

平成30年6月13日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15117

研究課題名(和文) がんのワールブルグ効果における炎症シグナルと増殖シグナルの機能的相互作用

研究課題名(英文) Functional interactions between inflammatory signal and growth signaling in the Warburg effect in cancer cells

研究代表者

櫻井 宏明(Hiroaki, Sakurai)

富山大学・大学院医学薬学研究部(薬学)・教授

研究者番号：00345571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：体内のストレス防御反応において中心的な役割を果たしている遺伝子発現を制御するタンパク質Nrf2を活性化する低分子化合物であるBardoxolone-methyl (BAR) に焦点を当て、その細胞遊走能、およびグルコース代謝に対する効果をヒト乳がん細胞株MCF-7を用いて検討した。その結果、細胞内の活性酸素消去作用を持つグルタチオンの減少によると思われる活性酸素の増加によって、解糖系や酸化リン酸化というグルコース代謝に影響し、がん細胞の遊走能を阻害することがわかった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the effects of Bardoxolone-methyl (BAR), a small molecule activating agents of Nrf2 transcription factor, on cell migration and glucose metabolism in human breast cancer MCF-7 cells. BAR inhibited glycolysis, mitochondrial oxidative phosphorylation, and cell migration via increase in intracellular reactive oxygen species and decrease in glutathione level.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん シグナル伝達 代謝 グルコース Nrf2

1. 研究開始当初の背景

(1) ワールブルグ効果とは、がん細胞は有酸素下でもミトコンドリアの酸化的リン酸化よりも解糖系で ATP を産生する現象であり、ピルビン酸キナーゼ (PKM2) が主要な調節因子である。PKM2 活性を低く保つことで、細胞分裂に必要なバイオマス (核酸、脂質、アミノ酸など) とエネルギー (ATP) 産生のバランスを取り、効率的に細胞分裂を起こす。

(2) PKM2 の活性調節機構の研究が進んでいる。これまでに、増殖因子受容体シグナルによる Tyr-105 リン酸化は PKM2 活性を低下させ、同時に ERK による Ser-37 リン酸化が PKM2 の核移行を誘導し、遺伝子発現を調節している。また、PKM2 は浸潤・転移に関わる上皮間葉転換 (EMT) やがん幹細胞機能にも関わっている。

(3) 我々は炎症によるがん悪性化機構に関する実績があり、その中で ERK/p38 を介した EGF シグナルと TNF- α シグナルの機能的相互作用を見出した。さらに、TNF- α および EGF がチロシンキナーゼ型受容体 EphA2 の Ser-897 リン酸化を起こし、細胞運動能を調節していることを報告するなど、炎症シグナルと増殖因子シグナルのクロストークを中心にがんの悪性化研究を進めている。

(4) Bardoxolone-methyl (BAR) は、体内のストレス防御反応において中心的な役割を果たす転写因子 Nrf2 を活性化する低分子化合物 (合成トリテルペノイド) である。2 型糖尿病による慢性腎障害やなどの治療薬として臨床開発が進んでいる。

(5) BAR は正常細胞と比して乳がん細胞に選択的に作用することが明らかにされている。その抗がん作用のメカニズムは明らかにされていないが、ミトコンドリア機能や解糖系に作用している可能性が示唆されている。また、NF- κ B の活性化を抑えるなど、Nrf2 とは異なる別の標的分子が存在すると考えられている。

2. 研究の目的

(1) がん細胞は好氣的条件下でも解糖系による ATP 産生を優先的に行っており、この現象をワールブルグ効果と呼ぶ。解糖系の律速酵素 PKM2 が、この効果の重要な調節因子である。PKM2 はリン酸化などにより活性が調節されており、EGF などの増殖因子刺激により核移行して転写を活性化することも知られている。炎症はがんの悪性化因子であるが、PKM2 活性に対する影響は全く解析されていない。我々は、TNF- α シグナルと EGF シグナルの機能的相互作用によるがん悪性化機構の研究で実績がある。

そこで本研究では、炎症シグナルと増殖因子シグナルのクロストークが PKM2 活性にど

のような効果を及ぼすかを網羅的に検討する。がん細胞特性の本質に迫る必要不可欠で喫緊の研究課題であり、細胞内シグナルと代謝系をつなぐ新たな調節機構を見出し、がん研究の発展に貢献する。

(2) BAR はがん細胞の様々な作用を及ぼし、新しい抗がん剤となることが期待されている。そこで本研究では、BAR が乳がん細胞の細胞遊走能に対する効果を検証するとともに、その作用機構として糖代謝やミトコンドリア機能に注目して解析を進める。本研究は、BAR の新たな活性化見出すことが期待され、今後の臨床開発にも貢献する。

3. 研究の方法

(1) 炎症性サイトカインや増殖因子による PKM2 リン酸化を、次に示す方法で検討した。ヒト肺がん細胞株 A549 (KRAS 変異) および PC-9 (EGFR 変異) に、EGF または TNF- α を作用した。その後、経時的に細胞抽出液を調製し、Phos-tag を用いたウェスタンブロット法にて PKM2 のバンドシフトを解析した。また、PKM2 の Ser-37 および Tyr-105 リン酸化を特異的に認識する市販抗体を入手し、上記の刺激でリン酸化レベルに変化が生じるのかを解析した。

(2) BAR の効果を検討するために、エストロゲン受容体陽性のヒト乳がん細胞株 MCF-7 細胞を用いた。細胞遊走能は、スクラッチアッセイで行った。細胞播種の翌日に BAR を添加し、細胞遊走に対する効果を検討した。

(3) ミトコンドリア代謝は、MTT アッセイで測定した。また、ミトコンドリアにおけるスーパーオキシドの産生は、細胞に MitoSOX を 30 分間処理後、フローサイトメーターで測定した。さらに、酸素消費速度 (OCR) および細胞外酸性化速度 (ECAR) は、XF-24 システムを用いて測定した。

(4) BAR の細胞内シグナル伝達分子の発現は、ウェスタンブロット法にて行った。解析には、Akt, NF- κ B やヒストン H2AX などに対するリン酸化特異抗体を用いた。

4. 研究成果

(1) 網羅的なメタボロミクス解析を行う条件設定を目的として、A549 および PC-9 細胞を用いて PKM2 リン酸化の検出を行った。EGF および TNF- α を、それぞれ単独および同時刺激によって PKM2 のリン酸化誘導されるのかをウェスタンブロット法で検討した。これまで報告のある Ser-37 および Tyr-105 に対するリン酸化特異抗体を用いた。その結果、TNF- α によって若干ではあるが Ser-37 リン酸化の変動が確認されたが、その変動幅は小さく、有意な変動とは認識することができなかった。EGF においてはリン酸化の変動は認め

られなかった。一方、Tyr-105 は刺激する前から強くバンドが認められたが、これが PKM2 に由来するのか、あるいは非特異的なバンドであるのか判別することができなかった。

(2) 部位特異的リン酸化抗体を用いたウェスタンブロット解析で期待した結果が得られなかったことから、リン酸化部位の特定はできないものの、リン酸化の有無をバンドシフトで検出可能な Phos-tag ウェスタンブロットを行った。Phos-tag はリン酸基を特異的に捕捉する低分子化合物であり、これをアクリルアミドに共有結合させて Phos-tag アクリルアミドを作製した。しかしながら、この場合においても、EGF および TNF- α 刺激によって PKM2 のリン酸化を示すシフトバンドは認められなかった。

以上の結果から、実験に用いた肺がん細胞では、増殖因子や炎症性サイトカインによって PKM2 のリン酸化が起こっていることを確認することができなかった。PKM2 のリン酸化が確認できなかったのは、検出系の問題なのか、それともリン酸化自体が起こっていないのかはわからなかった。当初の予定では、メタボロミクス解析を行う条件設定としてこれらの実験を位置付けていたこと、また網羅解析には本研究費のかなりの部分が必要となることから、リスクを冒してまでプロテオミクス解析を行うこと適当ではないと判断した。

(3) 体内のストレス防御反応において中心的な役割を果たしている転写因子 Nrf2 を活性化する低分子化合物である BAR に焦点を当て、その細胞遊走能、およびグルコース代謝に対する効果を検討した。スクラッチアッセイにおいて、MCF-7 細胞に BAR (50 nM) を処理すると、細胞の遊走能が有意に抑制された。また、MTT アッセイを行うと、ミトコンドリア活性の抑制も認められた。これらの結果が、BAR が Nrf2 に作用したもよるのかを確認するため、Nrf2 の代表的な標的遺伝子である酸化還元に関与する遺伝子の発現を解析した。その結果、グルタチオン合成に関わる Glutamate- cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)、および酸化的リン酸化のエネルギーを生成する前に、膜間のプロトン勾配を浪費することができるミトコンドリアの内膜のタンパク質をコードする Uncoupling protein-1 (UCP-1) の mRNA 発現が変化していた。実際、細胞内の還元型グルタチオン濃度が減少し、ミトコンドリアにおけるスーパーオキシド量が有意に上昇した。

(4) BAR のグルコース代謝系に及ぼす効果を検討した。その結果、BAR は酸素消費速度 (OCR) を低下させた。また、細胞外酸化速度 (ECAR) も低下した。これらのことから、BAR は解糖活性や酸化的リン酸化の両方を阻害することがわかった。これらの BAR による

ミトコンドリア活性の低下は、抗酸化剤の N-アセチルシステイン (NAC) 前処理によって回復したことから、活性酸素が関与していることがわかった。一方、パルミチン酸によっても同様にミトコンドリアの ROS 産生が増加、細胞遊走能や酸化的リン酸化の抑制が起こったが、この場合は NAC では回復しなかったことから異なる経路の存在が示唆された。

(5) BAR の細胞内シグナルに対する効果を検討した。その結果、少し高濃度 (1 μ M) ではあるが、刺激 1 時間後に Akt を強く活性化した。また、刺激 6 時間後には NF- κ B の活性化も認められた。さらに、DNA 損傷マーカーであるヒストンのリン酸化 (pH2AX) の増加が認められた。実際、細胞数の減少が認められた。

以上の解析から、BAR による細胞運動能の抑制は、解糖系やミトコンドリア機能の阻害に基づくものと考えられた。

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 3 件)

(1) Refaat A., Pararasa C., Arif M., Brown J.E.P., Carmichael A., Ali S.S., Sakurai H., Griffiths H.R.: Bardoxolone-methyl inhibits migration and metabolism in MCF7 cells. *Free Radic. Res.* 51: 211-221, 2017.

(2) Kato S., Yokoyama S., Hayakawa Y., Luhui L., Iwakami Y., Sakurai H., Saiki I.: P38 pathway as a key downstream signal of connective tissue growth factor to regulate metastatic potential in non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci.* 107: 1416-1421, 2016.

(3) Watanabe K., Yokoyama S., Kaneto N., Hori T., Iwakami Y., Kato S., Hayakawa Y., Sakurai H., Fukuoka J., and Saiki I.: COP9 signalosome subunit 5 regulates cancer metastasis by deubiquitinating SNAI1. *Oncotarget* 9: 20670-20680, 2018.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学) がん細胞生物学研究室ホームページ

<http://www.pha.u-toyama.ac.jp/cliche2/index-j.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

櫻井 宏明 (SAKURAI HIROAKI)
富山大学・大学院医学薬学研究部 (薬学)・
教授
研究者番号 : 00345571

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし