

令和 3 年 6 月 20 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02759

研究課題名(和文) 腫瘍内の代謝微小環境が放射線耐性を誘導するメカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms by which intra-tumor metabolic microenvironment leads to radioresistance

研究代表者

小野寺 康仁 (Onodera, Yasuhito)

北海道大学・医学研究院・准教授

研究者番号：90435561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞特異的な糖代謝の制御法を用いて糖充足状態のがん細胞と糖欠乏状態のがん細胞とを共培養し、両者の間に「代謝協調」を成立させて、生存性や細胞内代謝および表現型の変化、放射線への応答などを解析した。上記の実験系によって、糖欠乏状態のがん細胞が糖充足細胞からの代謝産物を得て生存性を維持すること、このとき前者の細胞の酸化ストレスや小胞体ストレスが顕著に抑制されることが明らかとなった。媒介する物質およびメカニズムの推定や、代謝協調状態で起こる様々な表現型の変化については現在解析を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍の内部はがん細胞の盛んな増殖と代謝変化とが相まって、しばしば栄養素や酸素の欠乏領域を生じる。そのような領域では薬剤や放射線の効果、および免疫細胞の作用が抑制されるため、治療効率が低下する。また、申請者自身の解析により、栄養素欠乏領域の存在は、周囲のがん細胞も含めた腫瘍全体の治療耐性亢進を誘導することが明らかとなった。栄養欠乏領域のがん細胞は、周囲の細胞の中間代謝産物を利用して生存性を維持している。このような「代謝協調」のメカニズムを明らかにし、それに基づき飢餓領域において細胞死を効率よく誘導する方法を確立できれば、既存の治療法の効率をより高めることができると考えられる。

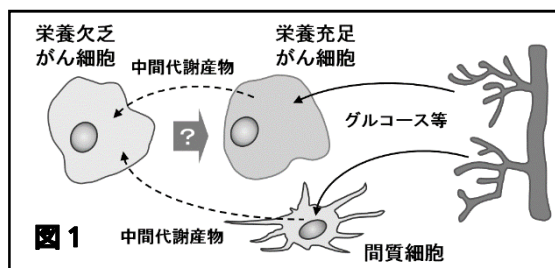
研究成果の概要(英文)：Using cell-specific regulation of glucose metabolism, we co-cultured glucose-sufficient and glucose-deficient cancer cells and established "metabolic cooperation" between them to analyze viability, intracellular metabolism, phenotypic changes, and response to radiation. The above experimental system revealed that cancer cells in a glucose-depleted state maintain their viability by obtaining metabolites from glucose-sufficient cells, and that oxidative stress and ER stress in the former cells are markedly suppressed. Estimation of the mediating substances and mechanisms, as well as the various phenotypic changes that occur in the metabolic cooperative state, are currently under analysis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：放射線 代謝協調 細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

腫瘍塊の中心部はしばしば酸素分圧が低下し、主要な炭素源であるグルコースやグルタミン酸が枯渇する。低酸素状態における放射線耐性の亢進については比較的良く解析されているものの、細胞が低栄養環境に耐えながら長期間生存するような実験条件の設定が難しいことから、低栄養状態が放射線感受性に与える影響については解析が遅れている。申請者は近年、細胞特異的にグルコースを導入できる新たな



実験法を確立し、これを用いることで、栄養欠乏状態の飢餓細胞群と栄養充足細胞群を単一の培養系で長期間共存させることに成功した(「研究の方法」参照)。通常の単独培養における糖飢餓はがん細胞に深刻な代謝ストレスをもたらし、数日のうちに著しい細胞死を引き起こす。しかしながら、上記のような共培養系においては、飢餓細胞は栄養充足細胞に由来する何らかの物質を用いて生存することが示唆される。このような状態は「代謝協調」と呼ばれており、腫瘍内の栄養欠乏状態の細胞が生存性を維持する原因であると考えられている(図1、引用文献1)。代謝協調が成立することによる腫瘍全体への影響については解析が遅れているが、適切な実験系が存在しないことがその一因であると考えられる。

2. 研究の目的

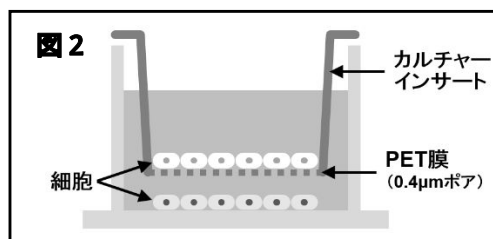
上記の背景から、本研究では上記の「細胞特異的なグルコース代謝調節法」を用いて腫瘍内の代謝協調状態を再現し、栄養飢餓および栄養充足状態の癌細胞における放射線耐性の変化を解析した。予備的な結果から、代謝協調状態においては栄養飢餓細胞のみならず栄養充足細胞までもが放射線耐性を亢進することが示唆されている。本申請課題の範囲では、腫瘍内の代謝微小環境が代謝協調を促し、放射線耐性を誘導するという仮説を立て、そのメカニズムの解明を目指す。代謝協調により生じる各細胞の表現型や放射線照射後の細胞応答の変化を観察し、遺伝子発現やエピゲノムの解析、細胞内外の代謝産物の解析等によって、その要因を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)細胞特異的なグルコース代謝制御(SIGHT)を用いた共培養

グルコースを含まない培地に、哺乳類では全く代謝されない「糖前駆体」を添加しておく。目的の細胞に、当該の前駆体に特異的なトランスポーターと代謝酵素(哺乳類以外の生物に由来するもの)を安定発現させておき、上記の培地で培養することで、その細胞の内部でグルコースが発生し解糖系代謝で使用される。このシステムをSIGHT(Selective Incorporation of Glucose via Hydrolysis after Transport)と名付けた。SIGHT発現細胞と非発現細胞とを共培養すると後者のみが「糖欠乏」の状態となり、単一の培養環境において糖代謝状態の異なる細胞同士の共存が可能となる。それらの細胞間に「代謝協調」の状態が生じることで、自身では糖代謝を行えない細胞の生存性の維持が可能となる。

上記のSIGHTを乳癌細胞MDA-MB-231に発現させ、親株細胞との共培養を行った。共培養はセルカルチャーインサート(Corning)をウェルプレートあるいはカルチャーディッシュと組み合わせて行い(図2)インサートのPET膜上およびディッシュ/プレートのプラスチック上に播種した細胞から、タンパク質、RNAおよび代謝産物を適宜回収した。また、表現型の解析はシリコンで作成(外注)したアタッチメントを用いたガラス面上での区画化培養によって行った。ガラスボトムディッシュにアタッチメントを密着させ、SIGHT発現細胞および親株細胞を異なる区画で単一培養した。24時間後、両区画を上記の前駆体含有・グルコース不含培地で接続し、物質交換による代謝協調状態を成立させ、以降の解析に用いた。



(2)SIGHTを用いた馴化培地の作成とそれを用いた生存性の解析

グルコースを(ほとんど)含まず、グルコース由来の代謝産物のみを含む馴化培地を作成するため、SIGHT発現MDA-MB-231細胞を上記の糖前駆体を含むグルコース不含培地で単独培養した。48時間後に培地を回収して遠心分離により細胞等を除去し、上清を以降の実験に使用した。

栄養充足細胞に由来する中間代謝産物のうち、栄養欠乏細胞が使用することによって生存性を維持するものを特定するため、上記のようにして回収した馴化培地を親株のMDA-MB-231細胞に投与して代謝産物量の変動を解析した。親株細胞を24時間および48時間培養して培地を再度回収し、含まれる代謝産物の量を培養前の馴化培地と比較した。

(3)代謝協調下で飢餓細胞の生存性維持に関する分子メカニズムの解析

代謝協調下での SIGHT 発現細胞および親株細胞の生存性を確認するため、両者に Eluc(引用文献 2) および Akaluc(引用文献 3) を安定発現させて共培養あるいは単独培養を行い、化学発光による細胞数の測定を行った。発光測定にはプレートリーダー (SpectraMax iD5, Molecular Devices) を用いた。同様の解析を種々の条件の放射線照射を行った後に行い、放射線耐性への影響を解析した。

遺伝子発現解析や細胞内外の代謝産物解析の結果に基づき、栄養欠乏細胞において生存性の維持に用いられている物質を推定し、それに関連する代謝経路の抑制を SIGHT 発現細胞や親株細胞でそれぞれ行い、生存性や表現型への影響を確認した。

(4)代謝協調下の表現型の解析

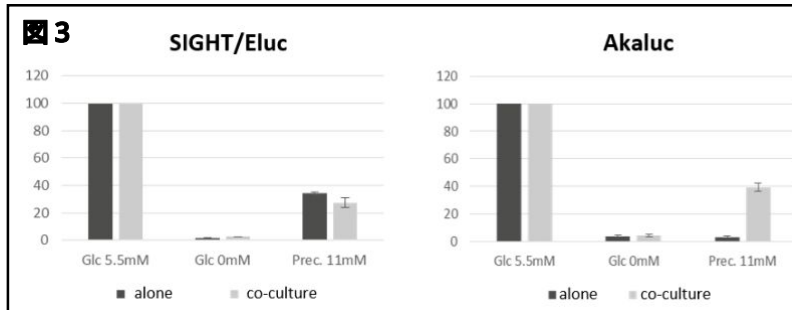
代謝協調による形態や運動性など種々の表現型への影響を確認するため、ガラス面上での区画化培養による共培養系(上記参照)を行い、ライブイメージングや免疫染色等を適宜行った。区画化培養においては細胞が浮遊し別の区画に混入する場合も想定されるため、免疫染色等、単一の細胞を観察する場合には異なる蛍光タンパク質(GFP と RFP など)を各細胞に発現させておき、細胞の特定が可能な状態にして解析を行った。

4. 研究成果

(1)SIGHT を用いた代謝協調誘導による生存性への影響

上記のようにして共培養した SIGHT 発現細胞と親株(SIGHT 非発現)細胞の生存性を、波長の異なる luciferase (Eluc および Akaluc) を用いた同時化学発光測定により検討した。プレートリーダーの測定条件を適切に設定することで、互いの測定域への影響を 1%程度に抑えることが可能であることを予め確認した。

図 3 に示すように、SIGHT 発現細胞の単独培養では、生理的糖濃度(5.5 mM)での生存・増殖と比較して、糖前駆体による培養ではおよそ 3~4 割程度の生存性を示した。これは糖前駆体の代謝効率がグルコースそのものよりも低いためであると推測され、



SIGHT の酵素活性等を調整することで改善が可能であると考えている。一方、Akaluc のみを発現する細胞の単独培養では、糖枯渇培地(0 mM)と前駆体含有培地のいずれにおいても生存性がほとんど全く維持されなかった。前駆体含有培地による共培養においては、両者とも生理的糖濃度と比較して 3~4 割程度の生存性を示した。これは SIGHT 発現細胞の前駆体含有培地における単独培養とほぼ同等である(上記参照)。なお、これらの条件において、顕著な細胞死は見られなかったことから、増殖の速度が若干低下したことによって総細胞数が少なくなったものと考えられる。

(2)代謝協調を介する物質およびメカニズムの解析

遺伝子発現解析および代謝産物解析により、糖飢餓状態で細胞死に至る直前の状態の細胞では、著しい酸化ストレスおよび小胞体ストレスが生じていることが示唆された。解糖系から分岐するペントースリン酸経路およびヘキソサミン合成経路では、酸化還元バランスの維持に必須の電子供与体である NADPH や、糖鎖合成のドナー物質である UDP-GlcNAc などの糖ヌクレオチドがそれぞれ合成される。代謝産物解析では、糖飢餓状態の細胞では解糖系やペントースリン酸経路の中間代謝産物がほとんど枯渇していることや、NADPH/NADP+比が顕著に低下していること(すなわち酸化状態に傾いていること)、糖ヌクレオチドの量も著しく減少していることが明らかとなった。代謝協調下では、NADPH/NADP+比および糖ヌクレオチド量が顕著に回復しており、酸化ストレスや小胞体ストレスが回復したと思われる。遺伝子発現解析の結果も、それを裏付けるものであった。一方で、代謝協調下においても、解糖系やペントースリン酸経路の中間代謝産物は殆ど回復が見られなかった。これらの結果は、代謝協調においては、他の何らかの経路を介して NADPH の産生・還元や糖ヌクレオチドの合成が補助されることを示唆している。

馴化培地を用いた解析から、酸化・還元状態の維持に寄与する物質が幾つか示唆された。当該物質の糖不含培地への添加による生存性維持についての検討を行ったが、効果は限定的であった。欠乏した糖ヌクレオチドの補給が行われず、小胞体ストレスが解消されていないためであると考えている。現在、SIGHT 発現細胞および親株細胞において関連する代謝経路の阻害を行い、共培養時の後者の生存性維持への影響を解析している。一方、糖ヌクレオチドの補給経路については、馴化培地による解析では説明し得る代謝産物変動が見られなかった。タンパク質や糖鎖な

ど、測定範囲に含まれない物質を介している可能性が示唆される。

(3)代謝協調による表現型変化の解析

代謝協調下の細胞における、浸潤性や運動性およびそれらの放射線照射後の変化について、上記の共培養系を用いて解析を行った。また、これまでの研究により放射線耐性や放射線応答による浸潤性の亢進との関与を見出しているミトコンドリアの分布制御(引用文献4)への影響についても、免疫染色やライブイメージングにより検討した。代謝協調下において、これらの性質に一定の変化が生じる傾向を確認しており、より詳細かつ定量的な解析を現在進めている。関連して、放射線応答によりリソソームの分布が変化すること、またそれによってがん細胞の浸潤性が亢進することを明らかにした(引用文献5)。代謝協調によるリソソーム分布への影響については現在解析の準備を進めている。

<引用文献>

1. Gupta S, Roy A, Dwarakanath BS. Metabolic Cooperation and Competition in the Tumor Microenvironment: Implications for Therapy. *Front Oncol.* 2017;7:68.
2. Nakajima Y, Yamazaki T, Nishii S, Noguchi T, Hoshino H, Niwa K, Viviani VR, Ohmiya Y. Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging. *PLoS One.* 2010;5(4):e10011.
3. Iwano S, Sugiyama M, Hama H, Watakabe A, Hasegawa N, Kuchimaru T, Tanaka KZ, Takahashi M, Ishida Y, Hata J, Shimozono S, Namiki K, Fukano T, Kiyama M, Okano H, Kizaka-Kondoh S, McHugh TJ, Yamamori T, Hioki H, Maki S, Miyawaki A. Single-cell bioluminescence imaging of deep tissue in freely moving animals. *Science.* 2018;359(6378):935-939.
4. Onodera Y, Nam JM, Horikawa M, Shirato H, Sabe H. Arf6-driven cell invasion is intrinsically linked to TRAK1-mediated mitochondrial anterograde trafficking to avoid oxidative catastrophe. *Nat Commun.* 2018;9(1):2682.
5. Wu PH, Onodera Y, Giaccia AJ, Le QT, Shimizu S, Shirato H, Nam JM. Lysosomal trafficking mediated by Ar18b and BORC promotes invasion of cancer cells that survive radiation. *Commun Biol.* 2020;3(1):620.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Wu Ping-Hsiu, Onodera Yasuhito, Recuenco Frances C., Giaccia Amato J., Le Quynh-Thu, Shimizu Shinichi, Shirato Hiroki, Nam Jin-Min	4. 巻 11
2. 論文標題 Lambda-Carrageenan Enhances the Effects of Radiation Therapy in Cancer Treatment by Suppressing Cancer Cell Invasion and Metastasis through Racgap1 Inhibition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1192 ~ 1192
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11081192	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wu Ping-Hsiu, Opadele Abayomi Emmanuel, Onodera Yasuhito, Nam Jin-Min	4. 巻 11
2. 論文標題 Targeting Integrins in Cancer Nanomedicine: Applications in Cancer Diagnosis and Therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1783 ~ 1783
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11111783	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Wu Ping-Hsiu, Onodera Yasuhito, Giaccia Amato J., Le Quynh-Thu, Shimizu Shinichi, Shirato Hiroki, Nam Jin-Min	4. 巻 3
2. 論文標題 Lysosomal trafficking mediated by Arl8b and BORG promotes invasion of cancer cells that survive radiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-020-01339-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nishioka Soichiro, Wu Ping-Hsiu, Yakabe Toshiaki, Giaccia Amato J, Le Quynh-Thu, Aoyama Hidefumi, Shimizu Shinichi, Shirato Hiroki, Onodera Yasuhito, Nam Jin-Min	4. 巻 2
2. 論文標題 Rab27b contributes to radioresistance and exerts a paracrine effect via epiregulin in glioblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 vdaa091
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/oaajnl/vdaa091	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	及川 司 (Oikawa Tsukasa) (20457055)	北海道大学・医学研究院・講師 (10101)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	ナム ジンミン (Nam JinMin) (60414132)	京都大学・大学院生命科学研究所・准教授 (14301)	
研究協力者	山本 雄広 (Yamamoto Takehiro) (50383774)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	
研究協力者	菱木 貴子 (Hishiki Takako) (10338022)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Stanford University		