



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	がん細胞が腫瘍微小環境に与える影響とそのメカニズムの解明 [全文の要約]
Author(s)	堀川, 芽衣
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2727 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14980号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86076
Type	doctoral thesis
File Information	HORIKAWA_Mei_summary.pdf



学位論文（要約）

がん細胞が腫瘍微小環境に与える影響とそのメカニズムの解明

(Studies on the effect of cancer cells on the tumor
microenvironment and its mechanisms)

2022年3月

北海道大学

堀川 芽衣

学位論文（要約）

がん細胞が腫瘍微小環境に与える影響とそのメカニズムの解析

(Studies on the effect of cancer cells on the tumor
microenvironment and its mechanisms)

2022年3月

北海道大学

堀川 芽衣

学位論文の要約

がん細胞は異常な増殖や強い生存性を保持し、それぞれの細胞において糖代謝が異常に亢進している。それに伴い、腫瘍微小環境における糖の消費が亢進して糖は枯渇し、また、糖代謝亢進によって乳酸などの酸性の代謝産物の蓄積も高まり、微小環境は酸性化する。微小環境の糖枯渇と酸性化などの厳しい環境は本来、細胞の生存を難しくさせる変化であるが、がん細胞はそのようなストレスにตอบสนองして、細胞内の pH を維持する機構や他の細胞の代謝産物を受け取り活用するような仕組みを利用することで、微小環境が悪化した状態でも生存や増殖を維持することができるようになる。結果として、微小環境の酸性化や糖枯渇がさらに進むが、このような微小環境の変化は免疫逃避や薬剤・放射線への耐性を惹起し、がん治療の奏功を妨げる。一方、これらの厳しいストレスに対するがん細胞の様々な応答について、そのメカニズムは未だ明らかになっていない点が多く存在する。本研究では、がん細胞が厳しい微小環境のもとで生存に有利な形質を獲得するメカニズムを解明することにより、がん細胞の生存性の抑制および腫瘍微小環境を治療に望ましい条件に適正化させることのできる新たな治療起点を見出すことを目的としている (Figure 4-1)。本論文では第一章において、がん細胞が微小環境の酸性化にตอบสนองして細胞内の pH を維持する機構について、第二章では糖が枯渇した微小環境において糖枯渇細胞が生存を維持するために行われる代謝協調について、それぞれ分子メカニズムの解明を試みた。

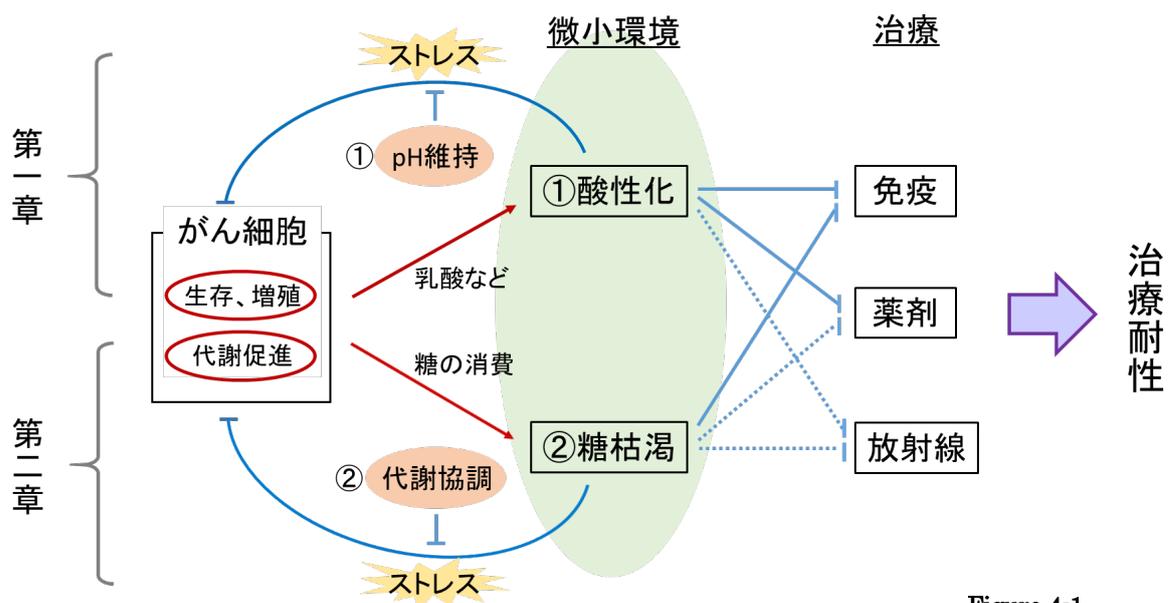


Figure 4-1

第一章：腫瘍微小環境の酸性化に寄与する腫瘍関連酵素 CAIX の発現

および局在の制御に関する解析

がん細胞による糖代謝の結果生じた乳酸などの代謝産物が細胞外に排出されることにより腫瘍微小環境は酸性化し、がん細胞では細胞内部で生じた物質に加えて、細胞外からも酸性物質が流入するようになる。腫瘍組織が酸性化していることは古くから知られており、がん細胞内部も同様に酸性化していると考えられていた。しかしながら、pH の測定技術の発展に伴い、より正確に細胞内 pH を測定することができるようになると、周囲が酸性化した状態でもがん細胞内部の pH は、何らかの仕組みによって正常組織内の細胞よりもむしろ僅かながらアルカリ化していることがわかってきた。このようなアルカリ性の細胞内環境では、がん細胞の様々な細胞機能が活性化され、増殖やアポトーシス回避、飢餓応答、浸潤・転移能が亢進し、がんの悪性度を高めている。一方、細胞外の酸性化は、がん細胞の悪性度の亢進のみならず、免疫逃避や薬剤耐性などに寄与しており、結果としてがん治療の奏功を妨げることが報告されている。

上記のようにがん細胞の内部は弱アルカリ性に保たれており、細胞内の酸性化はがん細胞においても多大なストレスとなる。したがって腫瘍微小環境が酸性化した状況において、がん細胞では内部 pH を維持するための応答経路が増強する。pH を制御する機能を持つ分子はさまざまなものが存在するが、なかでも Carbonic Anhydrase IX (CAIX) は、以降に述べるように、腫瘍関連酵素として近年着目されている分子である。

CAIX は多くの組織・器官でがん細胞特異的に発現し、正常細胞にはほとんど発現しないことから、がん細胞特異的な治療を行うための標的分子として有用であると考えられている。CAIX は細胞表面に局在し、その細胞外ドメインが触媒的および非触媒的に機能

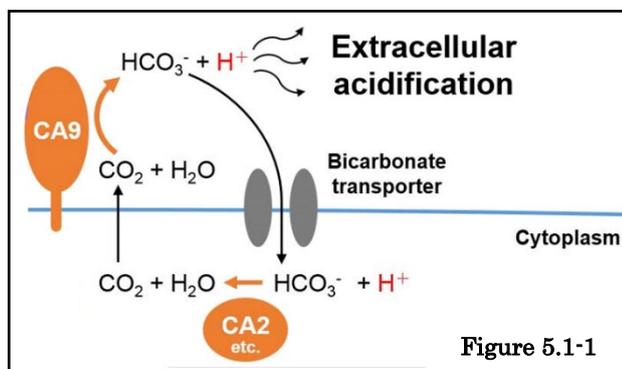
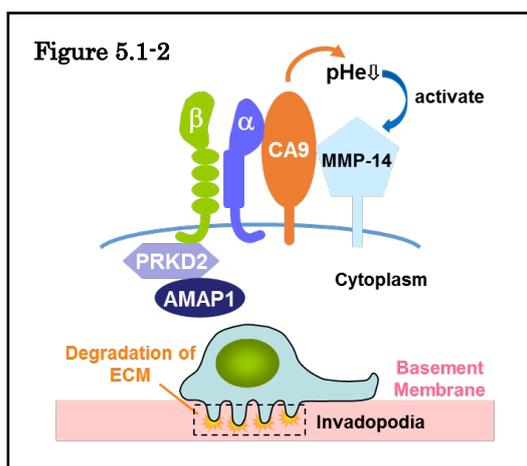


Figure 5.1-1

して pH 制御に寄与している (Figure 5.1-1)。がん細胞の糖代謝亢進によって細胞外に排出される乳酸などの酸性の代謝産物に加え、CAIX のような細胞内 pH 制御に関わる分子の働きにより、がん細胞では細胞外 pH が酸性に傾き (extracellular acidification)、腫瘍微小環境の酸性化が促進されている。また、CAIX は pH 制御に加えて、がん細胞におけるシグナル伝達や上皮間葉転換 (EMT : Epithelial Mesenchymal Transition)、細胞遊走、浸潤、転移などがんの悪性度を規定する要素に寄与する働きをもつことが知られており、腫瘍の悪性度・予後不良を示すマーカーとしても用いられている。

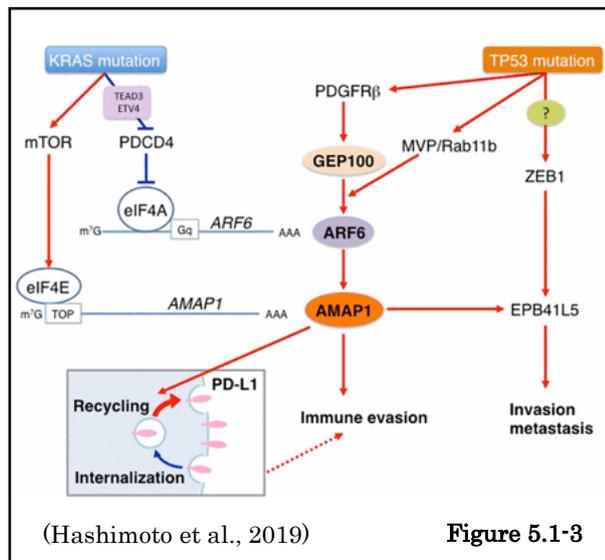
CAIX の機能を阻害する戦略としては、細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体製剤や、阻害剤として作用する低分子化合物が開発されている。CAIX の内在的な機能制御の様式については不明な点が多いが、転写制御については比較的解析が進んでおり、プロモーター領域には転写因子 hypoxia-inducible factor -1 (HIF-1) による制御を受ける hypoxia responsive element (HRE) を有することが報告されている。CAIX はクラスリン依存的エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、細胞膜上に再輸送 (リサイクリング) されていることが知られているものの、輸送メカニズムはこれまで解析されていない。CAIX が細胞膜に表出するメカニズムを明らかにし、CAIX を阻害するための新たな標的点を見出すことができれば、酸性環境下のがん細胞の機能を停止させて生存や増殖を防ぐと共に、糖代謝の持続による微小環境の酸性化も改善できるかもしれない。このような新たな戦略を既存の化学療法や放射線療法と組み合わせることで、治療の奏効率を向上させることができると期待される。

以上のような背景から、本研究では CAIX の局在制御の重要性に着目し、そのメカニズムの解明を目標とした。過去の報告から、高浸潤性乳癌の細胞株である MDA-MB-231 細胞において、CAIX は $\alpha 2\beta 1$ -integrin や MMP-14 と結合し、仮足 (pseudopodia) および浸潤仮足 (invadopodia) と呼ばれる細胞外マトリックス (ECM: extracellular matrix) を分解し浸潤・転移を促進する膜構造に局在することがわかっている (Figure 5.1-2)。



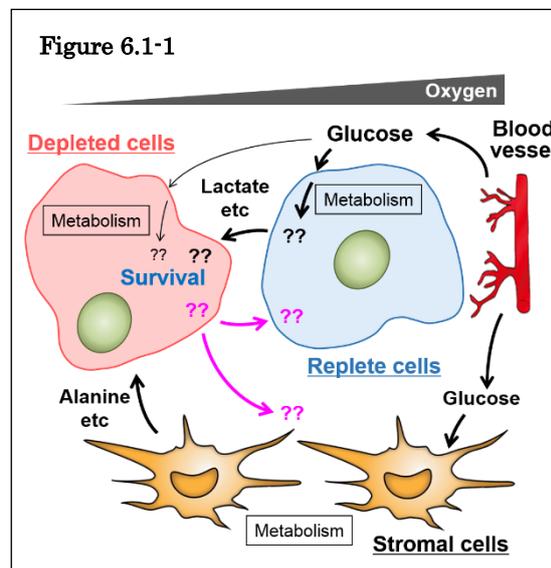
CAIX は細胞内をアルカリ化すると同時に細胞外の pH を酸性に傾け、MMP-14 を活性化して細胞外マトリックスの分解を促すことで、がん細胞の浸潤性および転移性の獲得に大きく寄与していると考えられている。このような CAIX と複合体を形成する分子群と、所属教室で解析してきた小胞輸送制御因子である AMAP1 が相互作用する分子群がよく共通すること、さらに両者の細胞内局在や関与する機能も共通することから、AMAP1 が CAIX の制御に関わる可能性が示唆された。AMAP1 は small GTPase である ARF6 のエフェクター分子であり、両者は浸潤性乳癌細胞で非常に発現が上昇している。また、ARF6 と AMAP1 は共に invadopodia に集積して細胞外マトリックスの分解を促進し、浸潤能を亢進する。AMAP1 のタンパク質相互作用により、 $\beta 1$ -integrin の細胞膜への recycling が促進されることがわかっており、このことはがん細胞が浸潤性を高めることに非常に重要な役割

を果たしている。AMAP1 と $\beta 1$ -integrin は PRKD2 というアダプタータンパク質を介して結合しており、腫瘍細胞においては、また別のアダプタータンパク質の介在により PD-L1 と結合して細胞膜へのリサイクリングを制御していることもわかっている (Figure 5.1-3)。以上に基づき、AMAP1 が CAIX と機能的および物理的に相互作用するという仮説を立て、さまざまな解析を行った。



第二章：腫瘍微小環境の糖枯渇に起因する細胞間代謝協調に関する解析

腫瘍内では血管からの距離の違いや周囲のがん細胞の糖代謝亢進によりそれぞれの細胞でグルコースへのアクセシビリティに差異が生じると考えられる。実際に、複数の先行研究で腫瘍深部において糖枯渇が起こることが示されている。培養環境における糖枯渇は多くのがん細胞を数日のうちに死滅させることを考慮すると、腫瘍組織内の糖欠乏細胞は、グルコース以外の何らかの物質を利用して生存していると推測される。他の細胞に由来する代謝産物等の利用による生存性の維持は一般に「代謝協調」と呼ばれており、グルコースを含む種々の栄養素の欠乏に対する腫瘍の応答として、近年非常に注目されている (Figure 6.1-1)。



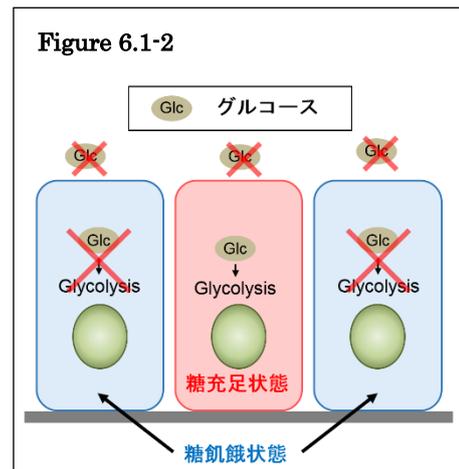
糖枯渇は免疫細胞の機能を著しく減弱させることが知られており、薬剤および放射線の効果にも影響を与えると考えられている。したがって、酸性化への細胞応答と同様に、代謝協調を介した糖枯渇への応答に関する分子メカニズムの解明は、腫瘍の成長を抑制しながら微小環境を適正化するための方法論の導出において非常に大きな意義を持つと考えられる。以上の背景から、本研究では腫瘍内グルコース分布の不均一性を原因として、糖が充足している細胞由来の代謝産物を糖欠乏状態の細胞が受け取

り生存を維持しているような「代謝協調」を想定し、そのメカニズムの解析を行うこととした。

上記のような代謝協調の解析において大きな障壁となるのは、適切な *in vitro* 解析系が存在しないことである。従来のような二次元培養法では、局所的な糖枯渇を再現することはできない。また、種々の三次元培養法で形成した腫瘍塊は糖枯渇領域を生じるものの時空間的な規定はできない（後述）。グルコースの不均一性に基づく代謝協調状態を実験系で再現するための最も簡便な方法は、特定の細胞にのみ糖代謝を行わせることである。より具体的には、グルコースの取り込みを局所的に制御できれば、単一の培養系における糖充足細胞と糖欠乏細胞の共存が可能となり、代謝協調状態を再現できるものと予想される。グルコースの輸送体は GLUT ファミリーや SGLT ファミリーなどを含めると多数存在することが知られている。

理論上、これら全ての遺伝子の発現抑制を細胞特異的に行えば局所的な糖欠乏を誘導できるが、必要な労力や実現可能性を考慮すると最善な方法とは言えない。また、多くの代謝酵素が「内臓酵素」として代謝以外の役割を持つことを考慮すると、解糖系酵素の阻害も不適切である。そこで本研究では、逆転の発想として、「特定の細胞にグルコースを発生させる」ことを考えた (Figure 6.1-2)。のちに詳述するが、特殊な遺伝子を複数導入することにより、通常ヒトの細胞では代謝することのできない「前駆体」からグルコースを生じさせることができると考えた。

しかしながら、この仕組みで糖代謝制御を行いつつ、さらに何らかの遺伝子の発現を制御する場合（過剰発現やノックダウンなど）や、発光または蛍光タンパク質プローブなどを導入する場合を想定すると、さらに多くの遺伝子構築の導入が必要となり、以降の解析での実用性を考慮すると、多数の遺伝子構築の全てが導入された細胞を容易かつ高効率に選択するための手法の確立が必要不可欠であることに思い至った。そこで本研究では、上記の糖代謝制御法の開発と並行して、複数の遺伝子構築を導入した細胞を単一の薬剤によって選択できる「分割型薬剤マーカー遺伝子」の開発に着手した。以下に、分割型マーカーおよび細胞特異的な糖代謝制御法の意義および原理の詳細を述べる。



・分割型薬剤マーカー遺伝子の意義および原理

遺伝子構築をウイルスベクターやトランスポゾン、ゲノム編集等により細胞に導入し、それらをさまざまな実験に使用することは、現在の生物学関連の研究において、必要不可欠な技術である。この際、後に続く実験が精密であるほど、正しく遺伝子導入された細胞のみをより確実に選び出すことが求められる。本研究で行う細胞特異的な糖代謝の制御においても、「グルコース前駆体」のトランスポーターと代謝酵素を確実に同時発現させることが、より精度の高い解析を行うために不可欠である（後述）。

現在、遺伝子導入細胞を最も簡便に選択する方法として広く用いられている手法は、導入する構築自体に組み込まれた「マーカー遺伝子」の利用である。代表的なマーカー遺伝子としては蛍光タンパク質や特定の薬剤の代謝酵素などが挙げられる。前者の蛍光タンパク質マーカーでは、GFP や RFP などの蛍光を利用し、セルソーターによって分離することで目的の細胞を選別する。この方法ではある強度以上の蛍光を示す細胞を選択することで、目的の遺伝子構築を十分に発現する細胞を選び出すことができるが、セルソーターは研究室によっては管理・保有の難しい装置であることや、選別の為に用いた蛍光波長域は後の解析で使用できなくなるという問題がある。

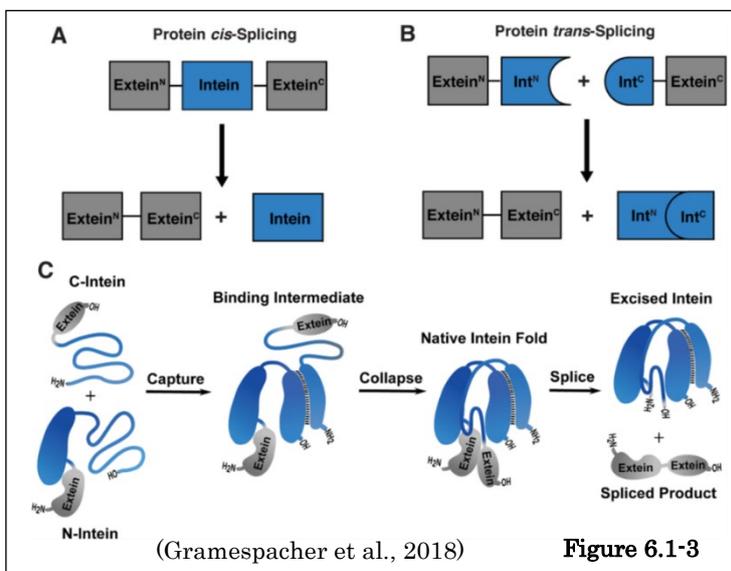
一方、後者の薬剤代謝酵素を用いた手法では、Puromycin や Blasticidin S などの細胞毒性を有する薬剤を細胞培養液に添加し、それらを代謝・無害化する酵素をマーカーとして発現する細胞のみが生存できることを利用して目的の細胞を選別する。こちらの方法は特別な装置を必要とせず、薬剤のみの使用で細胞の選別ができる点で優れている。しかし、薬剤による選別は蛍光タンパク質マーカーを用いる場合と比べて、遺伝子構築が導入されなかった細胞を排除するために比較的長い期間を要すること、細胞の種類により薬剤処理の際の適正な薬剤濃度・期間も異なり、実験ごとに処理条件の最適化が必要である点が欠点である。また、導入したい遺伝子構築の数が増えるとそれだけ選別に必要な薬剤も増えるが、選別に適する薬剤の数に限りがある点や処理条件の決定がさらに複雑化することが問題となる。なお、このような多重選択については、蛍光タンパク質マーカーを用いた場合も、蛍光波長の選択数の制限や細胞の抽出手順が煩雑になること、偽陽性が生じやすくなることが課題である。

前述した selection 効率の問題に加え、使用する薬剤の種類によっては予期しない副次的な反応が起こることも報告されている。具体的には、selection 薬剤として Zeocin を用いるとき、処理が高濃度もしくは長期間になった場合に DNA ダメージや変異がしばしば引き起こされる。その他にも、Neomycin/G418 や Hygromycin B などの耐性遺伝子として用いられる aminoglycoside phosphotransferase 関連の酵素はプロテインキナーゼとして機能することを示

唆する報告があり、それらの使用により selection された細胞の細胞内シグナリングが影響を受ける危険性がある。さらに、Puromycin 耐性遺伝子については活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species) 依存的にタンパク凝集を誘導する可能性が示されているが、安定発現細胞株ではそのような影響はみられない。したがって、使用する薬剤を決定する上で、薬剤の種類をなるべく少なく抑えるだけでなく、実験上好ましくない影響を及ぼす薬剤を避けて適切な組み合わせを選択することが非常に重要である。

そこで本研究では、過去の報告から細胞への影響や選択効率の面で最も優れた薬剤マーカーであると考えられる「ピューロマイシン耐性酵素 (PAC: puromycin-N-acetyltransferase)」に着目し、Puromycin 単剤のみで複数の遺伝子構築を導入した細胞を同時あるいは段階的に selection することのできる新たな手法の確立を試みた。具体的には、PAC を活性のない2~4分割の断片として細胞に発現させ、それらが正しく結合して全長酵素として再構成してはじめて耐性を示すような仕組みの開発に取り組んだ。分割された PAC はタンパク質のトランススプライシングを介する複数の split-intein と呼ばれる分子により再構成されるよう設計した。

以下に、intein の特徴や機能について述べる。mRNA における intron と exon の対応と同様に、intein により分割されたタンパク質は extein と呼ばれ、N 末端側と C 末端側をそれぞれ N-extein および C-extein (Ext_N、Ext_C) と呼ぶ。両者を分断する intein が除去されると共に、Ext_N および Ext_C



はペプチド結合により接続されて一つのタンパク質となる。この反応は、cis-splicing と呼ばれる。また、場合によって intein は分割された “split-intein” として存在しており、N 末端側と C 末端側をそれぞれ N-intein および C-intein (Int_N、Int_C) と呼ぶ。両者が会合することで上記と同様の反応を起こすことが可能であり (Figure 6.1-3)、これを trans-splicing と呼ぶ。種々の intein および split-intein が存在するが、その多くにおいて、Ext_C の 1 番目のアミノ酸はセリンもしくはシステインであることが望ましいとされている。すなわち、trans-splicing によってタンパク質の分割・再構成を行う場合、セリンまたはシ

ステインを分割点とする必要がある。

本研究では、幾つかの異なる *split-intein* により PAC をさまざまな部位で N 末端側および C 末端側に分割し (PAC_N、PAC_C)、各 *split-intein* において最適な PAC 切断部位を決定した。これらの「最適切断部位」において PAC を複数の断片に分割し、各断片を異なる Int_N/Int_C のペアによって接続することで、PAC の全長タンパク質を正しく再構成させることを試みた。PAC のアミノ酸配列に存在するセリンおよびシステイン残基は少数であり、分割点の候補が限られる。そこで本研究では、PAC の類似酵素のアミノ酸配列に含まれるセリン・システイン残基を検索し、それらに対応した位置にあるアミノ酸をセリン・システイン残基に置き換えた PAC 変異体を作成し、*trans-splicing* と再構成後の酵素活性を検討した。赤色または緑色の蛍光タンパク質を *bicistronic* に発現する *vector* にこれらの PAC-*intein* 断片を組み込んで細胞に安定導入して Puromycin にて *selection* したのち、両方の蛍光タンパク質を発現する割合をそれぞれの分割点について解析した。また、*selection* 後の細胞における、高濃度の Puromycin 濃度への耐性についても検討した。これらについて良好な結果を示す切断部位を組み合わせることができれば、3 つ以上の断片に分割した PAC を再構成して酵素活性をもたせることができると考えた。また、上記のようにして得た「多分割型 PAC 遺伝子」をウイルス様粒子 (VLP : virus-like particle) に組み込み、VLP による細胞外からのタンパク質導入を介して PAC 断片を再構成することができれば、複数の遺伝子構築を一つずつ導入し、その都度 Puromycin 選択を行うことができるような、*stepwise selection* に対応することも可能となると考え、そのような技術の開発も試みた。

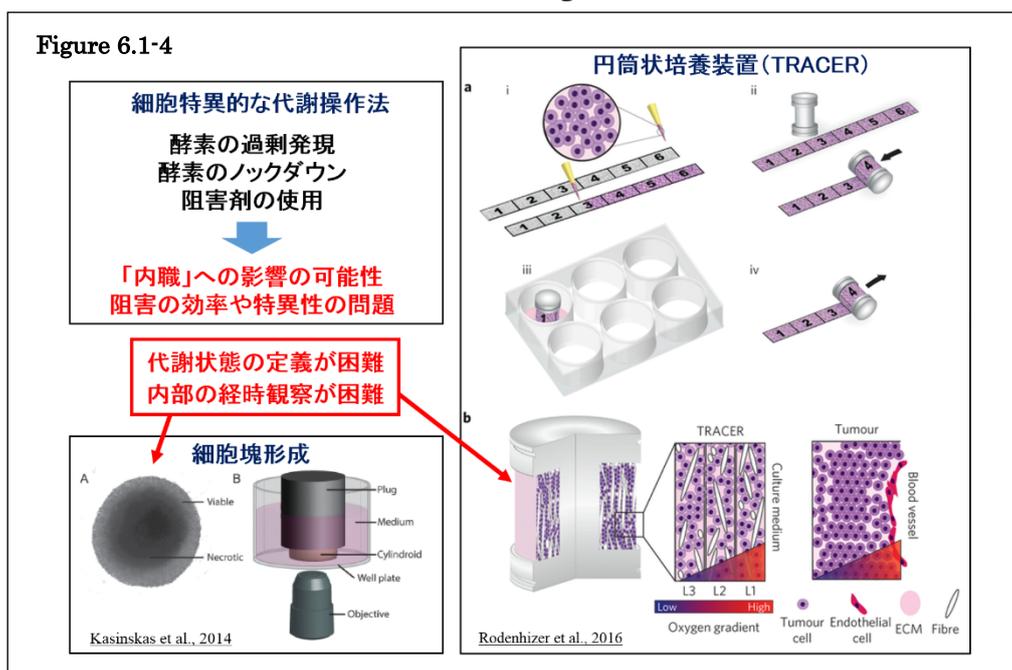
・細胞特異的な糖代謝制御法の意義および原理

がん細胞の代謝動態は、表現型や悪性度と密接に関連する。腫瘍におけるがん細胞の遺伝的多様性は一般に“*heterogeneity*”と呼ばれ、がんの治療をするうえで重大な課題となる治療抵抗性を形成する大きな要因のひとつとして考えられているが、上記を勘案すると、腫瘍内に存在するがん細胞の代謝動態の違いもまた、“*heterogeneity*”の背景を成す重要な要素である。

多くのがん細胞では糖代謝が亢進しており、その結果として、第一章で述べたような微小環境の酸性化が起こる。それと同時に、血管からの距離の違いも相まって、腫瘍内の一部の領域では糖が著しく減少する (Walker-Samuel et al.,2013 など)。すなわち、腫瘍内のグルコースへのアクセシビリティには不均一性が生じることとなるが、解糖系代謝はがんの悪性形質やそれに必要なシグナル伝達を直接的に制御することから、上記のような“*heterogeneity*”にも寄与すると考えられる。また、腫瘍内の糖枯渇は、免疫細胞の働きを抑制する。こ

これは癌細胞との栄養素の奪い合いの結果であることから “metabolic competition” (「代謝競合」) と呼ばれており、治療抵抗性の要因として注目されている。

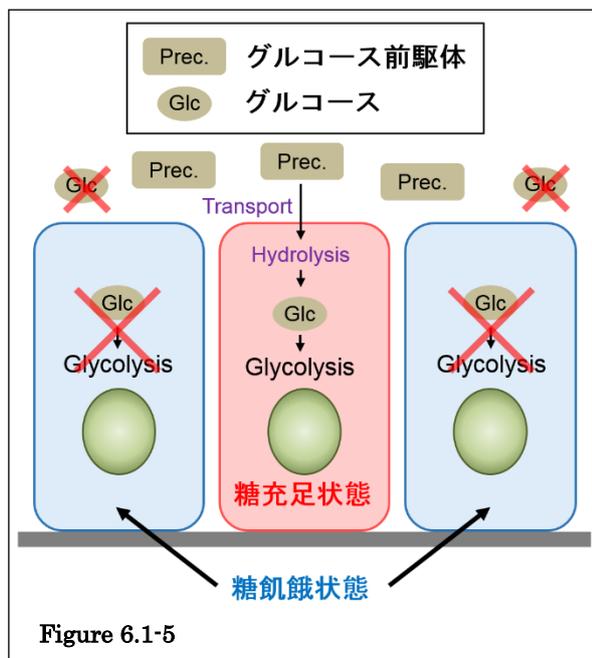
一方で、糖枯渇は本来、がん細胞自身にも非常に大きなストレスである。実際に、多くの癌細胞株は培養環境において糖枯渇により僅か数日のうちに死滅する。上述のように、腫瘍内部ではグルコースの分布が不均一であり、異なる代謝状態の細胞が存在している。そのような細胞の間で様々な代謝産物がやり取りされ、他方の生存性がサポートされるような状態は “metabolic cooperation” (代謝協調) と呼ばれており、その意義やメカニズムについての解明が待たれている。本研究では、糖枯渇の耐性メカニズムとしての代謝協調に着目し、そのメカニズムの同定を目標とするが、そのような状態を実験系で再現することは困難である。上述のように、「細胞特異的な糖代謝の制御」は、従来のような内在遺伝子の発現抑制による方法では実現性が乏しい。三次元培養による細胞塊形成や特殊な培養器具により栄養素分布の不均一性を再現することはできるが、「充足」と「欠乏」の各状態を任意に設定できず、それを知るためには多大な労力を要する代謝産物解析が必須となる (Figure 6.1-4)。



その他の一般的な方法は、馴化培地を用いるものである。細胞を糖充足状態で培養し、その培地を回収して糖欠乏状態の細胞に与える、という方法であるが、そのような解析を行う際は、グルコースを (ほとんど) 含まず、その中間代謝産物のみを含むような培地を用いるのが理想的である。まず細胞をグルコース含有培地で一定期間培養して、グルコース代謝が平衡状態に達した頃にグルコースを含まない培地に交換し、一定時間の培養により細胞内にのみ存在するグルコ

一ス由来の代謝産物を細胞外に放出させれば、その馴化培地は、理論上、上記のような状態になっていると考えられる。しかしこの場合、グルコース不含培地に切り替える段階で、細胞は糖枯渇に晒されることになる。そのため通常状態とは異なった代謝動態となり、馴化培地の成分に影響を及ぼすことが危惧され、本来得ようとしていた情報が失われる可能性が否定できない。

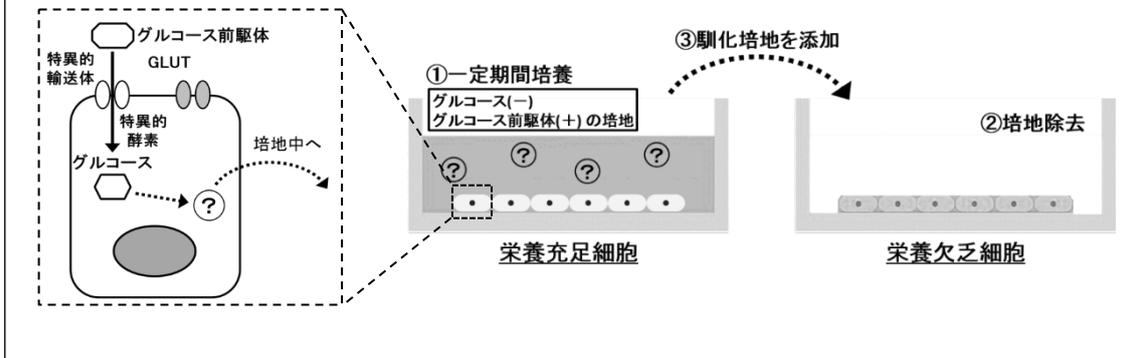
以上のような背景から、「特定の細胞の中にのみグルコースが存在する状態」を作り出すことが、本研究の目標達成において最も有効な手法であると考えた。具体的には、細胞内に取り込まれた後に特異的な酵素によってグルコースへと変換される「前駆体」と、その前駆体に特異的な輸送体と代謝酵素を発現した細胞を用いる新たな手法の開発に着手した (Figure 6.1-5)。これを用いることにより、上記のような従来の実験系の問題点を克服できると考えている。



第一に、この実験系では、最初から糖充足細胞と糖欠乏細胞が定義された状態で両者を共存させることが可能である。「カルチャーインサート」などを用いることで、両者を共存状態から瞬時に分離でき、状態変化を伴うことなく種々の解析へと直ちに供することができるため、三次元培養や特殊器具による手法での問題が解決できる。がん細胞の性質保持において三次元培養は非常に有用であり、代謝解析も三次元環境で行うことが望ましいが、この実験法はあらゆる培養環境において適用可能である。

第二に、この実験系では、グルコースを含まず前駆体のみを含む培地でグルコース代謝を行わせながら、通常のグルコース代謝を継続しながら中間代謝産物を放出させることができる。「糖充足細胞」をこの実験系で一定期間培養した後の馴化培地にはグルコース自体は含まれないため、それをそのまま回収して糖枯渇状態の細胞の培養に用いることで、グルコース以外の何らかの物質による生存性維持が開始される (Figure 6.1-6)。すなわち、従来の馴化培地を用いた手法の問題も、この手法によって解決することが可能である。以上のように、従来法では正確に捉えられなかった代謝産物を介した細胞間の「代謝協調」のメカニズムを、より明確にできる点が、本研究の最大の特徴である。

Figure 6.1-6



また、この解析法を確立することができれば、本研究での使用のみならず、培地中の代謝産物解析を行う他の研究にも役立てられる汎用性の高い技術となると予想される。なお、上記の手法は、安定同位体で標識された代謝産物解析（いわゆる「トレーサー解析」）にも適用化能である。グルコースと比べると高価ではあるが、安定同位体標識された「グルコース前駆体」も入手可能であり、それを用いれば共培養下の細胞内代謝産物を解析することによっても、代謝産物の授受を推測することができる。このような実験系についてはこれまで報告がなく、非常に新規性の高いものであると考えている。

