

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670572

研究課題名(和文) 蛋白質リン酸化特性の網羅的解析による大腸がんの病態解明と制御への応用

研究課題名(英文) Phosphoproteome analysis of colorectal cancer for understanding of tumor biology and its application to development of treatment

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：グリコーゲン合成酵素キナーゼ(GSK)3の大腸がん促進作用のメカニズムを蛋白質リン酸化特性の視点から探究した。GSK3阻害によりがん細胞でリン酸化レベルが変化する蛋白質群を、リン酸化プロテオームとメタボローム解析により統合的に検討した。その結果、糖代謝を触媒する酵素A(仮称)がGSK3によりがん細胞でリン酸化されることを見出した。したがって、GSK3は酵素Aのリン酸化と不活性化によるがん固有の糖代謝を介してがん促進的に作用し、GSK3阻害によるがん治療効果が蛋白質リン酸化の修飾に立脚すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The phosphoproteomic approach explored the putative biological mechanism by which glycogen synthase kinase (GSK)3 promotes colon cancer progression. Inhibition of GSK3 significantly modified the level of phosphorylation in a number of proteins in colon cancer cells. Integration of phosphoproteome and metabolome analysis for these proteins phosphorylated by GSK3 identified the enzyme A, a rate-limiting enzyme in glucose metabolism, which was preferentially phosphorylated by GSK3 in cancer cells. The results suggest that GSK3 promotes cancer progression by induction of aberrant glucose metabolism via phosphorylation-dependent inactivation of the enzyme A. In all, this study demonstrates that cancer treatment targeting GSK3 depends on modulation of cancer-specific profile of protein phosphorylation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：大腸がん 蛋白質リン酸化 GSK3

## 1. 研究開始当初の背景

大腸がんの発生・進展過程では、がん関連遺伝子や染色体の構造、性質や発現量の変化が多段階的に集積する<sup>1)</sup>。これらの遺伝子レベルの変化は RNA、蛋白質へと順次、転写、翻訳され、さらにアセチル化やリン酸化などの翻訳後修飾を経て、がん細胞の表現形質を構成し、変化させる。翻訳後修飾のなかでも蛋白質リン酸化や脱リン酸反応は種々のがん遺伝子産物やがん抑制分子の発現や機能を制御している。とくに、大腸がんの治療標的分子である表皮成長因子受容体 (EGFR) で代表されるチロシンリン酸化酵素の分子経路は詳細に検討されている<sup>2-4)</sup>。EGFR 以外のチロシンリン酸化酵素やその他のリン酸化酵素についても大腸がん病態への関与が検討されているが、その成果は限定的であり、診断や治療への応用には至っていない。

我々は、glycogen synthase kinase (GSK) 3 $\beta$ が正常細胞とは異なる経路で「がん促進作用」を示すことを発見した。そして、本酵素阻害による治療効果が大腸がんをはじめ種々のがん細胞と動物移植腫瘍で実証し、第 I/II 相臨床試験を開始した<sup>5)</sup>。GSK3 $\beta$ は多くの蛋白質をセリン・スレオニンリン酸化してその安定性や機能を制御することにより、細胞の代謝をはじめ基幹的生命現象を司っている<sup>6)</sup>。

## 2. 研究の目的

本研究では、がん細胞の生存、増殖、浸潤やエネルギー代謝など根源的な生命活動と GSK3 $\beta$ の病的作用を連結する可能性のある蛋白質リン酸化特性をプロテオミクスの理論と先進的技法により網羅的に解析する。そして、がん細胞の病理特性と GSK3 $\beta$ の「がん促進機能」の分子基盤をリン酸化プロテオームの視点から明らかにする。これにより、大腸がんの生物学的特性と連動する腫瘍蛋白質の性質や機能を規定するリン酸化特性と、GSK3 $\beta$ によるそれらの制御機構の手がかりとなる分子経路を特定し、GSK3 $\beta$ 阻害による新しいがん治療法の作用メカニズムを蛋白質の翻訳後修飾に着目して解明する。

## 3. 研究の方法

### (1) がん細胞と非腫瘍性細胞の蛋白質リン酸化状態の比較解析

大腸がん細胞 (SW480, HCT116) とヒト胎児腎由来の正常細胞 (HEK293) の蛋白質リン酸化状態の基礎レベルを網羅的に半定量解析し<sup>7, 8)</sup>、がん細胞に特徴的なリン酸化特性を調べた。

### (2) GSK3 $\beta$ によるリン酸化ペプチド群の同定

GSK3 $\beta$  特異的リン酸化モチーフ: S/TXXXS/T (アミノ酸配列: S, serine; T, threonine; X, any amino acids) を指標に、本酵素により直接リン酸化される可能性のあるペプチド群の抽出を試みた。

### (3) がん細胞で GSK3 $\beta$ により制御される蛋白質

## リン酸化の同定

dimethyl sulfoxide (DMSO; 阻害剤の溶媒) と GSK3 $\beta$  阻害剤 (AR-A014418; Calbiochem) により処理した同一の大腸がん細胞のリン酸化プロテオームを同様に測定した。データをバイオ統計学的に比較することにより、GSK3 $\beta$  阻害によって変化するリン酸化ペプチド群を抽出した。

### (4) がん細胞特異的エネルギー代謝に関与する触媒酵素のリン酸化解析

これまでに我々は、GSK3 $\beta$  阻害により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することを示す代謝産物の変化を見出し、両代謝経路の分岐点で機能する酵素 A (仮称) に着目している。上記のリン酸化プロテオーム解析データをもとに、GSK3 $\beta$  が酵素 A をリン酸化して、その活性を制御しているかを検討した。

## 4. 研究成果

GSK3 $\beta$  によってがん特異的にリン酸化状態が変化する 21 種類の蛋白質候補を見出した。各々の候補蛋白質を強制発現させ、GSK3 $\beta$  で免疫沈降することで相互作用を確認したところ、2 種類の蛋白質で直接的な相互作用を確認した。現在これらの蛋白質について、大腸がんにおけるリン酸化の意義を検討中である。

本研究と並行して進めてきたメタボローム解析と上記のリン酸化プロテオーム解析の結果を統合的に検討した結果、酵素 A が GSK3 $\beta$  によりがん細胞で有意にリン酸化されることが示唆された。この結果より、GSK3 $\beta$  は酵素 A のリン酸化によりその活性を修飾してがん固有の糖代謝を誘導し、がん促進的に作用することが示唆された。

本研究の成果により、大腸がんの生物学的特性と関係する蛋白質リン酸化特性の系統的解析を通じて、GSK3 $\beta$  阻害による新しいがん治療法が「がん特異的リン酸化特性の修飾」に立脚すると考えられた。

## < 引用文献 >

- 1) Markowitz SD, et al. Molecular origins of cancer: molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med* 361: 2449-60, 2009.
- 2) Meyerhardt JA, et al. Systemic therapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 352: 471-80, 2005.
- 3) Wolpin BM, et al. Systemic treatment of colorectal cancer. *Gastroenterology* 134: 1296-310, 2008.
- 4) Cunningham D, et al. Colorectal cancer. *Lancet* 375: 1030-47, 2010.
- 5) Minamoto T, et al. Distinct pathologic role for glycogen synthase kinase 3 $\beta$  in colorectal cancer progression. In: *Colorectal Cancer Biology - From Genes to Tumor*, Ettarh R (Ed.), pp. 107-34, 2012; InTech.

- 6) Phukan S, et al. GSK3 $\beta$ : role in therapeutic landscape and development of modulators. *Br J Pharmacol* 160: 1-19, 2010.
- 7) Masuda T, Sugiyama N, et al. Microscale phosphoproteome analysis of 10,000 cells from human cancer cell lines. *Anal Chem* 83: 7698-703, 2011.
- 8) Inazuka F, Sugiyama N, et al. Muscle-specific knock-out of NUAKE family SNF1-like kinase 1 (NUAK1) prevents high fat diet-induced glucose intolerance. *J Biol Chem* 287: 16379-89, 2012.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 6件) すべて査読あり

- (1) 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 $\beta$  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.
- (2) Minamoto T. Detection and characterization of oncogene mutations in preneoplastic and early neoplastic lesions. *Methods Mol Biol* 1105: 381-98, 2014.
- (3) Kurklu B, Whitehead RH, Ong EK, Minamoto T, Fox JG, Mann JR, Judd LM, Giraud AS, Menhennott TR. Lineage-specific RUNX3 hypomethylation marks the pre-neoplastic immune component of gastric cancer. *Oncogene*, 2014 Aug 4. doi: 10.1038/onc.2014.233. Epub ahead of print.
- (4) Oshima H, Ishikawa T, Yoshida GJ, Naoi K, Maeda Y, Naka K, Ju X, Yamada Y, Minamoto T, Mukaida N, Saya H, Oshima M. TNF- $\alpha$ /TNFR1 signaling promotes gastric tumorigenesis through induction of Nox1 and Gna14 in tumor cells. *Oncogene* 33 (29): 3820-9, 2014.
- (5) Suzuki R, Yamamoto H, Ngan CY, Ohtsuka M, Kitani K, Uemura M, Nishimura J, Takemasa I, Mizushima T, Sekimoto M, Minamoto T, Doki Y, Mori M. Inhibition of angiotensin 2 attenuates lumen formation of tumour-associated vessels in vivo. *Int J Oncol* 43 (5): 1447-55, 2013.
- (6) Pyko IV, Nakada M, Sabit H, Lei T, Furuyama N, Hayashi Y, Kawakami K, Minamoto T, Fedlau AS, Hamada JI. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  inhibition sensitizes human glioblastoma cells to temozolomide by affecting O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase promoter methylation

via c-Myc signaling. *Carcinogenesis* 34 (10): 2206-17, 2013.

(学会発表) (計 8件)

- (1) Domoto T, Chikano Y, Furuta T, Sabit H, Pyko IV, Takino T, Hayashi Y, Sato H, Nakada M, Minamoto T. Glycogen synthase kinase 3 $\beta$  sustains invasion of glioblastoma via the focal adhesion kinase, Rac1 and JNK-mediated pathway. 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「がん幹細胞・微小環境・分子標的～がん進展制御への挑戦」, 2015年1月21日, 22日, 石川県立音楽堂, 金沢.
- (2) Domoto T, Kami K, Hirose M, Pyko IV, Soga T, Esumi H, Minamoto T. Involvement of GSK3 $\beta$  in aberrant glucose metabolism in colon cancer. 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25日~27日, パシフィコ横浜, 横浜.
- (3) 堂本貴寛, 廣瀬まゆみ, 紙健次郎, 曾我朋義, 江角浩安, 源 利成. 大腸がんの糖代謝における GSK3 $\beta$  の機能解析. 第2回がん代謝研究会, 2014年7月10日, 11日, 東京理科大学葛飾キャンパス, 東京.
- (4) Domoto T, Hirose M, Kami K, Soga T, Esumi H, Minamoto T. Inhibition of GSK3 $\beta$  rectifies aberrant glucose metabolism in colon cancer cells. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa (金沢国際がん生物学シンポジウム) & Symposium on Drug Discovery in Academics, January 23<sup>rd</sup>~24<sup>th</sup>, 2014, Kanazawa Excel Hotel Tokyu, Kanazawa, Japan.
- (5) Minamoto T. GSK3 $\beta$  in cancer metabolism. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa (金沢国際がん生物学シンポジウム) & Symposium on Drug Discovery in Academics, January 23<sup>rd</sup>~24<sup>th</sup>, 2014, Kanazawa Excel Hotel Tokyu, Kanazawa, Japan.
- (6) Minamoto T. Targeting GSK3 $\beta$  in colorectal and refractory cancers. 7<sup>th</sup> Conference of the International Society of Gastroenterological Carcinogenesis, November 15<sup>th</sup>-16<sup>th</sup>, 2013, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, U. S. A.
- (7) Domoto T, Hirose M, Soga T, Esumi H, Minamoto T. Putative pathological role of GSK3 $\beta$  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日 - 5日, パシフィコ横浜, 横浜.
- (8) 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 GSK3 $\beta$  の機能解析. 第24回日本消化器癌発生学会総会: シンポジウム1. がんの代謝特性とがん生物学, 2013年9月5

日,6日,石川県立音楽堂,金沢.

(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:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

(その他)

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

杉山 直幸 (SUGIYAMA, Naoyuki)  
慶應義塾大学・政策・メディア研究科・特任  
講師  
研究者番号:50545704

### (4) 研究協力者

堂本 貴寛 (DOMOTO, Takahiro)