

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16728

研究課題名（和文）解糖系代謝フロー切替によるがん悪性形質獲得機序の解析

研究課題名（英文）A study on the mechanism regulating cell motility upon metabolic alterations by PFK1 inhibition

研究代表者

小林 大貴（Kobayashi, Hiroki）

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30528683

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：複雑ながん代謝を理解することは新たながん治療法開発につながる。我々は解糖系酵素ホスホフルクトキナーゼ（PFK1）の活性抑制によるがんのエネルギー代謝変化が、がん転移に關する細胞運動性を亢進させることを独自に見出してきた。本研究はそのメカニズム解明を目的とした。代謝物解析、遺伝子発現解析、遺伝学・薬理学的手法を用いた解析の結果、エネルギー代謝変化により、がん細胞の運動性を亢進させる責任遺伝子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
エネルギー代謝ががん細胞の悪性化にどのように關わるか、その一端を解明することができた。この成果はがんの治療戦略構築の一助となり、将来的に人類の健康に貢献しうる。

研究成果の概要（英文）：Understanding of cancer metabolism can lead to the development of new anti-cancer therapies. We have found that the alteration of energy metabolism by PFK1 inhibition in cancer cells enhances cell motility, which is involved in cancer metastasis. In this study, we tried to elucidate mechanisms underlying this phenomenon. We performed metabolic analyses, gene expression analyses, and phenotypic analyses using pharmacological and genetic approaches. Consequently, we succeeded in identifying the responsible gene that enhances the motility of cancer cells upon alteration of energy metabolism.

研究分野：がん、代謝、ケミカルバイオロジー

キーワード：がん代謝 解糖系 細胞遊走 PFK1

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

がん分子標的の探索アプローチのひとつにがん代謝の理解がある。解糖系律速酵素ホスホフルクトキナーゼ (PFK1) の活性抑制による解糖系代謝フローの切替はペントースリン酸経路の亢進、それによる酸化ストレス耐性の向上によりがんの悪性化に寄与することが知られるが、研究代表者は酸化ストレス耐性向上だけでなく、がん転移に関与する運動性をも亢進させることを独自に見出していた。この機序の解明は「複雑・多様ながん代謝がどのようにがんの悪性化に寄与するか」「がんの弱点は何か」の理解を目指すために重要だと考えられた。

2. 研究の目的

PFK1 の活性抑制による解糖系代謝フローの切替が細胞運動性を高める機序を解明する。

3. 研究の方法

PFK1 の活性抑制は遺伝学的手法 (PFK1 ノックアウト細胞と PFK1 再導入細胞の比較) および薬理学的手法 (PFK1 阻害剤 *tryptolinamide*, TLAM) を使用した。遺伝子発現解析には GeneChip、細胞遊走評価にはタイムラプス撮像装置 *IncuCyte Zoom* を使用した。

4. 研究成果

4-1) PFK1 ノックアウト細胞と PFK1 再導入細胞のトランスクリプトーム比較

解糖系代謝フロー切替がどのような遺伝子発現変化をもたらすか調べるため PFK1 ノックアウト細胞と PFK1 再導入細胞のトランスクリプトーム比較解析を行った。その結果 PFK1 ノックアウト細胞は PFK1 再導入細胞に比べて細胞細胞間接着接着因子をコードする遺伝子の発現が低下している一方、細胞外タンパク質の遺伝子発現が上昇していた (図 1)。また細胞骨格の遺伝子発現にも変化がみられ、これらの遺伝子発現の差は PFK1 ノックアウト細胞の細胞遊走能が高いことと矛盾しないと考えられた。

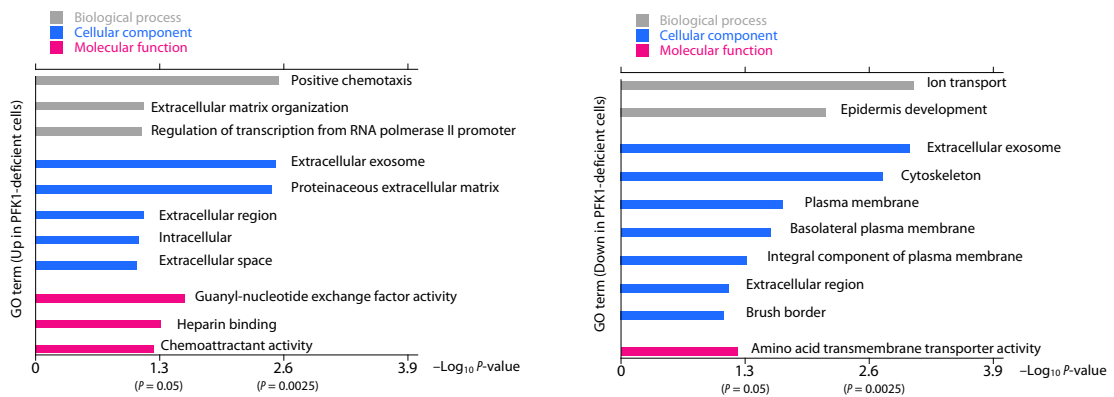


図 1 PFK1 ノックアウト細胞と PFK1 再導入細胞のトランスクリプトーム比較結果

PFK1 ノックアウト細胞と PFK1 再導入細胞のトランスクリプトームを比較し、エンリッチメント解析を行った。

4-2) 責任遺伝子候補 Gene X の PFK1 阻害による発現上昇検証

トランスクリプトーム解析により、PFK1 ノックアウト細胞で発現量がより高く、細胞遊走との関連が強く示唆されている遺伝子発現調節因子を見出した (Gene X)。Gene X は PFK1 再導入細胞、野生型の HeLa 細胞に PFK1 阻害剤 *Tryptolinamide* (TLAM) を添加すると発現上昇した。したがって、Gene X は PFK1 の活性低下により発現することが示唆された (図 2)。

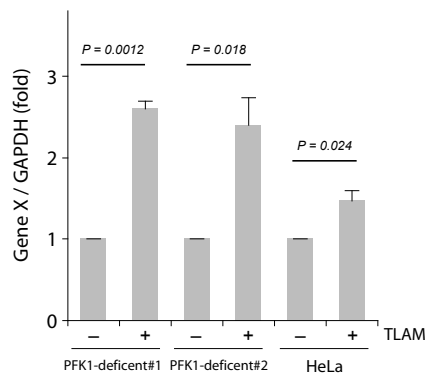


図 2 PFK1 阻害による Gene X の発現上昇

PFK1 再導入細胞あるいは HeLa 細胞に PFK1 阻害剤を処理し、ddPCR で Gene X の mRNA 量を定量した。

4-(3) Gene X の RNAi は細胞運動性を低下させる

Gene X が PFK1 の活性抑制による解糖系代謝フローの切替において細胞運動性を高める責任遺伝子かどうかを調べるために siRNA を用いた機能阻害実験を行った。siRNA により Gene X をノックダウンすると PFK1 ノックアウト細胞の細胞遊走が抑制されることから、Gene X は解糖系代謝フロー切替によりがん細胞の運動性を亢進させる責任遺伝子であることが示唆された (図 3)。

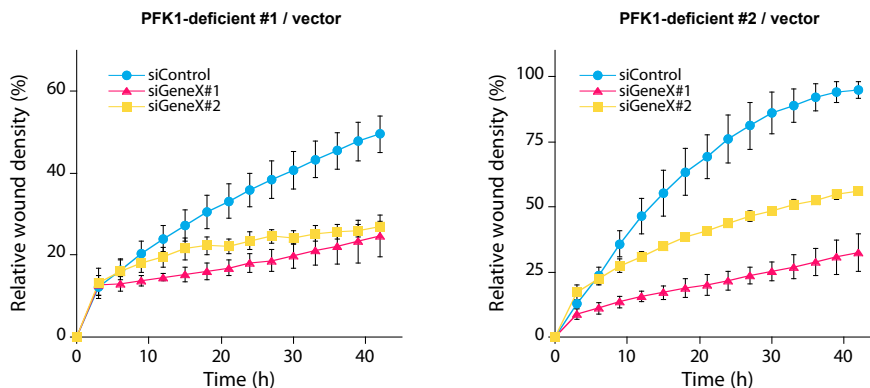


図 3 Gene X の発現抑制が細胞運動性に与える影響  
遊走能の高い PFK1 ノックアウト細胞に siRNA を導入し、細胞遊走を評価した。

4-(4) Gene X の強制発現は細胞運動性を亢進させる

つぎに Gene X が責任遺伝子であることをより確かにするための遺伝学実験を行った。運動性が低下している PFK1 再導入細胞に責任遺伝子候補を強制発現した結果、細胞遊走が亢進したことから、当該遺伝子が細胞運動に関わることが明らかとなった (図 4)。

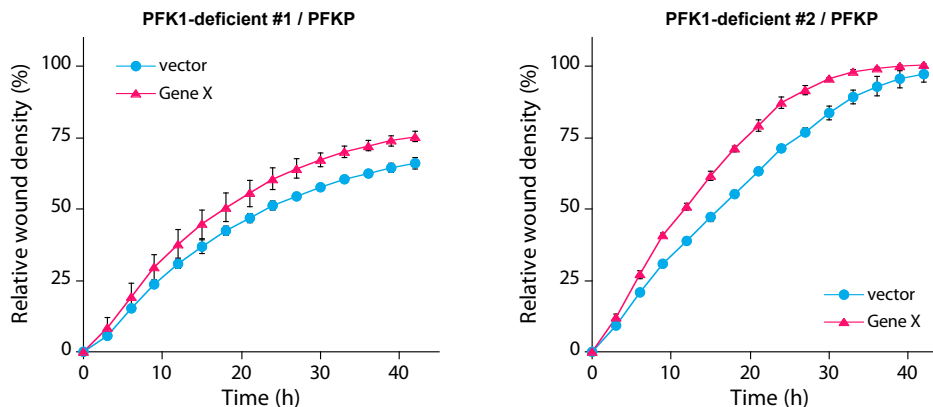


図 4 Gene X の強制発現が細胞運動性に与える影響  
遊走能の低い PFK1 再導入細胞に Gene X を強制発現させ、細胞遊走を評価した。

4-(5) 正常細胞での PFK1 の活性抑制による細胞運動性亢進

代謝フロー切替による細胞遊走亢進に一般性があるか、培養正常細胞を用いて検証した。化合物による PFK1 活性抑制により、正常細胞も細胞運動性が向上したことから、解糖系代謝フロー切替による細胞運動性亢進はある程度一般性があることが示唆された (図 5)。以上より PFK1 の活性抑制による解糖系代謝フローの切替が細胞の運動性を高める機序の一端を解明できた。

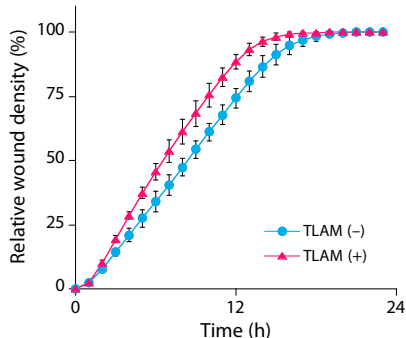


図 5 PFK1 阻害が正常細胞の運動性に与える影響  
培養正常細胞に TLAM を添加し、細胞遊走を評価した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hiroki Kobayashi, Hideyuki Hatakeyama, Haruna Nishimura, Mutsumi Yokota, Sadafumi Suzuki, Yuri Tomabechi, Mikako Shirouzu, Hiroyuki Osada, Masakazu Mimaki, Yu-ichi Goto, and Minoru Yoshida	4. 巻 17
2. 論文標題 Chemical reversal of abnormalities in cells carrying mitochondrial DNA mutations	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 335、343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41589-020-00676-4	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林大貴、畠山英之、西村はる菜、横田睦美、鈴木禎史、苫米地由里、白水美香子、長田裕之、三牧正和、後藤雄一、吉田稔
2. 発表標題 機能低下したミトコンドリアを活性化させる化合物の発見
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林大貴、畠山英之、西村はる菜、横田睦美、鈴木禎史、苫米地由里、白水美香子、長田裕之、三牧正和、後藤雄一、吉田稔
2. 発表標題 機能低下したミトコンドリアを活性化させる化合物の発見とその応用
3. 学会等名 日本ミトコンドリア学会主催 J-mit 特別オンラインシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroki Kobayashi, Hiroyuki Osada, and Minoru Yoshida
2. 発表標題 Identification of a novel compound that alters energy metabolism
3. 学会等名 Chemical Biology and Drug Discovery, Cold Spring Harbor Asia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Kobayashi, Hiroyuki Osada, and Minoru Yoshida
2. 発表標題 A novel compound that alters energy metabolism
3. 学会等名 The Joint Symposium of "10th Korea-Japan Chemical Biology Symposium" and "30th Meeting for New Drug Discovery" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林大貴、高瀬翔平、松本健、吉田稔
2. 発表標題 解糖系酵素PFK1の合成致死遺伝子同定
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会 第14回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林大貴、長田裕之、吉田稔
2. 発表標題 Discovery of a small-molecule compound that modulates the Warburg Effect
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 小林大貴、高瀬翔平、吉田稔
2. 発表標題 解糖系酵素PFK1の合成致死遺伝子の探索
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

プレスリリース  
[https://www.riken.jp/press/2020/20201110\\_1/index.html](https://www.riken.jp/press/2020/20201110_1/index.html)

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------