

198. 糖代謝調節による上皮細胞の癌化抑制メカニズム

小野寺 康仁

北海道大学 大学院医学研究科 生化学講座 分子生物学分野

Key words : 糖代謝, シグナル伝達, 3次元培養

緒 言

ヒトの正常乳腺上皮の3次元組織培養系を用いた解析から、正常細胞の増殖および3次元形態形成は上皮成長因子のシグナルには依存する一方、グルコースには依存しないことが明らかとなっている¹⁾。このことは、組織形態形成に伴う細胞増殖とそれに必要なバイオマス供給は、本来グルコース代謝には依存しないことを示唆している。一方で、乳癌細胞は生理的濃度 (5.5 mM) 以上のグルコース存在下で腫瘍塊様の構造を形成するが、グルコース濃度の低下に伴い正常細胞の示す上皮組織様形態に近い構造を形成するようになり、低濃度条件 (例えば 0.175 mM 以下) では正常細胞の構造と見分けの付かない形態を示すことが明らかとなっている¹⁾。

このような糖代謝抑制による「表現型の回帰 (phenotypic reversion)」と逆の現象として、「糖代謝亢進による表現型の悪性転換」も見出している。すなわち、正常細胞は糖の取り込みおよび代謝を亢進するだけで、シグナルの異常活性化と形態変化を示し、腫瘍塊様の構造を形成する¹⁾。本研究では糖代謝亢進による表現型の転換に「抵抗性」を示す細胞に着目し、正常上皮細胞の持つ新たな癌化抑制メカニズムの存在およびそのメカニズムについて検討した。

方 法

1. 細胞培養

ヒト正常乳腺上皮に由来する HMT-3522 S1 細胞と、S1 細胞が自発的に形質転換した HMT-3522 T4-2 細胞²⁾ は、H-14 培地にて培養した。H-14 培地は、DMEM/F12 培地に 250 ng/ml insulin, 10 µg/ml transferrin, 2.6 ng/ml sodium selenite, 0.1 nM β -estradiol, 1.4 µM hydrocortisone および 5 µg/ml prolactin を加えたものである。S1 細胞の増殖は EGF に依存するため、10 ng/ml EGF を加えて培養した。任意のグルコース濃度で培養する際は、グルコース不含の DMEM/F12 に上記の添加物を加えたのちに、グルコース溶液を必要量加えた。

2. 3次元培養および細胞の回収

3次元培養は、S1 および T4-2 細胞をそれぞれ $8.4 \times 10^5/\text{cm}^3$ および $6.0 \times 10^5/\text{cm}^3$ の濃度で細胞外基質溶液 (Cultrex 社または BD 社) に懸濁し、37 °C でゲル化させたのちに上記の培地を上層して行った。3次元形態が形成されるまで 7 日から 10 日間培養し、その間 1 日置きに上層した培地を新鮮なものに交換した。ゲル中の細胞塊は、細胞を含むゲルを 4 °C に冷却した 5 mM EDTA を含む PBS に懸濁し、冷却しながら 10 分から 30 分撹拌したのち、遠心分離によって回収した。タンパク質の抽出は細胞塊を lysis buffer (1 % NP-40, 1 % deoxycholate, 2 % SDS, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 5 mM EDTA, protease inhibitor cocktail set I, phosphatase inhibitor cocktail set I [Calbiochem]) で溶解して行った。RNA の抽出は NucleoSpin RNA (MACHEREY-NAGEL) により行った。

結果および考察

ヒトの正常乳腺上皮に由来する S1 細胞にグルコーストランスポーターの一種である GLUT3 を過剰に発現させると、およそ 60 % の細胞群で腫瘍塊様の 3次元形態の形成がみられた (図 1a)。このとき、残りの 40 % の細胞群では依然として上皮組織様形態を示すが、GLUT3 の発現を免疫染色で確認したところ、興味深いことに、ほぼ全ての細胞群において GLUT3 の内腔側への集積が確認された (図 1b)。この場合、GLUT3 はグルコース輸送を促進することは

きないため、糖代謝の活性化に起因するシグナルの活性化¹⁾を行うことは不可能であると考えられる。一方で、GLUT3を高発現したS1細胞はグルコース非存在下では上記のような表現型の転換を全く示さないが、このときGLUT3はほぼ全ての細胞群において細胞底面（細胞外基質と接する面）に集積していた（図1c）。すなわち、上記の内腔への局在とは全く逆の現象がみられた。腫瘍塊様の形態に変化した群の多くではGLUT3が細胞膜全体に広がっていることから（図1a）、腫瘍塊様構造の形成が促進された細胞群においては、GLUT3の輸送制御が最初から破綻しているか、局在制御機構の許容量以上のGLUT3が発現したために、シグナルの活性化および表現型の変化を抑えることができなくなったものと思われる。

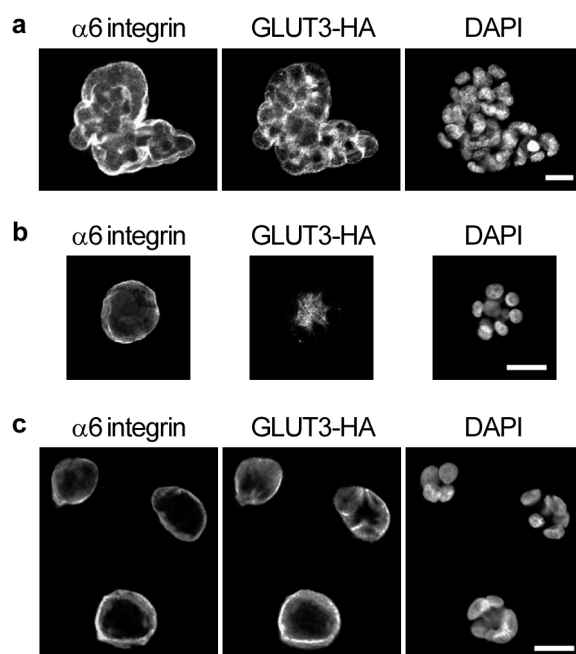


図1. 正常細胞における糖濃度に応じたグルコーストランスポーター局在の変化

GLUT3 - HA を安定的に過剰発現したS1細胞を3次元培養し、標記の抗体等にて免疫染色を行った。 $\alpha 6$ integrin は細胞基底面のマーカーであり、上皮極性が保持されている場合は底面側のみに局在する。(aおよびb) 高糖濃度 (17.5 mM) における細胞集団の構造およびGLUT3の局在。aと同様の形態を示す細胞群はおよそ4割であり、残りはbと同様の形態を示した。(c) 糖飢餓 (0 mM) における細胞集団の構造およびGLUT3の局在。ほぼ全ての細胞群においてこのような形態がみられた。Scale bars: 20 μ m.

上記の結果は、上皮細胞には糖飢餓時には糖の取り込みを盛んにし、糖代謝が充足しているときにはこれを抑制する機構が存在することを示唆している。一方、視点を変えると、癌細胞は糖飢餓時には正常細胞と同様の表現型を示すが、糖代謝が充足した際に、これを制限せずそのまま代謝およびシグナルを活性化するために悪性形質を獲得してしまうと解釈することもできる。このような「糖代謝の節制（あるいは摂生）機構」を明らかにできれば、新たな治療法やマーカーの導出に繋がるものと考えられる。

そこで正常細胞S1およびそれに由来する形質転換細胞であるT42を、低濃度および高濃度のグルコース存在下において3次元培養し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現を網羅的に解析した。S1細胞のみにおいてグルコース濃度に応じて発現量の変化する遺伝子群を得るため、高糖濃度下のS1細胞において、低糖濃度下のS1細胞および高糖濃度下のT42細胞と比較して、いずれも4倍以上の高発現を示すことを第一の条件として遺伝子を選別した。また、T42細胞においては低糖濃度と高糖濃度を比較しても1.5倍以下の発現変化に留まることを第二の条件として選別した。いずれの条件も満たす遺伝子は、185個得られた。これらのうち糖濃度変化に応じたGLUT局在変化を直接的あるいは間接的に制御し得るものを幾つか選定し、以降の解析を進めた。具体的には、細胞内シグナルに影響し得る受容体タンパク質Rや、膜タンパク質であるGLUTの局在を制御し得る小胞輸送関連タンパク質A等を、以降の解析の対象とした。

受容体 R について、糖代謝状態に応じてタンパク質発現量の変動がみられるか、ウエスタンブロットにて調べた。図 2a に示すように、受容体 R の発現は低糖濃度における S1 細胞で低く、高糖濃度では亢進していた。また、癌細胞 T4-2 ではこの発現変化がみられなかった。受容体 R をコードするプラスミドを T4-2 細胞にトランスフェクションして 3 次元培養を行うと、増殖抑制や形態変化がみられ、正常細胞様の組織構造が形成された (図 2b)。

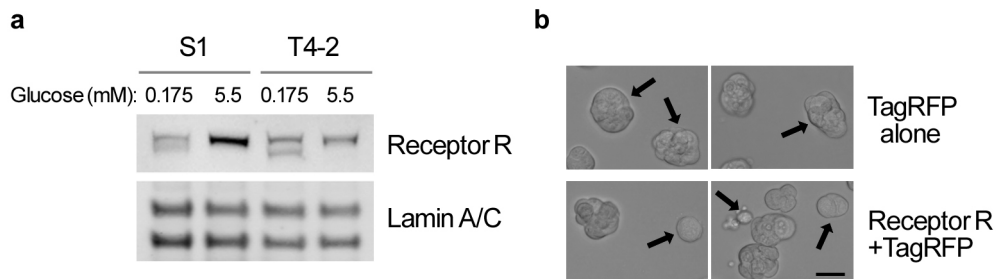


図 2. 糖濃度依存的な受容体 R の発現変化および受容体 R の強制発現による表現型への影響

(a) ウエスタンブロットによる、標記の糖濃度で 3 次元培養した S1 および T4-2 細胞における受容体 R の発現量変化の確認。Lamin A/C は内部コントロールとして使用した。(b) 受容体 R を強制的に高発現した T4-2 の 3 次元形態。トランスフェクションのマーカーとして TagRFP を同時に導入した。矢印で示した細胞において RFP の発現がみられた。コントロールとして TagRFP のみを発現させた細胞の形態も同時に観察した。Scale bars: 20 μ m.

一方、小胞輸送制御因子 A についてはこれまで解析された例が少なく有用な抗体などの情報が乏しいため、タンパク質レベルでの解析に遅れが生じている。しかしながら、The Cancer Genome Atlas (TCGA) データベースを用いた解析により、遺伝子 A の mRNA 発現量は乳癌のみならず膀胱癌においても、予後不良と逆相関することが明らかとなった (図 3a および図 3b)。

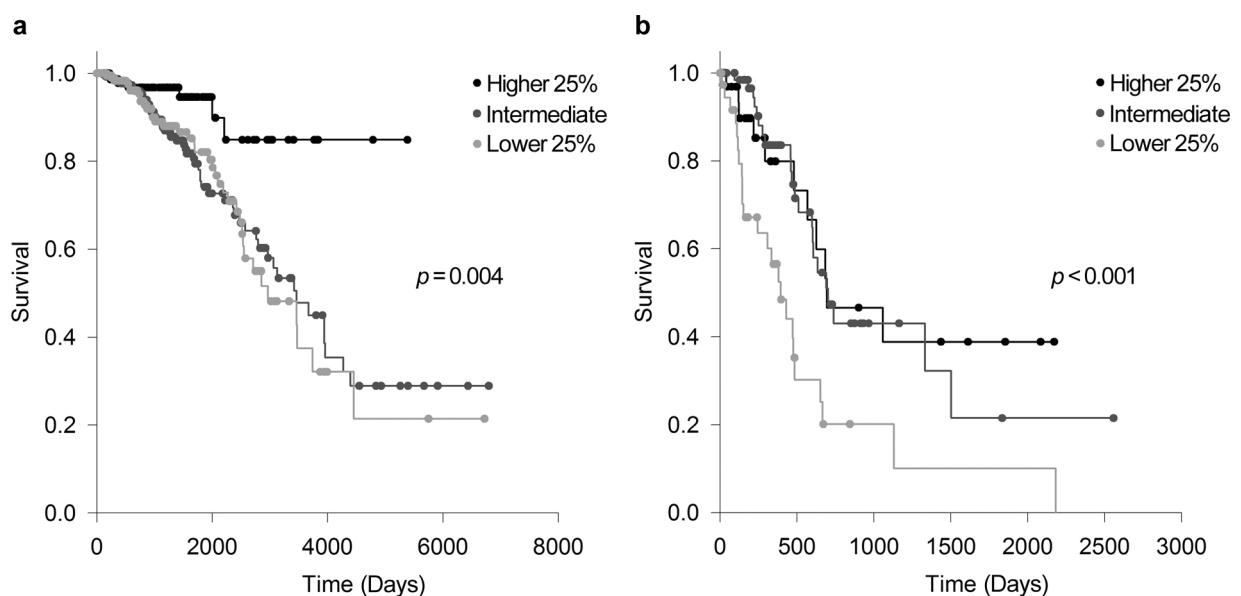


図 3. TCGA データベースを用いた遺伝子 A の発現量と予後の相関解析

(a および b) TCGA データベースに登録されている乳癌 (a) および膀胱癌 (b) 患者のデータについて、遺伝子 A の発現量に基づき 3 グループに分類したのち、各グループについて Kaplan-Meier 法にて生存曲線を得た。いずれも Log-rank 検定にて統計的有意差がみられた。

以上の結果から、受容体 R および受容体 A は、糖代謝が亢進し得る状況において高発現し、それによって正常細胞の表現型の変化を抑える役割を果たしていることが示唆された。現在、これらの因子の発現を制御する上流メカニズムの同定と、下流で起こる糖代謝やシグナルの制御について、詳細な解析を進めている。

癌細胞の糖代謝亢進は「ワールブルグ効果」と呼ばれ、細胞分裂に必要なバイオマスの供給や、ATP や抗酸化物質等、細胞の増殖および生存に必須である物質の産生に寄与することが、その主要な役割であると考えられてきた³⁻⁵⁾。一方で、最近の研究からは、盛んに増殖する細胞のバイオマス供給におけるグルコースの寄与は低く、炭素の供給は大部分がアミノ酸に依存していることが示唆されている⁶⁾。すなわち、糖代謝の亢進は、癌化に伴って生じるバイオマス供給の需要に対する応答として（つまりがん化の結果として）起こるのではなく、その他の役割によってがんの悪性形質そのものに寄与していることが示唆され、我々が着目している「糖代謝亢進によるシグナルの活性化」という現象は、その一端であると考えられる。本研究で明らかとなりつつある正常細胞における糖代謝シグナルの抑制機構は、代謝変化そのものが細胞のがん化の過程で原因的な側面を持つことの裏付けであるとも言える。今後、より詳細なメカニズムの解析を続け、有用な知見の導出へと繋げていきたい。

文 献

- 1) Onodera Y, Nam JM, Bissell MJ. Increased sugar uptake promotes oncogenesis via EPAC/RAP1 and O-GlcNAc pathways. *J Clin Invest*. 2014 124(1):367-84. doi: 10.1172/JCI63146.
- 2) Briand P, Petersen OW, Van Deurs B. A new diploid nontumorigenic human breast epithelial cell line isolated and propagated in chemically defined medium. *In Vitro Cell Dev Biol*. 1987 23(3):181-8.
- 3) Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer Cell*. 2008 13(6):472-82. doi: 10.1016/j.ccr.2008.05.005.
- 4) Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009 324(5930):1029-33. doi: 10.1126/science.1160809.
- 5) Levine AJ, Puzio-Kuter AM. The control of the metabolic switch in cancers by oncogenes and tumor suppressor genes. *Science*. 2010 330(6009):1340-4. doi: 10.1126/science.1193494.
- 6) Hosios AM, Hecht VC, Danai LV, Johnson MO, Rathmell JC, Steinhauser ML, Manalis SR, Vander Heiden MG. Amino Acids Rather than Glucose Account for the Majority of Cell Mass in Proliferating Mammalian Cells. *Dev Cell*. 2016 36(5):540-9. doi: 10.1016/j.devcel.2016.02.012.