

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16371

研究課題名（和文）低栄養環境で高発現するがん特異的代謝遺伝子とがん代謝リプログラミングに関する研究

研究課題名（英文）Research on cancer-specific metabolic genes highly expressed in nutrient deprivation and cancer metabolic reprogramming

研究代表者

小野寺 威文（Onodera, Takefumi）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所 沼津支所・研究員

研究者番号：20733166

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）：低酸素、低pH、低栄養状態といった腫瘍微小環境にあるがん細胞は、生存に必要なエネルギー獲得のため、解糖系に高度に依存した代謝改変を行っている。がん特異的代謝を分子標的治療薬の標的とすることは、新規抗がん剤の開発戦略として有望である。本研究では、アミノ酸欠乏環境において発現量が著しく上昇するTransketolase-like1(TKTL1)を見出し、その遺伝子機能解明とがん治療における分子標的候補としての検討を行った。その結果、TKTL1はアミノ酸欠乏環境にあるがん細胞の増殖を有利にさせるよう機能している可能性が示された。TKTL1は抗がん剤開発のための魅力的な標的であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍微小腫瘍環境の一つである低栄養状態を模倣した環境において、ペントースリン酸経路で機能するとされるTransketolase-like 1 (TKTL1)が高発現していることを見出し、がんにおけるTKTL1の機能解明を行った。これまで、TKTL1の機能についての詳細はよく分かっていなかったが、in vitroおよびin vivo実験結果から、TKTL1を抑制すれば、腫瘍増大を阻止できることが示唆された。本研究は、未解明であるがん代謝の理解を深めるとともに、がん特異的代謝を標的とした阻害剤の開発および新しいがん治療法の基盤構築に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells in the tumor microenvironment, characterized by hypoxia, low pH, and low nutrient conditions, undergo metabolic alterations that highly rely on the glycolytic pathway to acquire the energy necessary for proliferation and survival. Recent cancer metabolism studies have reported the complicated process of metabolic pathway alteration. However, few reports still exist on the molecular mechanism for cancer cells under nutrient deprivation. In this study, we found Transketolase-like 1 (TKTL1), whose expression significantly increases in an amino acid-deprived condition, and investigated its genetic function elucidation and potential as a molecular target in cancer treatment. As a result, TKTL1 was shown to potentially facilitate the proliferation of cancer cells in an amino acid-deprived environment. TKTL1 was suggested to be an attractive target for anti-cancer drug development.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん代謝 ペントースリン酸経路 アミノ酸欠乏

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

低酸素、低pH、低栄養状態といった腫瘍微小環境にあるがん細胞は、増殖・生存に必要なエネルギー獲得のため、解糖系に高度に依存した代謝改変を行っている。近年、解糖系以外の複雑な代謝経路の変化が幾つか発見されており、がん特異的代謝を分子標的治療薬の標的とすることは、新規抗がん剤の開発戦略として有望である。しかしながら、実際の腫瘍組織の環境下において、がん細胞がどのような代謝経路を介して生存しているのかについて詳細な説明は進んでいない。本研究では、栄養欠乏環境におけるがんの代謝リプログラミングは創薬のターゲットとなり得ると考え、新規標的分子の探索を行ったところ、解糖系から分岐したペントースリン酸経路に関わる遺伝子である Transketolase-like 1 (TKTL1)の発現量が大きく増大していることを見出した。ペントースリン酸経路は、還元的同化反応に必要な NADPH の産生とヌクレオチド合成に必要なリボース-5-リン酸の供給源であるため、がんのように細胞分裂が活発に行われる組織で活性が高い。さらに興味深いことに、低酸素環境下における TKTL1 遺伝子発現量を調べたところ、TKTL1 は酸素分圧に影響を受けず、低栄養環境においてのみ遺伝子発現量が著しく増大したことから、TKTL1 の発現制御は低酸素応答には依存せず、低栄養環境に特化した機構である可能性が示された。現在のところ、栄養欠乏環境における TKTL1 の機能に関する報告は非常に少なく、また、腫瘍微小環境におけるペントースリン酸経路の重要性についても議論の余地が多分に残されているため、本研究を開始した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、低栄養環境におけるがん特異的エネルギー代謝リプログラミング機構の解明である。具体的には、TKTL1 遺伝子の分子機能解析として、TKTL1 の酵素活性の測定、トランスケトラーゼファミリーを構成する Transketolase (TKT)と TKTL1 とのタンパク質間相互作用の解析を行う。細胞レベルにおいては、TKTL1 安定発現細胞株および遺伝子ノックダウン細胞株を用いて、栄養条件による TKTL1 の発現制御機構を解析する。また、遺伝子改変株を用いてメタボローム解析を行い、代謝フラックスについて検証する。個体レベルにおいては、TKTL1 安定発現および遺伝子ノックアウト細胞株をマウスに異種移植し、TKTL1 の造腫瘍能、転移能といったがんの悪性化に関する機能を調べる。また、臨床腫瘍サンプルを用いて、TKTL1 の実際の腫瘍における意義を検証する。TKTL1 の分子機能や生理機能を細胞レベルおよび個体レベルで詳細に解析することで、がん特異的エネルギー代謝リプログラミングにおける TKTL1 の機能的役割を明らかにすることができる。

### 3. 研究の方法

#### (1) グルコースまたはアミノ酸欠乏・添加培地における TKTL1 の発現解析

TKTL1 は低栄養条件で遺伝子発現量が増大するため、どのような栄養素が遺伝子発現制御に関与するのかを調べた。グルコースの有無、各種アミノ酸の有無といった栄養素が異なる組み合わせの培地を作製し、TKTL1 の発現量を解析した。

#### (2) 低栄養環境において TKTL1 遺伝子改変細胞の代謝フラックス解析

TKTL1 安定発現細胞株を用いて、低栄養環境におけるメタボローム解析を行った。解析には、ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社の中心エネルギー代謝に特化した高感度解析プラン (C-Scope) サービスを利用した。

#### (3) TKTL1-TKT タンパク質相互作用の解析

低栄養環境で機能する TKTL1 は、TKT と相互作用している可能性が示唆されていた。そこで、TKTL1-TKT タンパク質相互作用を確認するために、共免疫沈降を行った。さらに、TKTL1 とのタンパク質相互作用部位の解析のために、ドメイン領域を欠損した変異型 TKTL1 の作製し、同様に共免疫沈降にて TKTL1 と TKT とのタンパク質相互作用部位の解析を行った。

#### (4) 遺伝子安定発現細胞株とノックダウン細胞株の造腫瘍性評価

膵がん細胞 BxPC-3 および MIA PaCa-2 を用い TKTL1 遺伝子安定発現細胞株およびノックダウン細胞株を作製した。 $1 \times 10^6$  cells のそれらの細胞を 7 週齢の BALB/c ノードマウスに接種し、*in vivo* 造腫瘍性試験を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) グルコースまたはアミノ酸欠乏・添加培地における TKTL1 の発現解析

低栄養環境で発現上昇する TKTL1 の発現誘導メカニズムを解析するために、栄養条件の検討を行った。グルコースまたは 15 種のアミノ酸を含む培地では、グルコースの有無に関係なくアミノ酸が欠乏することで、TKTL1 の発現が上昇することが明らかとなった。次に、TKTL1 の発現誘導に関与するアミノ酸を明らかにするために、単一アミノ酸含有培地における TKTL1 の発

現量を調べたところ、核酸合成の窒素源に必要なグルタミン、分岐鎖アミノ酸のバリン、ロイシン、イソロイシンが存在すると TKTL1 の発現が抑制されることが分かった。TKTL1 はグルタミン濃度依存的に mRNA 量およびタンパク質量が低下したことから、TKTL1 の発現メカニズムは、グルタミン欠乏状態で活性化する転写因子によって制御されていることが示唆された。続いて、我々が行った低栄養環境における DNA マイクロアレイのデータを用いて、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 解析および転写因子結合予測の解析を行った。その結果、TKTL1 の発現制御に関わる転写因子候補を複数個に絞ることができ、その中には、飢餓ストレス応答、酸化ストレス応答に関連する転写因子が候補として挙げられた。そこで、転写因子候補の一つである Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) を siRNA でノックダウンし、TKTL1 の発現量変化を調べた。その結果、TKTL1 の mRNA 発現量の減少が確認された。しかし、高い Nrf2 ノックダウン効果にもかかわらず、TKTL1 の mRNA 発現量の減少は部分的であり、TKTL1 の発現制御には、Nrf2 以外の転写因子による発現制御を受けている可能性が示唆された。

## (2) 低栄養環境において TKTL1 遺伝子改変細胞の代謝フラックス解析

メタボローム解析の結果、対照群と比較して、TKTL1 を安定発現させた膵がん細胞 PANC-1 を低栄養環境で処理すると、解糖系の中間代謝産物量が減少し、最終代謝産物である乳酸の生成量が有意に増加していた。また、解糖系の迂回路であるペントースリン酸経路においても、グルコース 6 リン酸、リボース 5 リン酸といった代謝産物量が減少していた。一方で、NADPH の量が増加していた。ペントースリン酸経路で生成される NADPH は、脂肪酸やコレステロールなどの生合成や還元型グルタチオンの生成に利用されることが知られている。低栄養環境に晒された TKTL1 安定発現細胞株の NADPH 量の増加は、ペントースリン酸経路が亢進していることを示唆しており、ペントースリン酸経路は再び解糖系に繋がるので、総じて、TKTL1 安定発現細胞株では解糖系がより亢進していることが示唆された。

## (3) TKTL1-TKT タンパク質相互作用の解析

BxPC-3, MIA PaCa-2, PANC-1 細胞株を用いて、低栄養環境における TKTL1 と TKT のタンパク質間相互作用の解析を行った。TKT 抗体で共免疫沈降を行ったところ、ウエスタンブロットにおいて TKTL1 のバンドを確認した。反対に、TKTL1 に付加した FLAG タグで共免疫沈降を行ったところ、TKT が検出された。これらの結果から、TKTL1 は、TKT とタンパク質間相互作用していることが明らかとなった。次に、TKTL1-TKT とのタンパク質相互作用部位の解析のために、TKTL1 のタンパク質構造情報を基に、FLAG タグを付してドメイン領域を欠失した変異型 TKTL1 を 5 種類作製した。これらを共免疫沈降法にて、TKT とのタンパク質間相互作用の消失を指標に相互作用部位の解析を行う予定である。

## (4) 遺伝子安定発現細胞株とノックダウン細胞株の造腫瘍性評価

BxPC-3 および MIA PaCa-2 を用いて作製した TKTL1 遺伝子安定発現細胞株をヌードマウスの皮下に移植すると、対照群と比較して、有意な腫瘍の増大が認められた。一方、同様に作製した TKTL1 ノックダウン細胞株をヌードマウスの皮下に移植すると、対照群と比較して、腫瘍増殖の顕著な抑制が見られた。以上より、TKTL1 は腫瘍増殖に大きく関わっていることが確認された。TKTL1 はがん治療において、魅力的な分子標的である可能性が示唆された。

以上により、本研究で見出されたペントースリン酸経路の TKTL1 は、腫瘍微小環境の一つである低栄養環境、特にアミノ酸欠乏環境において、がん細胞の悪性化に大きく関わっていることが明らかとなった。また、TKTL1 は TKT とタンパク質相互作用することで、がん細胞の生存に有利になるよう機能している可能性が示唆された (Fig. 1)。今後本研究をさらに発展させ、アミノ酸欠乏環境で発現上昇する TKTL1 の発現メカニズムの解明および新規がん分子治療薬の標的候補としての可能性を探求し、がん代謝を標的とした抗がん剤の開発につなげていく予定である。

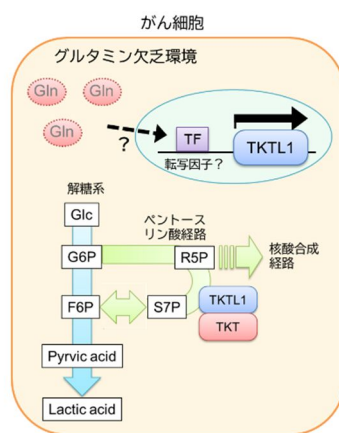


Fig. 1. アミノ酸欠乏環境におけるTKTL1の発現制御機構モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takefumi Onodera, Shuichi Sakamoto, Isao Momose, Manabu Kawada
2. 発表標題 Elucidation of the function of cancer metabolism genes highly expressed in human pancreatic cancer
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野寺威文、大庭俊一、百瀬功、川田学
2. 発表標題 低栄養環境に特異的ながん代謝遺伝子の発現誘導メカニズムの解明
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野寺威文、大庭俊一、百瀬功、川田学
2. 発表標題 低栄養環境で高発現するがん特異的代謝遺伝子の探索と機能解明
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Takefumi Onodera, Shuichi Sakamoto, Isao Momose, Manabu Kawada
2. 発表標題 Elucidation of cancer metabolic reprogramming in nutrient deprivation.
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 小野寺威文、大庭俊一、百瀬功、川田学
2. 発表標題 低栄養環境で高発現するがん特異的代謝遺伝子の機能解明
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takefumi Onodera, Shuichi Sakamoto, Isao Momose, Manabu Kawada
2. 発表標題 Functional role of cancer-specific metabolic gene highly expressed in nutrient-deprived conditions
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微化研HP <a href="https://www.bikaken.or.jp">https://www.bikaken.or.jp</a>
--

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