

令和元年5月22日現在

機関番号：34304

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15453

研究課題名(和文)ヘキソサミン合成経路異常亢進による酸化ストレス耐性を介したがん幹細胞化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of oxidative stress resistance via metabolic reprogramming of hexosamine biosynthetic pathway in cancer stem cells

研究代表者

泉川 友美 (IZUMIKAWA, Tomomi)

京都産業大学・総合生命科学部・研究助教

研究者番号：30780811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞は、酸化ストレスに耐性を示し、がん再発の原因となる。以前我々は、悪性度の高いがん組織でその産生の増加が報告されたヒアルロン酸の高産生乳がん細胞において、ヒアルロン酸の合成基質経路であるヘキソサミン合成経路の異常亢進によりがん幹様細胞が誘導されることを明らかにした。本研究では、ヒアルロン酸高産生乳がん細胞において、ヘキソサミン合成経路の異常亢進を介して、糖やアミノ酸の代謝経路であるペントースリン酸経路およびグルタミン代謝が促進され、抗酸化物質グルタチオンの割合が増加した結果、酸化ストレス耐性を獲得し、がん幹細胞様細胞が誘導されていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒアルロン酸の過剰産生を介したがん幹細胞誘導機構の解明を通じてがん根治的治療の研究基盤の形成を目的に研究を行った。その結果、ヒアルロン酸高産生乳がん細胞において、細胞内のヒアルロン酸の合成基質経路であるヘキソサミン合成経路の異常亢進が引き金となり、他の代謝経路を促進することを明らかにした。さらに、これらの代謝経路が亢進することにより、酸化ストレス耐性に関わるシグナルが誘導され、がん幹細胞様細胞の出現を促していることが示された。これらの結果より、新規のがん幹細胞誘導機構が示され、その機構を標的とした治療法の開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) have the capability of self-renewal and giving rise to malignant progeny that drive cancer progression. CSCs are also thought to be responsible for cancer recurrence due to their resistance to oxidative stress. Thus, elucidating molecular mechanisms that govern CSCs can greatly contribute to designing new strategies for targeting cancer progression and recurrence. We recently demonstrated that hyaluronan (HA) production induced the CSC-like properties and metabolic reprogramming by accelerating the glycolysis and hexosamine biosynthetic pathway (HBP), which is a glucose metabolic pathway that branches off from the main glycolytic pathway. Here, we demonstrated that increased HA production in cancer cells induces resistance to oxidative stress, upregulation of reduced glutathione ratio and metabolic reprogramming by accelerating pentose phosphate pathway and glutaminolysis.

研究分野：生物系薬学

キーワード：がん幹細胞 ヒアルロン酸 酸化ストレス耐性 抗がん剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒアルロン酸は、がん組織では間質を構成する細胞外マトリックスの主要な糖鎖成分であり、乳がんなど多くのがん組織だけでなく、がん幹細胞において、その高い産生レベルががんの成長やがんの浸潤・転移に対して促進作用があることが知られている。がん幹細胞は、抗がん剤や放射線治療による酸化ストレスに耐性を示し、がん細胞の供給源にもなる非常に未分化な悪性細胞であり、がん根治的治療のための最も重要なターゲットとして、注目されている。しかし、がん幹細胞がどのような仕組みで生み出されるのか、その機構は明確でない。

これまでに我々は、ヒアルロン酸合成の増加が、ヒアルロン酸の基質合成経路であるヘキサミン合成経路の異常亢進を介して乳がん細胞のがん幹細胞化に働くことを明らかにした。しかし、どのような機構でヘキサミン合成経路の異常亢進を介して、がん幹細胞を獲得しているのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、治療抵抗能をもつがん幹細胞が保持している酸化ストレス耐性に着目し、ヒアルロン酸の基質合成経路であるヘキサミン合成経路の異常亢進を介した酸化ストレス耐性獲得によるがん幹細胞の出現機構の解明と、その機構を標的とした治療への応用の基盤形成を目指す。

3. 研究の方法

ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞の樹立

ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞(Has2^{ΔNeo})およびその対照細胞(HAS2^{+Neo})は、以前に樹立されたマウス初代乳がん細胞を用いた (引用文献 1)。

過酸化水素水(H₂O₂)処理、阻害剤および抗がん剤処理

乳がん細胞(1 X10⁵細胞)を 35mm dish に播種し、24 時間培養した。培養後、培地のみをそれぞれの濃度の H₂O₂、シスプラチン、6-Diazo-5-oxo-L-norleucine (DON), ML385(Sigma), Dehydroepiandrosterone (DHEA), L-γ-Glutamyl-p-nitroanilide Monohydrate (GPNA), sulfasalazine (SSA), Buthioninesulphoximine (BSO) (Wako Pure Chemical Industries)や R162 (Focus Biomolecules)を含む培地で 16 時間処理し、アポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリー解析により測定した。

アポトーシス細胞の測定

H₂O₂処理、阻害剤あるいは抗がん剤処理した細胞をトリプシンを用いて回収し、Annexin V-FITC およびヨウ化プロピジウム(PI)で標識し、アポトーシス細胞の割合を FACS Calibur (BD Bioscience)によって測定し、Cell Quest (BD Biosciences)により解析した。

還元型グルタチオンの測定

乳がん細胞(1 X10⁶細胞)を用い、GSSG/GSH Quantification Kit (Dojindo)のプロトコールに従い、グルタチオン(GSH:還元型、GSSG:酸化型)を測定した。

NADPH/NADP の測定

乳がん細胞(4X10⁶細胞)を用い、NADP/NADPH Quantitation Colorimetric Kit (BioVision)のプロトコールに従い、細胞内の NADP/NADPH を測定した。

統計処理

二群間の比較は、t 検定を用いて行い、危険率 5%未満 (*P<0.05)を統計学的有意差ありと判定した。

4. 研究成果

がん幹細胞は、活性酸素を除去する能力が特に高く、治療に対して高い抵抗性を持つ。ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞は、がん幹細胞性を獲得していることから、対照乳がん細胞と比較し、酸化ストレス耐性を獲得していることが予想される。そこで、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞と対照乳がん細胞を H_2O_2 処理で処理し、アポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリ解析によって測定し、酸化ストレス耐性を保持しているかを検討した。その結果、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞において、対照乳がん細胞と比較し、 H_2O_2 刺激後のアポトーシス細胞の割合が減少した(図 1A) さらに、抗がん剤であるシスプラチンで処理し、アポトーシス細胞の割合を同様に解析した結果、両細胞ともシスプラチンの濃度依存的にアポトーシス細胞の割合は増加したが、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞において、対照乳がん細胞と比較し、25 μM および 50 μM シスプラチン処理の際に、有意にアポトーシス細胞の割合が減少した(図 1B)。これら結果より、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞は、酸化ストレス耐性を獲得していることが明らかとなった。

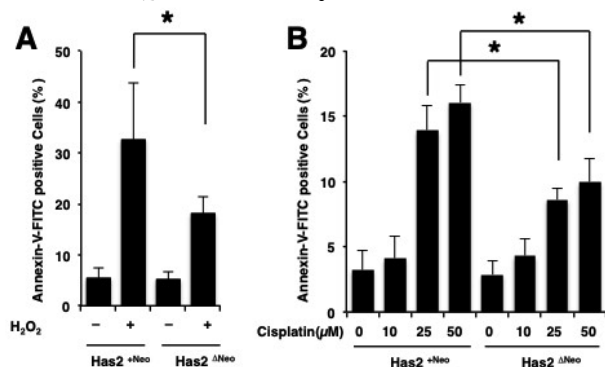


図 1 酸化ストレスおよび抗がん剤耐性の検討

ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞 (Has2^{ΔNeo}) およびその対照細胞 (HAS2^{+Neo}) を H_2O_2 (A) あるいはシスプラチン (B) 処理後、アポトーシスした細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。(*p<0.05)

次に、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞における還元力の供給源である NADPH および還元型グルタチオンの割合を調べた。その結果、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞において、対照乳がん細胞と比較し、NADP/NADPH が低下し、それに対応して還元型グルタチオンが増加していた(図 2A, B)。還元型グルタチオンは、酸化型から NADPH の還元力を利用し、還元型へと変換され、細胞内の酸化ストレスから細胞を保護する。これまでに、NADPH はグルコース代謝の副経路であるペントースリン酸経路を経て、生成されることが知られている。さらに、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞では、解糖系が亢進していたため、その副経路であるペントースリン酸経路に関して、代謝が亢進していることが予想された。そこで、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞と対照乳がん細胞をペントースリン酸経路の律速酵素の阻害剤である Dehydroepiandrosterone (DHEA) で処理し、アポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリ解析によって測定した。その結果、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞において、対照乳がん細胞と比較し DHEA 処理後のアポトーシス細胞の割合が増加した(図 2C)。

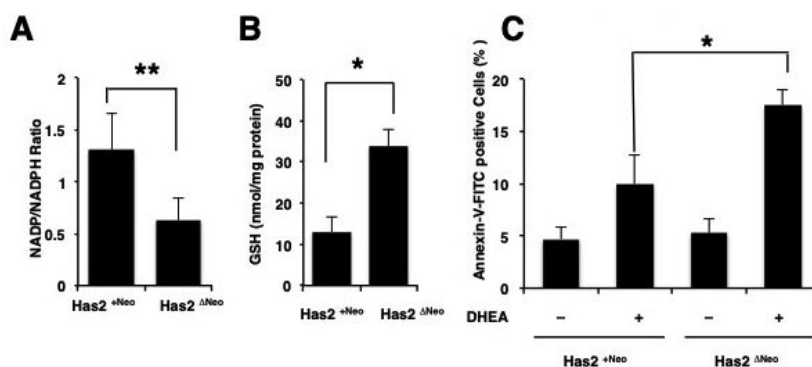


図 2 酸化ストレス耐性獲得における NADPH、還元型グルタチオンおよびペントースリン酸経路の関与の検討

Has2^{ΔNeo} および HAS2^{+Neo} 細胞における NADPH の割合 (A) および還元型グルタチオン量 (B) を調べた。C, DHEA 処理後、アポトーシスした細胞をフローサイトメトリーにより解析した。

(*p<0.05, **p<0.001)

ヘキソサミン合成経路の律速酵素であるGFATは、グルタミンとフルクトース-6-リン酸からグルタミン酸とグルコサミン-6-リン酸を生成する反応を担う。ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞においては、ヘキソサミン合成経路の代謝流速の加速により、グルタミン酸の産生も増加し、グルタミン代謝も亢進している可能性が示唆された。そこで、グルタミン代謝経路のグルタミントランスポーター阻害剤であるGPNAあるいはグルタミン酸脱水素酵素1(GDH1)阻害剤R162で処理後、アポトーシス細胞の割合をフローサイトメトリー解析によって測定した。その結果、ヒアルロン酸過剰産生乳がん細胞において、対照乳がん細胞と比較し阻害剤処理後のアポトーシス細胞の割合が増加した(図3A, B)。さらに、グルタチオンの合成を阻害するシステイントランスポーター阻害剤(SSA)およびグルタミンシステインリガーゼの阻害剤(BSO)処理した結果、同様の結果が得られた(図3C)。

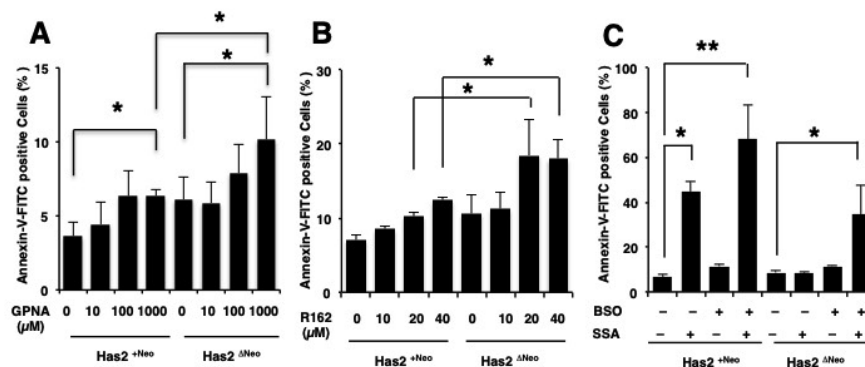


図3 酸化ストレス耐性獲得におけるグルタミン代謝経路の関与の検討

Has2^{ΔNeo}およびHas2⁺Neo細胞をGPNA(A)、R162(B)あるいはSSAおよびBSO(C)処理後、アポトーシスした細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。(*p<0.05, **p<0.001)

次に、ヘキソサミン合成経路の律速酵素であるGFAT1遺伝子の過剰発現細胞およびGFAT1の阻害剤処理を行い、ヘキソサミン合成経路の亢進および阻害が酸化ストレス耐性獲得に影響するかを検討した。その結果、GFAT1の発現量に相関して、H₂O₂およびシスプラチン処理によるアポトーシス細胞の割合が減少した(図4A, B)。さらに、GFAT1の発現量に相関して、還元型グルタチオンおよびNADPHの割合が増加していた(図4C, D)。これら結果より、ヘキソサミン合成経路の異常亢進を介して、グルタミン代謝や抗酸化物質グルタチオンの合成が増加した結果、酸化ストレス耐性を獲得し、がん幹細胞が誘導されていることが示唆された。

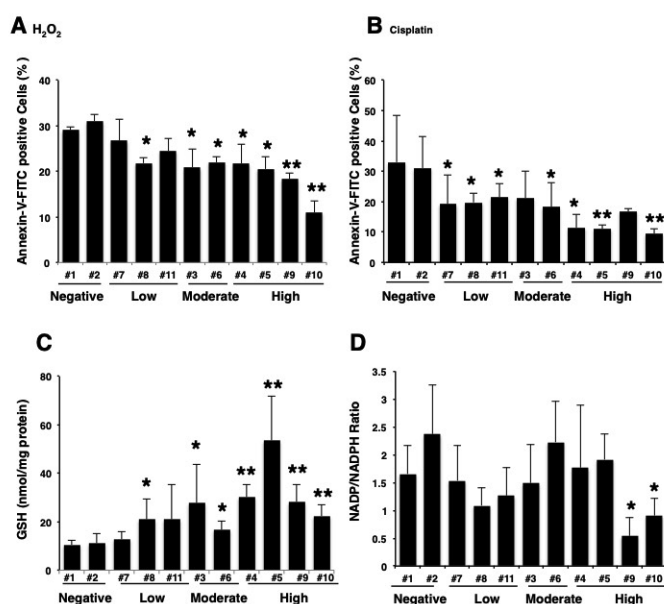


図4 GFAT1 遺伝子導入による酸化ストレス耐性へ及ぼす影響の検討

GFAT1発現量の異なる4群の細胞(Negative, Low, Moderate, High)を用いて、H₂O₂(A)あるいはシスプラチン(B)処理後、アポトーシスした細胞の割合をフローサイトメトリーにより解析した。さらに、同様の細胞を用い、還元型グルタチオン量(C)およびNADPHの割合(D)を調べた。(*p<0.05, **p<0.001)

<引用文献>

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Izumikawa, T.

Regulatory Mechanism of 2-*O*-Phosphorylation of Xylose in the Glycosaminoglycan-Linkage Region of the Tetrasaccharide, Trends in Glycoscience and Glycotechnology, in press, (2019) 査読有

(2)Izumikawa, T., Itano, N.

Metabolic Reprogramming and Hyaluronan Production in Cancer Stem Cells
Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 30 (176), E147-E154, (2018) 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1, 泉川 友美, 板野 直樹 ヒアルロン酸生合成を起点とした代謝リプログラミングとがん幹細胞性の発現調節 ConBio2017、2017.12.7

2, 東出 実歩, 泉川 友美, Chokchaitaweek Chatchadawarai, 板野 直樹 乳がん細胞の上皮-間葉転換を制御するヘキソ サミン合成経路の役割、ConBio2017、2017.12.6

3, 泉川 友美, チャンミー シーラウト, 東出 実歩, ショーチャイタウイスウ チャッチャダ
フライ, 中嶋 和紀, 柿崎 育子, 谷口 直之, 板野 直樹 ヘキソサミン合成経路を介したがん幹細胞の代謝リプログラミング 第 36 回日本糖質学会年会、2017.7.21

4, 泉川 友美, Theerawut Chanmee, Pawared Ontong, 東出 実歩, 望月 信利, Chatchadawalai
Chokchaitaweek, Manatsanan Khansai, 中嶋 和紀, 柿崎 育子, Prachya Kongtawelert, 谷口 直之,
板野 直樹 ヒアルロン酸産生によるがん幹細胞の代謝リプログラミング 第 64 回日本生化学会
近畿支部例会、2017.5.27

5, 泉川 友美, Theerawut Chanmee, Pawared Ontong, 東出 実歩, 望月 信利, Chatchadawalai
Chokchaitaweek, Manatsanan Khansai, 中嶋 和紀, 柿崎 育子, Prachya Kongtawelert, 谷口 直之,
板野 直樹 ヒアルロン酸産生によるがん幹細胞の代謝リプログラミング 第 8 回 関西グライコ
サイエンスフォーラム、2017.5.13

6, Tomomi Izumikawa, Theerawut Chanmee, Pawared Ontong, Miho Higashide, Nobutoshi Mochizuki,
Chatchadawalai Chokchaitaweek, Manatsanan Khansai, Kazuki Nakajima, Ikuko Kakizaki, Prachya
Kongtawelert, Naoyuki Taniguchi, Naoki Itano Hyaluronan production regulates metabolic and cancer
stem-like properties of breast cancer cells via hexosamine biosynthetic pathway-coupled HIF-1 signaling.
第 89 回日本生化学会大会、2016.9.27

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cc.kyoto-su.ac.jp/~itanon/index2.html>

6 . 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：板野 直樹

ローマ字氏名：ITANO, Naoki

研究協力者氏名：小林 孝

ローマ字氏名：KOBAYASHI, Takashi

研究協力者氏名：西垣 大樹

ローマ字氏名：NISHIGAKI, Daiki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。