

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19399

研究課題名（和文）腫瘍微小環境におけるメタボロインタラクトームの探索と制御

研究課題名（英文）Elucidation of metabolointeractome in tumor microenvironments

研究代表者

大澤 毅（Osawa, Tsuyoshi）

東京大学・先端科学技術研究センター・准教授

研究者番号：50567592

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：がんの転移・浸潤・薬剤耐性などの悪性化には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者は、腫瘍微小環境において、分岐鎖アミノ酸のがん細胞への供給が、線維芽細胞や間質細胞からなされる新たなメカニズムが存在する可能性を見出している。本研究では、アミノ酸を軸とした腫瘍組織における細胞間相互作用で鍵となる代謝物（メタボロインタラクトーム）の探索的な研究として、（1）腫瘍微小環境における細胞間相互作用で鍵となる代謝物の探索、（2）代謝物を介した細胞間相互作用によるがん悪性化機構の解明の2項目の研究を行い、新規がんの治療法の開発につながる栄養感知・制御因子候補を同定した他、新規栄養供給機構の一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、アミノ酸を軸とした腫瘍組織における細胞間相互作用で鍵となる代謝物（メタボロインタラクトーム）の探索的な研究から新規がんの治療法の開発につながる研究を目的とした。本研究は、がん研究のみならず、アミノ酸代謝疾患研究、栄養学研究、mTOR研究などの学術体系の変革や転換にも繋がる可能性を有し、がんを克服する画期的な代謝疾患の制御法を開発に繋がる研究である。また、本研究は、申請者が持つ独自のアミノ酸培養系で、これまで他の栄養素の作用が混在し解析が困難であった1代謝物に起因する系統的な多階層オミクス解析で実現し、がん細胞の生存や幹細胞性維持や腫瘍組織の細胞間相互作用の鍵代謝物の同定に繋がった。

研究成果の概要（英文）：The tumor microenvironment plays an important role in malignant tumor such as metastasis, invasion, and drug resistance. In this research we found a novel mechanism by which branched-chain amino acids are supplied to cancer cells from fibroblasts and stromal cells in the tumor microenvironment. In addition, we found amino acids as key metabolic interaction between cancer and fibroblast (metabolo-interactome) in tumor tissues evaluated by following two research topics: (1) exploration of key cell-cell interactions in the tumor microenvironment and (2) elucidation of the metabolic interactions within tumor microenvironment. We have identified potential nutrient sensing/regulation factors that may lead to the development of novel cancer therapies, and have also elucidated a novel nutrient supply mechanism in tumor.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん 代謝 細胞間相互作用 アミノ酸 オミクス統合解析

1. 研究開始当初の背景

がんの転移・浸潤・薬剤耐性などの悪性化には、腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者は、低酸素・低栄養・低 pH の過酷な腫瘍微小環境ががん悪性化を促進することを報告してきた (Osawa et al. *Cancer Sci.* 2009, *Science Transl. Med.* 2010, *BCJ* 2011, *Cell Death Dis.* 2011, *PNAS* 2011, *Nature Commun.* 2012, *Cancer Res.* 2013, *Cell cycle* 2013, *Cell Reports* 2013, *Oncogene* 2014, *Cell Reports* 2017, *MCB* 2017, *JoVE* 2017, *Cell Reports* 2019)。

また、がん細胞は、低酸素・低栄養・低 pH の過酷な環境において、ミトコンドリア非依存的な解糖系、次いで酢酸代謝、さらにグルタミン代謝という多重の代謝適応システムで生存し悪性化を獲得する知見を得てきた。近年、がんや生活習慣病の研究領域では、アミノ酸代謝が注目されている。バリンやロイシンなどの分岐鎖アミノ酸は、がん細胞の生存や幹細胞性維持に寄与することが知られている。一方、申請者は、腫瘍微小環境でがん関連線維芽細胞がバリンやロイシンを供給するという代謝物の細胞間相互作用 (メタボロインタラクトーム) が存在することを見出している。

本研究は、これまで知られていない腫瘍組織における細胞間相互作用で鍵となるアミノ酸や代謝物の探索と制御を目的とし、腫瘍微小環境で悪性化するがん細胞を攻略する画期的ながん治療法の開発に繋がる。また、本研究は、小児科領域の難治性疾患である先天性代謝異常疾患の病態生理解明や治療法にも応用可能であり、さらに「栄養学研究」や「mTOR 研究」などの学術体系の変革や転換にも繋がる可能性をもつ挑戦的な研究である。

2. 研究の目的

腫瘍微小環境で生存可能ながん細胞は、浸潤・転移能や薬剤耐性の獲得などががん悪性化を促進する。本研究は、上記研究成果を発展させ、がん細胞の生存や幹細胞性維持に重要な、腫瘍組織における細胞間相互作用で鍵となる代謝物の探索と制御を目的とした。本研究目的を達成する方法として、申請者が持つ独自の低栄養培養系 (PNAS 2011, *Cell Reports* 2019) に、アミノ酸などの代謝物を 1 種類ずつ添加することで、これまで他の栄養素の作用が混在し解析が困難であった 1 代謝物に起因する系統的な遺伝子発現解析、エピゲノム解析やメタボローム解析を、がん (HeLa, PANC1) 細胞と線維芽細胞 (PSC, vCAF) の *in vitro* 共培養系や *in vivo* 共移植系に利用し実現する。具体的には、申請者独自の実験系を駆使して、研究期間内で以下の 3 項目を検討した。

- [1] 腫瘍微小環境において細胞間相互作用で鍵となる代謝物の探索
- [2] 代謝物を介した細胞間相互作用によるがん悪性化機構の解明と制御
- [3] 現存する化学療法との併用における相乗効果の検討

これらをヒト・マウスのがん細胞株と線維芽細胞株の共培養系、遺伝子過剰発現やゲノム編集を用いた *in vitro* 細胞実験系、がん細胞と線維芽細胞共移植系や VEGFR-1TK KO マウスなどの *in vivo* マウス実験系、オミクス統合解析、空間的遺伝子発現解析を駆使して、がんや先天性代謝異常疾患に起因する疾患の病態生理解明や治療法の開発に繋がる研究を試みた。

3. 研究の方法

腫瘍微小環境で生存可能ながん細胞は、浸潤・転移能や薬剤耐性の獲得などががん悪性化を促進する。本研究は、上記研究成果を発展させ、がん細胞の生存や幹細胞性維持に重要な、腫瘍組織における細胞間相互作用で鍵となる代謝物の探索と制御を目的とした。本研究目的を達成する方法として、申請者が持つ独自の低栄養培養系 (PNAS 2011, *Cell Reports* 2019) に、アミノ酸などの代謝物を 1 種類ずつ添加することで、これまで他の栄養素の作用が混在し解析が困難であった 1 代謝物に起因する系統的な遺伝子発現解析、エピゲノム解析やメタボローム解析を、がん (AsPC1, A431) 細胞と線維芽細胞 (PSC, vCAF) の *in vitro* 共培養系や *in vivo* 共移植系に利用し実現を試みた。具体的には、申請者独自の実験系を駆使して、研究期間内で以下の 3 項目を検討した。

- (1) 腫瘍微小環境における細胞間相互作用で鍵となる代謝物の探索

腫瘍微小環境には、がん細胞の他に、線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞など多様な細胞が存在し、これらの細胞間相互作用が、がん進展に寄与することが知られている。本研究では、がん細胞と線維芽細胞や免疫細胞との代謝物を介した細胞間相互作用 (メタボロインタラクトーム) を解明する。既に提案者らは、膵癌がん細胞株 (AsPC1) と線維芽細胞 (膵星細胞 PSC) を免疫不

全マウスに共移植すると腫瘍増殖を促進し、さらに、メタボローム解析から線維芽細胞由来の分岐鎖アミノ酸 (Ile, Leu, Val) が腫瘍内で増加していることを発見した。このことから、線維芽細胞がアミノ酸をがん細胞に供給しがんの進展に寄与する可能性が示唆された。そこで、本研究では細胞間相互作用で鍵となる代謝物をがん細胞とがん関連線維芽細胞の共培養系、共移植系を用いて、1細胞・空間的遺伝子発現解析やメタボローム解析から同定を試みた。

(2) 代謝物を介した細胞間相互作用によるがん悪性化機構の解明と制御

がん細胞はロイシンなどの必須アミノ酸が mTOR 複合体を介したシグナル伝達系で感知することが知られている。しかし、その他アミノ酸によるがん悪性化機構は未だ不明な点が多い。本研究は、独自の低栄養培地に1アミノ酸のみを添加した培地を作成し20種類の各アミノ酸存在下で、線維芽細胞とがん細胞 (HeLa, PANC1 細胞) を24時間培養し、各アミノ酸で特異的に発現誘導される遺伝子群やメタボロームデータを用いて各アミノ酸に代謝経路やシグナル伝達系など、がん悪性化機構の解明を試みた。また、各種アミノ酸で特異的なヒストン修飾 (H3K4me3, H3K27ac) を解析し、プロモーター、エンハンサーの同定し、クロマチン相互作用のデータとの統合解析から、上流転写因子やアミノ酸トランスポーターなどの各アミノ酸で鍵となる機構の解明を試みた。既に申請者は、グルタミン標的遺伝子群、グルタミン標的エンハンサー、の解析から感知・制御因子候補を複数同定しているほか、分岐鎖アミノ酸トランスポーター (SLC6A) が、がん線維芽細胞で高発現し、アミノ酸供給に寄与している可能性を見出している。

(3) 現存する化学療法との併用における相乗効果の検討

上記計画(1)、(2)で同定した標的を阻害し現存する抗癌剤や分子標的治療薬との併用で相乗効果が認められるか *in vivo* の腫瘍移植実験系で検討した。本研究よりがん悪性化を促進する細胞間相互作用で鍵となる代謝物の同定とその制御が可能となり、腫瘍微小環境で悪性化するがん細胞を攻略する画期的ながん治療法の開発に繋がる、新規がん治療法の開発やアミノ酸代謝異常疾患の病態解明や治療法への応用が期待できる。

4. 研究成果

がんの転移・浸潤・薬剤耐性などの悪性化には腫瘍微小環境が重要な役割を果たす。申請者は、腫瘍微小環境において、分岐鎖アミノ酸のがん細胞への供給が、線維芽細胞や間質細胞からなされる新たなメカニズムが存在する可能性を見出している。本研究では、アミノ酸を軸とした腫瘍組織における細胞間相互作用で鍵となる代謝物 (メタボロインタラクトーム) の探索的な研究から新規がんの治療法の開発につながる研究を目的とする。本研究は、がん研究のみならず、アミノ酸代謝疾患研究、栄養学研究、mTOR研究などの学術体系の変革や転換にも繋がる可能性を有し、がんを克服する画期的な代謝疾患の制御法を開発に繋げるという挑戦的な研究である。

本研究は、がん細胞の生存や幹細胞性維持に重要な、腫瘍組織における細胞間相互作用で鍵となる代謝物の探索と制御を目的とする。申請者が持つ独自の低栄養培養系に、アミノ酸などの代謝物を1種類ずつ添加することで、これまで他の栄養素の作用が混在し解析が困難であった1代謝物に起因する系統的な遺伝子発現解析、エピゲノム解析やメタボローム解析を、がん細胞と線維芽細胞の *in vitro* 共培養系や *in vivo* 共移植系に利用し実現する。具体的には、申請者独自の実験系を駆使して、本研究で、以下の2項目を検討し成果を得た。

(1) 腫瘍微小環境における細胞間相互作用で鍵となる代謝物の探索

(2) 代謝物を介した細胞間相互作用によるがん悪性化機構の解明と制御

(1) 腫瘍微小環境における細胞間相互作用で鍵となる代謝物の探索：本研究では、がん細胞と線維芽細胞や免疫細胞との代謝物を介した細胞間相互作用 (メタボロインタラクトーム) を解明することを目的とした。申請者らは、膵癌がん細胞株と線維芽細胞を免疫不全マウスに共移植すると腫瘍増殖を促進し、さらに、メタボローム解析から線維芽細胞由来の分岐鎖アミノ酸が腫瘍内で増加していることを発見した。さらに、本研究では細胞間相互作用で鍵となる代謝物をがん細胞とがん関連線維芽細胞の共培養系、共移植系を用いて、1細胞・空間的遺伝子発現解析やメタボローム解析から同定しており *in vitro in vivo* の評価を行い、膵癌、肝内胆管がんでは、線維芽細胞由来の分岐鎖アミノ酸 (BCAA) ががんの進展に寄与することを明らかとした。また、子宮頸がんでは、BCAA 経路とは全く別の代謝経路が活性化されることを見出だしていることから、癌腫特異的ながん細胞と線維芽細胞の代謝相互作用が存在することが示唆された。

(2) 代謝物を介した細胞間相互作用によるがん悪性化機構の解明と制御：がん細胞はロイシンなどの必須アミノ酸を mTOR 複合体を介したシグナル伝達系で感知することが知られている。しかし、その他アミノ酸によるがん悪性化機構は未だ不明な点が多い。本研究は、独自の低栄養培地に1アミノ酸のみを添加した培地を作成し各アミノ酸存在下で、線維芽細胞とがん細胞を24時間培養し、各アミノ酸で特異的に発現誘導される遺伝子群やメタボロームデータを用いて

各アミノ酸に代謝経路やシグナル伝達系など、がん悪性化機構を解明した。また、各種アミノ酸で特異的なヒストン修飾 (H3K4me3, H3K27ac) を解析し、プロモーター、エンハンサーの同定し、クロマチン相互作用のデータとの統合解析から、上流転写因子やアミノ酸トランスポーターなどの各アミノ酸で鍵となる機構の一端を解明した。また、申請者は、グルタミン標的遺伝子群、グルタミン標的エンハンサー、の解析から感知・制御因子候補を複数同定したほか、引き続き、がん線維芽細胞で高発現し、アミノ酸供給に寄与するメカニズムの解明を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nagata N et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Metagenomic identification of microbial signatures predicting pancreatic cancer from a multinational study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Murakami K et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Selective PPAR Modulator Pemafibrate and Sodium-Glucose Cotransporter 2 Inhibitor Tofogliflozin Combination Treatment Improved Histopathology in Experimental Mice Model of Non-Alcoholic Steatohepatitis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 In press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamatsugu K et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Antibody mimetic drug conjugate manufactured by high-yield Escherichia coli expression and non-covalent binding system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Protein Expr Purif.	6. 最初と最後の頁 106043
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pep.2021	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 Yoneshiro et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Metabolic flexibility via mitochondrial BCAA carrier SLC25A44 is required for optimal fever	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e66865
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.66865	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 該当する

1. 著者名 Muramatsu M et al.	4. 巻 296
2. 論文標題 Loss of Down syndrome critical region-1 leads to cholesterol metabolic dysfunction that exaggerates hypercholesterolemia in ApoE-null background	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100697	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 該当する

1. 著者名 Shirai et al.	4. 巻 112
2. 論文標題 TET1 upregulation drives cancer cell growth by aberrant enhancer hydroxymethylation of HMGA2 in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2855-2869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14897	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Morihiro et al.	4. 巻 143
2. 論文標題 Fluoruridine Oligomers Activated under Hypoxic Environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Am. Chem. Soc	6. 最初と最後の頁 2230-3347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.0c10732	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5件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大澤毅
2. 発表標題 造血細胞、エクソソーム、多階層オミクス解析からみる全身性疾患生物学
3. 学会等名 94回日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 大澤毅
2. 発表標題 がん微小環境におけるがん細胞と線維芽細胞の代謝相互作用
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 大澤毅
2. 発表標題 ニュートリオミクスから迫るがん悪性化機構の解明
3. 学会等名 第121回北海道癌談話会春季シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 大澤毅
2. 発表標題 ニュートリオミクス、がんと代謝
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 大澤毅
2. 発表標題 がん微小環境におけるエピジェネティック制御
3. 学会等名 第14回日本エピジェネティクス研究会（招待講演）
4. 発表年 2021年～2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 大澤 毅ら	4. 発行年 2022年
2. 出版社 技術情報協会	5. 総ページ数 530
3. 書名 疾患原因遺伝子・タンパク質の解析技術と創薬/診断技術への応用	

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 検体チューブ及び分注デッキ	発明者 大澤毅ら	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-055060	出願年 2021年	国内・外国の別 国内
産業財産権の名称 神経芽腫の診断に用いる新たな尿中代謝物	発明者 大澤毅ら	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2.特願2022-010494	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

- https://www.onc.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------