

令和 4 年 4 月 30 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09687

研究課題名(和文) エネルギー代謝を標的にした転移浸潤性膀胱癌に対する新規抗癌剤の開発

研究課題名(英文) Development of a novel anti-cancer drug for metastatic bladder cancer by targeting energy metabolism

研究代表者

金 哲将 (Kim, Chul Jang)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10204968

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞では、好気的環境下でも解糖系によるエネルギー産生が優位となるグルコース代謝にシフト(ワールブルグ効果)が生じており、悪性化に寄与している。我々は、ピルビン酸からアセチルCoAへの反応を抑制し解糖系を亢進するピルビン酸脱水素酵素キナーゼ4(PDK4)に着目し、中医学で利用される丹参の薬効成分クリプトタンシノン(CPT)が低濃度でPDK4を抑制し、膀胱癌細胞株で三次元スフェロイド形成能、上皮間葉転換(EMT)を抑えることを見いだした。また、この活性には、カテニン/Nカドヘリン経路が関与することを明らかにした。CPTが、難治性膀胱癌治療の新しい治療アプローチにつながる可能性が示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膀胱癌は、10番目に発生が多い癌であり、浸潤性膀胱癌となった場合には、抗癌剤による治療と根治的膀胱全摘除術による標準治療を行っても満足できる治療結果は得られていない。また、一旦転移癌になると5年生存率は5%以下で、ここ30年間治療結果の改善が見られていない難治性の癌である。今回治療の新しいアプローチとして、癌細胞のエネルギー代謝に注目し、解糖系を抑えることにより癌の上皮間葉転換を抑え、細胞浸潤能を抑制できることを示した。用いた薬剤も漢方の有効成分であるクリプトタンシノンであり、癌治療の新しいアプローチの可能性を示すことができたと考えている。

研究成果の概要(英文)：A majority of cancer cells preferentially metabolize glucose through glycolysis, even under aerobic conditions (Warburg effect), which is a primary metabolic hallmark of cancer cells. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) is a key molecule, which via decarboxylation, regulates the oxidative metabolism of pyruvate into acetyl-CoA. Cryptotanshinone (CPT), which is obtained from the traditional Chinese herb danshen, effectively inhibited PDK4 activity at low concentrations to suppress the three dimensional (3D)-spheroid formation and epithelial-mesenchymal transition (EMT) in human bladder cancer cells via β -catenin/N-cadherin pathway. CPT could be a potential treatment option for intractable bladder cancer.

研究分野：膀胱癌

キーワード：膀胱癌 ワールブルグ効果 ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ4 クリプトタンシノン 上皮間葉転換
カテニン

1. 研究開始当初の背景

癌細胞では、好気的環境下でも解糖系によるエネルギー産生が優位となるグルコース代謝のシフト(ワールブルグ効果)が生じており、増殖に必要な物質やエネルギー産生の亢進、酸化ストレス回避などを介して、悪性化に寄与していると考えられている。

我々はこれまで、癌の悪性化進行に関与するいくつかの遺伝子(drs, periostin, cyclin D1b)に注目し、その生理機能と癌化の関連について膀胱癌等の泌尿器癌を中心に研究を続けてきた。その中で drs 遺伝子はヒトの活性化 K-ras など各種の癌遺伝子によって遺伝子発現が抑制され、膀胱癌や前立腺癌など多くのヒト癌細胞においも遺伝子発現が抑制されていることを確認した。我々は、drs ノックアウト(KO)細胞を用いた解析から、drs 遺伝子が乳酸脱水素酵素(LDH)やピルビン酸脱水素酵素キナーゼ 4(PDK4)などのピルビン酸代謝調節分子の発現調節を介してワールブルグ効果の誘導に関与していることを見出した。Drs KO 細胞でのこの遺伝子の発現消失は LDH と PDK4 の発現を亢進させた。そこで、これらの分子から特に PDK4 を標的とする新たな癌治療法の検討を始めた。PDK4 に対して μM オーダーで阻害作用を有する低分子化合物を深索していた北里大学の 大野智博士と東京工業大学の 中野洋文博士らと連携し PDK4 阻害剤のスクリーニングを行い、中医学で利用される薬用植物の丹参(*Salvia miltiorrhiza*)の薬効成分クリプトタンシノン(cryptotanshinone)が μM オーダーでヒト膀胱癌細胞株の三次元(3D)スフェロイド形成(癌幹細胞性とも関連する悪性化形質の一つ)を顕著に抑制する活性を有することを見出した。また、クリプトタンシノンはマトリゲルアッセイで細胞浸潤能を顕著に抑制することを見出した。これらの化合物の薬理作用には未詳の点が多く、代謝調節作用や抗腫瘍作用についても十分にわかっていない。また、これらの低分子化合物を新規抗癌剤として臨床応用するためには *in vitro* の培養細胞レベルの作用だけでなく、*in vivo* のマウス発癌モデルにおける抗腫瘍作用や副作用などの検証が必須である。我々はこれまでヌードマウスの膀胱にヒト膀胱癌細胞株を移植し腫瘍を形成させる同所性膀胱癌モデルや、尾静脈から肺への転移モデルを樹立してきている。本研究では、通常の皮下移植による Zenograft マウスモデルに加えて、同所性膀胱癌および転移マウスモデルを用いてクリプトタンシノンの抗腫瘍作用の検証を行う。

2. 研究の目的

これまで行ってきた drs 癌抑制遺伝子研究から見出したピルビン酸代謝の制御分子に着目し、我々が樹立してきた *in vitro* および *in vivo* の腫瘍活性を検討する実験系を用いて難治性膀胱癌の新たな治療法の深索するのが本研究の目的である。ミトコンドリアに局在するピルビン酸脱水素酵素(PDH)は糖代謝の制御に重要な酵素であり、PDK によりリン酸化され不活化される。癌や糖尿病では PDK4 の過剰発現による PDH の低下が起きていることから PDK4 阻害剤は癌や糖尿病の分子標的薬剤として深索が行われてきたが、これまで PDK4 を $100\ \mu\text{M}$ 以下の IC50 で阻害できる化合物は見い出されていなかった。PDK4 阻害剤として報告されているジクロル酢酸(DCA)は阻害活性が弱く神経毒性などの副作用が大きいため実用化には至らなかった。今回使用するクリプトタンシノンは、従来の化合物よりも阻害活性が強く毒性も低いもので、動物実験で良好な結果ができれば臨床への応用まで期待できる。

本研究では、クリプトタンシノンの *in vitro* での抗腫瘍活性を検討するとともに、その分子機構も明らかにする。また、ヌードマウスを用いた実験系を用い、*in vivo* での抗腫瘍活性や副作用の発現状態も検討を加える。

3. 研究の方法

新規 PDK4 阻害剤クリプトタンシノンは、ワールブルグ効果を抑制できるか。

ヒト膀胱癌細胞 (T24, J82)を CPT $10\sim 20\ \mu\text{M}$ で処理し、PDH のリン酸化(p-PDH)が抑制されるかウエスタンブロット(WB)分析で確認する。合わせて PDK4 や PDH の発現にも検討を加える。

クリプトタンシノンは、ヒト膀胱癌細胞に対して抗腫瘍活性を示すか。

癌細胞の腫瘍活性の指標として、細胞増殖活性、3D スフェロイド形成能、細胞浸潤能(Matrigel invasion assay)に検討を加えた。

クリプトタンシノンはどのような分子機構でヒト膀胱癌細胞に抗腫瘍活性を示すか。

ヒト膀胱癌細胞 (T24, J82)をクリプトタンシノン $10\sim 20\ \mu\text{M}$ で処理し、細胞増殖シグナル伝達系(mTOR, Akt, MEK/Erk)、細胞周期、上皮間葉転換(EMT) (E-cadherin, N-cadherin, カテニン など)、癌幹細胞性(CD44, EpCAM など)、アポトーシスに検討を加えた。また結果を検証する目的で、small interfering RNA (siRNA)の手法や mTOR, Akt, Erk に対する阻害剤を用いた実験を行った。

クリプトタンシノンは *in vivo* のヌードマウスを用いたモデルでも抗腫瘍活性を示すか。

ヒト膀胱癌細胞株 J82 細胞を用いて、皮下接種による皮下腫瘍形成モデル、膀胱内細胞注入に

よる膀胱癌同所性モデル、尾静脈癌細胞注入による肺転移モデルを試みたが、いずれも腫瘍形成が確認できず、動物実験モデルを確立することができなかった。

そのため、実験チームで確立していたヌードマウスでのヒト膵臓癌細胞株 SUIT-2 を用いた膵臓癌同所性モデルを用い *in vivo* の実験系として用いた。膵臓癌細胞 SUIT-2 を開腹後膵臓に接種したのち閉腹し、一週間後からクリプトタンシノン 40mg/kg を2日に1回2週間腹腔内に投与した。最終日翌日に解剖して腫瘍形成、腹膜播種の状態を観察したのちに、腫瘍や各種臓器を病理組織学的に検討し、コントロール群とクリプトタンシノン処理群で比較した。

4. 研究成果

in vitro におけるヒト膀胱癌細胞に対するクリプトタンシノンの細胞浸潤抑制活性

ヒト膀胱癌細胞 (T24, J82) をクリプトタンシノン 10~20 μ M で処理したところ、濃度依存的に PDH のリン酸化が抑制されることが確認できたが、PDH と PDK4 発現には変化はなかった。ATP 活性を指標とした細胞増殖活性、3D スフェロイド形成能、Matrigel invasion assay を用いた細胞浸潤能の癌化形質に関しても、濃度依存的に抑制されることが確認できた。アポトーシスの誘導の有無を、caspase-3 の活性化を指標とした WB 分析、Caspase-Glo3/7 分析を用いた caspase-3/7 活性の測定による検討を加えたが、アポトーシスの誘導は確認できなかった。

クリプトタンシノン処理に細胞浸潤関連タンパク質の変化

ヒト膀胱癌細胞 (T24, J82) をクリプトタンシノン 10~20 μ M で処理し、細胞浸潤に関連すると考えられる EMT 関連タンパク質の発現を WB 分析で検討した。N-cadherin の発現が濃度依存的に抑制され、EMT の関与を確認することができた。E-cadherin の発現は確認することはできなかった。カテニンの検討では、カテニンの核への移行や転写活性に關与する S552 のリン酸化が濃度依存的に抑制されることが確認できた。一方、ユビキチン化やプロテオソームでの分解に關与する S33/37/T41 のリン酸化は 10 μ M のクリプトタンシノン処理で増強された。20 μ M のクリプトタンシノン処理では、全体の カテニン、S33/37/T41 のリン酸化いずれも抑制された。これらのことよりクリプトタンシノンは、カテニンのリン酸化に対するデュアル機能により、細胞浸潤能を抑制すると考えられた。次に カテニンの細胞内の局在を検討したところ、クリプトタンシノン処理により カテニンの核への集積が著明に抑制されることも確認できた。カテニンがクリプトタンシノンによる細胞浸潤抑制活性に重要な機能を保持していることが確認できた。

3D スフェロイド形成能と関連すると考えられる癌幹細胞性について、CD44 と EpCAM の発現を検討すると、クリプトタンシノン処理により抑制されることが確認できた。癌に関連したシグナル経路である MEK/Erk、Akt、mTOR (S6K, 4EBP1) シグナル伝達系について検討したところ、いずれの経路もクリプトタンシノン処理により抑制されることが確認できた。

クリプトタンシノン処理により誘導される N-cadherin と細胞浸潤能抑制における カテニンの役割

クリプトタンシノン処理で誘導される EMT の抑制や癌幹細胞性の抑制が PDK4 抑制の結果か検討する目的で siRNA の手法で PDK4 をノックダウンした。T24 を用いた実験系で、PDH のリン酸化や PDK4 が抑制されていることが確認できた。細胞浸潤活性も抑制され、WB 分析により N-cadherin、カテニンの S552 のリン酸化、MEK リン酸化、Akt リン酸化、mTOR (S6K, 4EBP1)、CD44 いずれも抑制されており、これまでの実験結果に合致する結果であった。次に、カテニンをノックダウンして同様の検討を行ったところ、細胞浸潤活性抑制作用は確認できた。WB 分析では、カテニンと N-cadherin は抑制されたが、他のタンパク質には変化はなかった。カテニンは細胞浸潤能の制御に重要な役割を果たし、N-cadherin は カテニンの下流で機能することが確認できた。

40 μ M の mTOR、Akt、Erk 阻害剤で T24 細胞を処理し、カテニン、N-cadherin、CD44 等の関連を調べたところ、mTOR 阻害剤のみで N-cadherin の発現が抑制され、他の阻害剤では N-cadherin の発現に変化はなかった。これらの結果から、膀胱癌細胞でのクリプトタンシノンによる EMT 抑制を介した細胞浸潤抑制活性には、PDK4 mTOR カテニン N-cadherin EMT 細胞浸潤の経路が関与していることが確認できた。この経路には、Akt、MEK/Erk、癌幹細胞性は関与していないと考えられた。

in vivo ニューマウス膵臓癌同所性モデルでのクリプトタンシノンの抗腫瘍活性

ヒト膵臓癌細胞 SUIT-2 で、クリプトタンシノンがヒト膀胱癌細胞と同様の活性を示すか WB 分析で検討した。まず、クリプトタンシノン処理を行うと PDH リン酸化は抑制され、ワールブルグ効果の抑制効果が確認できた。EMT 関連タンパク質では、N-cadherin の発現が濃度依存的に抑制されたが、E-cadherin の発現に変化はなかった。カテニンの S552 のリン酸化、total カテニン、CD44 いずれも濃度依存的に抑制され、膀胱癌細胞の結果に合致し、膀胱癌細胞に対する活性と同様の活性を有することが確認できた。

クリプトタンシノン処理群とコントロール群各5匹の SUIT-2 膵臓癌同所性モデルで検討した。膵臓に形成された腫瘍は、最も大きい腫瘍容量で比較したところ、クリプトタンシノン処理群 0.011 \pm 0.008 mL、コントロール群 0.061 \pm 0.028 mL で、腫瘍の成長はクリプトタンシノン処理

群で有意に抑制されていた($p < 0.05$)。HE 標本による病理組織学的検討では、特に差は認めなかった。しかし、カテニンによる免疫組織学的検討では、カテニンの発現はコントロール群と比較して、クリプトタンシノン処理群の膵臓腫瘍で著明に抑制されていた。これは、*in vitro*の実験結果に合致するものであった。同所性モデルのマウスには、膵臓癌の腹膜播種による腫瘍が確認できた。腹膜播種腫瘍をカウントし比較すると、コントロール群と比較してクリプトタンシノン処理群では有意に少なく($p < 0.05$)、クリプトタンシノン処理で腹膜播種が抑制されていることが確認できた。クリプトタンシノン処理による副作用を検討する目的で、心臓、肺、肝臓、腎臓を病理組織学的にクリプトタンシノン処理群とコントロール群で検討したが、この実験系の範囲で明らかな副作用は確認できなかった。

クリプトタンシノンは、膵臓癌同所性モデルで *in vivo* での腫瘍の成長、腹膜播種を抑制する活性を有することが確認できた。

クリプトタンシノンが難治性癌の浸潤・転移抑制をターゲットとする新規治療法開発の候補になる可能性を示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Susumu Kageyama, koki Maeda, Shigehisa Kubota, Tetsuya Yoshida, Takashi Osafune, Yutaka Arai, Hiroki Soga, Zenkai Nishikawa, Yuji Sano, Keita Takimoto, Chul Jang Kim, Tokuhiko Chano, Akihiro Kawauchi	4. 巻 35
2. 論文標題 Single short retention instillation of pirarubicin prevents intravesical recurrence of low-risk non muscle invasive bladder cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 in vivo	6. 最初と最後の頁 1141-1145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tambe Y, Terado T, Kim CJ, Mukaisho KI, Yoshida S, Sugihara H, Tanaka H, Chida J, Kido H, Yamaji K, Yamamoto T, Nakano H, Omura S, Inoue H	4. 巻 58
2. 論文標題 Antitumor activity of potent pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitors from plants in pancreatic cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Mol Carcinog	6. 最初と最後の頁 1726-1737
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mc.23045.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kim CJ, Terado T, Tambe Y, Mukaisho KI, Kageyama S, Kawauchi A, Inoue H	4. 巻 59
2. 論文標題 Cryptotanshinone, a novel PDK 4 inhibitor, suppresses bladder cancer cell invasiveness via the mTOR/ -catenin/N-cadherin axis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Oncol	6. 最初と最後の頁 40-50
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ijo.2021.5220.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Okinaka Y, Kageyama S, Nishizawa K, Yoshida T, Ishitoya S, Shichiri Y, Kim CJ, Iwata T, Yokokawa R, Arai Y, Nishizawa Z, Soga H, Ushida H, Sakano Y, Naya Y, Yoshida T, Narita M, Kawauchi A	4. 巻 81
2. 論文標題 Clinical, pathological, and therapeutic features of newly diagnosed prostate cancer predominantly detected by opportunistic PSA screening: A survey of Shiga Prefecture, Japan.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Prostate	6. 最初と最後の頁 1172-1178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/pros.24212.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kim CJ, Nishida M, Hanada E, Kageyama S, Narita M, Kawauchi A	4. 巻 15
2. 論文標題 Application of the indocyanine green fluorescence imaging method in laparoscopic resection of a solitary retroperitoneal metastasis of renal cell carcinoma: A case report.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian J Endosc Surg	6. 最初と最後の頁 172-175
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ases.12945.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Chul Jang Kim, Tokio Terado, Yukihiro Tambe, Ken-ichi Mukaisho, Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi, Hirokazu Inoue
2. 発表標題 Cryptotanshinone, a PDK4 inhibitor, suppresses invasion and metastasis in human bladder and pancreatic cancers
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tokio Terado, Yukihiro Tambe, Chul Jang Kim, Hiroyuki Tanaka, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Hirokazu Inoue
2. 発表標題 A novel PDK4 inhibitor inhibits glutamine metabolism to suppress tumorigenesis of KRAS-activated cancer cells.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金 哲将, 寺戸勅雄, 旦部幸博, 河内明宏, 向所賢一, 杉原洋行, 井上寛一
2. 発表標題 膵臓癌と膀胱癌における新規PDK4阻害剤による浸潤転移の抑制
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 旦部幸博, 寺戸勅雄, 金 哲將, 中野洋文, 向所賢一, 杉原洋行, 井上寛一
2. 発表標題 新規PDK4阻害剤cryptotanshinoneはPI3K/Akt経路を介してKRAS活性型癌細胞の癌化を抑制する
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chul Jang Kim, Tokio Terado, Yukihito Tambe, Ken-ichi Mukaisho, Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi, Hirokazu Inoue
2. 発表標題 Cryptotanshinone, a novel PDK4 inhibitor, suppresses cell invasiveness in bladder cancer cells via β -catenin/N-cadherin.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tokio Terado, Yukihito Tambe, Chul Jang Kim, Hiroyuki Tanaka, Hirokazu Inoue
2. 発表標題 A PDK4 inhibitor, cryptotanshinone, inhibits lipid metabolism to suppress tumorigenesis of KRAS-activated cancer cells.
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金 哲將, 寺戸勅雄, 旦部幸博, 井上寛一, 河内明宏
2. 発表標題 新規ビルビン酸脱水素酵素キナーゼ4 (PDK4)阻害剤クリプトタンシノンの β カテニンを介したヒト膀胱癌細胞での細胞浸潤抑制作用
3. 学会等名 第109回日本泌尿器科学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	井上 寛一 (Hirokazu Inoue) (30176440)	滋賀医科大学・医学部・非常勤講師 (14202)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------