

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461029

研究課題名(和文) 膵癌におけるWarburg効果誘導因子の同定と治療応用

研究課題名(英文) Identification of Warburg effect inducer in pancreatic cancer

研究代表者

濱田 晋 (Hamada, Shin)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：20451560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではWarburg効果が膵癌進展に及ぼす影響を解析し、癌細胞における代謝機構を標的とした新規治療法開発のための基礎検討を行うことを目的とした。膵癌細胞の代謝機構を変化させるマイクロRNA、miR-197をテトラサイクリン誘導性に発現する細胞株を樹立し、miR-197発現誘導により酸素消費量が低下することを確認した。miR-197発現誘導によって酸化リン酸化・電子伝達系のコンポーネントを構成する多数の分子の発現が抑制されていることが判明した。また、膵癌細胞の上皮間葉形質転換を誘導する膵星細胞培養上清による刺激は、膵癌細胞の代謝プロファイルを大きく変化させることも明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This research project aimed to clarify the role of Warburg effect on malignant behavior of pancreatic cancer cells. For this purpose, we established tetracycline-inducible miR-197 expressing cell line. Induction of miR-197 suppressed oxygen consumption in this cell line. Furthermore, multiple components of oxidative phosphorylation and electron transport system were down-regulated. In addition, stimulation by pancreatic stellate cell-conditioned medium, was also found to affect cellular metabolism of pancreatic cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：膵癌 細胞内代謝

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌を含む多くの悪性腫瘍においては好気的環境下においてもミトコンドリアにおける酸化リン酸化が抑制され、解糖系からの ATP 産生が優位となる Warburg 効果が古くから知られている。解糖系によるエネルギー産生は非効率的であるが反応速度が速く、癌細胞が必要時に ATP を産生するのに有利である。一方、宿主側では癌によるエネルギーの浪費を反映した栄養状態の悪化が免疫能の低下等につながる。解糖系に参与する酵素の発現変化は癌細胞の機能にも影響を与えることが報告されており、一例として膵臓癌での高発現がみられるピルビン酸キナーゼ M2 アイソフォームは代謝酵素としての機能のみならず核内で転写因子としても機能し、癌細胞の増殖促進に寄与することが判明している (Yang W et al. Nature. 2011)。抗癌剤や放射線療法に抵抗性を示し、様々な分化度の癌細胞を再生産することで術後再発や遠隔転移形成の元となる癌幹細胞分画においても、解糖系活性が増加していることが報告されている (Mao P et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013)。このような知見から癌細胞特異的な解糖系への依存メカニズムは有用な治療標的になりうると思われる。しかしながら、これまで癌細胞における Warburg 効果の誘導には解糖系酵素の発現増加が寄与することが知られていたものの、その上流の制御因子については完全に明らかにはなっていない。

我々はこれまで、浸潤性膵癌と膵管内乳頭粘液腫瘍の microRNA 発現プロファイルと比較することにより膵癌細胞の浸潤性増殖にかかわる複数の microRNA を同定してきた。なかでも miR-197 は浸潤性膵管癌において発現が増加しており、E-cadherin 結合蛋白である p120 catenin の発現低下を介して膵癌細胞に epithelial-mesenchymal transition (EMT) を誘導する microRNA である (Hamada S et al. J Cell Physiol. 2013)。ヒト膵癌細胞株 Panc-1 および AsPC-1 に miR-197 前駆体と control miR 前駆体を導入し、遺伝子発現プロファイルをマイクロアレイにより網羅的に解析したところ、多数のミトコンドリア関連遺伝子の発現が抑制されていることが判明した。また、miR-197 導入細胞においては培養上清中の乳酸濃度が増加しており、好気的培養条件にもかかわらず解糖系の活性が増加しているものと考えられた。これらの結果から、miR-197 は膵癌細胞株の代謝経路を解糖系優位に調節している可能性が示された。

膵癌は癌細胞周囲に desmoplasia と呼ばれる厚い線維性結合織を有し、腫瘍組織内の血流は乏しい。このような組織構築は膵癌細胞への酸素供給を低下させ、低酸素状態への適応を促進させる。低酸素条件下では膵癌細胞内で転写因子 hypoxia-inducible factor 1 の安定化が起こり、適応に必要な遺伝子の

発現が誘導される。低酸素は VEGF や IL-6 などの成長因子やサイトカイン、典型的な膵癌関連 microRNA である miR-21 の発現を誘導し、膵癌細胞の悪性度を増加させることが報告されている (Bao B et al. PLoS One. 2012)。最近の検討では低酸素状態は膵癌細胞において酸化リン酸化から解糖系によるエネルギー産生への切り替えを促進するとともに蛋白質の糖鎖修飾を変化させることで細胞生存へ寄与することが判明している (Guillaumond F et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013)。このことは膵癌の微小環境が癌細胞特異的な代謝を促進することを示唆している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は膵癌細胞の悪性化因子である好気的条件下での解糖系活性の亢進、いわゆる Warburg 効果が膵癌進展に及ぼす影響を解析し、膵癌早期診断マーカーの同定並びに癌細胞における代謝機構を標的とした新規治療法開発のための基礎検討を行うことである。

## 3. 研究の方法

### (1) テトラサイクリン誘導性 miR-197 発現細胞株の樹立

テトラサイクリン誘導性に miR-197 を発現する細胞株を作成するため、ヒト膵癌細胞株 MIAPaca-2 にテトラサイクリン制御因子発現ベクターを遺伝子導入し、安定発現細胞株を樹立した。この細胞株に更にテトラサイクリン依存性 ZsGreen/miR-197 発現ベクターを遺伝子導入し、テトラサイクリン処理により ZsGreen による緑色蛍光が増強するクローンを選別した。得られた細胞株での miR-197 発現はリアルタイム PCR 法にて確認した。

### (2) miR-197 発現誘導細胞の機能解析

(1)の実験で樹立した細胞株について、テトラサイクリン処理の有無での代謝機能の変化を細胞外フラックスアナライザーにて、発現変動遺伝子をマイクロアレイにて解析した。

### (3) 膵星細胞培養上清による膵癌細胞機能への影響の解析

既報にて膵癌細胞に上皮間葉形質転換を誘導することが知られている膵星細胞培養上清 (以下 PSC-CM) について、膵癌細胞内の代謝機構へ与える影響を評価するために質量分析による網羅的なメタボローム解析を実施した。

### (4) 膵癌細胞内代謝機構に影響を与えるシグナル伝達経路の解析

PSC-CM によって活性化する膵癌細胞内のシグナル伝達経路について、ウエスタンブロットにて確認を行った。有意な活性化を呈し

たシグナル伝達経路について、阻害剤処理やリガンドに対する中和抗体処理を行い、PSC-CM による細胞機能の変化が阻害できるか検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1)テトラサイクリン誘導性 miR-197 発現細胞株の樹立

テトラサイクリン制御因子を安定発現するクローンの作成のため、遺伝子導入・抗生剤セレクションを実施した。クローン分取後にテトラサイクリン依存性にルシフェラーゼを発現するベクターを一過性に遺伝子導入し、テトラサイクリン処理にて蛍光強度の増加が良好なものを選別した。

この細胞株に更にテトラサイクリン依存性 ZsGreen/miR-197 発現ベクターを遺伝子導入し、テトラサイクリン処理にて ZsGreen 発現増加による緑色蛍光増加がみられるものを選択した(以下 M197)。樹立細胞株のテトラサイクリン処理の有無による蛍光変化を図 1 に示す。

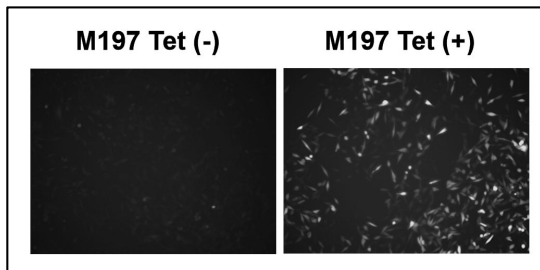


図 1

同細胞株における miR-197 発現の増加は Taqman assay によるリアルタイム PCR 法にて評価し、図 2 に示す如く miR-197 の増加を確認した。

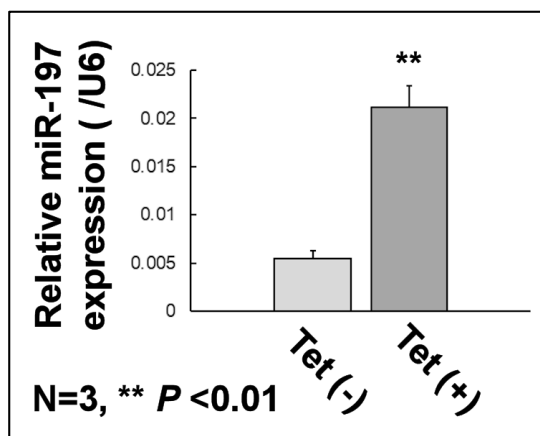


図 2

##### (2)miR-197 発現誘導細胞の機能解析

M197 細胞株にテトラサイクリン処理を行い、代謝状態の変化をフラックスアナライザーにて解析した。機器は XF24 extracellular flux analyzer を使用し、oxygen consumption ratio (OCR)・extracellular acidification rate (ECAR)の両者を反復して計測した。その結果、テトラサイクリン処理によって miR-197 発現を誘導した M197 細胞株では OCR

が著明に抑制されており、ミトコンドリアにおけるエネルギー産生が低下している可能性が示唆された(図 3)。

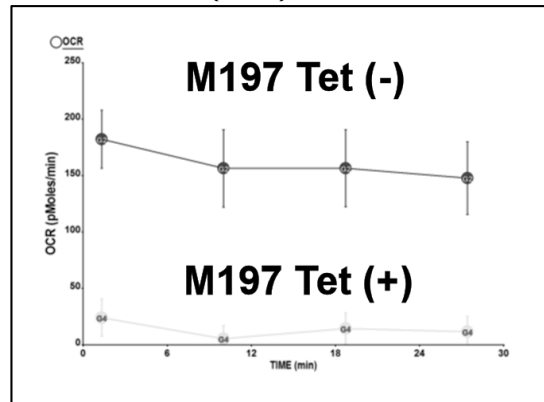


図 3

このような細胞機能の変化の原因となる miR-197 標的遺伝子を同定するため、テトラサイクリン処理後の M197 細胞株において有意な発現変動を認める遺伝子をマイクロアレイにて解析した。有意な発現変動を認めた遺伝子群を DAVID Bioinformatics Resosurdes 6.7 にて解析した結果の一部を図 4 に示す。

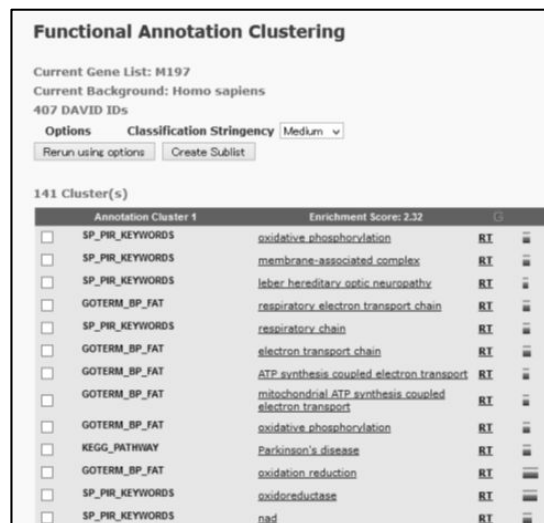


図 4

解析の結果 141 の遺伝子クラスターに発現変化が認められ、上位には酸化リン酸化や電子伝達系に関わる遺伝子群が多数含まれていた。以上の結果から、miR-197 が多くの遺伝子発現を網羅的に抑制することでミトコンドリアによるエネルギー産生を低下させている可能性が考えられた。

##### (3)膵星細胞培養上清による膵癌細胞機能への影響の解析

膵星細胞培養上清 (PSC-CM) 処理によって影響を受ける膵癌細胞内代謝を網羅的に解析するため、質量分析によるメタボローム解析を実施した。通常培養または PSC-CM 処理を行った膵癌細胞株 Panc-1 および SUIIT-2 について、5%マンニトール溶液による洗浄後メタノール抽出を行った。PSC-CM 処理によって Panc-1 および SUIIT-2 の両細胞株で解糖系中

間代謝産物・TCA サイクルの中間代謝産物の増加が確認され、PSC-CM 処理は膵癌細胞におけるエネルギー産生を増加させることが示唆された。これらの変化に加えて細胞内アミノ酸プロファイルにも変化が認められ、PSC-CM による作用は膵癌細胞に多彩な影響を与えることが明らかとなった。

#### (4)膵癌細胞内代謝機構に影響を与えるシグナル伝達経路の解析

PSC-CM によって膵癌細胞内で活性化するシグナル伝達経路につき、ウエスタンブロットによる確認を行った。PSC-CM 処理によって Panc-1 および SUIT-2 細胞で p38 MAPK、ERK、JNK、Akt 経路の活性化が確認でき、既報と一致する結果であった。上記のシグナル伝達経路に加えて STAT3 経路の活性化も認められ、PSC-CM 中の IL-6 濃度を ELISA にて確認したところ 10 ng/ml 前後の濃度であった。マイクロアレイを用いて、PSC-CM 処理によって複数の STAT3 標的遺伝子の誘導がみられることを確認した。

IL-6 中和抗体の PSC-CM への添加や、STAT3 阻害剤投与は PSC-CM による膵癌細胞の上皮間葉形質転換誘導を抑制することが明らかとなり、IL-6/STAT3 を介するシグナルは PSC-CM による膵癌細胞の機能変化に大きな役割を有すると予想された。同経路が PSC-CM による膵癌細胞内代謝のリプログラミングに与える影響について、更なる解析が必要であると考えられる。

#### 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 2 件)

1. Takikawa T, Masamune A, Yoshida N, Hamada S, Kogure T, Shimosegawa T. Exosomes derived from pancreatic stellate cells: microRNA signature and effects on pancreatic cancer cells. *Pancreas*. 2017;46:19-27. doi: 10.1097/MPA.0000000000000722  
査読有

2. Hamada S, Masamune A, Yoshida N, Takikawa T, Shimosegawa T. IL-6/STAT3 plays a regulatory role in the interaction between pancreatic stellate cells and cancer cells. *Dig Dis Sci*. 2016;61:1561-1571. doi: 10.1007/s10620-015-4001-5  
査読有

[学会発表](計 3 件)

1. Hamada S, Masamune A, Shimosegawa T. Multimodal regulation of cellular metabolism in pancreatic cancer cells. The 3rd JSGE International Topic

Conference 2015年4月24日 仙台 仙台国際センター

2. 濱田晋 正宗淳 下瀬川徹  
miR-197 は膵癌細胞においてミトコンドリア機能を抑制する  
第46回日本膵臓学会大会 2015年6月19-20日 名古屋 名古屋国際会議場

3. 濱田晋 正宗淳 下瀬川徹  
膵星細胞培養上清による膵癌細胞メタボローム変化の網羅的解析  
JDDW2015 2015年10月8-11日 東京 グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

濱田 晋 (Hamada, Shin)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：20451560

##### (2)研究分担者

正宗 淳 (Masamune, Atsushi)  
東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号：90312579