

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08663

研究課題名（和文）癌代謝変容機構解明による癌浸潤・転移制御法開発へむけた基盤研究

研究課題名（英文）The research for developing a method for controlling cancer invasion and metastasis by elucidating the mechanism of cancer metabolic change

研究代表者

遠藤 元誉（Endo, Motoyoshi）

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：40398243

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：癌細胞において解糖系を介したエネルギー産生が増加する「代謝変容」が生じた場合には、浸潤・転移能が亢進していることが報告されている。本研究では、癌細胞における慢性炎症因子の発現と代謝変容の相関解析を行った。慢性炎症因子ANGPTL2を高発現する肺癌細胞では、転写因子ZEB1の誘導を介して細胞内に糖を取り込むGLUT3の発現が増強し、解糖系優位な代謝変容が引き起こされ、浸潤・転移能が亢進していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性炎症は様々な疾患の増悪因子であり、癌においても浸潤能や転移能を高めることが知られている。本研究では、慢性炎症因子の1つであるANGPTL2が肺癌細胞に作用すると、癌細胞の代謝が変化し癌細胞の悪性度（転移能や浸潤能の亢進）が高まることを明らかにした。肺癌患者のサンプルを用いた解析においても、in vitro実験の結果と同様の結果を得られていることから、肺癌細胞のANGPTL2発現抑制は癌浸潤・転移抑制につながることを示された。

研究成果の概要（英文）：It is known that the change of energy metabolism from oxidative phosphorylation to glycolysis in cancer cells promotes tumor aggressiveness and malignancy. In this study, we showed that tumor cell-derived ANGPTL2 upregulated expression of GLUT3 and activated glycolytic metabolism. ANGPTL2 signaling through integrin $\alpha 5 \beta 1$ increased GLUT3 expression through increasing TGF- β signaling and its downstream transcription factor ZEB1. ANGPTL2 knockdown in lung cancer cell lines decreased TGF- β , ZEB1 and GLUT3 expression and antagonized glycolytic metabolism. In addition, ANGPTL2 expression levels correlated with GLUT3 expression in primary tumor cells from lung cancer patients. Overall, tumor cell-derived ANGPTL2 expression promotes activities associated with glycolytic metabolism in lung cancer cells by activating TGF- β -ZEB1-GLUT3 signaling.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：肺癌 癌浸潤・転移 癌代謝 ANGPTL2

1. 研究開始当初の背景

我が国において癌は最も死亡数の多い疾患であり、その浸潤・転移メカニズムを解明し、有効な治療法を開発することは急務である。浸潤度の高い癌細胞では、酸化リン酸化によるエネルギー産生が低下し、細胞質における嫌気性解糖系を介したエネルギー産生が増加する代謝変容が生じ、癌浸潤・転移能が亢進していることが報告されている。研究代表者はこれまでに慢性炎症因子のひとつであるアンジオポエチン様因子 (ANGPTL) 2 を介した癌浸潤・転移促進機構を明らかにしてきた。その解析過程において ANGPTL2 を強く発現し高頻度転移能を有する癌細胞と ANGPTL2 低発現で低頻度転移能を示す癌細胞では、細胞の代謝が異なっていることを見出した。また ANGPTL2 の発現には、プロモーター部位のメチル化が関与しているが、研究代表者は miRNA が ANGPTL2 の発現制御に関与していることを明らかにした。以上の結果より、研究代表者は ANGPTL2 による癌浸潤・転移を促進させる原因の 1 つとして、癌細胞の代謝変容が関与している可能性を考え、本研究課題の着想に至った。

2. 研究の目的

研究代表者は、肺癌患者の原発巣における ANGPTL2 の発現と無病生存期間(DFS)との相関解析にて、肺癌原発巣で ANGPTL2 の発現が高い患者は発現が低い患者と比較して無病生存期間 (DFS) が短縮していることを明らかにしていた。そのメカニズムとして、癌細胞から分泌される ANGPTL2 がインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介して、Rac を活性化し癌細胞自身の遊走能を促進させること、NF- κ B の活性化を介して炎症関連遺伝子を誘導させ、癌細胞の癌微小環境を整えること、p38 MAPK を活性化し、癌浸潤・転移に重要なマトリックスメタロプロテアーゼ (MMPs) の誘導を促進させること、を見出している。また、ANGPTL2 は肺癌のみならず、乳癌、骨肉腫、大腸癌など様々な癌においても肺癌と同様に癌浸潤・転移を促進させ、抗癌剤に対する治療抵抗性などを獲得させることも示した。一方、癌細胞の ANGPTL2 をノックダウンさせた細胞株を樹立し、マウス担癌モデルにおける転移能および生存期間の解析を行った結果、癌細胞における ANGPTL2 の発現低下は癌浸潤・転移を抑制させることを明らかにした。以上の結果より、癌細胞における ANGPTL2 の発現・機能抑制は癌の進展・浸潤を抑制すると考えられた。そのため研究代表者は、ANGPTL2 の発現メカニズム、ANGPTL2 の下流シグナルについて更なる解析を行い、miRNA が ANGPTL2 の発現制御に関与していること、ANGPTL2 高発現の癌細胞では、解糖系シグナルが亢進し代謝変容が生じている可能性を見出した。さらに、その研究過程において転移を来した骨肉腫細胞では、原発巣の骨肉腫細胞と比較して IL-6 が高値であることも明らかにした。したがって、本研究では、慢性炎症因子 IL-6 による骨肉腫浸潤・転移メカニズムの解明、癌細胞における ANGPTL2 の発現と miRNA 発現の相関解析、ANGPTL2 高発現癌細胞における解糖系亢進メカニズムの解析を行い癌浸潤・転移を抑制する新規治療法開発の基盤研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(1)慢性炎症因子 IL-6 による骨肉腫浸潤・転移メカニズム解明、(2)癌細胞における ANGPTL2 の発現と miRNA の相関解明、(3)ANGPTL2 高発現癌細胞における解糖系亢進メカニズム解明、を行い新規癌浸潤・転移抑制法開発の基盤研究を行った。

(1)慢性炎症因子 IL-6 による骨肉腫浸潤・転移メカニズム解明

研究代表者は肺転移した骨肉腫細胞では解糖系が亢進し、慢性炎症因子 IL-6 の発現が増加していることを見出した。また、IL-6 をノックダウンさせた骨肉腫細胞は代謝変容が抑制され、骨肉腫細胞の接着能などが抑制されることも明らかにした。そのため、IL-6 の機能抑制は癌浸潤・転移を抑制すると考えられた。本研究では、IL-6 が誘導されるメカニズムを解明し、現在癌以外の疾患で既に臨床応用されている IL-6 機能抑制剤を用いて、骨肉腫移植マウスモデルの骨肉腫浸潤・転移が抑制されるか検討した。

(2)癌細胞における ANGPTL2 発現と相関する miRNA の探索

研究代表者は腎細胞を用いたこれまでの解析から、一部の miRNA が ANGPTL2 の誘導を抑制する可能性を見出していた。また、本研究の準備研究により ANGPTL2 低発現肺癌細胞では ANGPTL2 高発現肺癌細胞と比較して miR-221 が高値であることも明らかにした。本研究では、腎癌細胞を用いて、ANGPTL2 の発現に関与する様々な miRNA 探索を行った。

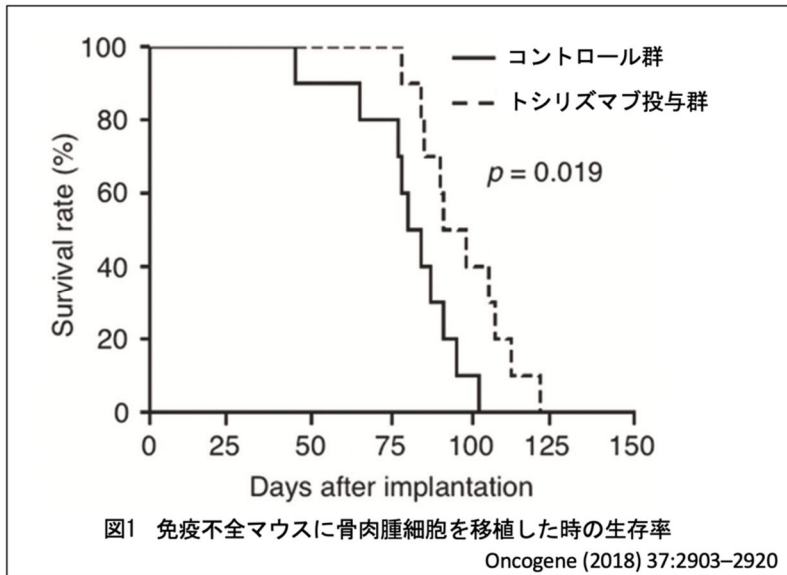
(3)ANGPTL2 高発現癌細胞における解糖系亢進メカニズム解明

研究代表者は本研究の準備研究により ANGPTL2 高発現細胞株は、コントロール株と比較して、解糖系シグナルが亢進していることを見出していた。多くの解糖系酵素の活性化には hypoxia-inducible factor (HIF)-1 が関与していることが報告されているが、研究代表者は ANGPTL2 の発現は HIF-1 の発現に影響を与えないことを予備実験にて明らかにしていた。そのため、癌細胞における ANGPTL2 の発現は、その他の経路を介して癌細胞の解糖系関連酵素の制御に関与している可能性が考えられた。本研究では、ANGPTL2 高発現癌細胞の c-Myc 経路と解糖系関連酵素の誘導などについて解析し、ANGPTL2 高発現癌細胞における解糖系亢進メカニズムを明らかにした。

4. 研究成果

(1)慢性炎症因子 IL-6 による骨肉腫浸潤・転移メカニズム解明

ヒト骨肉腫細胞株を免疫不全マウスに同所移植し、肺に転移した細胞と原発巣細胞をフラックスアナライザーにて解析したところ、肺に転移した細胞の方が OCR/ECAR 比が低いことを見出した。この結果は、肺に転移した細胞では原発巣細胞と比較して解糖系が亢進していることを示している。また、これらの細胞を RT-PCR アレイ法を用いて遺伝子の発現変化を解析した結果、肺に転移している骨肉腫細胞は原発巣細胞と比較して IL-6 の誘導が高いことを見出した。また、IL-6 の誘導には、腫瘍辺縁の微小環境の変化により誘導された TET2 によるプロモーター部位の脱メチル化が作用していることを見出した。次に、TET2 をノックダウンした骨肉腫細胞株を樹立し、コントロール細胞株と IL-6 の誘導について検討した結果、TET2 ノックダウン細胞株では、IL-6 の誘導が抑制され、またマウス同所移植モデルにおける転移能も低下していることを見出した。さらに、IL-6 をノックダウンした細胞株にて、マウス同所移植モデルを作成し転移能を



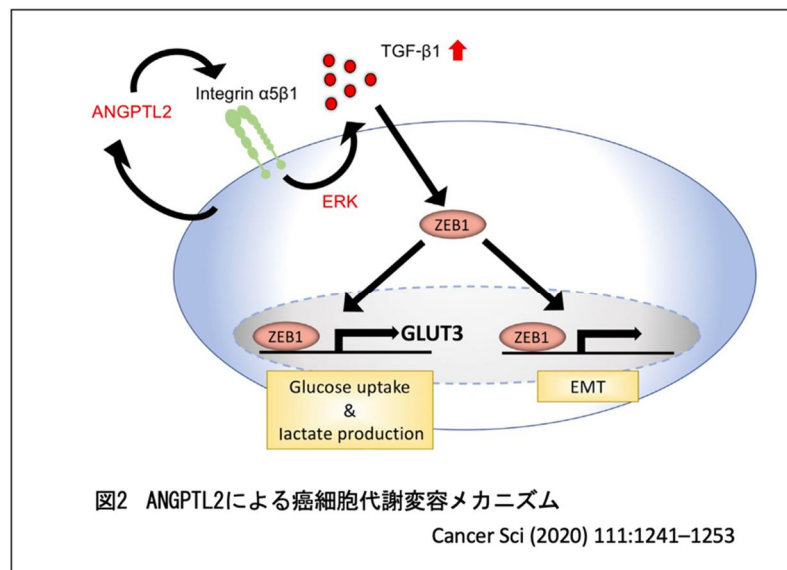
検討した結果、IL-6 ノックダウン細胞株では転移能が低下していることを確認した。一方、近年では IL-6 受容体モノクローナル抗体(トシリズマブ)が関節リウマチなどの治療に用いられている。骨肉腫細胞株にトシリズマブを作用させると、OCR/ECAR 比が高くなり、またマウス同所モデルにおける肺転移も抑制され生存率が高まることを見出した(図1)。以上の結果より、骨肉腫の肺転移においてはTET2を介したIL-6の誘導が重要であることが明らかとなった。

(2) 癌細胞の ANGPTL2 発現と相関する miRNA の探索

研究代表者が以前行った研究で、ANGPTL2 低発現肺癌細胞では miR-221 が高値であることを見出していたが、miR-221 の発現は癌細胞における ANGPTL2 を抑制することを見出した。一方、TFE3 遺伝子の転座がみられる腎癌では ANGPTL2 が強く誘導されていることが知られている。そのため TFE3 転座を有する腎癌モデルマウス(TFE3 トランスジェニックマウス)を作成し、TFE3 転座と miRNA 発現の相関について検討した。miRNA の qPCR アレイ解析を行い、抽出された 739 種類の miRNA の中から有意に上昇している miRNA 15 種類を同定した。次に、これら 15 種類の miRNA に着目し、TFE3 転座による腎癌患者の尿中の miRNA を測定したところ、miR-204-5p が TFE3 転座による腎癌患者において有意に上昇していた。これらの結果より、尿中 miR-204-5p 測定は TFE3 転座による腎癌患者のバイオマーカーとして有用である可能性を見出した。

(3) ANGPTL2 高発現癌細胞における解糖系亢進メカニズム解明

研究代表者は、以前行った H460 における ANGPTL2 発現株(H460/ANGPTL2)とコントロール株(H460/control)の高速シーケンスデータの再解析を行い、その結果においても ANGPTL2 発現株では GLUT3 の発現が有意に上昇していることを確認した。H460 のみならず A549 における ANGPTL2 発現株(A549/ANGPTL2)でも GLUT3 の発現が上昇していたことより、肺癌細胞における ANGPTL2



の発現は GLUT3 の発現を上昇させることが考えられた。次に H460/ANGPTL2 と H460/control において、解糖系の律速酵素であるヘキソキナーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、ピルビン酸キナーゼの発現について検討した。これらの酵素の発現に関しては、両者の細胞間において大きな違いは認めなかった。以上の結果より、H460/ANGPTL2にて解糖系が亢進している原因としては、GLUT3の発現亢進によるものである可能性が最も考えられた。また、GLUT3の誘導メカニズム

として c-Myc に着目し、さらなる解析を行った。A549/ANGPTL2 では、c-Myc の発現がコントロール株と比較してやや増強していることを見出した。一方、H460/ANGPTL2 ではコントロール株と比較して c-Myc の発現増強がみられなかった。以上の結果より、ANGPTL2 発現株における GLUT3 の発現増強は c-Myc 経路ではない可能性が考えられた。次に再度高速シーケンスの結果を詳細に解析し、ANGPTL2 発現肺癌細胞で上昇していた ZEB1 に着目した。肺癌細胞における ZEB1 の発現は ANGPTL2 の発現と一致し、ZEB1 をノックダウンすると GLUT3 の発現も低下した。さらに、インテグリン $\alpha 5 \beta 1$ 抗体を用いた解析により、ANGPTL2 はインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介して ZEB1 を誘導し GLUT3 の発現に関与していることを明らかにした。以上の結果より、ANGPTL2 は ZEB1 を介して癌細胞の代謝変容を引き起こし、癌浸潤・転移に関与している可能性を見出した(図 2)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Osumi H, Horiguchi H, Kadomatsu T, Tashiro K, Morinaga J, Takahashi T, Ikeda K, Ito T, Suzuki M, Endo M, Oike Y	4. 巻 111
2. 論文標題 Tumor cell-derived angiopoietin-like protein 2 establishes a preference for glycolytic metabolism in lung cancer cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1241, 1253
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14337	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 Kurahashi R, Kadomatsu T, Baba M, Hara C, Itoh H, Miyata K, Endo M, Morinaga J, Terada K, Araki K, Eto M, Schmidt LS, Kamba T, Linehan WM, Oike Y	4. 巻 110
2. 論文標題 MicroRNA-204-5p: A novel candidate urinary biomarker of Xp11.2 translocation renal cell carcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1897, 1908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14026	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 Endo M	4. 巻 41
2. 論文標題 The Roles of ANGPTL Families in Cancer Progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J UOEH	6. 最初と最後の頁 317, 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7888/juoeh.41.317	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 Sato M, Miyata K, Tian Z, Kadomatsu T, Ujihara Y, Morinaga J, Horiguchi H, Endo M, Zhao J, Zhu S, Sugizaki T, Igata K, Muramatsu M, Minami T, Ito T, Bianchi ME, Mohri S, Araki K, Node K, Oike Y	4. 巻 83
2. 論文標題 Loss of Endogenous HMGB2 Promotes Cardiac Dysfunction and Pressure Overload-Induced Heart Failure in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 368, 378
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-18-0925	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 Satou G, Maji D, Isamoto T, Oike Y, Endo M	4. 巻 28
2. 論文標題 keratinocytes increase melanogenesis via ANGPTL2 induction, an activity antagonized by Chrysanthemum extract.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Exp Dermatol	6. 最初と最後の頁 152, 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/exd.13862	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 Itoh H, Kadomatsu T, Tanoue H, Yugami M, Miyata K, Endo M, Morinaga J, Kobayashi E, Miyamoto T, Kurahashi R, Terada K, Mizuta H, Oike Y.	4. 巻 37
2. 論文標題 TET2-dependent IL-6 induction mediated by the tumor microenvironment promotes tumor metastasis in osteosarcoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2903, 2920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-018-0160-0.	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 Morinaga J, Zhao J, Endo M, Kadomatsu T, Miyata K, Sugizaki T, Okadome Y, Tian Z, Horiguchi H, Miyashita K, Maruyama N, Mukoyama M, Oike Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Association of circulating ANGPTL 3, 4, and 8 levels with medical status in a population undergoing routine medical checkups: A cross-sectional study.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0193731
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0193731.	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 Zhao J, Tian Z, Kadomatsu T, Xie P, Miyata K, Sugizaki T, Endo M, Zhu S, Fan H, Horiguchi H, Morinaga J, Terada K, Yoshizawa T, Yamagata K, Oike Y.	4. 巻 293
2. 論文標題 Age-dependent increase in angiotensin-like protein 2 accelerates skeletal muscle loss in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biol Chem	6. 最初と最後の頁 1596, 1609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.M117.814996.	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 Tanoue H, Morinaga J, Yoshizawa T, Yugami M, Itoh H, Nakamura T, Uehara Y, Masuda T, Odagiri H, Sugizaki T, Kadomatsu T, Miyata K, Endo M, Terada K, Ochi H, Takeda S, Yamagata K, Fukuda T, Mizuta H, Oike Y.	4. 巻 26
2. 論文標題 Angiopoietin-like protein 2 promotes chondrogenic differentiation during bone growth as a cartilage matrix factor.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Osteoarthritis Cartilage	6. 最初と最後の頁 108, 117
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.joca.2017.10.011.	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 Sugizaki T, Zhu S, Guo G, Matsumoto A, Zhao J, Endo M, Horiguchi H, Morinaga J, Tian Z, Kadomatsu T, Miyata K, Itoh H, Oike Y	4. 巻 3
2. 論文標題 Treatment of diabetic mice with the SGLT2 inhibitor TA-1887 antagonizes diabetic cachexia and decreases mortality.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 NPJ Aging Mech Dis	6. 最初と最後の頁 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41514-017-0012-0	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 Tian Z, Miyata K, Morinaga J, Horiguchi H, Kadomatsu T, Endo M, Zhao J, Zhu S, Sugizaki T, Sato M, Terada K, Okumura T, Murohara T, Oike Y.	4. 巻 82
2. 論文標題 Circulating ANGPTL2 Levels Increase in Humans and Mice Exhibiting Cardiac Dysfunction.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 437, 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-17-0327	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 Oike Y, Tian Z, Miyata K, Morinaga J, Endo M, Kadomatsu T.	4. 巻 81
2. 論文標題 ANGPTL2-A New Causal Player in Accelerating Heart Disease Development in the Aging.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Circ J	6. 最初と最後の頁 1379, 1385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1253/circj.CJ-17-0854	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
--	---------------------------	-----------------------	----