
総 説

癌細胞は HMGB1 を分泌し筋組織を エネルギー源として利用している

¹奈良県立医科大学分子病理学, ²味の素イノベーション研究所
國安弘基¹, 羅 奕¹, 米田純也²

Cancer cells utilize the skeletal muscle as an energy resource using cancer-secreted HMGB1

HIROKI KUNIYASU¹, YI LUO¹, JUNYA YONEDA²

¹Department of Molecular Pathology, Nara Medical University, ²Institute for Innovation, Ajinomoto, Co., Inc.²

Received May 14, 2014

Abstract : Cancer cells are known to produce energy through aerobic glycolysis; however, the role of host tissues in cancer energy metabolism is unclear. Here, we aimed to elucidate the cancer-host energy production relationship, in particular, the association between cancer energy production and host muscle. High mobility group box (HMGB)-1 increased during the development and progression of colorectal cancer (CRC), which decreased pyruvate kinase (PK) M1 expression and PK activity in the muscle through the receptor for advanced glycation end products. However, muscle mitochondrial energy production was maintained. In contrast, HMGB1 increased lactate fermentation in CRC cells. In the muscle, HMGB1 treatment induced autophagy by decreasing phosphorylated mTOR levels and increasing autophagy-associated proteins. Autophagy increased plasma glutamate levels and ¹³C-glutamine integration into acetyl-CoA in the muscle. In a dimethylhydrazine-induced mouse colon carcinogenesis model, the plasma free amino acid profile was altered, and glutamine increased, which was associated with a temporal HMGB1 increase in serum and colonic mucosa, a decrease in PKM1, and autophagy induction. These differences disappeared when HMGB1 was neutralized with an antibody. In a mouse subcutaneous CRC tumor model, PKM1 expression decreased and ¹³C-glutamine was integrated into acetyl-CoA in the muscle. In ¹³C-glutamine muscle-integrated mice with implanted CRC tumors, ¹³C-glutamine integration was detected in acetyl-CoA in the muscle and in lactate in the cancer cells. However, integration in the tumor was decreased by HMGB1 neutralization, glutamine targeting by DON, and glutaminase knockdown. These findings suggest that HMGB1 usurps the muscle to supply glutamine to cancer cells as an energy source.

Key words : HMGB1, energy metabolism, plasma free amino acid profile, Warburg effect, autophagy

【はじめに】

癌細胞が Warburg 効果と呼ばれる好気性解糖系に偏ったエネルギー産生機構を有することはよく知られている。解糖系により生じたピルビン酸を酸化リン酸化に利用することにより正常細胞はより効率の良い ATP 産生を行っているのに対し、ピルビン酸から乳酸発酵という同じ ATP を発生するのにより多くのグルコースを必要とする効率の悪いエネルギー産生を癌細胞がおこなっている理由として、ミトコンドリアからの酸化ストレスの発生の抑制や高エネルギー・フローの達成などが挙げられている。癌細胞が多くのグルコースを消費することはよく知られているが、癌細胞がグルコース以外にアミノ酸や脂肪酸をエネルギー源とすることも知られている。

【遊離アミノ酸】

遊離アミノ酸は極めて正確なコントロール下におかれ、ある一定のアミノ酸プロファイルを血漿中に形成している。しかし、種々の疾患においてこのアミノ酸プロファイルに変化が生じることが報告されており、とくに癌においては早期から変化が認められてい

る^{1),2)}。遊離アミノ酸の最大の貯蔵源は骨格筋であり、骨格筋の代謝に随伴して血漿中アミノ酸濃度に変化が生じることが考えられる。われわれは、癌における骨格筋の代謝の変化に着目し、とくに癌由来のサイトカイン様物質の影響に焦点を絞って検討を行った。

【HMGB1】

HMGB1 は、大腸癌の発生、進展、転移に重要な役割を果たしている。HMGB1 は癌細胞から分泌あるいは壊死に伴う放出により細胞膜上の受容体 RAGE に結合し、MAPK, NF κ B, Rac2/Cdc42 など複数のシグナルの活性化を介して、増殖、浸潤、転移を促進する (Fig. 1)³⁾。一方、高濃度では単球系細胞にアポトーシスを誘導し⁴⁾、リンパ洞マクロファージ、肝クッパー細胞、単球系樹状細胞の抑制により、リンパ節転移・肝転移への宿主免疫を介する転移抵抗性を減弱させる^{5),7)}。さらに、化学療法による癌細胞大量壊死により放出される HMGB1 は、残存する癌細胞の生存と再増殖を促進する⁸⁾。このように、多面的に癌細胞-宿主相互作用に関与する HMGB1 に対して、われわれは、HMGB1 の担癌宿主および癌細胞のエネルギー代謝に与える影響を癌-宿主筋組織相互作用の観

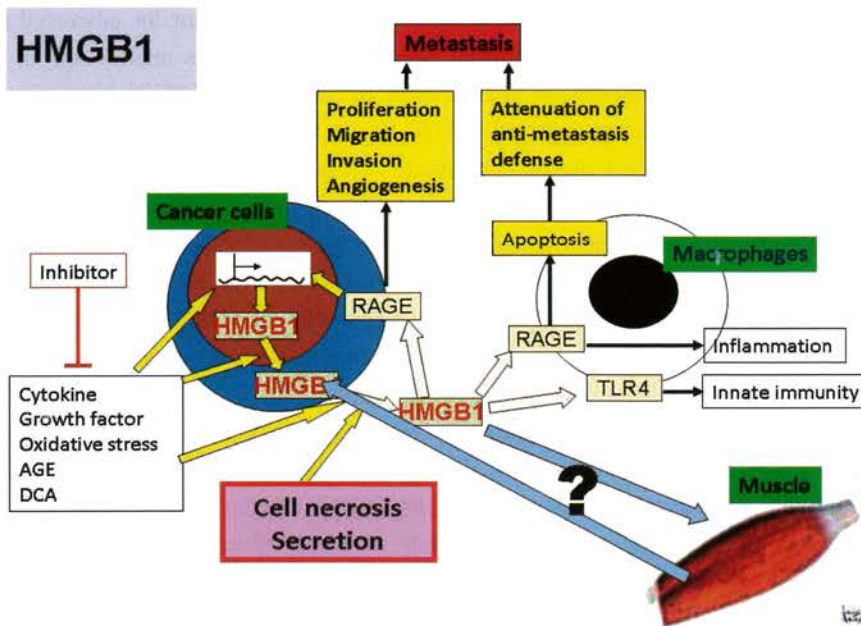


Fig. 1. HMGB1 の多様な作用

点から検討した⁹⁾。

【HMGB1 の解糖系への影響】

Ex vivo 系で、BALB/c マウスヒラメ筋薄切組織を培養し HMGB1 処理すると、解糖系の最終反応を媒介するピルビン酸キナーゼ M1 アイソザイム (PKM1) の発現抑制と活性低下が認められた (Fig. 2)。HMGB1 の受容体である RAGE および TLR4 をノックダウンしたところ、RAGE ノックダウンにより PKM1 発現抑制は消失し、この系が HMGB1 - RAGE を介することが考えられた。

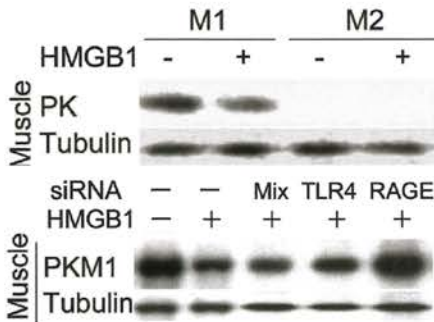


Fig. 2. HMGB1 は受容体 RAGE を介して筋組織の PKM1 発現を抑制する

【HMGB1 の autophagy への影響】

HMGB1 を3週にわたり BALB/c マウス腹腔に投与しヒラメ筋におけるタンパク・レベルを検討した。すると、PKM1 発現抑制と PK 活性低下しており、HMGB1 処理により autophagy 抑制性のリン酸化 mTOR レベルは低下し、autophagy 実行タンパクである Beclin1 や LC3II の発現が亢進し (Fig. 3)、血漿中のアミノ酸プロファイルでは Glu, Gln, Asp, Asn などが増加したのに対し、ヒラメ筋ではほとんどのアミノ酸が減少した (Fig. 4)。

HMGB1 処理により解糖系の PK 下流のピルビン酸やアセチル CoA のレベルは低下した (Fig. 5)。さらに、¹³C 標識グルタミンを投与すると、¹³C は主にアセチル CoA に取り込まれたことから、グルタミン分解産物が α -ケトグルタル酸から TCA サイクルに供給されていることが考えられた。一方、3-methyladenine に

より autophagy を阻害するとアセチル CoA, ATP レベルの低下と乳酸発酵が促進された。

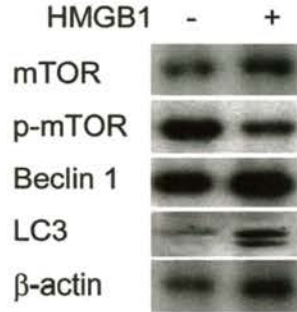


Fig. 3. HMGB1 は mTOR リン酸化を抑制し autophagy 実行タンパクである Beclin1 や LC3-II の発現を亢進する

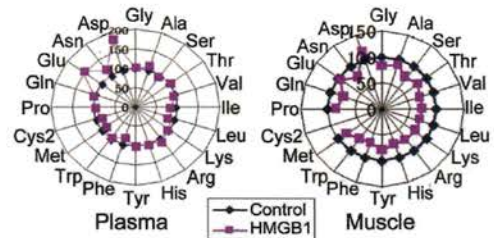


Fig. 4. HMGB1 を投与されたマウスの血漿中アミノ酸では Glu, Asp, Asn, Gln などが増加しているが、筋組織内では Asp を除くすべてのアミノ酸が減少しており、autophagy の影響と考えられる

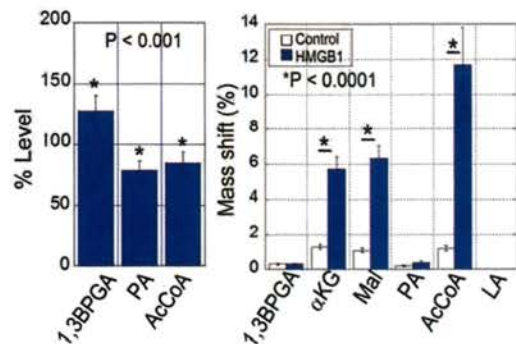


Fig. 5. (左) HMGB1 処理により解糖系の PKM1 より上流の 1,3BPGA が貯留し下流のピルビン酸 (PA) やアセチル (Ac) CoA が減少している。(右) ¹³C 標識 Gln を投与すると ¹³C は α -ケトグルタル酸で TCA サイクルに入り、ピルビン酸にはならずアセチル CoA に変換され利用されている。

【大腸発癌における HMGB1 発現と血漿アミノ酸プロファイル】

われわれは、すでに大腸発癌過程で HMGB1 の発現・分泌の誘導が生じることを報告している^{10), 11)}。今回、DMH-C57BL マウス大腸発がんモデルを作成し、25 週（前発癌期）、35 週（腺腫発生期）、40 週（腺癌発生期）に HMGB1 発現と血漿アミノ酸プロファイルを測定したところ、経時的な大腸粘膜における HMGB1 発現・分泌の亢進とともに、血漿中グルタミンレベルの増加を含む血漿アミノ酸プロファイルの変化が認められた (Fig. 6)。さらに、HMGB1 中和抗体処理によりアミノ酸プロファイルの変化は消失した。

【皮下腫瘍モデルによる 進行癌のシミュレーション】

大腸癌細胞株 CT26 および HT29 を用いたマウス皮下腫瘍モデルにおいても、腫瘍からの HMGB1 分泌により血漿中 HMGB1 濃度は増加した (Fig. 7)。ヒラメ筋においては、HMGB1 投与マウスと同様、PKMI 発現の低下、ピルビン酸やアセチル CoA のレベル低下、さらに、¹³C 標識グルタミン投与による ¹³C のア

セチル CoA への取り込みが認められた。

HMGB1 中和抗体処理により、血漿中 HMGB1 は低下し、皮下腫瘍により生じていた、体重の減少や筋組織内のタンパク減少は消失した (Fig. 8)。

【筋組織由来グルタミンの癌細胞による利用】

さらに、絶食・摂食サイクルにより骨格筋に ¹³C 標識グルタミンを取り込ませた BALB/c マウスに、別の同系マウス皮下に作成した CT26 腫瘍を移植すると、血漿中 HMGB1 濃度は増加し、移植前の腫瘍組織に含まれなかった ¹³C が、移植後 1 週後に腫瘍を検索すると癌組織内の乳酸に移行していた (Fig. 9)。すなわち、¹³C がマウス筋組織から血漿中に放出され癌細胞内に取り込まれエネルギー源として代謝されたと考えられた。この系において、HMGB1 中和抗体処理、非活性グルタミンアナログ投与¹²⁾、グルタミンナーゼ・ノックダウンによるグルタミン標的治療を行うと、腫瘍増大が抑制された。

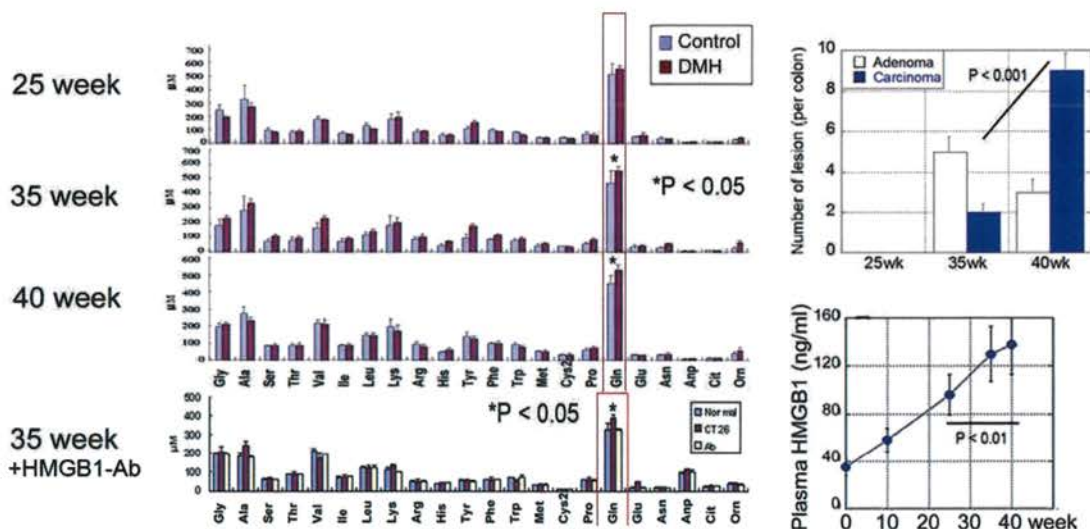


Fig. 6. ジメチルヒドラジン (DMH) 誘導マウス大腸発癌モデルでは、右上図のように 35 週で腫瘍が発生するが、右下図のようにその以前から経時的な血漿中 HMGB1 増加が認められている。このモデルでは、腫瘍発生前の 25 週ですでに血漿中 Gln の増加が認められ、腫瘍形成の見られる 35 週・40 週で増加している。しかし、抗 HMGB1 中和抗体投与により Gln はコントロール・レベルに低下している。

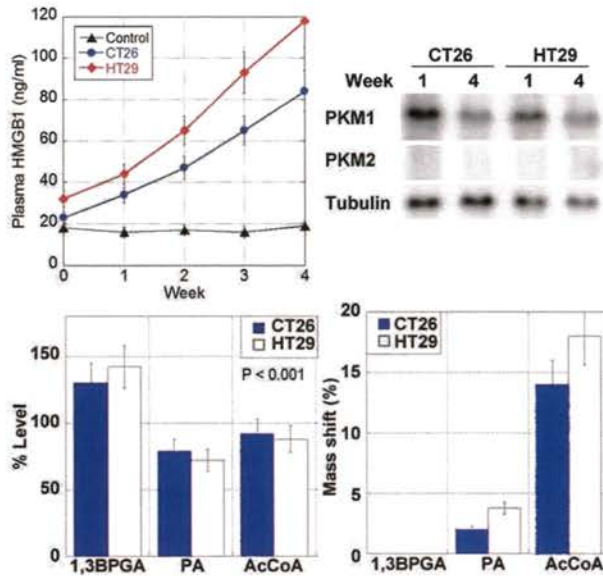


Fig. 7. CT26, HT29 の大腸癌細胞株による皮下腫瘍を形成すると、経時的に血漿中 HMGB1 は増加する (左上)。さらに、マウス筋組織中の PKM1 の発現は減少し (右上)、PKM1 下流のピルビン酸・アセチル CoA は減少する (左下)。¹³C 標識 Gln 投与により、やはり主としてアセチル CoA に ¹³C が利用される。

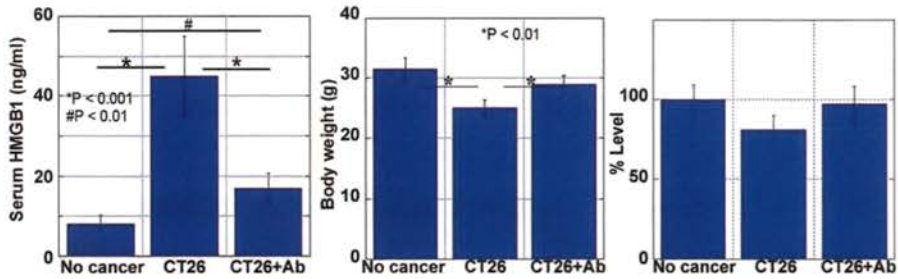


Fig. 8. CT26 皮下腫瘍モデルでは、腫瘍により血清中 HMGB1 増加 (左)、マウス体重減少 (中)、下腿三頭筋内タンパク含量の減少 (右) がもたらされるが、いずれも抗 HMGB1 中和抗体により消失している。

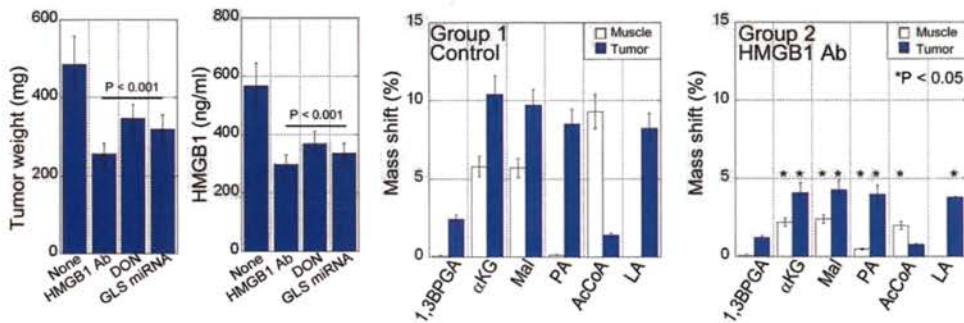


Fig. 9. このようにして筋組織のタンパク分解を促進することが癌にとってどのような意味を有するのか検討した。BALB/c マウスに絶食サイクルにより ¹³C 標識 Gln を筋組織内に取り込ませる。別のマウスに CT26 皮下腫瘍を形成しこれを増大後切出し、先のマウス皮下に移植、1 週後に安楽殺し腫瘍内に ¹³C が取り込まれているかを検討する。このとき、HMGB1 抗体、非代謝性 Gln アナログ (DON)、グルタミンナーゼ・ノックダウン (GLS miRNA) によるグルタミン・ターゲティングを行う。すると、腫瘍増大は抑制され、血漿中 HMGB1 は減少した。さらに、腫瘍内に取り込まれた ¹³C は α ケトグルタル酸で TCA サイクルに入り、リンゴ酸 (MAL) からピルビン酸に変換され、乳酸発酵に用いられていた。

【癌細胞－宿主筋組織相互作用】

癌細胞においては、Warburg 効果として知られるように好氣的解糖が主たるエネルギー源と見なされている。一方、グルタミンは、一連のグルタミン分解を経たのち α -ケトグルタル酸の形で TCA サイクルに組み込まれ、エネルギー源として利用されることが知られている¹³⁾。われわれは、ここまで述べてきたように、癌細胞から分泌される HMGB1 が宿主および癌細胞のエネルギー代謝に影響を与えることが明らかにした⁹⁾。HMGB1 は、宿主骨格筋の PKM1 発現に影響し、正常のエネルギー産生を抑制する。同時に、autophagy を誘導し、筋組織の分解・遊離アミノ酸の生成を惹起する。筋組織においては生成したグルタミンは TCA サイクルから酸化リン酸化に利用されるが、一方、癌細胞も血漿中に放出されたグルタミンを取り込むが、酸化リン酸化ではなく乳酸発酵に利用されることが示唆された (Fig. 10)。

このように癌細胞が積極的に宿主筋組織の代謝を異化に偏倚させ、組織崩壊を誘導することは、癌悪液質の一つの原因として重視される。同時に、今回、癌－筋組織相互作用のキー・ファクターとして HMGB1

を同定したが、HMGB1 は自然免疫系の活性化作用も知られ、IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインを誘導することも正常組織の異化亢進や悪液質の誘導を惹起することにつながると考えられる。

担癌患者における血漿中アミノ酸プロファイルの特異的变化はすでに報告されており、臨床検査として癌の早期発見に実用化されている^{11), 12)}。そのアミノ酸プロファイルの変化の原因の一つとして本研究で明らかになった、エネルギー産生に纏わる新たな癌－宿主相互作用が重視される。HMGB1 の発癌早期からの発現・分泌誘導は、血漿中アミノ酸プロファイルによる発癌リスク診断の可能性をも示唆するものと考えられる。

本研究では、グルタミンを標的とした抗癌治療についても可能性を検討し、有用性が示される結果が得られた。これは、アミノ酸プロファイルの変化に基づくアミノ酸補正が治療法として有効である可能性を示唆していると考えられ、今後の検討が待たれる。

【結 語】

これらの結果から、癌細胞は HMGB1 を分泌し、宿主筋組織の autophagy・タンパク分解を亢進させ、

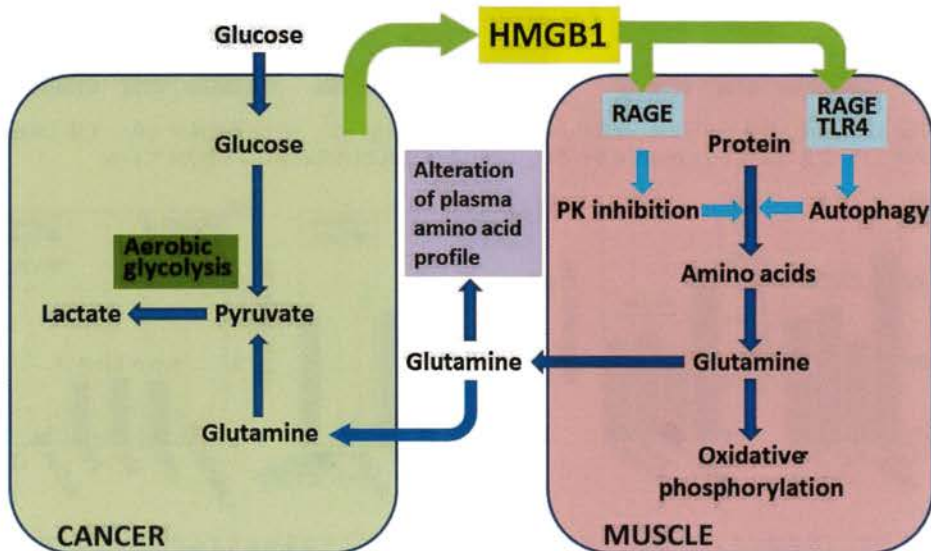


Fig. 10. 癌は分泌する HMGB1 により筋細胞に解糖系障害と autophagy を惹起し、タンパク分解と Gln 血漿中放出を生じる。その Gln を癌は取り込み乳酸発酵に用いエネルギーを産生している。これは、Warburg effect の新たな経路ともいえる。

血漿中に遊離したグルタミンを取り込んでエネルギー源としていることが示唆された。

【文 献】

- 1) Okamoto N, Miyagi Y, Chiba A, et al. Diagnostic modeling with differences in plasma amino acid profiles between non-cachectic colorectal/breast cancer patients and healthy individuals. *Int J Med Med Sci.* 2009; 1: 1-8.
- 2) Miyagi Y, Higashiyama M, Gochi A, et al. Plasma free amino acid profiling of five types of cancer patients and its application for early detection. *PLoS One.* 2011; 6: e24143.
- 3) Ohmori H, Luo Y, Kuniyasu H. Non-histone nuclear factor HMGB1 as a therapeutic target in colorectal cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2011; 15: 183-93.
- 4) Kuniyasu H, Yano S, Sasaki T, Sasahira T, Sone S, Ohmori H. Colon cancer cell-derived high mobility group 1/amphoterin induces growth inhibition and apoptosis in macrophages. *Am J Pathol.* 2005; 166: 751-60.
- 5) Moriwaka Y, Luo Y, Ohmori H, et al. HMGB1 attenuates anti-metastatic defense of the lymph nodes in colorectal cancer. *Pathobiology.* 2010; 77: 17-23.
- 6) Luo Y, Ohmori H, Fujii K, et al. HMGB1 attenuates anti-metastatic defence of the liver in colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2010; 46: 791-9.
- 7) Kusume A, Sasahira T, Luo Y, et al. Suppression of dendritic cells by HMGB1 is associated with lymph node metastasis of human colon cancer. *Pathobiology.* 2009; 76: 155-62.
- 8) Luo Y, Chihara Y, Fujimoto K, et al. High mobility group box 1 released from necrotic cells enhances regrowth and metastasis of cancer cells that have survived chemotherapy. *Eur J Cancer.* 2013; 49: 741-51.
- 9) Luo Y, Yoneda J, Ohmori H, et al. Cancer usurps skeletal muscle as an energy repository. *Cancer Res.* 2014; 74:330-340.
- 10) Ohmori H, Luo Y, Fujii K, et al. Dietary linoleic acid and glucose enhances azoxymethane-induced colon cancer and the metastasis through the expression of high mobility group box 1. *Pathobiology.* 2010; 77: 210-7.
- 11) Shimomoto T, Luo Y, Ohmori H, et al. Advanced glycation end products (AGE) induce the receptor for AGE in the colonic mucosa of azoxymethane-injected Fischer 344 rats fed with a high-linoleic acid and high-glucose diet. *J Gastroenterol.* 2012; 47: 1073-83.
- 12) Shelton LM, Huysentruyt LC, Seyfried TN. Glutamine targeting inhibits systemic metastasis in the VM-M3 murine tumor model. *Int J Cancer.* 2010; 127: 2478-85.
- 13) Wagenmakers AJ. Muscle amino acid metabolism at rest and during exercise: role in human physiology and metabolism. *Exerc Sport Sci Rev.* 1998; 26: 287-314.