

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830073

研究課題名(和文)代謝から理解する上皮間葉転換の分子機序の解明とがん診断・創薬への応用

研究課題名(英文)Understanding metabolic regulation of epithelial-mesenchymal transition

研究代表者

入野 康宏(Irino, Yasuhiro)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・特命助教

研究者番号：10415565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：上皮間葉転換(EMT)はがんの浸潤に深く関与している。がん細胞では、細胞内の代謝機構が変化していることが大きな特徴であると広く知られているが、がんの浸潤(EMT)と細胞内代謝との関連性は未だ不明な点が多い。そこで本研究では、EMT時の細胞内代謝の変化を網羅的に代謝物を一斉分析(メタボローム解析)することで明らかにすることを目的とした。

EMT誘導時には代謝物プロファイルが明らかに変化しており、EMTが誘導されると細胞内の代謝が変化することが分かった。EMT誘導時には、ピルビン酸と乳酸が増加しており、ホスホエノールピルビン酸が減少しており、解糖系が亢進していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The epithelial-mesenchymal transition (EMT) contributes cancer progression.

Although previous reports suggest that alternations in cell metabolism are characteristic of many tumor cells, the contribution of cancer metabolism to the morphological changes in EMT remains elusive.

To examine the roles for changed metabolism, we analyzed the metabolome of breast cancer cells before and after EMT using a gas-chromatography mass spectrometry. We found that metabolic profiling was dramatically changed during EMT. EMT resulted in increase in pyruvic acid and lactic acid and decrease in phosphoenolpyruvic acid, indicating the activation of glycolysis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：代謝 がん

## 1. 研究開始当初の背景

がんの診断方法や治療方法の進歩により、がんの治療成績は近年向上しつつある。しかし、約半数のがん患者の治療は困難な状態であり、さらに高齢化に伴いがん患者数は増加の一途をたどっており、がん克服はすべての人類にとって重要な課題である。

がんの治療が困難である原因は、がん細胞が保持している治療抵抗性、再発能、転移能という3つの特徴のためと考えられている。がん細胞は不均一な集団であることが、これら3つの性質の根本的な原因であり、単一な治療ではすべてのがん細胞を殲滅することは困難である。

がん細胞の不均一性の要因は、ゲノム変異とエピジェネティクス変化に大別される。がん細胞は増殖・細胞分裂速度が速くなっており、遺伝子複製に誤りが起こりやすく、ゲノム変異が生じている。エピジェネティクス変化は、ゲノム自身には変化はなくても、ゲノムが修飾されることで遺伝子の発現に影響があらわれ、細胞の性質が変化することである。がん細胞の特徴である転移能に深く関与している上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) はエピジェネティクス変化の一例である。

がん細胞が転移能を獲得するためには、EMT の劇的な変化を遂げなければならない (Nature Rev. Cancer, 2, 442-54, 2002)。EMT はがん細胞のみに観察される現象ではなく、原腸形成に代表される特定の形態形成の段階で広範に使われている。胚形成の正常な段階とがんの転移過程に EMT とよばれる共通な現象があることから、がん細胞は転移能を獲得するためには、複数の表現型の変化を個別に獲得する必要はなく、ゲノムにコードされた形態形成 (EMT) のプログラムを活性化させるだけで十分である。すなわち、がん細胞の転移を抑制するためには、転移性がん細胞の特徴を個別に調べる必要はなく、EMT のプログラムの活性化機構を解析しこの制御機構を標的とした診断や創薬が非常に有効であると考えられる。

## 2. 研究の目的

がんが転移能を獲得することは、がんを悪性化し治療を妨げている原因である。がんが転移能を獲得するときには、EMT の変化を遂げる必要があり、EMT の分子機序を明らかにすることは、がんを克服するための第一歩である。そこで、本研究では、EMT が起こっている時の代謝プロファイルを調べることで、EMT の分子機序を明らかにすることを目的とする。代謝物変動だけでなく、代謝酵素変動も併せて網羅的に解析し、それぞれのデータの融合をはかる。その所見に基づいて、蛍光・ポジトロン放出断層撮像 (PET) などのがん転移のイメージングシ

ステムに応用することや転移性がんの治療のための標的分子の同定を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) EMT 誘導条件の検討

上皮細胞を TNF- $\alpha$  や TGF- $\beta$  で刺激すると EMT が誘導されることが知られている。本研究課題では、MCF7 細胞や A549 細胞を解析対象にする。ウエスタンブロット法や細胞染色法を用いて、E-カドヘリンの発現量の低下と細胞形態の変化を調べて EMT の程度を評価する。

### (2) オミックス解析

EMT を誘導させたときの細胞から代謝物を抽出しメタボローム解析を行う。ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) を用いて解糖系、TCA 回路、アミノ酸代謝経路に関与する代謝物を網羅的に解析する。得られた測定データを処理し、定量的な検討を実施することで、どのような分子が、どのような EMT の進行状態によって変動するのかを明らかにするとともに、EMT 特有のメタボローム変動パターンを決定する。さらに、EMT 前後での解析だけではなく、上皮細胞と間葉系細胞の特徴的な代謝プロファイルが存在するかを調べる。

ある瞬間の代謝を理解するメタボローム解析に加え、動的な代謝を理解するためのフラックス解析も併せて実施する。具体的には、安定同位体でラベルされたグルコースやグルタミンを培地に添加し、グルコースやグルタミン代謝経路の代謝物にどのくらい安定同位体を取り込まれたかを調べることで、代謝経路の流れを観察することができる。

## 4. 研究成果

### (1) EMT 誘導条件の検討

MCF7 細胞に 5 ng/ml の TNF- $\alpha$  と 2 ng/ml の TGF- $\beta$  を添加し 72 時間培養した後に、E-cadherin の発現量をウエスタンブロットで調べた。TNF- $\alpha$  と TGF- $\beta$  を添加した培地で培養すると MCF7 細胞の上皮系のマーカーである E-cadherin の発現量が低下していた (図 1)。

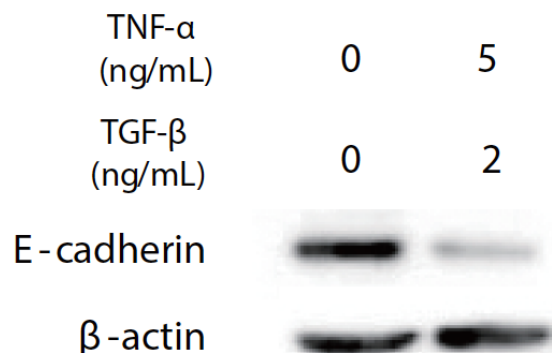


図1 MCF7細胞でのEMT誘導

MCF7細胞にTNF- $\alpha$ とTGF- $\beta$ を添加後72時間培養した後に、細胞内のE-cadherinの発現量をウェスタンブロットで調べた。 $\beta$ -actinをローディングコントロールとした。

この結果から、MCF7をEMT誘導させる条件を決定した。なお、リアルタイムPCRを用いて同条件で間葉系細胞のマーカーであるCDH2のmRNAが増加していることを見出した。

また、EMT誘導させたMCF7細胞のE-cadherinの局在を調べたところ、EMT誘導時にはE-cadherinが細胞接着部位から消失しており、細胞の形態が変化していた(図2)。

これらの結果から、EMTを効率的に誘導できる条件を決定することができた。

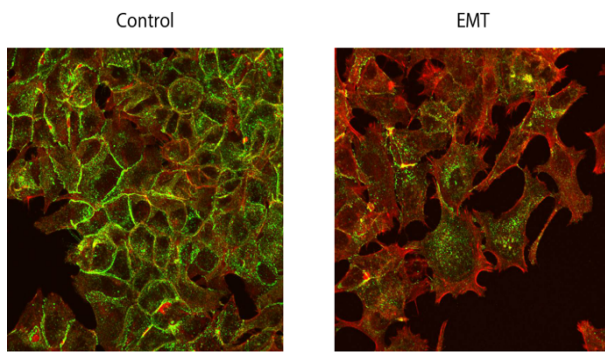


図2 MCF7細胞でのEMT誘導

MCF7細胞にNF- $\alpha$ とTGF- $\beta$ を添加後72時間培養した後に、細胞内のE-cadherinの局在を免疫染色法で調べた。E-cadherinを緑色で、actinを赤色で示した。EMTが誘導されると上皮系の形態から間葉系へと変化しているのが見て取れる。

## (2)オミックス解析

### ①メタボローム解析

EMTを誘導させたときの細胞から代謝物を抽出しメタボローム解析を実施した。ガスクロマトグラフ-質量分析計(GC-MS)を用いて解糖系、TCA回路、アミノ酸代謝経路に関与する代謝物を網羅的に解析した。

メタボローム解析で得られた代謝物データを主成分分析すると、EMT誘導前後で代謝物のプロファイルが異なっていることが分かった(図3)。74代謝物が検出され、そのうち30種類の代謝物で有意な変化が認められた。特に、EMT誘導時には糖代謝が亢進していることが明らかにされた。

代謝物のデータからEMT誘導時に糖代謝の亢進が示唆されたので、解糖系周辺の代謝酵素の発現パターンを調べたところ、解糖系の重要な酵素の翻訳後修飾に差があることがわかった。この翻訳後修飾は酵素活性に影響を与えることが知られており、EMTによって酵素活性が変化し代謝物のプロファイルが変化していることが示唆された。

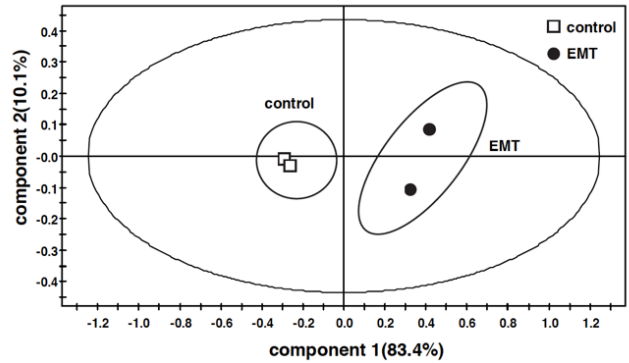


図3 EMT誘導時の代謝物プロファイル

MCF7細胞にTNF- $\alpha$ とTGF- $\beta$ を添加後72時間培養した後に、細胞内の代謝物をGC-MSで網羅的に調べた。得られたデータを主成分分析した結果、control群とEMT誘導群をグルーピングすることができた。これは、EMT誘導前後で、細胞内の代謝物プロファイルが異なっていることを示している。

### ②フラックス解析

EMT誘導時の代謝をより深く調べるために、動的な代謝を理解するためのフラックス解析も併せて実施した。具体的には、安定同位体( $^{13}\text{C}$ )でラベルされたグルコースを培地に添加し、糖代謝経路の代謝物にどのくらい安定同位体を取り込まれたかを調べた。

まず、安定同位体ラベルされた代謝物を検出するシステムの確立を目指した。上記①に記載したGC-MSを用いたメタボローム解析では、誘導体化試薬としてN-Methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MS-TFA)を使用していたが、天然同位体の考慮を考えて(データ解析の容易さ)、フラックス解析においては、N-methyl-N-[tert-butyltrimethylsilyl trifluoroacetamide] + 1%tert-butyltrimethylchlorosilane (MTBSTFA+1%TMCS)を誘導体化試薬として採用した。天然同位体の補正はIsoCor software (Bioinformatics, 28, 1294-1296, 2012)を使用した。今回確立したシステムを用いると、同位体レベルされた乳酸や、TCA回路の代謝物、アミノ酸を定量することが可能になった。

EMT誘導時させた細胞に安定同位体ラベル( $^{13}\text{C}$ )されたグルコースを添加し、その下流の代謝物に含まれる $^{13}\text{C}$ の割合を調べたが、EMT非誘導時と比較して $^{13}\text{C}$ ラベルされた代謝物に大きな変化が見られなかった(図4)。この原因として、 $^{13}\text{C}$ -グルコースの添加量や添加後の培養時間などのさまざまな要因が考えられ、実験条件を再検討する必要がある。

今回の検討では、静的なメタボローム解析でみられた解糖系の亢進を $^{13}\text{C}$ -グルコースを用いた実験では証明することができなかった。しかし、EMT時には、解糖系の酵素の活性が変化していることが示唆された結果と、静的

なメタボローム解析の結果をあわせると EMT 時には解糖系が活性化されると考えられる。動的な代謝を調べる条件検討が急務である。

このような動的な代謝とその代謝酵素の違いを解析することは、EMT の新規分子機序を明らかにすることになる。

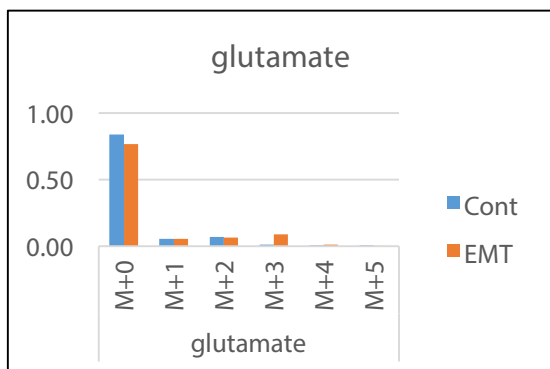
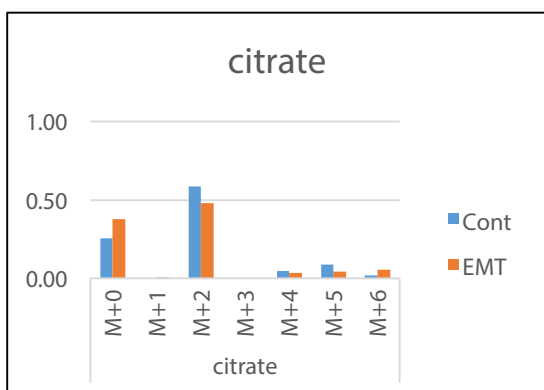
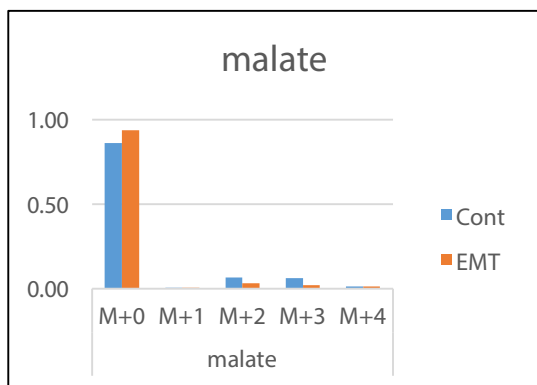
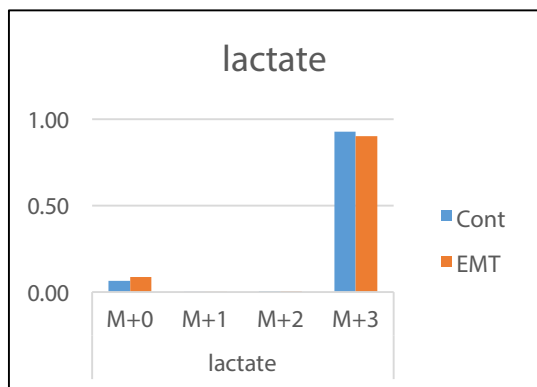


図4  $^{13}\text{C}$ -ラベルされた代謝物の変化  
MCF7 細胞を TNF- $\alpha$  と TGF- $\beta$  で刺激後培地に  $^{13}\text{C}$ -グルコースを添加し、細胞内の代謝物を GC-MS で測定した。検出された代謝物に対して、 $^{13}\text{C}$ -ラベルされた割合を計算した。誘導体化試薬などに含まれる天然同位体の補正を、IsoCor を用いて実施した。今回の検討では、EMT 誘導前後で、検出された代謝物における  $^{13}\text{C}$  ラベルされた割合に変化は見られなかった。

### (3)まとめ

今回の研究では、EMT 誘導時のメタボローム解析を実施した。メタボローム解析の結果から、EMT 誘導時には解糖系が亢進していることがわかり、解糖系を制御している酵素の翻訳後修飾の違いが見られた。動的な代謝を調べるための分析システムを構築することに成功した。EMT 誘導時の動的な代謝を調べてみた結果、解糖系の亢進を認めることができなかったが、さまざまな実験条件を見直すことで、EMT 誘導時の解糖系の亢進を観察することが可能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. Nagashima H, Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Sato N, Takeuchi Y, Kyotani K, Mukasa A, Mizukawa K, Sakata J, Yamamoto Y, Hosoda K, Itoh T, Sasaki R, Kohmura E.

Diagnostic value of glutamate with 2-hydroxyglutarate in magnetic resonance spectroscopy for IDH1 mutant glioma.

Neuro-Oncology, in press.

2. Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Takata K, Nagashima H, Satoh N, Kyotani K, Mizowaki T, Imahori T, Ejima Y, Masui K, Gini B, Yang H, Hosoda K, Sasaki R, Mischel PS, Kohmura E.

Compensatory glutamine metabolism promotes glioblastoma resistance to mTOR inhibitor treatment.

J Clin Invest. 2015, 125:1591-602. doi: 10.1172/JCI78239.

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobeu.ac.jp/icms/icms/index.html>

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/eblm/index.html>

### 6. 研究組織

#### (1)研究代表者

入野 康宏 (IRINO Yasuhiro)

神戸大学・大学院医学研究科・特命助教

研究者番号：10415565