

令和 4 年 4 月 26 日現在

機関番号：84409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06546

研究課題名（和文）がんエクソソームの分泌におけるワールブルグ効果の役割の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the role of Warburg effect in the secretion of tumor exosomes

研究代表者

原田 陽一郎（Harada, Yoichiro）

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪国際がんセンター（研究所）・その他部局等・糖鎖オンコロジー部主任  
研究員

研究者番号：80464147

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）：本研究では、ワールブルグ効果（好氣的解糖系）を標的とする阻害剤が、がんの転移に関わる細胞外小胞（EV）の分泌を制御するという申請者の知見に基づき、そのメカニズムにアスパラギン結合型糖鎖修飾が関与するという予想外の発見をした。その過程において、がんの転移を促進するタンパク質を含んだ新規のEVを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞は、核酸やタンパク質が入った細胞外小胞（EV）を分泌し、それらを宿主細胞に受け渡すことでがんの増殖と転移に有利な環境を構築する。本研究では、小胞体で起こるタンパク質のアスパラギン結合型糖鎖修飾を標的とすることにより、がん細胞から分泌される特定のEVの分泌を阻害できることを発見した。本研究の成果は、EVを介したがんと宿主との相互作用の制御法の開発の一助となり、がん治療への道が開かれると期待される。

研究成果の概要（英文）：We have found that an inhibitor of Warburg effect suppresses the secretion of extracellular vesicles (EVs), which have been implicated in tumor metastasis. In the present study, we explored the underlying mechanism and unexpectedly found that the inhibitor suppressed the secretion of EVs by targeting asparagine-linked glycosylation, but not Warburg effect.

研究分野：糖鎖生物学

キーワード：アスパラギン結合型糖鎖修飾 エクソソーム がん 糖代謝 非エクソソーム小胞

### 1. 研究開始当初の背景

がんは、国民の半数が罹患する国民病であり、その病態はがん細胞の増殖とともに進行する。この無秩序な細胞分裂に必要な材料は、ワールブルグ効果と呼ばれる好氣的解糖系によって合成される (Science 324:1029, 2009)。

この特殊な代謝経路に加えて、がん細胞から分泌される悪玉エクソソームが、がんの病態の促進に関与することが報告されている (Cancer Cell 30:836, 2016)。エクソソームは直径が 30 nm から 150 nm 程度の分泌小胞で、その中には核酸や受容体タンパク質といった多くのシグナル伝達分子が含まれる。がん細胞は、自身が分泌する悪玉エクソソームを利用してがん促進分子を周囲に撒き散らし、増殖に都合の良い環境を整える。これまでの研究から、悪玉エクソソームに含まれるがん促進分子として、肝細胞増殖因子受容体タンパク質 (Met) が同定されている (Nat Med 18:883, 2012)。しかし、Met を含む悪玉エクソソームの分泌を駆動するメカニズムは不明である。

### 2. 研究の目的

がん細胞が分泌する「エクソソーム」は、がんの進行を促進する因子である。私は、この悪玉エクソソームの分泌に、がんの代謝で重要な「ワールブルグ効果」が関与することを発見した。そこで本研究では、ワールブルグ効果に着目し、がんの促進因子である悪玉エクソソームの分泌機構の解明とその制御法の開発を目的とする。本研究の成果は、がんの治療法や治療薬の開発への応用が期待できる。

### 3. 研究の方法

マウス悪性黒色腫 B16-F10 細胞を、ワールブルグ効果の阻害剤 (2-deoxyglucose, 2-DG) の存在下あるいは非存在下で培養後、そのそれぞれの培養上清から超遠心法により膜小胞画分を調製した。これらの画分の生化学的な特徴を、透過型電子顕微鏡観察、ナノトラッキング解析、ウェスタンブロット、ラベルフリープロテオミクス解析、フォーカストメタボロミクス解析、リポミクス解析により比較した。

### 4. 研究成果

B16-F10 細胞を 2-DG で処理すると、膜小胞の分泌が抑制された (図 1)。

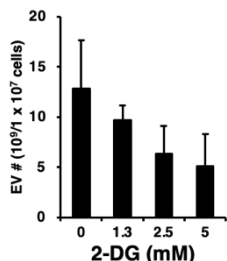


図 1. 2-DGによるEVの分泌抑制

研究開始当初、エクソソームと考えていたこの小胞は、生化学的な特徴から新しい種類の小胞 (非エクソソーム小胞) であることが判明した (図 2)。

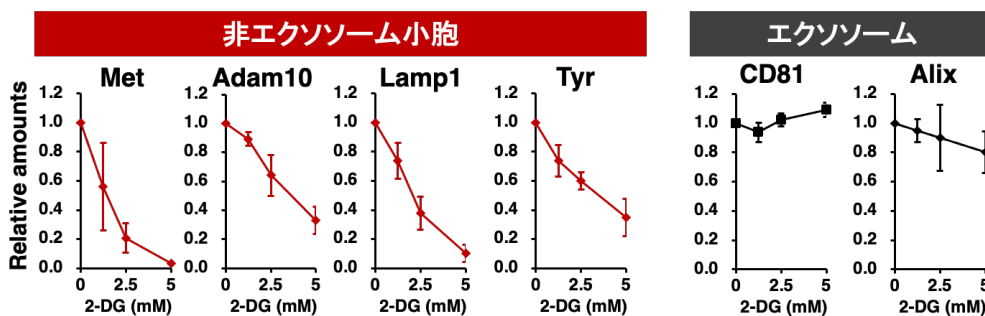


図 2. 非エクソソーム小胞の発見

次に、2-DG が非エクソソーム小胞の分泌を抑制するメカニズムを解析した結果、2-DG は解糖系の阻害ではなく、小胞体におけるタンパク質のアスパラギン結合型糖鎖修飾を阻害することで非エクソソーム小胞の分泌を抑制していることが明らかとなった。具体的には、細胞内に取り込まれた 2-DG が GDP-2-DG に代謝され、アスパラギン結合型糖鎖の前駆体の合成に間違っって利用されることで非天然型の糖鎖前駆体が合成される。この異常な糖鎖前駆体は研究代表者が以前

に発見した糖鎖の品質管理機構によって分解され (PNAS 110:19366, 2013)、アスパラギン結合型糖鎖修飾が抑制されることが分かった (図3)。

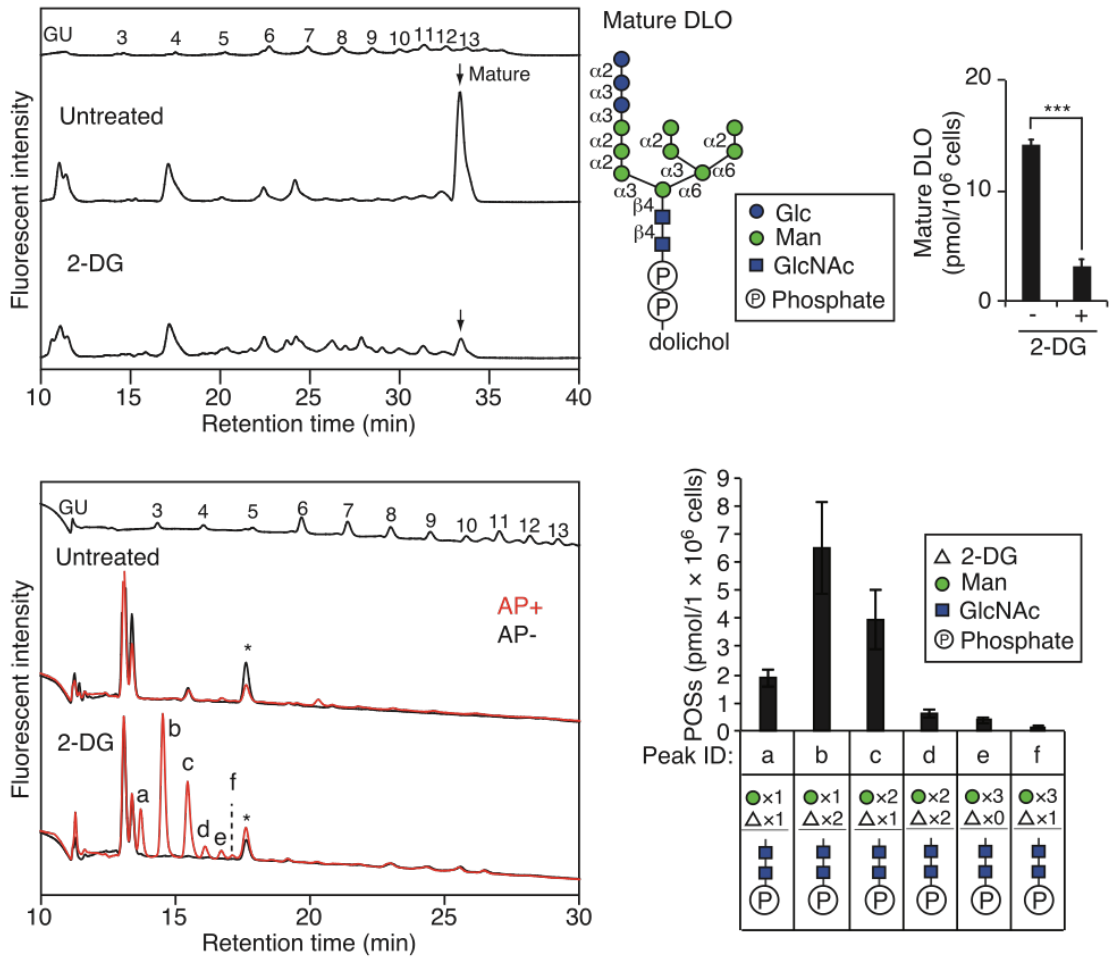


図3. 2-DGによるアスパラギン結合型糖鎖修飾の抑制メカニズム

さらに、アスパラギン結合型糖鎖修飾は、がんの転移に関わるタンパク質 (Met) の小胞への積み込みに関わることが示唆された (図4)。

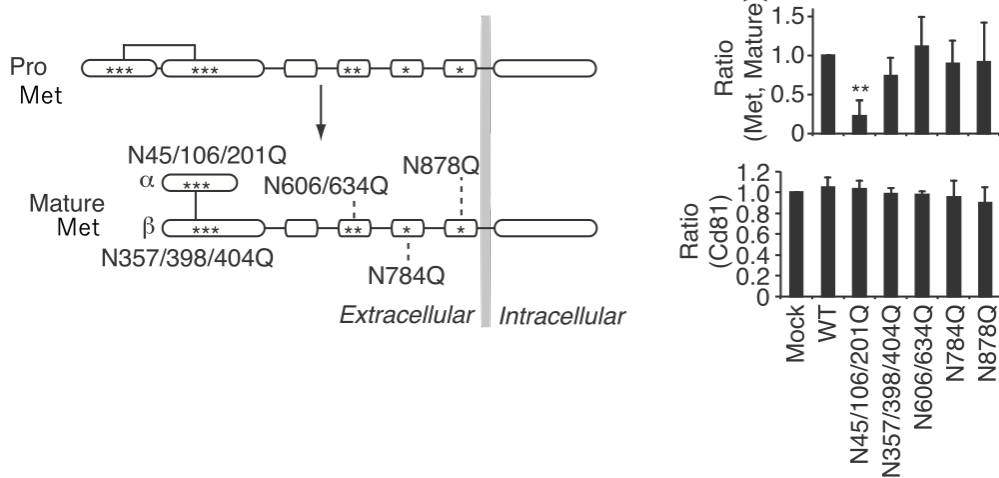


図4. Metタンパク質上のアスパラギン結合型糖鎖修飾は、MetのEVへの積み込み必須である

最後に、プロテオミクス的手法を用いて非エクソソーム小胞の生化学的な特徴付けを行なった結果、がん促進因子である Met をはじめ、アスパラギン結合型糖鎖修飾部位を持つ膜タンパク質が濃縮されており、エクソソームとは異なるタンパク質組成を有していた (図 5)。

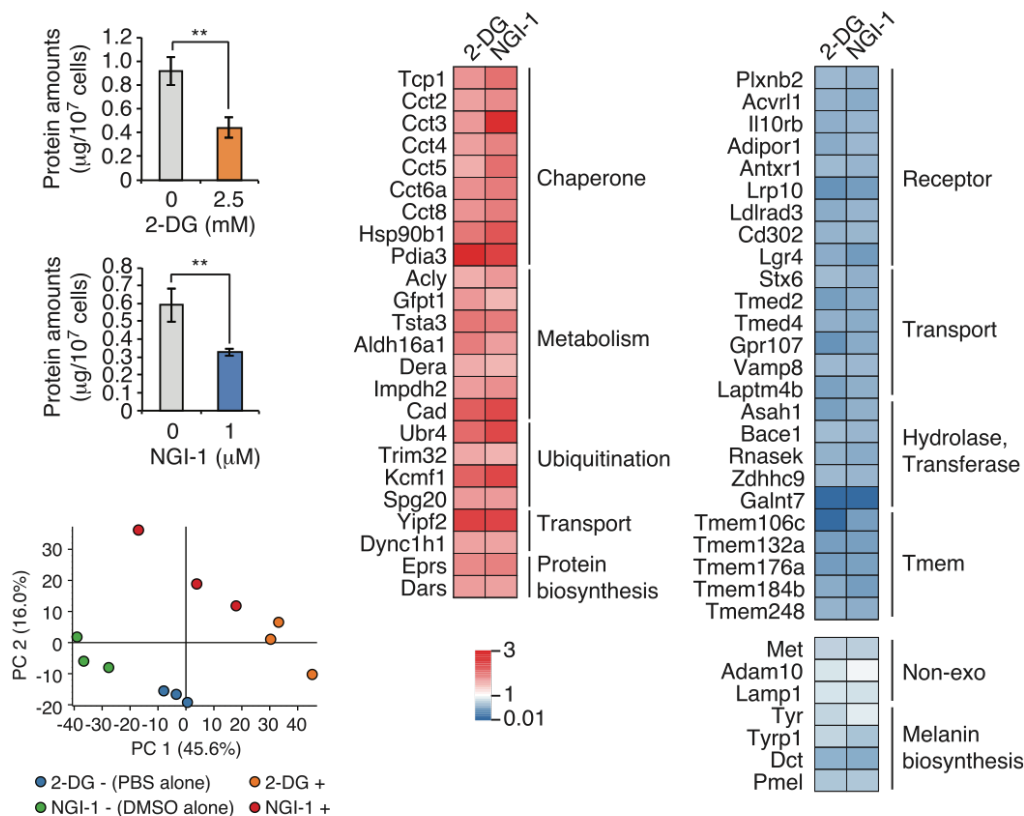


図 5. EVのラベルフリープロテオミクス解析

また、リポドミクス解析の結果、非エクソソーム小胞にはホスファチジルセリンがわずかに多く濃縮されていることが分かった (図 6)。

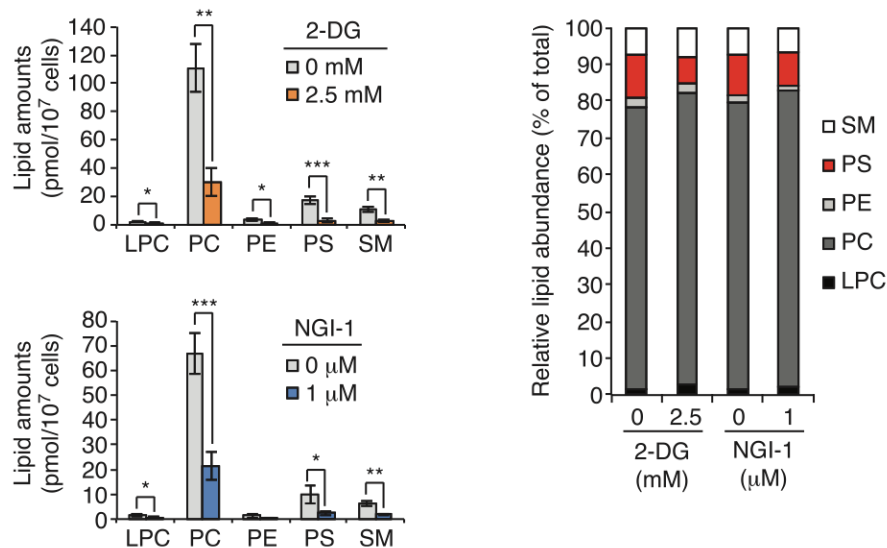


図 6. EVのリポドミクス解析

以上の研究実績を Cell Reports 誌 (Cell Rep. 33:108261, 2020) に報告し、関連プロトコルを STAR Protocols 誌 (STAR Protoc. 2:100316, 2021) に報告した。本研究の成果は、NHK 関西ニュースおよび南日本新聞(鹿児島)に取り上げられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Harada Yoichiro, Nakajima Kazuki, Li Shengtao, Suzuki Tadashi, Taniguchi Naoyuki	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for analyzing the biosynthesis and degradation of N-glycan precursors in mammalian cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100316 ~ 100316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100316	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 Harada Yoichiro, Nakajima Kazuki, Suzuki Takehiro, Fukushige Tomoko, Kondo Kiyotaka, Seino Junichi, Ohkawa Yuki, Suzuki Tadashi, Inoue Hiromasa, Kanekura Takuro, Dohmae Naoshi, Taniguchi Naoyuki, Maruyama Ikuro	4. 巻 33
2. 論文標題 Glycometabolic Regulation of the Biogenesis of Small Extracellular Vesicles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108261 ~ 108261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108261	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 Kondo Kiyotaka, Harada Yoichiro, Nakano Miyako, Suzuki Takehiro, Fukushige Tomoko, Hanzawa Ken, Yagi Hirokazu, Takagi Koichi, Mizuno Keiko, Miyamoto Yasuhide, Taniguchi Naoyuki, Kato Koichi, Kanekura Takuro, Dohmae Naoshi, Machida Kentaro, Maruyama Ikuro, Inoue Hiromasa	4. 巻 in press
2. 論文標題 Identification of distinct N-glycosylation patterns on extracellular vesicles from small-cell and non-small-cell lung cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 101950 ~ 101950
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.101950	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6件（うち招待講演 5件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yoichiro Harada, Kazuki Nakajima, Takehiro Suzuki, Tomoko Fukushige, Kiyotaka Kondo, Junichi Seino, Yuki Ohkawa, Tadashi Suzuki, Hiromasa Inoue, Takuro Kanekura, Naoshi Dohmae, Naoyuki Taniguchi and Ikuro Maruyama
2. 発表標題 Glycometabolic regulation of the biogenesis of small extracellular vesicles
3. 学会等名 Society for Glycobiology 2020 Virtual Annual Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原田 陽一郎
2. 発表標題 細胞外小胞の不均一性とその形成におけるN型糖鎖修飾の役割
3. 学会等名 第38回日本糖質学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 陽一郎
2. 発表標題 細胞外小胞の分泌におけるN結合型糖鎖修飾の役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 陽一郎、谷口 直之
2. 発表標題 糖鎖依存的に分泌される細胞外小胞の同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 陽一郎、谷口 直之
2. 発表標題 N-glycosylation regulates the secretion of tumor-derived extracellular vesicles
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原田 陽一郎、丸山 征郎、谷口 直之
2. 発表標題 がん細胞が分泌する糖鎖依存性の細胞外小胞の発見とその形成機構の解析
3. 学会等名 第1回日本癌学会若手の会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>プレスリリース：がんの進行を引き起こす物質が入っている ナノサイズの小さな袋を放出する仕組みを解明  <a href="https://oici.jp/center/news/2198/">https://oici.jp/center/news/2198/</a>          プレスリリース：肺癌細胞から出る細胞外小胞を調べて肺癌の種類を診断できる可能性  <a href="https://oici.jp/center/news/2704/">https://oici.jp/center/news/2704/</a></p>
---

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