

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03859

研究課題名(和文) 乳酸シャトルによる骨転移進展の制御

研究課題名(英文) The role of lactate shuttle in bone metastasis

研究代表者

米田 俊之 (Yoneda, Toshiyuki)

大阪大学・大学院歯学研究科・招へい教員

研究者番号：80142313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞はWarburg効果により大量に乳酸を産生・分泌し、分泌された乳酸は隣在するがん細胞や正常細胞に取り込まれ再利用される。この傍分泌的ながん周囲細胞内外への乳酸の移動は“乳酸シャトル”と呼ばれるがん特有の現象であるが、がんの骨転移における役割は不明である。本研究では、乳酸分泌を制御するモノカルボン酸トランスポーター4 (MCT4)およびGタンパク質共役型乳酸受容体GPR81が、乳がん細胞の乳酸シャトル形成を介して骨転移ならびにがん性疼痛を制御することを見出した。本研究は、骨転移の新たな制御機構を明らかにするとともに、乳酸シャトルの制御による革新的な骨転移治療の開発に貢献すると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、がん遺伝子/がん抑制遺伝子とは異なる視点からのアプローチとして、がんの増大、浸潤、転移における細胞内エネルギー代謝系およびその代謝産物の役割に関する研究が進められている。その中でも、がんに対する乳酸代謝の影響、あるいはがん治療ターゲットとしての乳酸代謝が改めて注目されている。本研究はがん患者の管理を困難にし、生命予後を大きく左右する骨転移における乳酸シャトルの役割を解明した点で学術的意義は高い。さらに、乳酸シャトルは、がんの種類にかかわらず全てのがんに共通の現象であり、本研究の成果はがん治療に広範に応用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：Cancer cells produce and secrete large amounts of lactate due to the Warburg effect, and the secreted lactate is taken up and recycled by both cancer cells and normal cells. This paracrine transfer of lactate is a cancer-specific phenomenon called "lactate shuttle," but its role in bone metastasis is unknown. We found that monocarboxylate transporter 4 (MCT4), which regulates lactate secretion, and GPR81, a G protein-coupled lactate receptor, regulate bone metastasis and cancer pain through lactate shuttle in breast cancer cells. Our study uncovered a new regulatory mechanism of bone metastasis and contribute to the development of innovative bone metastasis therapies through the regulation of lactate shuttles.

研究分野：生化学

キーワード：骨転移 乳酸シャトル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんは自身の旺盛な増殖、代謝のために周囲環境が低酸素状態 (hypoxia) に陥る。そのような不利な環境に適応し、増殖・生存を図るために、がんはマスター転写因子 Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) 発現を誘導し、細胞内代謝を様々に調節する。その一環として、がんはグルコーストランスポーター (GLUT1) を通じて取り込んだグルコースを正常酸素状態 (normoxia) でもヘキソキナーゼ-2 (HK2) を律速酵素とする解糖系で消費し、その最終産物ピルビン酸はピルビン酸脱水素酵素キナーゼ-1 (PDK1) により TCA 回路には利用されずに乳酸脱水素酵素-A (LDHA) によりプロトン (H⁺) と乳酸に変換される。この現象はがん細胞に特有で、“**Warburg 効果**” と呼ばれ (Van der Heiden et al, 2009)、がんの悪性度の指標とされている (Goodwin et al, 2019)。

Warburg 効果による乳酸/H⁺の蓄積は細胞内 pH の低下と細胞死を招くため、がん細胞は細胞膜上に存在する乳酸/H⁺共輸送体、モノカルボン酸トランスポーター4 (MCT4) (Halestrap, 2013) を通じて乳酸/H⁺を細胞外に放出する。その結果、がんの周囲環境は酸性となり、がんニッチとしてがんの進展をサポートする (Peppicelli et al, 2017)。MCT4 も HIF-1 α により発現が増加し、がんの悪性度に比例して発現が高まる (Doherty & Cleveland, 2013)。細胞外の乳酸は MCT1 を通じて隣在するがん細胞や正常細胞に取り込まれ再利用される。このような MCT4/MCT1 を通じた傍分泌的ながん周囲細胞内外への乳酸の移動は“**乳酸シャトル**” と呼ばれ (Doherty & Cleveland, 2013)、がんの増大、浸潤、転移、休眠との関連が示唆されている (図 1)。

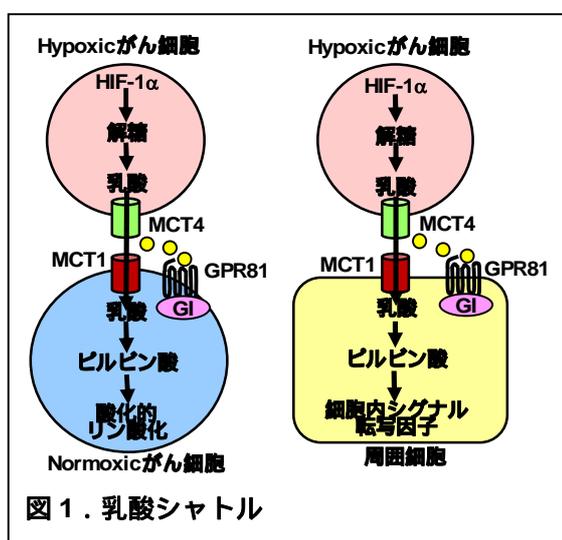


図 1. 乳酸シャトル

近年、7 回膜貫通型 G タンパク質共役型の乳酸受容体 GPR81 (Ahmed et al, 2014) が同定され、乳酸シャトルやがん進展との関連が提唱されている。GPR81 に乳酸が結合すると、共役している Gai タンパクの作用によりアデニル酸シクラーゼが抑制され、ATP からサイクリック AMP (cAMP) への変換が減少することで、細胞内 cAMP 濃度が低下することが明らかとなっている。興味深いことに、GPR81 は乳がん細胞を含む様々ながん細胞においても発現が見出されており、がんの増殖、代謝への関与が推測されているが、その詳細な役割についてはほとんど不明である。

2. 研究の目的

本研究においては、「乳酸シャトルは骨微小環境を変化させ、がんの骨転移進展を制御する」との仮説のもと、骨転移およびがん性骨痛における乳酸シャトルの役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 乳酸シャトルが骨転移に及ぼす影響の検討

ヒト乳がんの臨床検体ならびに乳がん細胞を用いて MCT4 (乳酸放出) および GPR81 (乳

酸感知)の発現を検討するとともに、培地中の乳酸濃度を測定し乳酸シャトルの形成能を検討した。また、shRNAを用いてMCT4遺伝子ならびにGPR81遺伝子をノックダウンした乳がん細胞を作製し、脛骨注入モデルに応用することで骨内でのがんの増大ならびに骨破壊に対する乳酸シャトルの影響を検討した。

(2) 乳酸シャトルががん性骨痛に及ぼす影響の検討

がん性骨痛はがんによる骨内の知覚神経興奮により誘導される。そこで、がんが形成する乳酸シャトルに応答する知覚神経の増生、興奮、ならびに骨痛に及ぼす影響を検討した。そのための研究アプローチとして、まず知覚神経におけるMCT1(乳酸取り込み)およびGPR81の発現を免疫染色により検討した。さらに、乳がん細胞の培養上清で知覚神経を刺激し、リン酸化ERKとCREBを指標にして培養知覚神経細胞の増生、興奮に対する効果について検討を行った。

4. 研究成果

(1) ヒト乳がんにおけるMCT4ならびにGPR81の発現と乳酸シャトル形成能

ヒト乳がん臨床検体におけるMCT4ならびにGPR81の発現を検討するためにTissueArray.Com社から乳がん組織アレイを購入し免疫組織学的検討を行った。その結果、乳がん組織は正常上皮に比較してMCT4ならびにGPR81を優位に高発現していることが明らかとなった。

次に、乳がん細胞および対照として正常乳腺上皮細胞におけるMCT4ならびにGPR81の発現をウェスタンブロットリング法により検討した。その結果、ヒト乳がん細胞株MDA231細胞およびマウス乳がん細胞株EO771細胞においてMCT4ならびにGPR81の強い発現を認めた。一方ヒト正常乳腺上皮細胞株MCF10A細胞でのMCT4ならびにGPR81発現は弱かった。

次に、ヒト乳がん細胞における乳酸分泌能を測定することにより乳酸シャトルの形成能について検討を行った。その結果、MDA231細胞およびEO771細胞で培養上清中への乳酸の放出が認められ、乳酸分泌はMCT1/MCT4阻害剤であるサイロシゴピンにより濃度依存的に抑制された。以上の結果より、乳がん細胞はMCT4を介して乳酸を放出すること、さらにGPR81を介して腫瘍微小環境に存在する乳酸を感知していることが明らかとなった。

(2) 骨転移におけるMCT4の役割の解明

乳がんの骨転移におけるMCT4の役割を明らかにするために、骨転移の動物モデルの一つであるマウス脛骨骨髓内がん細胞注入モデルを用いて検討を行った。まずはじめに、shRNA発現プラスミドベクターを用いてMCT4遺伝子がノックダウンされたEO771細胞(以下shMCT4細胞)およびコントロール細胞(以下shNT細胞)を作製した。ウェスタンブロットリング法ならびにRT-qPCR法により、shMCT4細胞においてMCT4の発現がタンパク質ならびにmRNAレベルでノックダウンされていることを確認した。また重要なことにshMCT4細胞では細胞内および培養上清中の乳酸量が有意に減少していることが明らかとなった。5週齢雌BALB/cヌードマウスの右側脛骨骨髓腔にshNT細胞およびshMCT4細胞を接種し、細胞移植1週間後の腫瘍の増大をX線写真により検討した。その結果、shNT細胞を接種した脛骨では骨破壊を示す透過像が認められたが、shMCT4細胞を接種した脛

骨では腫瘍の増大が抑制されていることが明らかとなった(図 2)。

(3) がん性骨痛における MCT4 の役割の解明

次に、がん性骨痛における MCT4 の役割の検討を行った。まずはじめに、骨髄内に乳がん細胞を接種すると骨破壊を伴う腫瘍が形成されるとともに、乳がんを接種されたマウスは癌性骨痛を示すことをダイナミックプランター・エステシオメータにより確認した。また、乳がん細胞を接種した側の感覚神経の後根神経節 (DRG) では、ニューロン興奮の分子指標であるリン酸化 pERK1/2 と cAMP-response element-binding protein (pCREB) の細胞内シグナルが活性化していることがウェスタンブロット法により明らかとなった。

がん性骨痛における乳酸シャトルの役割を明らかにするために、MCT4 遺伝子をノックダウンした shMCT4 乳がん細胞を接種し、その効果を検討した。その結果、shMCT4 細胞を接種したマウスではコントロールの shNT 乳がん細胞を接種マウスと比較して、DRG における pERK1/2 と pCREB の発現が低下するとともに癌性骨痛も減弱していることが明らかとなった(図 3)。さらに、感覚神経細胞において GPR81 遺伝子をノックダウンすると、乳酸刺激による pERK1/2 の上昇と Ca²⁺流入が抑制され感覚神経細胞の興奮が阻害されることが明らかとなった。

以上の結果より、乳がん細胞から MCT4 を介して細胞外に放出された乳酸は、ニューロンの GPR81 を活性化させることで癌性骨痛に寄与していることが明らかとなった。

(4) 骨転移における GPR81 の役割の解明

次に、骨転移における GPR81 の役割の解明を行った。shRNA 発現プラスミドベクターを用いて GPR81 遺伝子がノックダウンされた MDA231 細胞 (以下 shGPR81 細胞) およびコントロール細胞 (以下 shNT 細胞) を作製した。ウェスタンブロット法ならびに RT-qPCR 法により、shGPR81 細胞において GPR81 の発現がタンパク質ならびに mRNA レベルでノックダウンされていることを確認した。また重要なことに shGPR81 細胞では細胞内 cAMP 濃度が有意に増加していることが示され、shGPR81 細胞では GPR81 の発現に併せてその機能も低下していることが明らかとなった。

次に、GPR81 遺伝子ノックダウンの乳酸シャトルへの影響について検討した。その結果、shGPR81 細胞では MCT1, MCT4 の発現が低下していた。これらの結果に一致して、shGPR81 細胞では培養液中への乳酸分泌が有意に低下していた。したがって GPR81 発現は乳酸シャトル形成および乳酸分泌と連動することが示唆された。

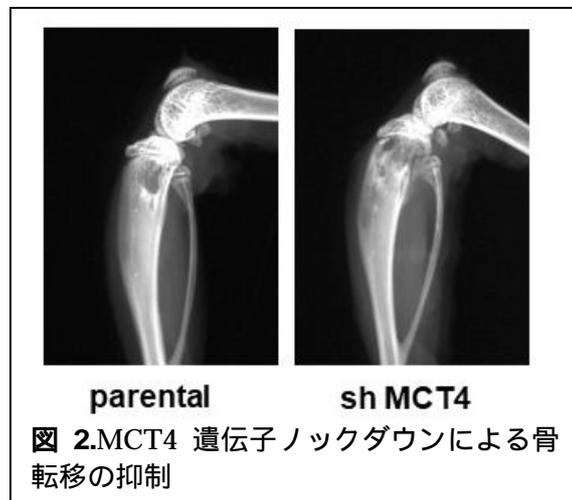


図 2.MCT4 遺伝子ノックダウンによる骨転移の抑制

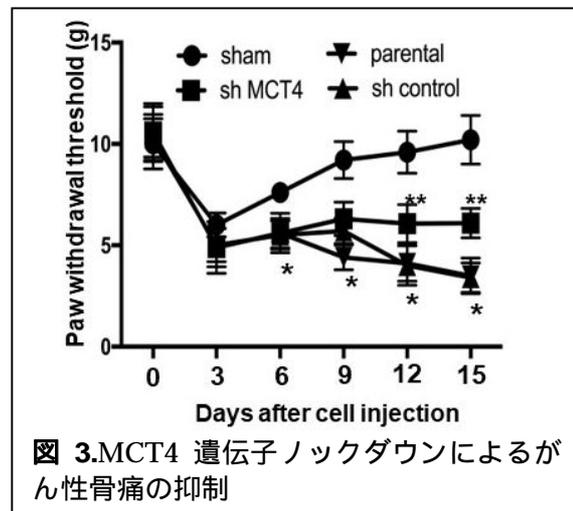


図 3.MCT4 遺伝子ノックダウンによるがん性骨痛の抑制

次に、5 週齢雌 BALB/c
ヌードマウスの右側脛骨
骨髓腔に shNT 細胞および
shGPR81 細胞を接種し、
細胞移植後2週間の腫瘍の
増大を μ CT ならびに組織
学的に検討した。その結
果、shNT 細胞を接種した
脛骨では骨破壊を伴う活
発な腫瘍形成を認めたが、
shGPR81 細胞を接種した

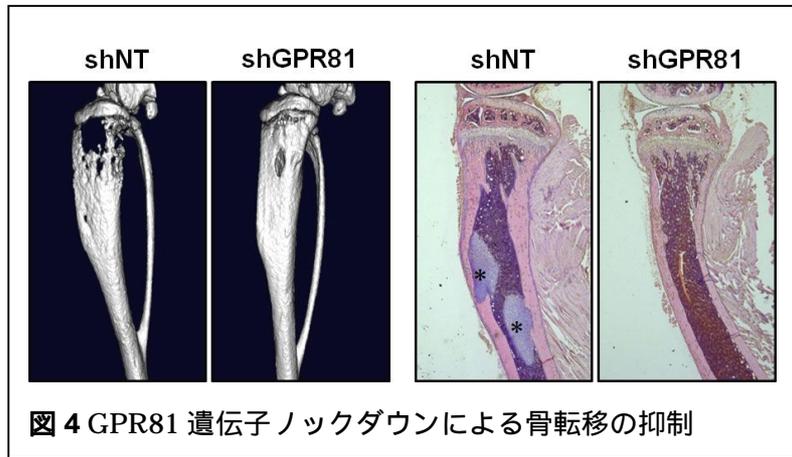


図 4 GPR81 遺伝子ノックダウンによる骨転移の抑制

脛骨では腫瘍の増大が低下していた（図 4）。また、TRAP 染色により shNT 細胞が形成する腫瘍と骨との間に多数の破骨細胞による骨破壊を認めたが、shGPR81 細胞が形成する腫瘍では破骨細胞による骨破壊は著しく減少していることが明らかとなった。この組織像に一致して X 線透過性の骨破壊像も見られ、X 線写真の解析により骨破壊領域の定量を行った結果、shGPR81 細胞を接種した脛骨では shNT 細胞を接種した脛骨に比較して骨破壊領域が有意に減少しており、腫瘍の増大が抑制されていることが示された。

骨転移において、乳がん細胞は副甲状腺ホルモン関連たんぱく質(PTHrP)や IL-11 などの破骨細胞促進因子を産生することで、破骨細胞による骨破壊を促進する。そこで、shGPR81 細胞における破骨細胞促進因子の発現を RT-qPCR 法により検討した結果、shGPR81 細胞では IL-6 および IL-11 の mRNA 発現が有意に低下していた。

以上の結果より、GPR81 は乳がん細胞の骨内での増大、ならびにそれに伴う破骨細胞による骨破壊に密接に関与していることが示唆された。

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 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Okui Tatsuo, Hiasa Masahiro, Hasegawa Kazuaki, Nakamura Tomoya, Ono Kisho, Ibaragi Soichiro, Kanno Takahiro, Sasaki Akira, Yoneda Toshiyuki	4. 巻 62
2. 論文標題 Lactate secreted via MCT4 from bone-colonizing breast cancer excites sensory neurons via GPR81	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 39-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2023.5487	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 Yoneda Toshiyuki, Hiasa Masahiro, Okui Tatsuo, Hata Kenji	4. 巻 オンライン版
2. 論文標題 Cancer-nerve interplay in cancer progression and cancer-induced bone pain	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 オンライン版
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-023-01401-6	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 Ishihara Shota, Hata Kenji, Hirose Katsutoshi, Okui Tatsuo, Toyosawa Satoru, Uzawa Narikazu, Nishimura Riko, Yoneda Toshiyuki	4. 巻 12
2. 論文標題 The lactate sensor GPR81 regulates glycolysis and tumor growth of breast cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6261-6274
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-10143-w	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 Yoneda Toshiyuki, Hiasa Masahiro, Okui Tatsuo, Hata Kenji	4. 巻 30
2. 論文標題 Sensory nerves: A driver of the vicious cycle in bone metastasis?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone Oncology	6. 最初と最後の頁 100387 ~ 100387
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbo.2021.100387	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 Okui Tatsuo, Hiasa Masahiro, Ryumon Shoji, Ono Kisho, Kunisada Yuki, Ibaragi Soichiro, Sasaki Akira, Roodman G. David, White Fletcher A., Yoneda Toshiyuki	4. 巻 26
2. 論文標題 The HMGB1/RAGE axis induces bone pain associated with colonization of 4T1 mouse breast cancer in bone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone Oncology	6. 最初と最後の頁 100330 ~ 100330
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbo.2020.100330	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 該当する

1. 著者名 Sakamoto Yumi, Okui Tatsuo, Yoneda Toshiyuki, Ryumon Shoji, Nakamura Tomoya, Kawai Hotaka, Kunisada Yuki, Ibaragi Soichiro, Masui Masanori, Ono Kisho, Obata Kyoichi, Shimo Tsuyoshi, Sasaki Akira	4. 巻 531
2. 論文標題 High-mobility group box 1 induces bone destruction associated with advanced oral squamous cancer via RAGE and TLR4	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 422 ~ 430
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.07.120	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 波多賢二、高畑佳史、村上智彦、西村理行、米田俊之
2. 発表標題 乳酸受容体GPR81は骨での乳がん細胞の増殖を制御する
3. 学会等名 第40回日本骨代謝学会
4. 発表年 2022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
研究分担者	奥井 達雄 (Okui Tatsuo) (40610928)	島根大学・学術研究院医学・看護学系・准教授 (15201)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	波多 賢二 (Hata Kenji) (80444496)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授 (14401)	

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			
米国	Indiana University School of Medicine			