

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19378

研究課題名(和文) 肝癌幹細胞から成熟癌細胞への分化に伴う代謝リプログラミングのシステム解析

研究課題名(英文) Systemic analysis of metabolic reprogramming of live cancer stem cells

研究代表者

Qin XianYang (Qin, Xian-Yang)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・特別研究員

研究者番号：60756815

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)：網羅的オミクス解析を駆使した肝癌再発予防薬非環式レチノイド(ACR)の標的同定の結果から、1)メタボローム解析では、ACRがアラキドン酸を阻害し癌化進展を抑制する方向に働くことを見出した。分子機構として、アラキドン酸がROS/TG2シグナルにより肝障害に関与することが分かった。2)トランスクリプトーム解析では、MYCN陽性EpCAM陽性肝癌幹細胞がACRにより選択的に排除されることを見出した。プロテオーム解析/メタボローム解析では、不飽和脂肪酸がEpCAM陽性細胞で亢進していることを見出した。不飽和脂肪酸は、慢性肝障害を引き起こすとともに肝癌幹細胞のstemnessを維持することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Acyclic retinoid (ACR) is a synthetic vitamin A-like compound capable of preventing the recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC). I performed omics analyses to identify molecular targets of ACR. In vivo metabolome analysis revealed that inhibition of biosynthesis of unsaturated fatty acids such as arachidonic acid (AA) but not glucose metabolism played a crucial role in the prevention of hepatic tumorigenesis by ACR. In vitro mechanical analysis showed a critical role of induced ROS/TG2 signaling in liver injury by AA. A genome-wide transcriptome analysis identified that an MYCN+EpCAM+ cancer stem cell (CSC)-like subpopulation was selectively depleted by ACR. Further proteome/metabolome analyses showed unsaturated fatty acids were enriched in EpCAM+ CSC-like HCC cells compared with EpCAM- cells. These findings suggested a potential role of unsaturated fatty acid-associated metabolic changes during hepatic tumorigenesis, which might serve as a therapeutic target for HCC prevention.

研究分野：消化器内科学

キーワード：不飽和脂肪酸 がん幹細胞 肝発がん MYCN オミクス解析 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

病態等の表現形発現に直結する特異的な代謝物・代謝経路とその変化を同定することは癌の早期診断や予後診断、および有効な治療法の開発につながる。正常細胞でのミトコンドリア好気呼吸に依存する ATP 産生に対し、癌細胞では酸素の存在にも関わらず、好気性解糖（グルコースの乳酸への変換）を主とした生体エネルギー代謝経路にシフトすることは、Warburg（ワールブルグ）効果として知られている。しかし、多くの癌では adenoma の段階から既に代謝リプログラミングが見られ、その後のステージごとの代謝変化は見られない (Farshidfar et al. *J Clin Oncol*, 2014)。さらに、発癌過程の早期段階にある癌の“芽（クローン）”では、ミトコンドリアの機能自体は正常であることが報告され、ワールブルグ効果以外の代謝経路も関与していることが考えられる。癌細胞の代謝リプログラミングがどの時点でどのような制御メカニズムによって起きるのかはまだ未明なことが多い。

肝発癌の過程では、肝炎ウイルスの持続感染などの発癌要因により、肝全体がひとつの“発癌フィールド”となり、多中心性に、また独立した形で複数の癌の“芽（クローン）”が発生してくる。非環式レチノイド（ACR）は副作用を惹起することなく肝癌治療後の再発を有意に抑制することから、世界初の肝癌再発抑制剤として期待されている (Muto et al., *N Engl J Med*, 1999)。その作用機序の 1 つの特徴は、肝癌幹細胞（CSC）を標的とした癌の化学予防である。CE-TOFMS 及び NMR を用いたメタボローム解析による ACR 処理した未分化肝 CSCs を多く含む肝癌細胞株 JHH7 と正常肝細胞株 Hc の代謝変化を比較したところ、ACR が癌細胞特異的に PDK4 遺伝子発現を誘導し、ATP 合成や細胞増殖を抑制することが明らかにした (Qin et al. *PLoS One*, 2013)。面白いことに、PDK4 はミトコンドリア好気呼吸を介した ATP 合成を抑制する酵素で、JHH7 細胞と Hc 細胞の乳酸量も差が見られず、未分化な CSC の段階ではワールブルグ効果を起きていないことが示唆された。

2. 研究の目的

ACR をケミカルプローブとして用い、網羅的オミクス解析により、その抗癌作用の分子基盤解明とその結果に基づいて肝発癌の adenoma 段階及び肝 CSCs の代謝リプログラミングの解明を目指す。

3. 研究の方法

1) 肝発癌における不飽和脂肪酸の役割に関する検討

db/db 肥満マウス（オス、4 週齢、各群 6 匹ずつ）に化学肝発癌物 DEN を 2 週間投与し、その後 ACR を 0、0.03、0.06% 含む飼料を 34 週間投与した。マウス肝組織を回収し、CE-TOFMS によるイオン性代謝物質または

LC-TOFMS による脂溶性代謝物質のメタボローム解析を行った。Loss of Function 実験は、siRNA/shRNA や化学阻害剤で行った。活性酸素種（ROS）は CM-H2DCFDA を用い視覚的に半定量、核トランスグルタミナーゼ（TG2）活性は、その作用で核内蛋白質に取り込まれた 5-BAPA 量を streptavidin 結合 TRITC を用い視覚的に半定量した。遺伝子組換えにより蛍光タンパク質（EGFP）の遺伝子と融合させることで、TG2 の変異タンパク質の細胞内分布を蛍光顕微鏡で観察した。

2) 肝 CSCs における不飽和脂肪酸の役割に関する検討

正常肝細胞株 Hc と肝癌細胞株 JHH7 において、次世代シーケンスを用いた CAGE トランスクリプトーム解析により ACR の癌特異的標的遺伝子を同定した。免疫染色解析とフローサイトメトリーにより MYCN と肝 CSC マーカーとの共局在を観察した。FACS 法により EpCAM 陽性肝 CSCs と EpCAM 陰性肝癌成熟細胞を樹立した。nLC-MS/MS を用いたプロテオーム解析並びに LC-TOFMS を用いたメタボローム解析により EpCAM 陽性/陰性細胞のタンパク質/脂溶性代謝物質のプロファイルを比較した。

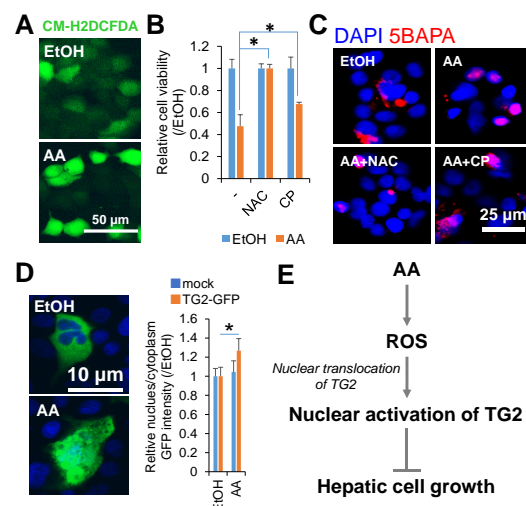


Figure 1. Arachidonic acid (AA) suppressed hepatic cell growth through ROS-mediated activation of nuclear TG2. (A) AA induced the ROS production as detected using CM-H2DCFDA staining. Blockade of ROS production by antioxidants N-acetyl-L-cysteine (NAC) and corn oligopeptide (CP) prevented AA-induced (B) suppression of cell growth and (C) activation of nuclear TG2 and in the hepatic cells. (D) AA induced nuclear translocation of TG2 in the GFP-TG2 transfected hepatic cells. (E) A schematic model of a ROS-mediated TG2-dependent signaling pathway underlying AA-induced growth suppression of hepatic cells. * $P < 0.05$.

4. 研究成果

1) 肝発癌における不飽和脂肪酸の役割に関する検討

in vivoマウス肝発癌モデルを用いたメタボローム解析では、肝発癌における adenoma 段階において、グルコース代謝異常が見られない代わりに、脂質代謝が亢進されており、ACR が不飽和脂肪酸の1種であるアラキドン酸の代謝を阻害し癌化進展を抑制する方向に働くことを見出した。細胞培養系を用いた検討では、アラキドン酸は濃度依存的に肝細胞増殖を抑制した。その分子機構として、アラキドン酸が ROS の生産を介してタンパク質架橋酵素 TG2 の核移行と活性化を誘導することが分かった。shRNA と阻害剤を用いて TG2 の機能を欠損させると、アラキドン酸による細胞増殖抑制がブロックされた(Figure 1)。核 TG2 は転写因子 Sp1 の架橋不活性化反応により細胞死を促進することを見出しており (Tatsukawa et al. *Gastroenterology*, 2009)、アラキドン酸が ROS/TG2 シグナルにより肝障害に関与することが示唆された。

2) 肝 CSCs における不飽和脂肪酸の役割に関する検討

トランスクリプトーム解析では、癌遺伝子 MYCN は、正常肝細胞株 Hc では転写されず、肝癌細胞株 JHH7 でのみ高い転写を受けており、その転写は ACR 処理によって強く抑制される標的マーカーであることが分かった。米国 Gene Expression Omnibus (GEO) データベースを用いた臨床データの解析では、肝癌組織中の MYCN 遺伝子発現は、CSC マーカー AFP、EpCAM、CD133、DLK1、GPC3 及び Wnt/ β カテニンシグナル経路マーカー CTNNB1、DKK1、BAMBI、CCND1 と有意な正の相関、肝癌成熟細胞マーカー CYP3A4、UGT2B7 と有意な負の相関が見出した。免疫染色解析により、肝癌細胞並びに肝癌組織 (Figure 2) では MYCN 陽性 EpCAM 陽性肝

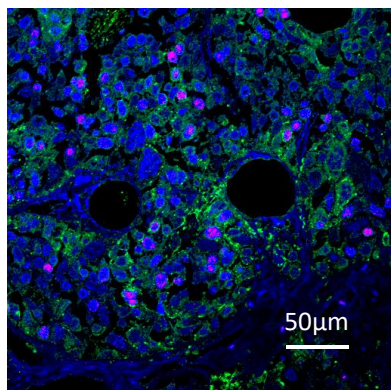


Figure 2. MYCN positive liver cancer stem cells. A fluorescent microphotograph of a section of a patient's hepatocellular carcinoma (HCC) tissues stained with MYCN (red), a cancer stem cell (CSC) marker EpCAM (green) and DNA (blue).

CSC 集団の存在が観察され、これらの細胞が ACR 処理によって特異的に排除された。FACS 法により樹立された EpCAM 陽性肝 CSCs と EpCAM 陰性肝癌成熟細胞を用いた解析では、EpCAM 陽性細胞は高い MYCN 発現並びに ACR に対する感受性を示した。さらに、プロテオーム解析では、脂肪酸不飽和化酵素の発現が EpCAM 陽性肝 CSCs で亢進していることを見出した。メタボローム解析では、一価不飽和脂肪酸が EpCAM 陽性肝 CSCs で約 6 倍高いことを見出した。

不飽和脂肪酸は、慢性肝障害を引き起こすとともに肝癌幹細胞の stemness を維持するなど多彩な機能を発揮し、肝癌予防の標的となる可能性が示唆された。

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 Qin XY, Suzuki H, Honda M, Okada H, Kaneko S, Inoue I, Ebisui E, Hashimoto K, Carninci P, Kanki K, Tatsukawa H, Ishibashi N, Masaki T, Matsuura T, Kagechika H, Toriguchi K, Hatano E, Shirakami Y, Shiota G, Shimizu M, Moriwaki H, Kojima S. Prevention of hepatocellular carcinoma by targeting MYCN-positive liver cancer stem cells with acyclic retinoid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115 (19): 4969-4974 (2018). 査読有

② Qin XY, Hara M, Arner E, Kawaguchi Y, Inoue I, Tatsukawa H, Furutani Y, Nagatsuma K, Matsuura T, Wei F, Kikuchi J, Sone H, Daub C, Kawaji H, Lassmann T, Itoh M, Suzuki H, Carninci P, Hayashizaki Y; FANTOM consortium, Kokudo N, Forrest ARR, Kojima S. Transcriptome analysis uncovers a growth-promoting activity of orosomucoid-1 on hepatocytes. *EBioMedicine*. 24:257-66. (2017) 査読有

[学会発表] (計 12 件)

① Qin XY, Kojima S. Selective depletion of liver cancer stem cells by retinoids. JSPS Core-to-core Program Symposium, 2018-1-29, Tokyo, Japan. [口頭]

② 秦 咸陽、小嶋 聡一. 非環式レチノイドによる肝癌化学予防の分子機構解明に向けた網羅的解析の取り込み. 日本レチノイド研究会第28回学術集会, 2017-11-18, 神戸.[口頭]

③ Qin XY, Shrestha R, Sekihara S, Wada A, Kojima S. Role of transglutaminase 2 in selective deletion of MYCN+CD133+ liver cancer stem cells by acyclic retinoid. DEBRECEN UNIVERSITY Symposium “Transglutaminases in Medicine”, 2017-8-4, Debrecen, Hungary. [口頭]

④ 秦 咸陽、原 詳子、河口 義邦、古谷 裕、永妻 啓介、松浦 知和、國土 典宏、小嶋 聡一. 肝再生時の新しい肝細胞増殖マーカーリポカリンファミリー分子オロソムコイド 1. 第53回日本肝臓学会総会, 2017-6-9, 広島.[口頭]

⑤ Qin XY, Hara M, Arner E, Kawaguchi Y, Kokudo N, Suzuki H, Carninci P, Forrest A, Kojima S. Hepatic orosomuroid is an additional essential regulator promoting hepatocyte proliferation during liver regeneration. 2016-11-11, Boston, MA, USA. [ポスター]

⑥ 秦 咸陽、小嶋 聡一. ベイジアンネットワーク解析を用いた肝再生調節因子の探索. 情報計算化学生物学会 CBI 学会 2016 年大会, 2016-10-27, 東京. [口頭]

⑦ 秦 咸陽、原 詳子、小嶋 聡一. リポカリンファミリー分子による肝細胞増殖の制御. 日本レチノイド研究会第 27 回学術集会, 2016-10-23, 東京. [口頭]

⑧ 秦 咸陽、原 詳子、鈴木 治和、小嶋 聡一. トランスクリプトーム解析からわかった肝類洞内皮細胞と肝細胞の相互作用による新規肝再生制御因子リポカリン Orm1 の同定. 第23回肝細胞研究会, 2016-7-7, 大阪.[口頭]

⑨ Qin XY, Shirakami Y, Ishibashi N, Shimizu M, Moriwaki H, Kojima S. Acyclic retinoid inhibits aberrant lipogenesis to prevent diethylnitrosamine-induced hepatic tumorigenesis. FASEB's 3rd International Conference on Retinoids, 2016-6-22, West Palm Beach, FL, USA. [ポスター]

⑩ 秦 咸陽、白上 洋平、石橋 直人、清水 雅仁、森脇 久隆、小嶋 聡一. 脂質代謝を標的とした非環式レチノイドによる肝発癌の化学予防. 日本ケミカルバイオロジー学会 第11回年会, 2016-6-15, 京都. [ポスター]

⑪ 秦 咸陽、小嶋 聡一. 新規肝(癌)細胞増殖因子リポカリン Orm1. 第20回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2016-5-30, 大分. [ポスター]

⑫ 秦 咸陽、Shrestha Rajan、小嶋 聡一. 網羅解析による非環式レチノイドの肝癌再発化学予防標的シグナルの同定. 第52回日本肝臓学会総会, 2016-5-19, 千葉. [口頭]

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

① 非環式レチノイドによる MYCN 陽性肝がん幹細胞の排除
http://www.riken.jp/pr/press/2018/20180424_1/

② 肝細胞の増殖を促進する肝再生制御因子 Orm1
http://www.riken.jp/pr/press/2017/20171024_3/

6. 研究組織

(1)研究代表者

秦 咸陽 (Xian-Yang Qin)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・特別研究員

研究者番号 : 60756815

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :

(4)研究協力者

()