

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860233

研究課題名(和文) エネルギー代謝特性に基づく消化器がん病態解明と制御への応用

研究課題名(英文) Exploring biological basis of aberrant energy metabolic property of gastrointestinal cancer toward application to cancer treatment

研究代表者

堂本 貴寛 (Domoto, Takahiro)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：80635540

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はGSK3 のがん促進作用のメカニズムをがん固有の代謝特性に焦点を当てて検討した。大腸がん細胞で異常活性を示すGSK3 はピルビン酸脱水素酵素(PDH)を特異的にリン酸化してその活性を阻害することにより、がん促進的に作用する解糖系優位の代謝を誘導していると考えられた。GSK3 阻害により、がん細胞のエネルギー産生経路は解糖系から酸化的リン酸化にシフトし、アポトーシス刺激感受性になった。一方、これらの代謝変化は非腫瘍性細胞では認められなかった。したがって、GSK3 阻害によるがん治療効果はがん特有のエネルギー代謝を選択的に是正することによるものと考えられ、その安全性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：We have identified aberrant GSK3beta as an attractive therapeutic target in various cancer types. Here we explored the mechanism for the tumor-promoting role of GSK3beta by focusing on the distinct energy metabolic property in cancer. We found that GSK3beta deregulated in cancer cells and their xenografts phosphorylates and inactivates pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1alpha, the active subunit of PDH. This results in induction of the aerobic glycolysis that preferentially fuels cancer cells, leading to progression of cancer. Inhibition of GSK3beta shifted the energy source of cancer cells from glycolysis to oxidative phosphorylation in mitochondria, rendering them susceptible to apoptotic insults. No such metabolic changes were observed in non-neoplastic cells or rodent's liver. Our results suggests that cancer therapeutic effect of GSK3beta inhibition depends on the exclusive metabolic shift in cancer cells, which reinforces the safety of targeting GSK3beta for cancer treatment.

研究分野：医歯薬学

キーワード：がん代謝 分子標的治療 リン酸化 GSK3beta

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は自らの代謝経路を変化させることで、低酸素・低栄養という生存に不利な微小環境に順応している。とくに解糖系をはじめとするエネルギー産生経路では、がん細胞は酸素の多寡にかかわらず、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化 (tricyclic acid, TCA) 回路に優先して嫌氣的解糖系を亢進することで ATP を産生している (Warburg 効果)。こうしたがん細胞特有の代謝に伴うミトコンドリアの機能異常はがんの浸潤や治療抵抗性を惹起するため、がん特有のエネルギー代謝を是正 (正常化) することにより難治性がんに有効な治療法が開発できると期待される。

glycogen synthase kinase (GSK) 3 β はグリコーゲン合成、転写因子の活性、タンパク質分解シグナルをはじめとする多彩な細胞機能をリン酸化によって厳密に制御するセリン・スレオニンキナーゼである。GSK3 β は複数のがん促進分子をリン酸化して不活性化することから、これまで「がん抑制的に働く」という認識が持たれてきた。これとは異なり、我々の研究室では大腸がんや膵がんなどの消化器がんを中心に GSK3 β ががん細胞の生存や増殖を亢進するという「がん促進作用」を発見し、その活性阻害による治療効果を培養がん細胞とその動物移植腫瘍を対象に実証してきた。これまでに我々が見出した GSK3 β の病的作用の多くはおもに細胞質における機能に着目したものがあるが、GSK3 β は核やミトコンドリアにも局在し、その局在と活性に応じて細胞運動、細胞周期、増殖や分化など異なる細胞機能を調節している。

本研究に先立って、我々は GSK3 β が制御するがん細胞の代謝特性をメタボローム解析により検討した。そして、GSK3 β 阻害により大腸がん細胞の解糖系が抑制され、ミトコンドリアの酸化的リン酸化回路が賦活化されることを示唆する中間代謝産物の量的変化が認められた。一方、正常細胞ではこれらのエネルギー産生経路を含めた代謝産物の顕著な変化はほとんど観察されなかった。こうした予備解析の結果から、GSK3 β はミトコンドリアの代謝経路に関与することで病理作用を発揮しているという本研究の作業仮説を着想した。

2. 研究の目的

本研究では、大腸がん細胞の GSK3 β 阻害によるメタボローム変化を個々の代謝産物の測定により検証し、GSK3 β の病理作用とその阻害によるがん治療効果をエネルギー代謝特性の視点から明らかにする。そして、GSK3 β が

制御する大腸がん細胞の新たな代謝経路を特定する。これにより、GSK3 β 阻害効果に基づく新しいがん治療法の標的代謝経路を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) GSK3 β 阻害による代謝産物の変動

ヒト大腸がん (SW480, HCT116) と膵がん (PANC1) 細胞のメタボローム解析で得られた予備データをもとに、解糖経路から TCA 回路における個々の代謝産物を GSK3 β 阻害剤 (AR-A014418) 添加後から経時的に計測し、メタボロームデータを検証した。また、RNA 干渉により GSK3 β の発現を抑制して、各種代謝産物量の変化を計測した。

(2) GSK3 β によるピルビン酸脱水素酵素のリン酸化と活性修飾の解析

pyruvate dehydrogenase (PDH)-E1 α 活性サブユニットのアミノ酸配列から GSK3 β によるリン酸化モチーフの候補配列を検索した。これにより選定されたそれぞれの候補配列からリン酸化部位変異体を作成した。そして、Phos-tag® Acrylamide を用いた解析により PDH-E1 α に存在するリン酸化部位を決定した。また、これらのリン酸化ペプチド特異抗体をそれぞれ作成し、がん細胞におけるリン酸化レベルとその GSK3 β 阻害剤による変化をウエスタンブロット法で比較、解析した。

(3) 動物移植腫瘍における代謝産物の測定

大腸がん細胞 (SW480, HCT116) をヌードマウス皮下に移植し、4 週間、腫瘍を生着、増殖させた。その後、マウスに dimethyl sulfoxide (DMSO) あるいは GSK3 β 阻害剤 (AR-A014418: 5 mg/kg 体重) を 1 日 1 回腹腔内投与し、1 週間後に安楽死させて移植腫瘍と肝を摘出した。腫瘍組織と肝における各種代謝産物量と PDH の活性を計測し、GSK3 β 阻害の効果を検討した。

(4) GSK3 β とミトコンドリアおよび PDH-E1 α の相互作用の検討

大腸がん細胞を用いて、免疫沈降や共焦点顕微鏡観察によりミトコンドリアにおける GSK3 β と PDH-E1 α の細胞内局在や相互作用を解析した。また、ミトコンドリアの膜電位や過酸化水素レベル、cytochrome C の放出とアポトーシス関連分子の発現を計測することにより、GSK3 β 阻害によるミトコンドリア機能に対する影響を検討した。

4. 研究成果

(1) GSK3 β 阻害によるがん細胞の代謝産物の

変化

大腸がん細胞 (SW480, HCT116) のエネルギー産生経路における中間代謝産物量の変化を正常細胞 (HEK293) と比較解析した結果、がん細胞で亢進していた乳酸が GSK3 β 阻害により減少した。一方、ピルビン酸を起点とする TCA 回路の中間代謝産物 (クエン酸, α -ケトグルタル酸, フマル酸, リンゴ酸) 量は GSK3 β 阻害により増加した。また, GSK3 β 阻害によりグリコーゲン量が増加する一方で, がん細胞で取込みの亢進していたグルコース量が減少した。これらの結果より, GSK3 β はがん細胞の解糖系 (Warburg 効果) に促進的に作用することが示唆された。

(2) GSK3 β による PDH-E1 α のリン酸化と活性の変化

PDH-E1 α のアミノ酸配列変異体を用いた Phos-tag® Acrylamide 解析により, GSK3 β によってリン酸化される 4 か所の候補アミノ酸残基を特定し, それぞれのリン酸化ペプチド特異抗体を作成した。大腸がん細胞では, PDH-E1 α のリン酸化レベルが GSK3 β 阻害により低下した。本研究で同定した PDH-E1 α のリン酸化部位は PDK (pyruvate dehydrogenase kinase) による C 末端側のリン酸化部位の近傍に位置していることから, GSK3 β は PDH のリン酸化による構造あるいは機能の修飾によって, その活性を制御することが示唆された。

(3) 動物移植腫瘍と肝組織における代謝産物の変化

大腸がん細胞移植腫瘍での代謝産物は, DMSO 投与群に比べて GSK3 β 阻害剤投与群で乳酸量が減少するとともにアセチル-CoA, クエン酸などの代謝産物量が増加し, TCA 回路の賦活化を示す変化が観察された。GSK3 β 阻害剤投与によって腫瘍組織で PDH の発現は変化しなかったが, 同じ個体の肝組織に比べて低下していた PDH 活性が高まった。また, GSK3 β 阻害剤投与群のマウスの正常組織に副作用を示唆する所見は認められなかった。

(4) GSK3 β , ミトコンドリアと PDH-E1 α の細胞内局在と相互作用

大腸がん細胞において, GSK3 β は細胞質のみならず PDH-E1 α とともにミトコンドリアに共局在していた。ミトコンドリアに局在する GSK3 β は細胞質の分画と比べ, 活性型 (第 216 チロシンリン酸化) として多く存在していた。また, 免疫沈降法により GSK3 β と共沈する分画に PDH-E1 α が検出されたことから, PDH-E1 α は GSK3 β のリン酸化基質である可能性が示唆された。GSK3 β 阻害により, 大腸がん細胞では ミトコンドリア分画における cytochrome C が減少 (放出が増加) し, 過酸化水素が増加したことから, ミトコンドリアの状態がアポトーシス感受性になっている

ことが示された。

本研究の結果から, 大腸がん細胞で異常活性を示す GSK3 β はミトコンドリアにおける PDH-E1 α の特異的リン酸化によりその活性を阻害することによって, がん細胞特有の解糖系優位のエネルギー代謝 (Warburg 効果) を惹起していると考えられた。GSK3 β 阻害により, がん細胞のエネルギー産生経路は解糖系から TCA 回路にシフトし, アポトーシス刺激感受性になった。一方, これらの代謝変化は非腫瘍性 (HEK293) 細胞やマウス肝では認められなかった。したがって, GSK3 β 阻害によるがん治療効果はがん特有の糖・エネルギー代謝を選択的に是正 (正常化) することによるものと考えられ, その安全性を示唆している。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) Takino T, Nakada M, Li Z, Yoshimoto T, Domoto T, Sato H. Tip60 regulates MT1-MMP transcription and invasion of glioblastoma cells through NF- κ B pathway. Clin Exp Metastasis 33(1): 45-52, 2016. URL: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10585-015-9756-8> 査読あり
- (2) Chikano Y*, Domoto T*, Furuta T, Sabit H, Kitano-Tamura A, Pyko IV, Takino T, Sai Y, Hayashi Y, Sato H, Miyamoto KI, Nakada M, Minamoto T. Glycogen synthase kinase 3 β sustains invasion of glioblastoma via the focal adhesion kinase, Rac1 and c-Jun N-terminal kinase-mediated pathway. Mol Cancer Ther 14(2): 564-74, 2015. doi:10.1158/1535-7163.MCT-14-0479. *Equal contribution 査読あり
- (3) Yoshimoto T, Takino T, Li Z, Domoto T, Sato H. Vinculin negatively regulates transcription of MT1-MMP through MEK/ERK pathway. Biochem Biophys Res Commun 455(3-4): 251-5, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.154. 査読あり
- (4) Takino T, Yoshimoto T, Nakada M, Li Z, Domoto T, Kawashiri S, Sato H. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase regulates fibronectin assembly and N-cadherin adhesion. Biochem Biophys Res Commun 450(2): 1016-20, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.100. 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) Takahiro Domoto, Takuya Furuta, Takahisa Takino, Hiroshi Sato, Mitsutoshi Nakada, Toshinari Minamoto. GSK3 β sustains invasion of glioblastoma by expression of MMPs via the FAK, Rac1 and JNK-mediated pathway. 第 74

- 回日本癌学会学術総会，2015年10月8-10日，名古屋国際会議場，名古屋市
- (2) 堂本貴寛，滝野隆久，佐藤 博，源 利成．GSK3βは FAK-Rac1-JNK 経路を介して膠芽腫細胞の浸潤を推進する．第24回日本がん転移学会学術集会・総会，2015年7月23-24日，シティプラザ大阪，大阪市
- (3) 堂本貴寛，紙 健次郎，廣瀬まゆみ，Ilya V. Pyko，土原一哉，曾我朋義，江角浩安，源利成．大腸がん糖代謝特性におけるGSK3βの役割．第3回がんと代謝研究会，2015年7月16-17日，石川県立音楽堂，金沢市
- (4) Takahiro Domoto, Yuri Chikano, Takuya Furuta, Hemragul Sabit, Ilya V. Pyko, Takahisa Takino, Yutaka Hayashi, Hiroshi Sato, Mitsutoshi Nakada, Toshinari Minamoto. Glycogen synthase kinase 3β sustains invasion of glioblastoma via the focal adhesion kinase, Rac1 and JNK-mediated pathway. 日本癌学会主催 金沢大学がん進展制御研究所共催日本癌学会シンポジウム共同利用・共同研究拠点シンポジウム，2015年1月22-23日，石川県立音楽堂，金沢市
- (5) 堂本貴寛，紙 健次郎，廣瀬まゆみ，Ilya V. Pyko，曾我朋義，江角浩安，源 利成．Involvement of GSK3β in aberrant glucose metabolism in colon cancer. 第73回日本癌学会学術総会，2014年9月25-27日，パシフィコ横浜，横浜市
- (6) 堂本貴寛，紙 健次郎，廣瀬まゆみ，曾我朋義，江角浩安，源 利成．GSK3βを標的とする大腸がんの糖代謝制御の可能性．第2回がんと代謝研究会，2014年7月10-11日，東京理科大学，東京都葛飾区
- (7) Takahiro Domoto, Mayumi Hirose, Kenjiro Kami, Tomoyoshi Soga, Hiroyasu Esumi, Toshinari Minamoto. Inhibition of GSK3β rectifies aberrant glucose metabolism in colon cancer cells. 金沢国際がん生物学&アカデミア創薬 シンポジウム，2014年1月23-24日，金沢東急ホテル，金沢市
- (8) Takahiro Domoto, Mayumi Hirose, Kenjiro Kami, Tomoyoshi Soga, Hiroyasu Esumi, Toshinari Minamoto. Putative pathological role of GSK3β in aberrant glucose metabolism in colon cancer cells. 第72回日本癌学会学術総会，2013年10月3-5日，パシフィコ横浜，横浜市
- (9) 堂本貴寛，廣瀬まゆみ，紙 健次郎，曾我朋義，江角浩安，源 利成．大腸がんの糖代謝経路におけるGSK3βの機能解析．第24回日本消化器癌発生学会学術総会，2013年9月5-6日，石川県立音楽堂，金沢市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://ganken.cri.kanazawa-u.ac.jp/shuyoseigyoi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堂本 貴寛 (DOMOTO TAKAHIRO)
 金沢大学 がん進展制御研究所 助教
 研究者番号：80635540

(2) 研究協力者

源 利成 (MINAMOTO TOSHINARI)
 金沢大学 がん進展制御研究所 教授
 研究者番号：50239323