

酸性環境における腫瘍の悪性化機構

近藤 彩乃¹, 大澤 毅²

1. はじめに

腫瘍組織内には、がん細胞の不均一性 (heterogeneity) や低酸素、低栄養といった腫瘍微小環境が存在することが知られている。近年、固形がんにおいては、不完全な血管構築による血流不全から引き起こされる劣悪な腫瘍微小環境が、ゲノム不安定性やエピゲノム変化、エネルギー代謝変動、転移・浸潤促進などを引き起こし、細胞死耐性や薬剤耐性の獲得、免疫反応の回避を介して、がんの悪性化に寄与することが注目されている。腫瘍微小環境の一つとして酸性環境が存在することは古く1950年代から知られていたが、低酸素環境における解糖系亢進の「結果」として捉えられ、腫瘍の悪性化に対する関与は詳細に明らかにされていなかった。しかし最近の研究で、酸性環境が、酸性環境特異的な細胞応答やがんの代謝変化を通じて悪性化に寄与することが提唱されてきた。本稿では、酸性環境における腫瘍の悪性化機構について、近年筆者らが明らかにしたSREBP2を介したコレステロール、酢酸代謝制御を中心に解説する。

2. 腫瘍微小環境とがん悪性化

腫瘍血管は正常血管と比較し、血管内皮細胞どうしや血管内皮細胞と血管壁細胞の接着が疎になるため血管透過性が高く、基底膜構造も異常であることが知られている¹⁾。これら未成熟な血管構造は、乱雑で不規則な走行、大中小血管の階層性の喪失を起し、無秩序な血管構造を示す。そのため、がん組織では血管が豊富であるにもかかわらず血流が少なく、腫瘍組織内には低酸素や低栄養の微小環境

が生じ、がん細胞がこの過酷な微小環境に対し適応することで、血管新生やdormancy (腫瘍が長期間増殖を停止し、休止・静止している状態) の獲得、抗がん剤への抵抗性を引き起こすと考えられている。

細胞の環境応答機構として、トランスクリプトームやエピゲノムの変化があげられる。細胞内シグナル伝達は、外部環境情報を転写因子に伝達し、遺伝子発現を制御して細胞形質変化を起こす分子機構である。これらがタンパク質のリン酸化、相互作用、分解等生化学的反応と協奏的に起こり、複雑な細胞応答が制御される。たとえば、低酸素環境においては低酸素応答因子1 (hypoxia-inducible factor 1: HIF1) の安定性が向上し、vascular endothelial growth factor (VEGF) をはじめとする腫瘍血管新生に関わる遺伝子群や、「Warburg 効果」として知られる解糖系酵素群の発現を誘導し、低酸素微小環境に適応する²⁾。一方低栄養環境では、小胞体ストレス応答を担うactivating transcription factor 4 (ATF4) やForkhead box O (FOXO) ファミリー転写因子等の活性化が引き起こされ、ストレス応答、代謝制御、細胞周期、アポトーシス、DNA修復などに関連する遺伝子の発現誘導を促し、低栄養環境でのがん細胞のdormancyの獲得や薬剤耐性に寄与していると考えられている^{3,4)}。このように低酸素、低栄養などの腫瘍微小環境において、それぞれ異なった転写因子が遺伝子発現変化を起こし、劣悪な環境に適応することで、がんの進展や治療抵抗性を起こすと考えられている^{2,5)}。

3. 腫瘍における酸性環境

腫瘍においては、通常組織でpH 7.4に保たれている細胞外pHがpH 6.8程度まで低下することが報告されている⁶⁾。この酸性環境は、低酸素状態、および増殖の盛んながん細胞における解糖系亢進の結果引き起こされることが知られている。低酸素環境におけるHIF1の標的因子であるglucose transporter, type 1 (GLUT1) の発現亢進により細胞内へのグルコースの取り込みが促進され、同様にHIF1の標的遺伝子である一連の解糖系酵素群によってグルコースが代謝され、ATPを生成する過程で乳酸 (lactate) とプロトン (H^+) を生成する。これらはともに正の電荷を帯びており、細胞内pHは低下傾向になる。細胞内pHを一定に維持するため、 Na^+/H^+ exchanger isoform 1 (NHE1) や

¹協和発酵キリン株式会社 (東京都町田市旭町3-6-6)

²東京大学先端科学技術センターニュートリオミクス・腫瘍学分野 (東京都目黒区駒場4-6-1)

Acidic tumor microenvironment promotes tumor progression

Ayano Kondo^{1,2} and Tsuyoshi Osawa² (¹Innovative Technology Laboratories, Kyowa Hakko Kirin, Co., Ltd., 3-6-6 Asahi-machi, Machida-shi, Tokyo, ²Division of Integrative Nutriomics and Oncology, RCAST, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2018.900502

© 2018 公益社団法人日本生化学会

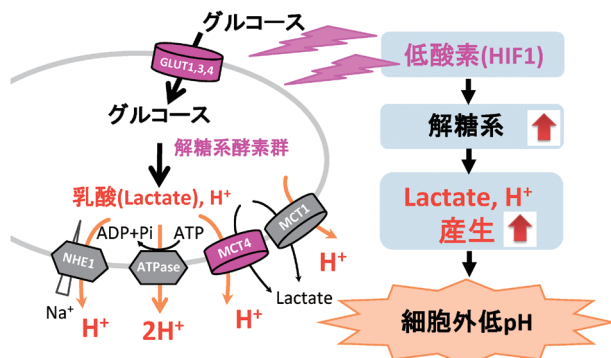


図1 低酸素環境による酸性環境誘発メカニズム

酸性環境は、低酸素状態、および増殖の盛んながん細胞における解糖系の亢進の結果引き起こされる。HIF1の標的因子GLUT1の発現亢進により細胞内へのグルコースの取り込みが促進され、同様にHIF1によって発現誘導された一連の解糖系酵素群によってグルコースが代謝されてエネルギー生成する過程で乳酸とプロトン (H⁺) を生成する。この乳酸やH⁺がNHE1やATPase, MCT1, 4によって細胞外に排出され、細胞外pHが低下する。

ATPase, monocarboxylate transporter 1, 4 (MCT1, 4) 等の膜タンパク質によって乳酸やプロトンを細胞外に排出し、細胞外pHが低下する^{7,8)} (図1)。

1990年代から2000年代にかけて、酸性環境は、がんの進展、特に浸潤や転移の促進に寄与することが報告されてきた⁹⁾。具体的には、酸性環境はVEGFやインターロイキン (IL)-8等の血管新生関連因子の発現を誘導し、腫瘍血管新生に寄与する報告や、細胞骨格のリモデリングを介した細胞極性変化やmatrix metalloproteinase-2 (MMP2), MMP9などのプロテアーゼの発現亢進による細胞外基質分解を介してがん細胞の遊走能を増加させたという報告がなされた。*in vivo*においても、xenograftモデルで酸性環境下に置かれたがん細胞は転移能が亢進することが示唆されており、酸性環境ががんの悪性化に貢献することが認識されつつある。しかしながら、その環境適応および悪性化をつかさどる制御転写因子、その結果引き起こされる転写応答変化やがん代謝に対する影響は明らかにされていなかった。

4. 酸性環境におけるSREBP2による転写応答制御

そこで我々のグループは、網羅的かつアンバイアスに酸性環境における制御転写因子を予測するために、酸性状態を模した培養系を用い、がん細胞に対しトランスクリプトーム、エピゲノムのオミクス統合解析を行った。その結果、酸性環境においては、低酸素や低栄養環境とは大きく異なった遺伝子発現変化やクロマチン構造変化を起こすことが明らかとなった¹⁰⁾。具体的には、低酸素状態においてはHIF1の下流遺伝子であるpyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme (PDK) 1やlactate dehydrogenase A

(LDHA) が、低栄養においてはATF4の下流にあるDNA damage-inducible transcript (DDIT) 3やLipocalin-2 (LCN2) などが、一方酸性環境においてはisopentenyl-diphosphate delta isomerase (IDI) 1やPDK4といった遺伝子が発現誘導され、それぞれの条件下における発現変動遺伝子はほとんど共通しなかった。

そこで、酸性環境で発現変動がみられた遺伝子群や、酸性環境で転写が活性化されているクロマチン領域の配列情報を用いた上流制御因子解析を行った。その結果、酸性環境における制御転写因子候補としてsterol regulatory element-binding protein (SREBP) 2を同定し、確かに細胞内pHの低下に伴ってSREBP2が核内移行することで活性化され、遺伝子発現に変化を引き起こすことを明らかとした。一般的に、SREBP2は細胞内コレステロール量の低下によって小胞体からゴルジ体へ移行、二段階切断を経て、活性化体SREBP2が核内へ移行することが知られている。酸性環境におけるSREBP2の活性化がSREBP2を小胞体にアンカーするコレステロールおよび25-ヒドロキシコレステロールを添加することで抑制されたこと、また酸性環境において二段階切断された核内移行型SREBP2量が増加したことから、酸性環境によるSREBP2の活性化機構は、通常のSREBP2活性化機構と同様の過程を経ると考えられる。SREBP2のファミリータンパク質であるSREBP1は、増殖期のがん細胞で活性化されて脂肪酸やリン脂質を合成し、がん細胞の増殖に寄与することが報告されている¹¹⁾が、SREBP2ががん細胞において活性化することを明らかとしたのは本研究が世界で初めてである。SREBP2は、肝臓においてコレステロール代謝関連酵素の遺伝子発現を制御し、脂質代謝の恒常性維持に関与する転写因子である¹²⁾。我々の検討から、SREBP2は酸性環境においてもコレステロール生合成関連酵素の発現を上昇させることで細胞内コレステロール濃度の維持に寄与する可能性が見いだされた。コレステロールは細胞膜の成分として多く存在し、細胞外からの有害物質の侵入や中身の漏えいを防ぐ強固な構造形成に必要な不可欠な代謝物である。酸性培養条件下で細胞接着能の減少や形態の変化が観察されていることから、障害された細胞膜を補修し、より強固な細胞膜を作るためにコレステロール生合成が促進されている可能性がある。

5. 酸性環境におけるACSS2によるがん代謝シフト

さらに我々は、酸性環境におけるSREBP2の直接の標的遺伝子の同定を行い、acetyl-CoA synthetase 2 (ACSS2) を同定した。このACSS2は、酢酸をアセチルCoAに代謝するACSSファミリー (ACSS1~3) のうち、主に細胞質に局在する唯一の酵素である。酢酸から生成されるアセチルCoAは、解糖系とTCAサイクルを結ぶ中心代謝物である

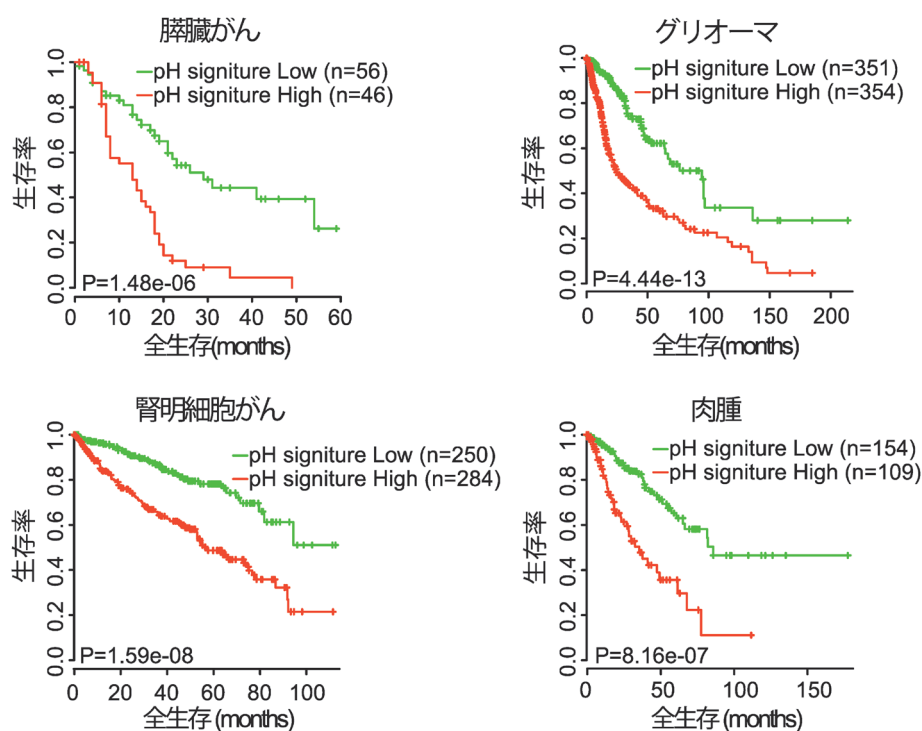


図2 酸性環境におけるSREBP2の標的遺伝子を用いたがん患者の生存時間解析
酸性環境におけるSREBP2の標的遺伝子12遺伝子を酸性シグニチャーとし、TCGAおよびパブリックのアレイデータを用いて、酸性シグニチャーの発現が高い患者 (pH signature Risk High) と発現の低い患者 (pH signature Low) に分け、生存時間解析を行った。縦軸は患者の生存率、横軸は患者の全生存 (months)、Pはログランク検定値を示す。

だけでなく、ステロールやケトン体の生成、さらにはヒストンタンパク質のアセチル化修飾にも寄与することが知られている¹³⁾。近年、酢酸の利用は正常組織に比べて腫瘍組織ではるかに亢進していること、がん細胞の酢酸代謝への依存は、低酸素・低栄養という腫瘍微小環境において増すことが次々と明らかとなり、がんにおける酢酸代謝の重要性が最近注目されている。酢酸は栄養供給が制限された状況においては脂肪酸やリン脂質合成における主要な炭素供給源になり、この傾向はACSS2領域に増幅があるがんにおいて特に顕著であることが報告されている¹⁴⁾。

我々の検討から、酸性環境下においてSREBP2がプロモーターに結合することでACSS2の発現を上昇させ、細胞増殖や腫瘍形成に寄与することが明らかになった。このことから、ACSS2は低酸素、低栄養だけでなく、酸性環境という腫瘍微小環境ストレス下においても必要な役割を果たすことが示唆された。ACSS2ノックアウト (KO) マウスは正常に発生し異常を来さなかったことから、ACSS2の阻害剤はがん特異的な酢酸代謝経路を絶つ新しい創薬につながることを期待される。

6. 酸性環境における腫瘍悪性化

最後に、酸性環境におけるSREBP2の活性化の臨床検体

における重要性を検討するため、酸性条件培養におけるSREBP2の標的遺伝子12遺伝子 (ACSS2, DHCR7, ELOVL5, FDFT1, HMGCR, HMGCS1, IDI1, LDLR, MSMO1, MTHFR, SQLE, SREBP2) を酸性シグニチャーとし、12遺伝子の発現量を基にCox比例ハザードモデルを推定してがん患者の生存時間解析を行った (図2)。酸性pHシグニチャー Risk Highグループの患者 (pH signature High) では、Risk Lowのグループの患者 (pH signature Low) と比較し、膵臓がん、グリオーマ、腎がん、肉腫、浸潤性乳がん等種々のがん種で予後不良であることが明らかとなった。このことから、酸性環境への細胞応答やSREBP2を介したシグナル伝達のがんにおいて重要であることが示唆された。

7. おわりに

がん細胞は、エピゲノム制御、転写制御、シグナル伝達経路、代謝のリプログラミングなどを介して腫瘍微小環境に適応し、がんの悪性化や治療抵抗性を引き起こすことが知られている。一方、酸性環境は、低酸素に対する細胞応答の単なる「結果」として捉えられており、酸性環境における細胞応答を担うエピゲノム制御、転写制御因子、シグナル伝達経路、代謝経路に関してはこれまで不明な点が多かった。

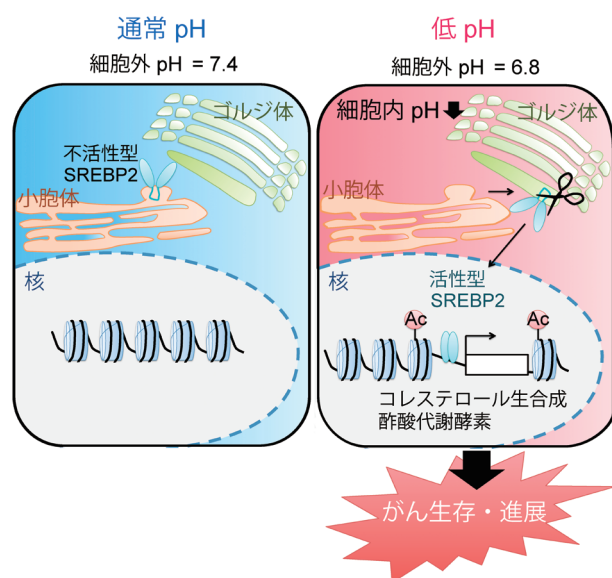


図3 悪性化に寄与する酸性環境下の転写・代謝応答
通常状態（左，細胞外pH 7.4）では，SREBP2は小胞体に局在し不活性型である。酸性環境にがん細胞が陥ると（右，細胞外pH 6.8），細胞内のpHが低下し，SREBP2がゴルジ体を経由して核内に移行し活性化する。その結果，コレステロール合成や酢酸代謝に関連する酵素群の発現を誘導することで，がんの生存や進展に寄与する。

我々は，酸性環境が，がん細胞内pHを低下させSREBP2を活性化しコレステロール合成経路関連代謝酵素を発現亢進させること，ACSS2を介した酢酸代謝リプログラミングを起こすこと，さらに，がん患者予後に寄与することを明らかとした（図3）。酸性環境における腫瘍悪性化の仕組みは，がんの新たな特性を理解する上で重要な発見と考えられる¹⁰⁾。

最後に，酸性環境におけるSREBP2の活性化は，さまざまながん細胞株や正常細胞株においても広く普遍的な細胞反応である可能性を見いだしていることから，将来，SREBP2に着目したがんに対する新規治療薬の開発のみならず，生体に起こりうるさまざまなアシドーシス疾患における病態の克服，および，治療薬の開発につながることが期待できる。

謝辞

本研究の一部はAMED次世代がん医療創生研究事業，AMED革新がん医療実用化研究事業，文部科学省科学研究費補助金・新学術領域「システムがん」（課題番号：18H04897），新学術「代謝アダプテーション」（課題番号：18H04797）の助成を受けて行われたものであり，ここに深く感謝の意を表します。また，武田科学振興財団，小林がん学術振興会からの研究助成をいただいていたものであり，ここに深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) Carmeliet, P. (2003) Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.*, **9**, 653–660.
- 2) Semenza, G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 721–732.
- 3) Greer, E.L., Oskoui, P.R., Banko, M.R., Maniar, J.M., Gygi, M.P., Gygi, S.P., & Brunet, A. (2007) The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J. Biol. Chem.*, **282**, 30107–30119.
- 4) Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., & Shaw, R.J. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell*, **30**, 214–226.
- 5) Pugh, C.W. & Ratcliffe, P.J. (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: Role of the HIF system. *Nat. Med.*, **9**, 677–684.
- 6) Gerweck, L.E. & Seetharaman, K. (1996) Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: Potential exploitation for the treatment of cancer. *Cancer Res.*, **56**, 1194–1198.
- 7) Izumi, H., Torigoe, T., Ishiguchi, H., Uramoto, H., Yoshida, Y., Tanabe, M., Ise, T., Murakami, T., Yoshida, T., Nomoto, M., et al. (2003) Cellular pH regulators: Potentially promising molecular targets for cancer chemotherapy. *Cancer Treat. Rev.*, **29**, 541–549.
- 8) Pouyssegur, J., Dayan, F., & Mazure, N.M. (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, **441**, 437–443.
- 9) Corbet, C. & Feron, O. (2017) Tumour acidosis: From the passenger to the driver's seat. *Nat. Rev. Cancer*, **17**, 577–593.
- 10) Kondo, A., Yamamoto, S., Nakaki, R., Shimamura, T., Hamakubo, T., Sakai, J., Kodama, T., Yoshida, T., Aburatani, H., & Osawa, T. (2017) Extracellular acidic pH activates the sterol regulatory element-binding protein 2 to promote tumor progression. *Cell Reports*, **18**, 2228–2242.
- 11) Menendez, J.A. & Lupu, R. (2007) Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, **7**, 763–777.
- 12) Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M.R., Brown, M.S., Goldstein, J.L., & Wang, X. (1993) SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11603–11607.
- 13) Gao, X., Lin, S.H., Ren, F., Li, J.T., Chen, J.J., Yao, C.B., Yang, H.B., Jiang, S.X., Yan, G.Q., Wang, D., et al. (2016) Acetate functions as an epigenetic metabolite to promote lipid synthesis under hypoxia. *Nat. Commun.*, **7**, 11960.
- 14) Schug, Z.T., Peck, B., Jones, D.T., Zhang, Q., Grosskurth, S., Alam, I.S., Goodwin, L.M., Smethurst, E., Mason, S., Blyth, K., et al. (2015) Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell*, **27**, 57–71.

著者寸描

●近藤 彩乃（こんどう あやの）



協和発酵キリン株式会社創薬技術研究所
研究員。博士（工学）。

■略歴 2010年東京大学大学院薬学系研究
科修士課程修了，同年協和発酵キリン
株式会社入社。16年東京大学先端科学技
術センターにて東京大学大学院工学系研
究科博士課程修了，現在に至る。

■研究テーマと抱負 がん微小環境で鍵
となる新しい細胞応答を，アンバイアス

な解析から見出す事を目標としている。大切な仲間たちと常に
ワクワクを忘れず協力して研究を推進したい。

■趣味 旅行，グルメ，お酒，歌。

●大澤 毅（おおさわ つよし）



東京大学先端科学技術研究センター
ニュートリオミクス・腫瘍学分野特任准
教授。博士（腫瘍学）。

■略歴 2001年ロンドン大学キングス
カレッジ卒業，05年同大学院博士課程腫
瘍学専攻修了，06年東京大学医科学研究
所研究員，07年東京医科歯科大学大学院
医歯学総合研究科特任助教，11年東京大
学先端科学技術研究センター特任助教を

経て18年から現職。

■研究テーマと抱負 がん微小環境におけるがん悪性化機構の
解明を目指し研究している。また，血管生物医学若手研究会，
がんと代謝研究会若手の会などを発起し，がん微小環境研究，
血管研究，がん代謝研究のボトムアップやデータ駆動型のウ
ェット・ドライの研究者コミュニティー形成を推進している。

■ウェブサイト [http://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/research/people/
staff-osawa_tsuyoshi_ja.html](http://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/research/people/staff-osawa_tsuyoshi_ja.html)

■趣味 お城見学，旅行，お酒。