

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670163

研究課題名(和文) 自然癌化モデルを用いた癌化に関する特異的な代謝機構の解明と治療標的の探索

研究課題名(英文) Identification of the specific metabolic system for cellular senescence and tumorigenesis

研究代表者

南嶋 洋司 (Minamishima, Yoji Andrew)

九州大学・生体防御医学研究所・特任准教授

研究者番号：20593966

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)：マウス胎仔の初代培養線維芽細胞(MEFs)を用い、(1)細胞の自然老化・自然癌化(不死化)モデルの樹立、(2)老化あるいは癌化(不死化)した細胞に特徴的な代謝産物の探索、を行い、それら細胞老化・癌化に特徴的な代謝産物の増減パターンのvalidationを行い、細胞老化・細胞癌化に実際に関与した代謝酵素反応を絞り込み、それらの代謝酵素の(a)過剰発現細胞株、(b)発現ノックダウン細胞株、(c)遺伝子破壊細胞株を樹立、(a)と(b)については、薬剤(テトラサイクリン)によって代謝酵素の発現をコントロール出来るシステム、すなわち、細胞の老化や癌化をコントロールできるシステムを樹立中である。

研究成果の概要(英文)：We have performed metabolome analysis on fresh, senescent, and immortalized stage in “cellular senescence to spontaneous immortalization model” using mouse embryonic fibroblasts (MEFs) 3T3 technique.

Several senescent stage-specific and immortalization-specific metabolic pathways were determined, and tetracycline-inducible tunable senescence / immortalization cellular model were under development.

研究分野：細胞内エネルギー代謝

キーワード：細胞老化 代謝 不死化 癌化 低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

2006年頃より膠芽腫や傍神経節腫、および一部の白血病において、ミトコンドリアTCA回路の酵素であるイソクエン酸脱水素酵素 (IDH1~2)、コハク酸脱水素酵素 (SDH) やフマル酸ヒドラーゼ (FH) などの遺伝子変異が相次いで報告された。これを契機に、Warburg効果の提唱以来久しぶりに“癌と代謝”という領域が脚光を浴びるようになってきた (Kaelin WG Jr., Cancer Cell. 2009)。さらには、IDHの変異によって産生される2-HG (2-hydroxyglutarate) や、フマル酸加水酵素 (FH) の変異によって蓄積したフマル酸のように、代謝異常によって生じた癌代謝物が細胞の癌化に深く関与するという概念も定着しつつあった (Kaelin WG Jr, McKnight SL, Cell. 2013)。「代謝の異常が細胞の癌化を引き起こすのであれば、それは即ち癌特異的な代謝経路が創薬のターゲットとなり得る」という考えが広まり、“癌と代謝”という領域が、各種オミクス技術を駆使して今後も集中的に研究されていく分野と思われ始めていた。

## 2. 研究の目的

本研究開始当時、oncometabolite / proto-oncometabolite (癌代謝物) と総称される異型代謝物と細胞の癌化との密接な関係、すなわち“癌と代謝”という概念が急速に注目されつつあった。しかし、代謝関連遺伝子の変異と、その結果として生じる代謝異常に関しては数多報告があるものの、正常な細胞が癌化してゆく過程でどのように細胞内代謝が変化して癌化に関与するのかという点に関しては、ほとんど知見がなかった。そこで申請者は、正常細胞が不死化・癌化していくモデルを用いて、「正常細胞が癌化する過程において代謝のどこがどう変化するのか」、「どの代謝経路の変化が癌化に直接関与しているのか」という観点から、(1) 癌のバイオロジーの未知の領域の探索と、(2) 近未来における新しい癌治療の標的の探索を試みたいと考え、本研究に着手した。

## 3. 研究の方法

研究計画全体を下記3つの実験系に大別し、研究目標達成を目指した。

(1) 不死化/癌化の前・後での代謝産物の比較解析

- ✓ 3T3 アッセイを用いて、正常細胞が癌化する前後での代謝産物の比較解析を行う。
- (2) 癌化の原因となり得る代謝異常および新規癌代謝物候補の探索

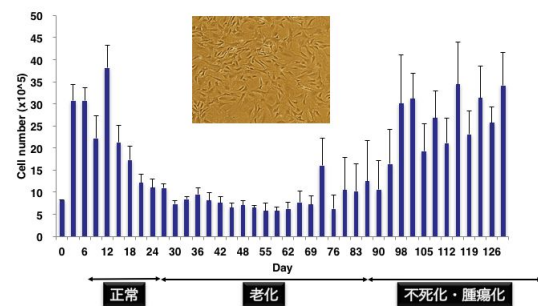
✓ 癌化に関与したと思われる癌特異的な代謝反応・癌特異的な代謝産物を探索する。

(3) 癌治療のターゲットとなる癌特異的な代謝経路・癌代謝物の同定

- ✓ 同定した癌特異的な代謝経路 (あるいは癌特異的な代謝産物) を正常細胞に導入して正常細胞が癌化することを確認し、最終的に新規癌治療標的を同定する。

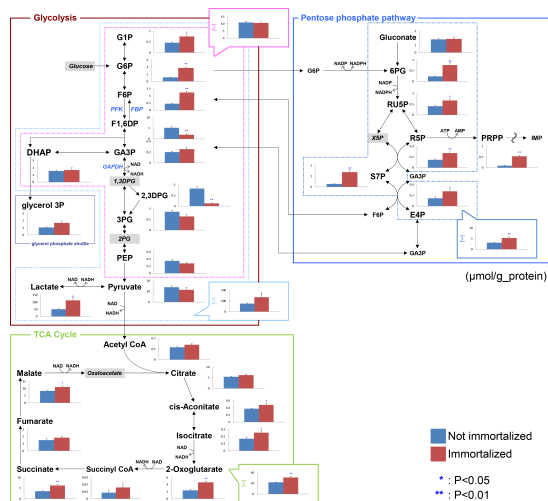
## 4. 研究成果

二年次までに、マウス胎仔の初代培養線維芽細胞 (MEFs) を用い、(1) 細胞の自然老化・自然癌化 (不死化) モデルの樹立、および、(2) 老化あるいは癌化 (不死化) した細胞に特徴的な代謝産物の探索、を完了し、当初のロードマップ通りにプロジェクトを進捗させることが出来た【図1】。



【図1】細胞の自然老化・自然癌化 (不死化) モデルの樹立。マウス胎仔線維芽細胞 (MEFs) の 3T3 アッセイを用いた。

最終年度は、それら細胞老化・癌化に特徴的な代謝産物の増減パターンの validation を行い、細胞老化・細胞癌化に実際に関与した代謝酵素反応を絞り込み、それらの代謝酵素の (a) 過剰発現細胞株、(b) 発現ノックダウン細胞株、(c) 遺伝子破壊細胞株を樹立することで、細胞老化・細胞癌化を誘導することが出来る代謝パスウェイを複数同定した。また、(a) と (b) については、薬剤 (テトラサイクリン) によって代謝酵素の発現をコントロール出来るシステム、すなわち、細胞の老化や癌化をコントロールできるシステムを樹立中である。



【図2】メタボローム解析結果の一部 (正常細胞 vs. 不死化細胞での代謝産物の比較) その他、老正常細胞 vs. 老化細胞、化細胞 vs. 不死化細胞、などの比較を行い、老化細胞・不死化細胞特異的な代謝システムを同定した。

さらに、現所属先で既に樹立されていたヒトの正常線維芽細胞の細胞老化システムを用いて、マウスの胎子の細胞を老化・癌化へと導くシステムが、ヒトの成体由来の細胞の老化・癌化をも同様にコントロールできることを確認中である(Toramaru-Oyaizu T et al., manuscript in preparation)。

また、研究遂行中に、細胞老化・癌化に密接な関与があると思われた代謝パターンは、細胞の老化・癌化に関係無く、dishに播いた細胞の密度によっても全く異なるといった、予想外かつ興味深い、かつ要注意な知見をも得ることが出来た(Toramaru-Oyaizu T et al., manuscript in preparation)。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

(1) Futatsugi K, Tokuyama H, Shibata S, Naitoh M, Kanda T, Minakuchi H, Yamaguchi S, Hayashi K, Minamishima YA, Yanagita M, Wakino S, Itoh H:

Obesity-induced kidney injury is attenuated by amelioration of aberrant PHD2 activation in proximal tubules  
*Sci Rep* 6:36533, 2016

(2) Tanaka N, Kosaka T, Miyazaki Y, Mikami S, Niwa N, Otsuka Y, Minamishima YA, Mizuno R, Kikuchi E, Miyajima A, Sabe H, Okada Y, Uhlén P, Suematsu M, Oya M:

Acquired platinum resistance involves epithelial-to-mesenchymal transition through ubiquitin ligase FBX032 dysregulation  
*JCI insight* 1(18):e83654, 2016

(3) Suhara T, Hishiki T, Kasahara M, Hayakawa N, Oyaizu T, Nakanishi T, Kubo A, Morisaki H, Kaelin WG Jr, Suematsu M, Minamishima YA<sup>§</sup> (<sup>§</sup>Corresponding author):  
Inhibition of the oxygen sensor PHD2 in the liver improves survival in lactic acidosis by activating the Cori cycle  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 112(37):11642-47, 2015

(4) Kikuchi D, Minamishima YA, Nakayama K:  
Prolyl-hydroxylase PHD3 interacts with pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1 and regulates the cellular PDH activity  
*Biochem Biophys Res Commun* 451(2):288-294, 2014

[学会発表](計18件)

(1) Oyaizu-Toramaru T, Suhara T, Hayakawa N, Nakamura T, Minamishima S, Kubo A, Yamaguchi K, Hishiki T, Morisaki H, Suematsu M, Minamishima YA\* (\*speaker)  
Targeting the oxygen sensor PHD (prolyl

hydroxylase) for the treatment of lethal lactic acidosis  
[2-YIA-15 ~ 18] Candidates for Young Investigator Outstanding Oral Presentation Award Sessions (Endocrine, Metabolism)【英語】年会優秀発表賞受賞(指名)  
第90回日本薬理学会年. 2017年3月16日、長崎ブリックホール/長崎新聞文化ホールにて

(2) Oyaizu-Toramaru T, Suhara T, Hayakawa N, Nakamura T, Minamishima S, Kubo A, Yamaguchi K, Hishiki T, Morisaki H, Suematsu M, Minamishima YA\* (\*speaker)  
Targeting oxygen sensor PHD for the treatment of metformin-associated lactic acidosis (MALA)

Keystone Symposia “Adaptations to Hypoxia in Physiology and Disease (X4)” . 3/7/2017, Whistler Conference Centre, Whistler, BC, Canada

(3) 小柳津-寅丸智子、壽原朋宏、早川典代、中村貴、南嶋しづか、山口京二、菱木貴子、森崎浩、末松誠、南嶋洋司\* (\*発表者)  
低酸素センサーPHDを標的としたメトホルミン誘発乳酸アシドーシス(MALA)治療法の開発

ポスター発表  
第39回日本分子生物学会年会. 2016年11月30日、パシフィコ横浜にて

(4) 岸本翔太郎、早川典代、末松誠、南嶋洋司\* (\*発表者)  
膵癌細胞は間質に豊富に存在するグリコサミノグリカンを栄養源にしている  
口頭およびポスター発表  
第14回がんハイポキシア研究会. 2016年11月4日、岐阜グランドホテルにて

(5) Kishimoto S\*, Hayakawa N, Suematsu M, Minamishima YA (\*speaker)  
Glycosaminoglycan as an energy source for pancreatic cancer cells: A novel potential therapeutic target

International Sessions IS6 : Metabolic feature of cancers for anti-cancer therapy  
【英語】口頭発表(指名)  
第75回日本癌学会総会. 2016年10月7日、パシフィコ横浜にて

(6) Oyaizu-Toramaru T, Suhara T, Hayakawa N, Nakamura T, Minamishima S, Yamaguchi K, Hishiki T, Morisaki H, Suematsu M, Minamishima YA\* (\*speaker)  
Targeting hypoxic response for the treatment of diseases: Renal anemia and lethal lactic acidosis  
Symposium 2S09: Hypoxia and Disease

【英語】口頭発表(指名)

第89回日本生化学会大会. 2016年9月26日、  
仙台国際センターにて

(7) 岸本翔太郎、早川典代、末松誠、南嶋洋司\* (\*発表者)

低酸素・低栄養環境下で増殖する膵管癌  
(PDAC)は、間質のグリコサミノグリカン  
(GAG)を栄養源にしている

ポスター発表

第4回低酸素研究会. 2016年7月23日、早  
稲田大学先端生命医科学センター (TWIns)  
にて

(8) 寅丸智子\*、壽原朋宏、早川典代、中村  
貴、南嶋しづか、菱木貴子、森崎浩、末松誠、  
南嶋洋司 (\*発表者。Y.I.A.優秀賞受賞)

Prolyl hydroxylase (PHD) as a therapeutic  
target for metformin-associated lactic  
acidosis

口頭およびポスター発表

第4回低酸素研究会. 2016年7月23日、早  
稲田大学先端生命医科学センター (TWIns)  
にて

(9) 岸本翔太郎、早川典代、末松誠、南嶋洋司\* (\*発表者)

膵癌細胞は間質のグリコサミノグリカンを  
栄養源にしている

ポスター発表

第4回がんと代謝研究会. 2016年7月8日、  
かごしま県民交流センターにて

(10) Kishimoto S\*, Minamishima YA\*,  
Hayakawa N and Suematsu M (\*Equally  
contributed)

Glycosaminoglycan as an energy source for  
pancreatic cancer cells

10th AACR-JCA Joint Conference on  
Breakthroughs in Cancer Research: From  
Biology to Therapeutics. 2/18/2016, Hyatt  
Regency Maui, Maui, Hawaii, U.S.A.

(11) 壽原朋宏、菱木貴子、笠原正貴、早川  
典代、小柳津智子、中西豪、久保亜紀子、森  
崎浩、Kaelin WG Jr、末松誠、南嶋洋司\* (\*  
発表者)

致死的乳酸アシドーシスに対する、低酸素セ  
ンサーPHDを標的とした新しい治療法の開発

口頭およびポスター発表

新学術領域 酸素生物学・ダイニングコード  
合同若手会議. 2016年1月27日、一宮シー  
サイドオーツカにて

(12) 壽原朋宏\*、菱木貴子、笠原正貴、早川  
典代、小柳津智子、中西豪、久保亜紀子、森  
崎浩、Kaelin WG Jr、末松誠、南嶋洋司 (\*  
発表者)

低酸素応答によるCori回路の制御機構の解  
明～肝臓における低酸素応答を標的とした

新たな乳酸アシドーシスの治療法の開発～

口頭およびポスター発表

BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会、第  
88回日本生化学会大会 合同大会). 2015年  
12月4日、神戸ポートアイランドにて

(13) 壽原朋宏、菱木貴子、笠原正貴、早川  
典代、小柳津智子、中西豪、久保亜紀子、森  
崎浩、Kaelin WG Jr、末松誠、南嶋洋司\* (\*  
発表者)

低酸素センサーPHD2を阻害するとCori回路  
の肝内経路の活性化を介して致死的乳酸ア  
シドーシスの生存率が改善される

口頭およびポスター発表

第27回高遠シンポジウム. 2015年8月26日、  
比叡山会館にて

(14) Suhara T\*, Hishiki T, Kasahara M,  
Hayakawa N, Oyaizu T, Nakanishi T, Kubo A,  
Morisaki H, Kaelin WG Jr, Suematsu M,  
Minamishima YA (\*発表者。Y.I.A.優秀賞受  
賞)

Inhibition of the oxygen sensor PHD2 in the  
liver improves survival in lactic acidosis  
by activating the Cori cycle

口頭およびポスター発表

第3回低酸素研究会. 2015年7月25日、早  
稲田大学先端生命医科学センター (TWIns)  
にて

(15) 南嶋洋司

低酸素応答とミトコンドリアストレス

ワークショップ「2WE: 酸素リモデリング・  
レドックスシグナルと蛋白修飾の新たな  
潮流」

口頭発表(指名)

第15回日本蛋白質科学会年会. 2015年6月  
25日、徳島市あわぎんホールにて

(16) 壽原朋宏、菱木貴子、笠原正貴、早川  
典代、小柳津智子、中西豪、久保亜紀子、森  
崎浩、Kaelin WG Jr、末松誠、南嶋洋司\* (\*  
発表者)

肝臓における低酸素応答はCori回路の活性  
化を介して血中乳酸レベルを制御している

口頭およびポスター発表(一般)

第13回がんとハイポキシア研究会. 2015年  
6月5日、国立遺伝学研究所にて

(17) Suhara T, Hishiki T, Kasahara M,  
Hayakawa N, Oyaizu T, Nakanishi T, Kubo A,  
Morisaki H, Suematsu M, Minamishima YA\*  
(\*speaker)

Inactivating HIF-prolyl hydroxylase PHD2  
in liver improves survival after lactic  
acidosis by activating Cori cycle

Keystone Symposia "Hypoxia: From Basic  
Mechanisms to Therapeutics (E3)".  
5/14/2015, Royal Dublin Society, Dublin,  
Ireland

(18) 壽原朋宏、笠原正貴、菱木貴子、早川典代、南嶋洋司\*、末松誠(\*発表者)  
低酸素応答による乳酸代謝制御機構  
指定口頭演題およびポスター発表  
第12回がんとハイポキシア研究会。2014年11月21日、ホテルマリターレ創世佐賀にて

〔図書〕(計5件)

(1) 小柳津-寅丸智子、壽原朋宏、南嶋洋司  
低酸素応答による代謝制御とドラッグ・リポジショニング  
ファルマシア ISSN: 0014-8601. 53(3): 234-237, 2017

(2) 壽原朋宏、長田大雅、南嶋洋司、武田純三、森崎浩  
敗血症における乳酸の役割 低酸素応答は血中乳酸値を下げるか?  
臨床麻酔 ISSN: 0387-3668. 40(4): 599-607, 2016

(3) 南嶋洋司  
酸素濃度センサー分子・PHDによる細胞内代謝調節  
生化学 PMID: 27483947 ISSN: 0037-1017. 88(3): 302-307, 2016

(4) 南嶋洋司、久保亜紀子  
メタボローム解析  
腎臓内科・泌尿器科 ISSN 2188-9147. 2(2): 203-209, 2015

(5) 南嶋洋司、末松誠  
低酸素応答-細胞内エネルギー代謝の低酸素モードとは?  
実験医学 ISSN 0288-5514. 32(15): 2393-2403, 2014

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

なし

取得状況(計0件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://orcid.org/0000-0001-7995-9318>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

南嶋 洋司 (Yoji Andrew Minamishima)  
慶應義塾大学・医学部・講師(研究開始時)  
九州大学・生体防御医学研究所・特任准教授  
(研究終了時)

研究者番号: 20593966

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

久保 亜紀子 (Akiko Kubo)  
慶應義塾大学・医学部・特任講師  
研究者番号: 50455573

菱木 貴子 (Takako Hishiki)  
慶應義塾大学・医学部・特任講師  
研究者番号: 10338022

杉浦 悠毅 (Yuki Sugiura)  
慶應義塾大学・医学部・特任講師  
研究者番号: 30590202

(4) 研究協力者

なし