細胞における幹細胞性 (stemness) には、ストレス環境における代謝を通じた適応といった側面があり、グリオーマ幹細胞は生存により有利な代謝特性をもっていることが示唆される。

(3) グリオーマ細胞における脂質代謝について

近年、さまざまな癌細胞で脂肪酸合成酵素 (FASN) が発現し、脂肪酸合成が亢進していることが報告されている。脂肪酸は細胞膜のリン脂質の材料、 β 酸化によるエネルギーの供給源、脂質性シグナル伝達に関わる分子の合成材料として、腫瘍細胞の生存や増殖に密接に関与している。細胞内の脂質の恒常性は、内在性の脂肪酸合成、CD36 や endocytosis を介した細胞外からの脂質の取り込み、および脂肪酸分解の三者のバランスにより成り立っている。グリオーマ細胞における脂質代謝

動態は上述の糖代謝に比べると未知な点が多いが、最近、グリオーマの悪性度が増すにつれ FASN の発現が高くなること、EGF 受容体に遺伝子変異を持つグリオブラストーマでは脂質合成の阻害が治療効果を示すことが示された。しかしながら、グリオーマ幹細胞における脂質代謝の特性についてはいまだほとんど調べられていなかった。また、申請者はグリオーマ細胞が種々のストレス条件下で幹細胞様の形質を示すこと、ヒトグリオーマ細胞や組織において fatty acid synthase (FASN) や acetyl-CoA carboxylase (ACC) といった脂質合成に関与する酵素が発現していることを見出ししてきた。

2. 研究の目的

(1) グリオーマ細胞における脂質代謝関連蛋白の発現パターン、リン酸化パターンの解析を通してグリオーマ細胞における脂質代謝の特性を明らかにする。

(2) グリオーマ細胞にメトホルミンを作用させることによる脂質代謝動態の変化を細胞レベル、蛋白レベル、遺伝子発現レベルで解析する。このことにより、グリオーマ細胞における脂質代謝動態が細胞の生存、増殖、幹細胞性に及ぼす影響を検証し、代謝関連因子を標的とした治療開発の端緒とする。

3. 研究の方法

(1) 代謝動態の評価のための *in vitro* 実験系の確立

細胞培養に用いる液体培地中の血清濃度やグルコース濃度はグリオーマ細胞の糖代謝や脂質代謝動態に大きな影響を及ぼすと考えられる。通常の培養条件では細胞の安定的な増殖のためにこうした因子が過剰に供給されているため、代謝経路への実験的介入の条件設定や再現性の確保を困難にしている。そこで、ヒトグリオーマ細胞株 U373

と U87 をさまざまな血清濃度、グルコース濃度の環境で培養し、可能な限り低血清濃度、低グルコース濃度下に安定的な増殖を得られる条件を決定するべく検討した。

(2) (1) で確立した低血清・低グルコース濃度培養条件下の U373 および U87 において、脂質代謝関連蛋白 (CPT1C、FASN、ACC1、AMPK) の発現パターンおよびリン酸化のパターンを、免疫染色ならびにウェスタンブロッティング法で検討した。また、この系において 1mM メトホルミン投与の代謝動態への経時的な影響を、これら蛋白の発現パターンやリン酸化パターンの変化を指標に検討した。

(3) (1) で確立した U373 の低血清・低グルコース濃度培養条件下において 1mM メトホルミン 3 日間投与した後、マイクロアレイ解析を用いて遺伝子発現の変化を網羅的に検討した。

4. 研究成果

(1) 代謝動態の評価のための *in vitro* 実験系の確立

U373 と U87 を低血清濃度、低グルコース濃度の環境で培養して馴化した結果、2% 血清、17.5mM グルコースの条件で継代可能で安定的な増殖を得られることが判明した。これにより、血清やグルコースが代謝の基底状態に及ぼす影響がより低減された実験系が得られた。

(2) 脂質代謝関連蛋白の発現パターンおよびリン酸化のパターン

上記の *in vitro* 系において CPT1C、FASN、ACC1、AMPK に対する免疫染色を行ったところ、CPT1C は核に発現し、FASN が細胞質に発現していた。この結果よりグリオーマ細胞では脂肪酸の合成と分解・利用の両方が亢進していることが示唆された。また、ACC1 は

グリオーマ細胞の胞体に分布したが、リン酸化ACC1はCPT1Cと同じく核に移行していた。AMPKは非リン酸化、リン酸化状態ともに細胞質に局在した。

(3) 代謝経路への実験的介入

① 1mM メトホルミンの添加により、低血清・低グルコース培養において、U373の増殖が通常培養よりも顕著に抑制された。

② メトホルミン添加低血清・低グルコース培養において、細胞質内のACC1が減少し、リン酸化ACC1が核内への移行が促進された。ウェスタンブロッティングによってもメトホルミン添加によりACC1、AMPKのリン酸化がともに亢進することを示唆する結果が得られ、免疫染色で観察された所見に合致した。このことはメトホルミンがAMPKの活性化を介してACC1をリン酸化し、脂肪酸合成を抑制するとの仮説 (Fullerton, 2013) に合致した。

③ 両グリオーマ株ともに低グルコース濃度の幹細胞培養条件において良好なsphere形成が得られた。

(4) 代謝動態と遺伝子発現プロファイルとの関係

上記のU373低血清・低グルコース濃度培養条件下においてメトホルミン1mMを3日間作用させた後、マイクロアレイ解析を用いて遺伝子発現の変化を網羅的に検討した結果、753の遺伝子で発現亢進が、382の遺伝子で発現低下が有意に認められた。メトホルミン投与により、予想された代謝関連遺伝子、増殖関連遺伝子などの発現変化に加えて、58の癌抑制遺伝子で有意な発現亢進がみられ、その大半がDNAメチル化やヒストンの化学修飾といったエピジェネティックな発現制御を受けることが知られている遺伝子であった。中でもsox11は顕著な発現亢進を示した。Sox11

はグリオーマ幹細胞をニューロンへ分化させる方向に働き、癌抑制遺伝子として働くとの報告がある (Hide, 2009)。このことから、悪性グリオーマ細胞内における代謝とエピジェネティクスとの相方向性の影響が本腫瘍の生物学的特性や幹細胞性維持機構の基礎にあることが示された。

<引用文献>

- ① Fullerton, et al. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. Nat Med. 2013;19(12):1649-54
- ② Hide, et al. Sox11 prevents tumorigenesis of glioma-initiating cells by inducing neuronal differentiation. Cancer Res 2009;69(20):7953-9

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 4件)

- ① Yoshimoto K, Hatae R, Sangatsuda Y, Suzuki SO, et al. Prevalence and clinicopathological features of H3.3 G34-mutant high-grade gliomas: a retrospective study of 411 consecutive glioma cases in a single institution. Brain Tumor Pathol. 査読あり, in press.
- ② Hatae R, Hata N, Suzuki SO, et al. A comprehensive analysis identifies BRAF hotspot mutations associated with gliomas with peculiar epithelial morphology. Neuropathol. 査読あり, 2017;37(3):191-199.
- ③ Hatae R, Hata N, Yoshimoto K, Kuga D, Akagi Y, Murata H, Suzuki SO, et al.

Precise Detection of IDH1/2 and BRAF Hotspot Mutations in Clinical Glioma Tissues by a Differential Calculus Analysis of High-Resolution Melting Data. PLoS One. 査読あり, 2016;11(8):e0160489.

④ Hata N, Suzuki SO, et al. Genetic analysis of a case of glioblastoma with oligodendroglial component arising during the progression of diffuse astrocytoma. Pathol Oncol Res. 査読あり, 2015;21(3):839-43.

[学会発表] (計 3件)

①北川玲華, 鈴木諭, 岩城徹. グリオーマ細胞の糖・脂質代謝研究に有用な細胞培養条件の確立. 第34回日本脳腫瘍病理学会学術集会, 東京都, 2016年5月

②若宮富浩, 鈴木諭, 本田裕之, 溝口昌弘, 吉本幸司, 飯原弘二, 中原由起子, 河島雅到, 阿部竜也, 岩城徹. MedulloblastomaにおけるCPT1CとFASNの発現亢進. 第33回日本脳腫瘍病理学会学術集会, 高松市, 2015年5月

③ 若宮富浩, 鈴木諭, 濱崎英臣, 本田裕之, 溝口昌弘, 吉本幸司, 岩城徹. Gliomaにおける脂肪酸代謝動態-CPT1cとFASNの細胞内局在に関する免疫組織化学的検討. 第32回日本脳腫瘍病理学会学術集会, 徳島市, 2014年5月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 諭 (SUZUKI, Satoshi)
九州大学大学院・医学研究院・准教授
研究者番号: 90294917

(3) 連携研究者

岩城 徹 (IWAKI, Toru)
九州大学大学院・医学研究院・教授

研究者番号: 40221098

(4) 研究協力者

北川 玲香 (KITAGAWA, Reika)
九州大学大学院・医学系学府・修士課程