

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 20日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659643

研究課題名（和文）がん特異的エネルギー代謝を標的とする消化器がん治療法の開発

研究課題名（英文） Treatment of gastrointestinal cancer by targeting the distinct energy metabolism of cancer cells

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

研究成果の概要（和文）：我々は、glycogen synthase kinase (GSK) 3 β のがん促進作用を発見し、GSK3 β 阻害によるがん治療効果を消化器がん細胞と動物実験で実証した。糖代謝の初期段階で、GSK3 β はグリコーゲン合成と解糖という相反経路の起点を調節する。本研究では、がん特有の糖代謝に対する GSK3 β の病的作用をメタボロームの理論と技法により解析した。その結果、GSK3 β は解糖とミトコンドリアの酸化的リン酸化の均衡を制御する代謝経路に作用して、がん細胞の病的代謝（Warburg 効果）を誘導することを示唆する代謝産物の変化が観察された。これが GSK3 β 阻害によるがん治療効果の重要なメカニズムであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Recently we discovered novel pathological roles for glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) in promoting cancer cell survival and proliferation via the modulation of cell cycle, tumor suppressor and cell immortality pathways. This has led us to propose GSK3 β as a potential target for cancer treatment. A primary role for GSK3 β is the control of glycogen synthase activity that switches glycogenesis and glycolysis, the two major pathways of glucose metabolism. In this research, we investigated whether GSK3 β influences the aberrant glucose metabolism in gastrointestinal cancer cells. Using innovative metabolomic technology, we found a distinctive metabolic trait in cancer cells that suggests inhibition of GSK3 β attenuates glycolysis (Warburg effect) and restores mitochondrial glucose oxidation. This trait could be an important molecular basis for cancer treatment targeting aberrant GSK3 β .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：腫瘍外科学，分子腫瘍学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：消化器がん，エネルギー代謝，標的治療，GSK3 β

1. 研究開始当初の背景

低酸素，低栄養という生存には不利な微小環境に適応するかのように，がんは代謝を自身の都合のよいように改変し，増殖と宿主の浸潤破壊を繰り返し，抗がん剤や放射線に耐性となって転移する。この根底には，がん細胞の生命活動を支えるための解糖によるエネルギー獲得が必須である。とくに，酸素供給

の多寡に影響されない嫌気性解糖の亢進（Warburg 効果）はがん細胞生存の本質的選択圧力であり，それ故がん細胞はグルコースを多量に必要とする。Warburg 効果はミトコンドリア不調和（mitochondrial uncoupling）やグルタミン異化亢進を伴うが，その理由は明らかではない。このような代謝特性はがんの浸潤・転移を促進し治療抵抗性を惹起するという概念から，この代謝経路の制御により根絶

的ながん治療法の開発が期待されているが、現在までに有効な方策は得られていない。

本研究に先行して我々は、GSK3 β が誘導するシグナルが細胞周期、がん抑制分子経路や細胞不死化機構を修飾して、がん細胞の生存と増殖を維持・推進することを発見した。そして、GSK3 β 阻害による強力ながん治療効果を種々の消化器がん細胞と担がん動物において実証し、本酵素が新しいがん治療標的であることを提唱した（国際出願）。その後、がんの浸潤能や治療抵抗性に対するGSK3 β の作用を明らかにするとともに、GSK3 β 阻害医薬品と抗がん剤の併用によるがん治療法を考案し（特許出願）、第 I/II 相臨床試験を開始した。

GSK3 β はインスリン経路をはじめ細胞周期、増殖・分化、細胞死や細胞運動能など多彩な細胞機能を調節している。疾患との関連では、インスリン経路、神経細胞や造骨細胞への作用から糖尿病、アルツハイマー病、骨粗しょう症などの創薬標的として注目され、多数の阻害剤が開発途上である。このようにGSK3 β はひろく細胞機能調節や疾患の発症と病態に関与する一方で、糖代謝の初期段階でグリコーゲン合成と異化（中心エネルギー代謝：解糖と酸化的リン酸化 [TCA 回路]）という相反経路の起点を調節している。我々は糖代謝における双方向的機能に着目して、GSK3 β の異常発現と活性により誘導されるがん促進作用の帰結が、がん細胞における代謝・異化の病的な亢進に起因するのではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

がん細胞の生命源となる糖質・エネルギー代謝に対する GSK3 β の病的作用をメタボローム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 β の「がん促進機能」の分子基盤を代謝の視点から明らかにする。これにより、がん細胞の生存、増殖、浸潤などの病態と連動する中心エネルギー代謝の特性と GSK3 β による制御の仕組みを明らかにし、GSK3 β 阻害による“がん細胞特異的代謝の正常化”に基づく新しいがん治療法の標的代謝経路を解明する。

3. 研究の方法

(1) がん細胞と非腫瘍性細胞の代謝動態の網羅的比較解析

大腸がん細胞株 (SW480, HCT116) と非腫瘍性細胞株 (HEK293) の基礎代謝状態をメタボロームの理論と技法により網羅的に比較解析する。実際には、キャピラリー電気泳動-質量分析計 (CE-MS) および液体クロマトグラフィー (LC)-MS により、中心エネルギー代謝（解糖系と TCA 回路）経路、ペン

トースリン酸化経路、アミノ酸合成経路などの代謝産物を網羅的に定量分析する。

(2) GSK3 β 阻害による細胞代謝変化のメタボローム解析

同一のがん細胞を ^{13}C 標識ブドウ糖含有培地を用いて同じ条件のもとに培養し、小分子 GSK3 β 阻害剤あるいは対照として DMSO (dimethyl sulfoxide) を添加し、それぞれの細胞におけるメタボロームを経時的に測定する。これにより、がん細胞における GSK3 β 活性阻害が代謝動態におよぼす影響を網羅的に検討する。GSK3 β 阻害剤は、その酵素活性阻害特異性が高いことが検証されている AR-A014418 を使用する。同じ実験系で、GSK3 β 阻害剤の有無により細胞のグルコース取込みが変化するかを計測する。

(3) GSK3 β 阻害による乳酸、解糖系と TCA 回路の中間代謝産物、ミトコンドリア機能の変動解析

同一のがん細胞をそれぞれ GSK3 β 阻害剤や siRNA により処理し、細胞内の乳酸量、細胞内 pH、pyruvate dehydrogenase (PDH) の発現や活性、TCA 回路の中間代謝産物やミトコンドリア状態（膜電位、過酸化水素レベル、チトクローム C 含有量と放出量など）の変化を個別に測定する。そして、GSK3 β 阻害により、これらの細胞性質や各代謝産物が非腫瘍性細胞に近い状態になる（正常化する）かを検討する。また、これらの変化にともなって、caspase 3 などのアポトーシス関連分子の変化が誘導されるかを検討する。

(4) GSK3 β 阻害によるグルタミン異化経路の変化

Myc により誘導されるグルタミン異化はがん細胞のエネルギー獲得源の 1 つであり、がんの治療標的になると提唱されている。これまでに GSK3 β が c-Myc の発現を調節することが報告されいることから、がん細胞の GSK3 β 阻害によりグルタミン分解経路の中間代謝産物や glutaminase などの酵素活性の変動を解析する。

(5) 動物移植腫瘍の代謝産物の測定

大腸がん細胞 HCT116 をヌードマウス皮下に移植する。腫瘍の生着を確認後、マウスに DMSO あるいは GSK3 β 阻害剤 (AR-A014418 5mg/kg) を腹腔内投与し、5 週間後に安楽死させ、移植腫瘍、全身の主要臓器と末梢血を採取・凍結保管する。代謝産物の測定に適する腫瘍組織試料の量、代謝産物の抽出法などについて予備検討する。その後、検体の代謝産物を測定し、GSK3 β 阻害の有無により培養細胞の解析から得られる結果との異同の比

較や再現性を解析する。

4. 研究成果

(1) がん細胞と非腫瘍性細胞の代謝動態

¹³C 標識ブドウ糖を用いてヒト大腸がん細胞と非腫瘍性細胞 (HEK293) 細胞の代謝産物を比較した。その結果、がん細胞では解糖系とエネルギー産生の亢進が観察され、Warburg 効果が検証された。この結果は、連携研究者：曾我らが報告したヒト大腸がん病巣の代謝特性を外挿していた。

(2) GSK3β 阻害によるメタボローム変化

GSK3β 阻害による大腸がん、膵がん細胞と非腫瘍性細胞の代謝産物の変化を同様の手法により網羅的に比較解析した。その結果、GSK3β 阻害剤により、がん細胞ではグルコースの取込みが変化することなく、乳酸の低下とともに、ピルビン酸脱水素酵素とミトコンドリアにける酸化的リン酸化 (TCA 回路) の賦活化あるいは“正常化”を示唆する中間代謝産物の変化が検出された。一方、非腫瘍性細胞 (HEK293) の代謝産物は GSK3β 阻害剤により変化しなかった。

(3) GSK3β 阻害による乳酸、解糖系と TCA 回路の中間代謝産物、ミトコンドリア機能の変化とがん細胞の生物学的特性

Warburg 効果と TCA 回路不調和 (mitochondrial uncoupling) によるミトコンドリア膜電位過分極はがん細胞の生存維持と、浸潤・転移能や治療抵抗性獲得の主要因と認識され、がん治療の標的経路であることが指摘されている。なかでも PDH は嫌気性解糖と TCA 回路の分岐点を制御する重要な代謝酵素であり、PDH kinase (PDK) により活性が制御されている。がん細胞では嫌気性解糖経路が TCA 回路より優位になっていることから、PDH 活性が低下、あるいは PDK 活性が亢進していることが予想される。我々の予備解析結果より、GSK3β ががん細胞における TCA 回路の代謝回転、ひいては PDH の発現や活性に影響していると推察された。

前項の中間代謝産物の一部を同じがん細胞を対象に個別に測定し、メタボローム解析の結果の一部を検証した。とくに、大腸がん細胞の GSK3β 阻害により、ミトコンドリア膜電位の回復、シトクローム C 含有量の低下とカスパーゼ 3 活性化が観察され、ミトコンドリア機能の賦活化が示唆された。これに伴い、アポトーシスが誘導された。GSK3β 阻害による代謝変動と関連して、がん細胞の生存、増殖、浸潤が抑制され、細胞老化が誘導された。

(4) GSK3β 阻害によるグルタミン代謝の変化

メタボロームデータの再解析の結果、当初予想していたグルタミン異化経路の代謝産物には明らかな変化はみられなかった。

(5) 動物移植腫瘍の代謝産物の測定

大腸がん細胞の動物移植腫瘍の解析により、細胞レベルで観察された PDH とミトコンドリアにける酸化的リン酸化 (TCA 回路) の賦活化を示唆する中間代謝産物の変化が検出された。

これらの結果より、GSK3β 阻害はがん細胞特有の解糖系 (Warburg 効果) を是正 (正常化) することにより、がん治療効果を示すことが示唆された。

なお、前年度の計画の遅れにより、当初予定していたヒト大腸がん病巣のメタボローム解析と、抗糖尿病薬メトフォルミン、乳酸アシドーシス治療薬ジクロロ酢酸 (DCA) と GSK3β 阻害剤の併用効果については、研究期間内に実施できなかった。

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 12 件)

- (1) Kitano A, Shimasaki T, Chikano Y, Nakada M, Hirose M, Higashi T, Ishigaki Y, Endo Y, Takino T, Sato H, Sai Y, Miyamoto KI, Motoo Y, Kawakami K, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3β is involved in pancreatic cancer cell invasion and resistance to therapy. PLoS One 8(2):e55289, 2013. doi: 10.1371/journal.pone. 査読有り
- (2) Shimasaki T, Kitano A, Motoo Y, Minamoto T. Aberrant glycogen synthase kinase 3β in pancreatic cancer development, progression and resistance to therapy. J Carcinog 11: 15, 2013. doi: 10.4103/1477-3163.100866. 査読有り
- (3) Matsunoki A, Kawakami K, Kotake M, Kaneko M, Kitamura H, Ooi A, Watanabe G, Minamoto T. LINE-1 methylation shows little intra-patient heterogeneity in primary and synchronous metastatic colorectal cancer. BMC Cancer 12: 574, 2012. doi: 10.1186/1471-2407-12-574. 査読有り
- (4) Nakajima H, Koizumi K, Tanaka T, Ishigaki Y, Yoshitake Y, Yonekura H, Sakuma T, Fukushima T, Umehara H, Ueno S, Minamoto T, Motoo Y. Loss of HITS (FAM107B) expression in cancer of the multiple organs: a tissue microarray analysis. Int J Oncol 2012, in press. doi: 10.3892/ijo.2012.1550. 査読有り

- (5) Loh M, Chua D, Yao Y, Soo RA, Zeps N, Platell C, Kawakami K, Minamoto T, Iacopetta B, Soong R. Can population differences in chemotherapy outcomes be inferred from differences in pharmacogenetic frequencies? *Pharmacogenomics J* 2012, in press. doi: 10.1038/tpj.2012.26. 査読有り
- (6) Kong D, Piao YS, Oshima H, Oguma K, Minamoto T, Yamada Y, Sato K, Yamashita S, Ushijima T, Ishikawa T, Oshima M. Inflammation-induced repression of tumor suppressor miR-7 in gastric epithelial cells. *Oncogene* 31 (35): 3949-60, 2012. doi: 10.1038/onc.2011.558. 査読有り
- (7) Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakamura Y, Takata T, Nakaya N, Nakajima H, Sato I, Zhao X, Kitano A, Kawakami K, Tanaka T, Takegami T, Tomosugi N, Minamoto T, Motoo Y. Glycogen synthase kinase 3 β inhibition sensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine. *J Gastroenterol* 47 (3): 321-33, 2012. doi: 10.1007/s00535-011-0484-9. 査読有り
- (8) Mimura M, Masuda A, Nishiumi S, Kawakami K, Fujishima Y, Yoshie T, Mizuno S, Miki I, Ohno H, Hase K, Minamoto T, Azuma T, Yoshida M. AP1B plays an important role in intestinal tumorigenesis with the truncating mutation of an *APC* gene. *Int J Cancer* 130 (5): 1011-20, 2012. doi: 10.1002/ijc.26131. 査読有り
- (9) Nakada M, Furuta T, Hayashi Y, Minamoto T, Hamada JI. The strategy for enhancing temozolomide against malignant glioma. *Front Oncol* 2:98, 2012. doi: 10.3389/fonc.2012.00098. 査読有り
- (10) Tomita H, Takaishi S, Menheniott TR, Yang X, Shibata W, Jin G, Betz KS, Kawakami K, Minamoto T, Tomasetto C, Rio MC, Lerkowit N, Varro A, Giraud AS, Wang TC. Inhibition of gastric carcinogenesis by the hormone, gastrin, is mediated by suppression of TFF1 epigenetic silencing. *Gastroenterology* 140 (3): 879-91, 2011. doi: 10.1053/j.gastro.2010.11.037. 査読有り
- (11) Kawakami K, Matsunoki A, Kaneko M, Saito K, Watanabe G, Minamoto T. Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation is a potential biomarker for the prediction of response to oral fluoropyrimidines in microsatellite stable and CpG island methylator phenotype-negative colorectal cancer. *Cancer Sci* 102 (1): 166-74, 2011. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01776.x. 査読有り
- (12) Motoo Y, Shimasaki T, Ishigaki Y, Nakajima H, Kawakami K, Minamoto T. Metabolic disorder, inflammation and deregulated molecular pathways converging in pancreatic cancer development: implications for new therapeutic strategies. *Cancers* 3(1): 446-60, 2011. doi: 10.3390/cancers3010446. 査読有り
- [学会発表] (計 35 件)
- (1) 堂本貴寛, 源 利成. がんの代謝と治療標的 GSK3 β の接点. 日本癌学会シンポジウム: がん代謝シンポジウム 2013, 2013 年 1 月 17-18 日, 慶應義塾大学医学部信濃町キャンパス北里記念医学図書館講堂, 東京.
- (2) Kawakami K, Matsunoki A, Kotake M, Kaneko M, Kitamura H, Watanabe G, Minamoto T. Knockdown of LINE-1 enhances sensitivity to 5-FU in LINE-1-hypomethylated colorectal cancer cell. 22nd Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, July 7-10, 2012, Centre Convencions International Barcelona, Barcelona, Spain.
- (3) Minamoto T, Mai W, Kyo S, Shakoori A, Miyashita K, Yokoi K, Shimasaki T, Motoo Y, Kawakami K. Deregulated GSK3 β sustains gastrointestinal cancer cells by modulating hTERT and telomerase. 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, March 31-April 4, 2012, McCormick Place, Chicago, Illinois, U.S.A.
- (4) Matsunoki A, Kawakami K, Kotake M, Kaneko M, Watanabe G, Minamoto T. LINE-1 methylation level is a molecular marker with little intra-patient heterogeneity in primary and synchronous metastatic colorectal cancer. 103rd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, March 31-April 4, 2012, McCormick Place, Chicago, Illinois, U.S.A.
- (5) Nakajima H, Minamoto T, Motoo Y. HITS (FAM107B): novel heat-shock induced protein as a maker for cancer progression and diagnosis. 16th World Congress on Advances in Oncology and 14th International Symposium on Molecular Medicine, October 6-8, 2011; Hotel Rodos Palace, Rhodes Island, Greece.
- (6) Menheniott TR, O'Connor L, Minamoto T, Kawakami K, Tomita H, Fox JG, Wang TC, Judd LM, Giraud AS. Interleukin-1 β is a signal for *Trefoil factor 2* promoter methylation in gastric preneoplasia. DDW 2011, May 7-10, 2011, McCormick Place, Chicago, Illinois, U.S.A.
- [図書] (計 3 件)
- (1) 源 利成, 川上和之. がんのエネルギー代謝と GSK3 β . 実験医学増刊 がん代謝:

何故がん細胞が好んで解糖系を使うのか？ 曾我朋義, 江角浩安 (編), 2012年, pp. 48-53, 羊土社, 東京.

- (2) Minamoto T, Kotake M, Nakada M, Shimasaki T, Motoo Y, Kawakami K. Distinct pathologic role for glycogen synthase kinase 3 β in colorectal cancer progression. In: Colorectal Cancer Biology - From Genes to Tumor, Rajunor Ettarh (Ed.), ISBN: 978-953-51-0062-1, pp. 107-134, 2012; InTech.
- (3) Nakada M, Minamoto T, Pyko IV, Hayashi Y, Hamada JI. The pivotal role of GSK3 β in glioma biology. In: Molecular Targets of CNS Tumors, ISBN 978-953-307-736-9, Miklos Garami (Ed.), pp. 567-590, 2011; InTech.

[その他]

ホームページ等

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/shuyoseigo/index.html>

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

川上 和之 (KAWAKAMI KAZUYUKI)
金沢大学・がん進展制御研究所・准教授
研究者番号：00293358

(3) 連携研究者

曾我 朋義 (SOGA TOMOYOSHI)
慶應義塾大学・環境情報学部・教授
研究者番号：60338217