

2015年度 森泰吉郎記念基金研究振興基金 研究成果報告書

政策・メディア研究科 修士課程 2年

所属プログラム：BI

ログイン名：toki

学籍番号：81424625

氏名 土岐 珠未

研究テーマ「がん細胞生存維持における代謝ストレスの影響」

要旨

固形がんでは、血管形成不全のため、正常な組織にはみられない低酸素・栄養飢餓状態などのストレス環境が存在する。そのストレス環境下での生存を可能にするため、がん細胞は、ストレスに対する適応応答を誘導することが知られている。本研究では、ストレス環境下でのがん細胞の生存及び維持において、小胞体ストレス応答 (UPR, unfolded protein response)がどのように関与しているかについて検討を行った。第一に、がん細胞集団の維持に中心的な役割を果たす、がん幹細胞におけるUPRの役割について明らかにすることを目的とし、第二に、細胞内代謝産物及び遺伝子発現の網羅的解析を行い、UPR誘導・非誘導時の細胞内プロファイルを明らかにすることを目的とし、研究を行った。

まず、がん幹細胞におけるUPRの役割については、大腸がん細胞 HT29細胞株のストレス負荷下における、がん幹細胞マーカー分子の発現を観察することにより評価を行った。その結果、マーカー分子の一つであるLGR5は、UPRを誘導するストレス環境下において、顕著に発現量が減少することが明らかになった。また、小胞体膜上に存在するUPRのセンサータンパク質の一つであるPERK経路の活性化阻害により、LGR5の発現減少が回復する事実を見出した。このことから、PERKを介したUPRの誘導により、がん幹細胞マーカー分子であるLGR5の発現が制御されることが明らかになった。

次に、グルコース飢餓環境下でUPRを誘導しないことが知られている、ミトコンドリアDNA(mtDNA)欠損がん細胞 (ρ^0 細胞)を用いて、UPR誘導時・非誘導時の細胞応答性について検討した。具体的には、mtDNAの有無によるグルコース飢餓下での応答性の違いを、遺伝子発現及び代謝産物の網羅的解析により、比較した。その結果、mtDNAを有するHT29 細胞の親株は、18時間のグルコース飢餓により、既知のUPR関連遺伝子群の変動を示したが、 ρ^0 細胞ではその変動を認めなかった。そこで、UPR活性化以前の細胞変化を明らかにするため、飢餓ストレス6時間後の細胞内代謝物を観察したところ、 ρ^0 細胞では、解糖系の活性低下とともに、細胞内のピルビン酸及び、アスパラギン酸・アラニンなどの必須アミノ酸の量が顕著に低下することが分かった。一方で、親株では、同様にピルビン酸は低下するが、それらのアミノ酸は増加することが分かった。これらのことから、UPRの誘導には、グルコース飢餓下におけるピルビン酸や各種アミノ酸の変動が関与する可能性が考えられた。

以上の結果から、UPRの腫瘍増殖維持に対する役割の理解が深まり、UPRを制御する新規抗がん剤の開発に貢献できる可能性が期待された。

1. 序論

1.1 研究背景

がん細胞において、低酸素や低栄養状態などの微小環境ストレス下で生存するための一つの機構として、小胞体ストレス応答 (UPR; Unfolded Protein Response) が報告されている。UPRは、細胞内小器官の一つである小胞体で誘導される適応応答であり、小胞体の膜上に存在するストレスセンサータンパク (PERK(PRKR like ER kinase)・ATF6 (activating transcription factor 6)・IRE1(inositol requiring kinase 1)) を起点としたシグナル伝達経路の活性化により、ストレスを回避することが可能であると知られている。しかしながら、がん細胞集団の維持に中心的な役割を果たし、悪性化や薬剤耐性化に寄与すると考えられているがん幹細胞 [1] は、必ずしも良くない微小環境で生存しており、UPRの誘導と強い関連があるのではないかと予測されるが、その直接的な関与のメカニズムは、明らかにされていない。

また、ミトコンドリアDNA (mtDNA) を欠損させたがん細胞では、グルコース飢餓環境下においても、UPRが誘導されず、細胞死に至ることが知られている [2] が、その代謝プロファイルについては、未だ明らかでない。

そこで、本研究では、第一にがん幹細胞に対するUPRの関与について、また第二に、ストレス下でUPRを誘導しないmtDNA欠損細胞との比較によるUPR誘導メカニズムについて、2つの異なる視点から細胞生存へ寄与するUPRの役割に関して新たな知見を得ることを目的にした。

1.1.1 小胞体ストレス応答

微小環境ストレス下でがん細胞において誘導される適応応答の一つに、細胞内小器官の一つである小胞体で誘導される小胞体ストレス応答(Unfolded Protein Response; UPR)が知られている。UPRとは、タンパク質が正常な高次構造を取ることが出来ず、折りたたみ不全になった異常タンパク質が小胞体に蓄積することに対し、小胞体膜上に存在するPERK, IRE1, ATF6 などのストレスセンサータンパクが応答しシグナルの伝達が起こることによって、ストレスを回避する機構であることが知られている [3] [Fig. 1].

UPRの誘導により、(1) 分子シャペロンの産生増加、(2) タンパク質の翻訳抑制、(3) ユビキチン-プロテアソーム系によるタンパクの分解が亢進し、異常タンパクを解消するが、解消しきれない場合には、細胞死が誘導される場合もあることが明らかになっている [4].

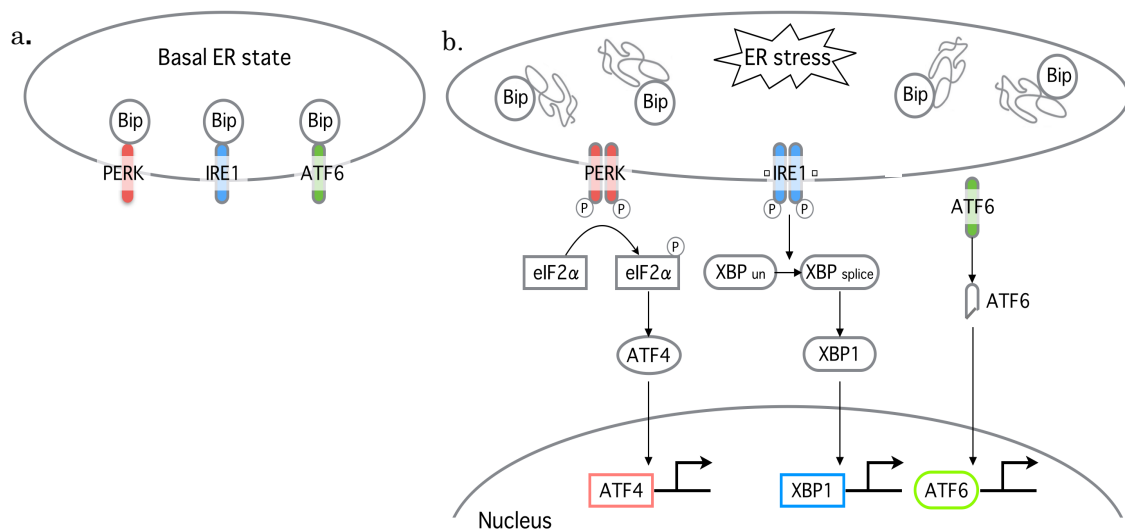


Figure 1 : UPR signalingの誘導

a) 通常時は、小胞体(ER)内に存在する小分子分子シャペロン(Bip)が膜タンパク PERK・IRE1・ATF6と結合している状態を保っている。b) 微小環境への暴露などで、ストレスが負荷されると、小胞体内に折りたたみ不全の異常タンパクが蓄積する。その異常タンパク質にBipが結合することにより凝集を防ぎ、PERKを初めとする3つの膜タンパクの応答により下流に存在するそれぞれの遺伝子の転写・翻訳を促進する。Bip : immunoglobulin binding protein (別名 GRP78 : G protein-coupled receptor 78 または HSPA5 : heat shock 70kDa protein 5), eIF2 α : eukaryotic translation initiation factor 2 α , ATF4 : activating transcription factor 4, XBP : X-box-binding protein

1.2 目的

微小環境下におけるがん細胞のストレス応答を分子標的とした新規治療法の開発のために、UPRのメカニズム解明に向けた、新規の知見を得たいと考えた。はじめに、本研究では、腫瘍細胞集団の維持に重要な役割を果たす、がん幹細胞における、UPRとの関与について、そのメカニズムを明らかにすることを第一の目的とした。さらに、グルコース飢餓ストレス下で、UPRが誘導されず、速やかに細胞死に至ることが知られるミトコンドリアDNA欠損がん細胞を用いて、グルコース飢餓下でUPRを誘導する親株との比較を行い、両細胞株のグルコース飢餓応答性の違いを明らかにすることを第二の目的とした。

2. 対象と手法

2.1 細胞培養

ヒト大腸がん細胞株 HT29 の培養は、一部の実験系を除き、FBS 10% (NICHIREI) , kanamycin 100 μ g/mL (meiji) 含有 RPMI1640 培地 (Wako) を用い、37°C インキュベーター内で、5% CO₂、湿度 100%の環境下で行った。また、そのミトコンドリアDNA欠損細胞(HT29 ρ^0 細胞)は、FBS 10 %、カナマイシン 100 μ g/mL、ウリジン 50 μ g/mL、ピルビン酸 1 mM含有 RPMI-1640 (Wako) 培地により培養を行った。ただし、HT29 Pt 細胞とHT29 ρ^0 細胞を同時に用いて比較を行う際には、HT29 Pt 細胞もピルビン酸 ウリジンを追加した、同一条件下で培養を行った。

2.2 ストレス誘導

RPMI1640 培地 (Wako) に、2-deoxyglucose (2DG、ヘキソキナーゼ阻害剤) 10 mM、Thapsigargin (TG、Ca²⁺-ATPase(SERCA)阻害剤) 100 nM、Tunicamycin (TM、糖鎖修飾阻害剤) 5 μ g/ μ L を添加することで、細胞にストレスを負荷し、UPRを誘導させた。また、UPRを介さないネガティブコントロールとして、Buformin (Buf., ミトコンドリア酸化リン酸化阻害剤) 300 μ M を、また、ポジティブコントロールとして、がん幹細胞阻害剤 PTC-209 (Xcess Biosciences Inc.またはEMD MILLIPORE) を0- 1.0 μ M の濃度で用いた。また上記薬剤は、PERK 活性化阻害剤 GSK2656157 1 μ L [5] との併用も行った。

また、グルコース飢餓ストレスの誘導には、FBS 10 %、カナマイシン 100 μ g/mL、ウリジン 50 μ g/mL、ピルビン酸 1 mM含有 Glucose-Free RPMI-1640 (GIBCO 11879-020) を用いた。同じくグルタミン飢餓ストレスの誘導には、FBS 10 %、カナマイシン 100 μ g/mL、ウリジン 50 μ g/mL、ピルビン酸 1 mM含有 Glutamine-Free RPMI-1640 (WAKO 183-02165) を用いた。

2.3 細胞増殖能評価

細胞増殖能を観察するため、CellTiter-Glo Luminescent Cell Luminescent Cell Viability Assay (ATP assay) (Promega) を用いて評価した。培地の交換後、48時間後に CellTiter-Glo Luminescent Cell Luminescent Cell Viability Assay (ATP assay) により、増殖中の細胞の ATP 含有量から生存細胞数を定量した。CellTiter-Glo は代謝活性のある細胞に由来する ATP を発光により定量する系である。ATP 量は通常条件下であれば細胞数に比例することが知られているため、本研究では細胞数を評価する手法として用いた。

2.4 ウェスタンブロット

細胞をPBS (4°C) で洗浄後, 1 × Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) sample buffer (Tris (Nacalai Tesque) 62.5 mM, SDS (Sigma) 2%, DTT 5mM, Glycerol (Sigma) 10 %) (HCl (Wako) を用いて pH 6.8 に調整) を加え, 超音波破碎し, 100°Cで10分間加熱した後, BioRad Protein Assay (BioRad) を用い, 595 nM の吸光波長にてライセート中のタンパク質量の定量を行い, 濃度を調整した. その後, 6 μ L (30 μ g) または 10 μ L (5 μ g) のライセートをマルチゲルIIミニ (コスモ・バイオ) にロードし, Running Buffer (Tris 25 mM, Glycine (Nacalai Tesque) 192 mM, SDS 0.1%) 中で電気泳動を行った. 電気泳動後, ゲル中に展開されたタンパク質を Electrotransfer Buffer (methanol (Wako) 20 %, Glycine 192 mM, Tris 25 mM) 中でニトロセルロース膜 (Whatman) へブロットティングした. ニトロセルロース膜を Blocking Buffer (Tris (pH 7.4) 50 mM, NaCl (Sigma) 150 mM, Tween 20 (Nacalai Tesque) 0.1%, Skim Milk (Morinaga) 4%) 中で1時間ブロッキングした後, Blocking Buffer 中に希釈した1次抗体を4°C Overnight で反応させた. 1次抗体による反応後, ニトロセルロース膜を Washing Buffer (Tris 50 mM NaCl 150 mM, Tween20 0.1%) で洗浄して, Blocking Buffer 中に希釈した2次抗体を室温 1-3 時間反応させた. 本研究で使用した1次抗体及び2次抗体は, 2.3.4.2 で述べる. ニトロセルロース膜を Washing Buffer で洗浄した後, Enhanced Chemiluminescence Detection System (Perkin Elmer) にて2次抗体を発光させ, Medical X-ray Film (Kodak) を用いて検出した.

2.4.1 使用抗体

1次抗体: Anti-ATF4 抗体 (Cell Signaling Technology), Anti-BMI-1 抗体 (Abcam), Anti-CD44v9 抗体 (コスモバイオ), Anti-IRE1抗体 (Cell Signaling Technology), Anti-KDEL 抗体 (Stressgen), Anti-LGR5 抗体 (Abcam), Anti-p-eIF2 α 抗体 (Cell Signaling Technology), Anti-PERK 抗体 (Abcam), Anti-RPL7 抗体 (Cell Signaling Technology), Anti-RPS3 抗体 (Cell Signaling Technology), Anti-XBP1(Spliced) 抗体 (Cell Signaling Technology), Anti-p-4EBP1 抗体 (Cell Signaling Technology).

2次抗体: Anti-rabbit IgG HRP conjugate (Amersham), Anti-mouse IgG HRP conjugate (Amersham), Anti-rat IgG HRP conjugate (Amersham).

2.5 siRNA導入ノックダウン実験

リバーストランスフェクション法によりノックダウン実験を行った. OPTI-MEM (GIBCO) に最終濃度 20 nM になるようにsiRNAを加え, トランスフェクション試薬 lipofectamine RNAiMAX(invitrogen) を適当量加え, 混合した. siRNA混合液をプレートに添加後, Transfection medium (RPMI1640 (WAKO), FBS 5%)中に, 3.75×10^4 cells/mL の濃度に懸濁した細胞を播種した. トランスフェクションから24時間経過後, 通常培地(RPMI1640 (WAKO), FBS 10%, kanamycin 100 μ g/mL) に交換し, その後のアッセイを行った. なお, 96well plate では, 0.3 μ L RMA iMAX 含有 siRNA 混合液 20 μ L に,細胞懸濁液を 80 μ L 加え, 6 well plate では, 7.5 μ L RMA iMAX 含有 siRNA 混合

液 0.5 mL に、細胞懸濁液を 2.0 mL 加え実験を行った。本研究では、オフターゲット効果が低い、ON-TARGETplus SMART pool siRNA (Dharmacon)を用いて実験を行った。各siRNAは、si-Control, si-PLK1, si-LGR5, si-GCN2, 及びsi-ATF4である。

2.6 マイクロアレイ解析

RNeasy Kit (Qiagen) の標準プロトコルに従い、細胞からトータル RNA を抽出後、2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) 及び RNA 6000 Nano LabChip キット (Agilent Technologies) を用いてトータルRNAのクオリティチェックを行った。Affymetrix 標準プロトコルに基づき、トータル RNA 5 μ g をcDNAへ、さらにビオチン標準 cRNAターゲットへと合成し、ターゲットを断片化した後、Fluidics Station 450 (Affymetrix) 及び GeneChip Scanner 3000 (Affymetrix) を用いて GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 arrays (Affymetrix) へのハイブリダイズ、洗浄、ストレプトアビジン-フェコエリスリン染色、シグナル検出を行った。また、マイクロアレイ遺伝子発現データを解析するに先立ち、MAS 5.0 [7] アルゴリズムを用いて、遺伝子発現強度を正規化した。遺伝子発現量の相違を判別する基準として、コントロールに対してシグナル値 (真数) が2倍以上検出されたものを増加 (UP), 1/2 倍以下で検出されたものを減少 (DOWN)と定義した。ただし、シグナル値強度が弱い場合は、測定誤差を生じやすいため、偽陽性を小さくするための工夫として、比較するいずれかのシグナル値が 50 未満だった場合は、全て“50”に置き換えた [6]。

2.7 メタボローム解析

細胞は、6 well プレートを用いて、HT29 Pt 細胞 2.0×10^5 cells/well, HT29 ρ^0 細胞 3.0×10^5 cells/well の濃度で播種した。細胞播種後、24時間後に同量の培地を追加し、さらに24時間後から6時間のグルコース飢餓ストレス暴露を経てサンプルの回収を行った。サンプル回収前には、マンニトール 5 %を添加し2度洗浄した。その後、L-methionine sulfone, MES, CSA を含むメタノール 25 μ Mを、1 サンプルに対し 1mL 添加し、スクレーパーで1.5 mL チューブに回収した。

回収したサンプルはすべて、-80 $^{\circ}$ Cにて一度保存した後、4 $^{\circ}$ Cにて 10 分間静置後、400 μ L のサンプル溶液に対し、400 μ L のクロロホルムと 200 μ L の Milli-Q を加え十分に攪拌し、10,000 \times g, 22 $^{\circ}$ Cにて 3 分間遠心分離を行った後、水層 450 μ L を Millipore 製限外ろ過フィルターに移し、再度 9,100 \times g,18 $^{\circ}$ C にて 2 時間以上遠心分離を行った。その後、ろ液を 40 $^{\circ}$ Cで 240 分間遠心乾固させ、100 μ M の 3-Aminopyrrolidine,Trimesate を含む 50 μ L の Milli-Q により可溶化し、CE-TOFMS によるメタボローム測定を行った [8]。また、本研究ではCE-TOFMSにより計測された陽イオン性および陰イオン性物質全てのサンプルデータを用いてメタボローム解析を行った。CE-TOFMSにより得られた全データをMasterHands2 [9] を用いて積分によるピーク検出

を行い、各物質の精密質量や、標準物質の濃度を元に各代謝物濃度の計算を行った(本項に記載した測定前処理および測定は、TTCKの大石 麻希さん・牧 寛子さんに行っていた)。得られた値は、全て、コントロールと比較して、F.C(Fold change) >2.0 を「増加」、F.C <0.5 を「減少」と評価した。また、データに関しては、全て、Benjamini-Hochberg法を用いてt検定の補正を行った (p値 <0.05)。統計分析は、Rを統計ソフトウェア (バージョン3.1.3) を用いた [10]。

3. 結果・考察

本内容にて論文を執筆中のため、誠に勝手ながら結果の掲載は控えさせていただきます。

謝辞

本研究を進めるにあたり、(公財)がん研究会がん化学療法センターゲノム研究部の富田章弘部長には、数々のご指導・ご鞭撻を頂きました。また、同研究部研究員の岡本有加さんや小井土大さんを始め、研究助手の櫻井純子さん、谷優理さん、池田千佳さんに数多くのご指導をいただきました。心より感謝申し上げます。

また、メタボロームの解析について、多くのご協力を賜りました、アドバイザーの田畑祥さんを始め、TTCKの曾我朋義教授、大石麻希さん・牧寛子さんに深く感謝しております。

最後にこのような恵まれた研究機会を与えて下さる富田勝教授に深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ: Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* 2012, 12(2):133-143.
2. Haga N, Saito S, Tsukumo Y, Sakurai J, Furuno A, Tsuruo T, Tomida A: Mitochondria regulate the unfolded protein response leading to cancer cell survival under glucose deprivation conditions. *Cancer Sci* 2010, 101(5):1125-1132.
3. Schmied V, Mills A, Kruske S, Kemp L, Fowler C, Homer C: The nature and impact of collaboration and integrated service delivery for pregnant women, children and families. *J Clin Nurs* 2010, 19(23-24):3516-3526.
4. Szegezdi E, Duffy A, O'Mahoney ME, Logue SE, Mylotte LA, O'Brien T, Samali A: ER stress contributes to ischemia-induced cardiomyocyte apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2006, 349(4):1406-1411.
5. Atkins C, Liu Q, Minthorn E, Zhang SY, Figueroa DJ, Moss K, Stanley TB, Sanders B, Goetz A, Gaul N et al: Characterization of a novel PERK kinase inhibitor with antitumor and antiangiogenic activity. *Cancer Res* 2013, 73(6):1993-2002.
6. Jiang N, Leach LJ, Hu X, Potokina E, Jia T, Druka A, Waugh R, Kearsley MJ, Luo ZW: Methods for evaluating gene expression from Affymetrix microarray datasets. *BMC Bioinformatics* 2008, 9:284.
7. Mashima T, Ushijima M, Matsuura M, Tsukahara S, Kunimasa K, Furuno A, Saito S, Kitamura M, Soma-Nagae T, Seimiya H et al: Comprehensive transcriptomic analysis of molecularly targeted drugs in cancer for target pathway evaluation. *Cancer Sci* 2015, 106(7):909-920.
8. Soga T, Igarashi K, Ito C, Mizobuchi K, Zimmermann HP, Tomita M: Metabolomic profiling of anionic metabolites by capillary electrophoresis mass spectrometry. *Anal Chem* 2009, 81(15):6165-6174.

9. Sugimoto M, Wong DT, Hirayama A, Soga T, Tomita M: Capillary electrophoresis mass spectrometry-based saliva metabolomics identified oral, breast and pancreatic cancer-specific profiles. *Metabolomics* 2010, 6(1):78-95.
10. Megumi Uetaki, Sho Tabata, Fumie Nakasuka, Tomoyoshi Soga, Tomita M: Metabolomic alterations in human cancer cells by vitamin C-induced oxidative stress. *Scientific Reports* 2015.

研究業績

1. Tamami Toki, Yuka Okamoto, Ikuko Nagasawa, Akihito Tomida. Downregulation of Cancer Stem Cell Markers LGR5 and CD44 Under ER Stress Conditions. the 19th Japanese Association for Molecular Target Therapy of Cancer, Matsuyama, Japan. (June 10-12, 2015)
2. Tamami Toki, Yuka Okamoto, Akihito Tomida, Masaru Tomita. The Effects of the Expression of Cancer Stem Cell Markers by PERK activation. the 38th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kobe, Japan. (December 1-4, 2015)