

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K14999

研究課題名(和文) 癌関連繊維芽細胞(CAF)が惹起するワールブルグ効果の本質的解明

研究課題名(英文) Elucidation of Warburg effect induced by cancer-associated fibroblasts

研究代表者

大西 なおみ(Ohnishi, Naomi)

公益財団法人がん研究会・がんプレジジョン医療研究センター がんオーダーメイド医療開発プロジェクト・研究員

研究者番号：50507217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：癌では大規模な代謝シフト(ワールブルグ効果)が起こることが知られているが、その意義や機序については明らかにされていない。我々はヒト癌検体から分泌されるエクソソームの解析から、腎癌微小環境中の癌関連繊維芽細胞(CAF)がエクソソームを介して持続的かつ大量のグリコーゲンを癌細胞に供給していることを見出した。本研究ではまず、ヒト腎癌組織から効率よくCAFを単離培養する方法を構築した。さらにCAF由来エクソソームにより癌細胞に送達されるグリコーゲン量の測定を行い、癌細胞内で誘導される代謝物変化量と合わせて各フラックス量を定量的に解析することでワールブルグ効果の全貌を明らかにすることを試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、90年以上前から現象として知られてきたワールブルグ効果の分子機序をエクソソームを介した癌-間質相互作用の観点から解明しようという新しい試みである。本研究から得られた成果は、多くの癌で特徴的に認められるワールブルグ効果がどのようにグルコースを獲得しどのような代謝経路によって癌の増殖を支持するかを明らかにするものであり、CAF由来エクソソームならびに癌特異的代謝機構を標的とした広い癌種に適用可能な癌治療薬開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Metabolic shifts (Warburg effect) are known to occur in cancer, but little is known about their significance or molecular mechanisms. Recently, from the analysis of exosomes secreted from human cancer specimens, we hypothesized that cancer-associated fibroblasts (CAF) in the renal cancer microenvironment provide a continuous and abundant supply of glycogen to cancer cells via exosomes. In this study, we first constructed a method to efficiently isolate and culture CAF from human kidney cancer tissues. In addition, we measured the amount of glycogen delivered to cancer cells by CAF-derived exosomes, and quantitatively analyzed the amount of each flux together with the amount of metabolite change induced in cancer cells to clarify the whole picture of the Warburg effect.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：エクソソーム 腎癌 ワールブルグ効果

1. 研究開始当初の背景

癌の増殖進展において、**癌微小環境**の重要性が注目されて久しい。特に、癌微小環境中の線維芽細胞は“**癌関連線維芽細胞 (CAF: cancer-associated fibroblasts)**”と呼ばれ、非癌部にある線維芽細胞では発現しないサイトカインや増殖因子を産生して癌の増殖を補助することが知られる。一方、癌では“**ワールブルグ効果**”と呼ばれる嫌氣的解糖系への異常な代謝シフトが誘導される。解糖系は酸化的リン酸化と比較して ATP 産生の速度が著しく早い一方、エネルギー効率がきわめて悪いことから癌細胞は大量のグルコースを消費している。実際にワールブルグ効果は癌検出に用いられる FDG-PET 検査の理論根拠として応用されており、ほぼ全ての癌種で異常が認められることから現象としては広く認知されているものの、癌の高い増殖能を支えるエネルギー代謝機構としては疑義があり、その意義や分子機序は未だ明らかにされていない。

申請者はこれまでに、癌の手術切除検体を特殊条件下で培養し、癌部ならびに非癌部から分泌されたエクソソーム (Tissue-exudative exosomes: **Te-EV**) 中のタンパク質プロファイルを LC-MS/MS を用いて網羅的に定量解析する手法を構築した (図 1)。本法を用いて腎癌 20 症例の癌部、正常腎由来 Te-EV を網羅的プロテオーム解析に供した結果 3,871 エクソソームタンパク質が同定され、癌部由来 Te-EV で有意に含有量が増加するタンパク質を 106 種類得た ($p < 0.05$, fold-change > 2.0)。興味深いことに、同解析からは腎癌部由来 Te-EV 中において「**グリコーゲン構成タンパク質 Glu1**」、「**グリコーゲン生合成酵素 Glu2**」、「**グリコーゲン生合成補助因子 Glu3**」が揃って著しい濃度上昇を示していることが分かった。さらに重要なことに、これらグルコース供給関連分子群は癌細胞由来エクソソームよりも、**癌微小環境中の CAF に由来するエクソソーム**に特異的に含まれていることを示唆する知見を得た (未発表データ)。このことから我々は癌細胞の高い増殖能を維持するために必須となる大量のグルコースは癌微小環境中の CAF が供給源であり、その輸送はエクソソームを介して持続的に行われるという仮説を立てた (図 2)。エクソソームを介した癌微小環境から癌細胞へのエネルギー供給の証明はワールブルグ効果のメカニズムを包括的に解明するものであり、本研究の進展はエネルギー代謝を標的とする新しい癌治療法の開発に繋がることを期待された。

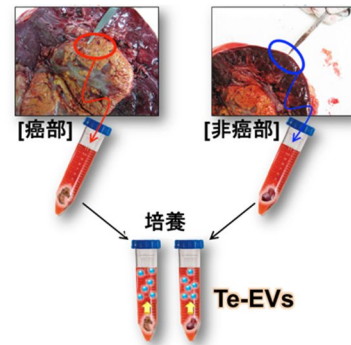


図 1. 切除組織培養分泌エクソソーム回収法

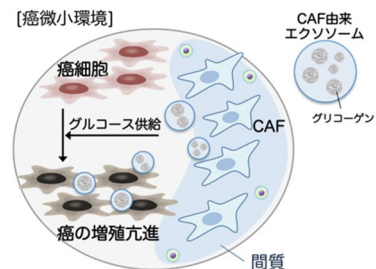


図 2. 本研究の仮説の概

2. 研究の目的

本研究は、癌関連線維芽細胞由来エクソソームがワールブルグ効果の維持に必須なグルコースの供給源となっていることを分子生物学的に証明することを目的とし、得られた研究成果から新しい機序の癌分子標的治療薬の開発に繋げることを目指す。

3. 研究の方法

本計画は 2 年度内に **CAF 由来エクソソームを介した癌のワールブルグ効果惹起の分子機構を明らかにすること**を目的とする。初年度には 腎癌切除組織を用いた CAF 培養系ならびに CAF 由来エクソソーム精製法の確立と、CAF 由来エクソソームの取り込みに伴う癌細胞の生理応答を明らかにする。翌年度には CAF 由来エクソソームを取り込んだ癌細胞の網羅的メタボローム解析を行い、癌細胞に引き起こされる代謝変動を網羅的に定量化する。最終的には CAF 由来エクソソームにより癌細胞に送達されるグリコーゲン量と、癌細胞内で誘導される代謝物変化量を統合し各フラックス量を定量的に解明することでワールブルグ効果惹起の全貌を明らかにしていく。

4. 研究成果

本研究は 2 年度内に遂行される予定であったが、申請者の出産に係る産前産後休暇ならびに育児休業のため平成 29 年度 5 月より平成 30 年 3 月まで研究を中断した。

研究中断前までに、当初の 29 年度の計画のうち、腎癌切除組織を用いた CAF 培養系の確立を完了した。癌組織中の線維芽細胞 (CAF) は組織片培養法により単離した。組織片培養法は線維芽細胞の高い遊走能に基づき既に確立された手法であり、具体的には腎癌手術検体組織を滅菌カバーガラスで固定して培養ディッシュ上で培養し、癌組織内から遊走してくる線維芽細胞を培養ディッシュ上で増殖させる。本法により、遊走能を持たない他の細胞の混入が抑えられ、CAF を選択的に培養することができると考えられる。さらに、単離した線維芽細胞について CAF マーカーとして知られる α -SMA ならびに Vimentin 染色を行うことで単離した線維芽細胞の CAF としての活性を確認するとともに、CAF の培養上清中からエクソソームを回収、さらに内包されるタンパク質量を定量する実験系の構築に成功した。

研究再開後の平成 30 年度には、CAF 由来エクソソームをリン脂質二重膜結合性光色素 PHK26 を用いて標識し、レシピエントとなる腎癌細胞株に添加することでその取り込み能の検証を行った。共焦点レーザー顕微鏡下における観察の結果、標識されたエクソソームが癌細胞内に取り込まれていることを確認できた。また、腎癌組織切片を用いて Glu1、Glu2、Glu3 の免疫組織化学染色を行い、それらの分子局在を検討した。さらにエクソソーム等の各種マーカータンパク質との共染を行うことで上記 3 タンパク質が癌細胞と CAF の直接的なコンタクトではなく、エクソソームを介して癌細胞へ輸送されていることを示唆する知見を得た。

平成 31 年度には腎癌の手術切除検体ならびに同一腎に由来する隣接非癌部正常組織 25 例を収集した。手術検体の収集に多くの時間を要したが、切除した組織から CAF ならびに NF を選択的に培養することに成功し、それらに由来するエクソソームの精製を完了した。

令和元年度には、精製したエクソソームの網羅的メタボローム解析を計画し、主に解糖系構成メタボライト 10 種、ならびに癌細胞で解糖亢進に伴い亢進することが知られるペントースリン酸経路構成メタボライト 6 種について定量的な変動率の解析を進めている。本実験系によりこれらの経路の亢進が認められれば、CAF 由来エクソソームの取り込みによって癌細胞にワールブルグ効果が惹起される確証を得ることができると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Jingushi Kentaro, Uemura Motohide, Ohnishi Naomi, Nakata Wataru, Fujita Kazutoshi, Naito Takuya, Fujii Risa, Saichi Naomi, Nonomura Norio, Tsujikawa Kazutake, Ueda Koji	4. 巻 142
2. 論文標題 Extracellular vesicles isolated from human renal cell carcinoma tissues disrupt vascular endothelial cell morphology via azurocidin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 607 ~ 617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ijc.31080	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 Furuta Yoshikazu, Harima Hayato, Ito Emiko, Maruyama Fumito, Ohnishi Naomi, Osaki Ken, Ogawa Hirohito, Squarre David, Hang'ombe Bernard Mudenda, Higashi Hideaki	4. 巻 3
2. 論文標題 Loss of Bacitracin Resistance Due to a Large Genomic Deletion among Bacillus anthracis Strains	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 00182-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mSystems.00182-18	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 Minato Erina, Aoshima Keisuke, Kobayashi Atsushi, Ohnishi Naomi, Sasaki Nobuya, Kimura Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Exogenous Expression of Equine MHC Class I Molecules in Mice Increases Susceptibility to Equine Herpesvirus 1 Pulmonary Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Veterinary Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0300985819834616	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 Akamatsu Reiko, Suzuki Masato, Okinaka Keiji, Sasahara Teppei, Yamane Kunikazu, Suzuki Satowa, Fujikura Daisuke, Furuta Yoshikazu, Ohnishi Naomi, Esaki Minoru, Shibayama Keigo, Higashi Hideaki	4. 巻 25
2. 論文標題 Novel Sequence Type in Bacillus cereus Strains Associated with Nosocomial Infections and Bacteremia, Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 883 ~ 890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2505.171890	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 Mori J, Tanikawa C, Ohnishi N, Funauchi Y, Toyoshima O, Ueda K, Matsuda K	4. 巻 19
2. 論文標題 EPSIN 3, A Novel p53 Target, Regulates the Apoptotic Pathway and Gastric Carcinogenesis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neoplasia.	6. 最初と最後の頁 185-195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.neo.2016.12.010	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 Jingushi K, Uemura M, Ohnishi N, Nakata W, Fujita K, Naito T, Fujii R, Saichi N, Nonomura N, Tsujikawa K, Ueda K	4. 巻 142
2. 論文標題 Extracellular vesicles isolated from human renal cell carcinoma tissues disrupt vascular endothelial cell morphology via azurocidin.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Cancer.	6. 最初と最後の頁 607-617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1002/ijc.31080	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 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Naomi Ohnishi, Naomi Saichi, Risa Fujii, Kentaro Murakami, Hisahiro Matsubara, Koji Ueda
2. 発表標題 Exosomes secreted from gastric cancer cells deliver anti-apoptotic signals to tumor microenvironment
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naomi Ohnishi, Naomi Saichi, Risa Fujii, Kentaro Murakami, Hisahiro Matsubara, Koji Ueda
2. 発表標題 Comprehensive proteomic profiling of serum exosomes identifies novel biomarkers for early detection of gastric cancer
3. 学会等名 HUP02018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naomi Ohnishi, Naomi Saichi, Risa Fujii, Kentaro Murakami, Hisahiro Matsubara, Koji Ueda
2. 発表標題 Gastric cancer cell-derived exosomes deliver anti-apoptotic signals to tumor microenvironment
3. 学会等名 JSEV2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naomi Ohnishi, Naomi Saichi, Risa Fujii, Kentaro Murakami, Hisahiro Matsubara, Koji Ueda
2. 発表標題 Gastric cancer cell-derived exosomes deliver anti-apoptotic signals to tumor microenvironment
3. 学会等名 11thJCA-AACR (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----