

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06815

研究課題名(和文)代謝酵素PDHの新たな機能 - 代謝と遺伝子発現の連携によるがん促進機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of tumor growth mediated by pyruvate dehydrogenase PDH

研究代表者

中山 恒(Nakamaya, Koh)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：10451923

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)：本研究では、がんの進展過程におけるエネルギー代謝状態の変化が、がん形成にどのような意義を持つのかを明らかにすることをめざした。まず、PDHノックアウト乳がん細胞株を樹立したところ、この細胞は増殖が有意に抑制されていた。さらに、マウスにノックアウト細胞を移植したところ、腫瘍形成能が低下していた。この細胞にPDHを発現誘導できるベクターを導入して、レスキュー実験を行ったところ、腫瘍形成能が回復した。さらに、発現誘導のタイミングを変えたところ、移植後3週間経過してからPDHを誘導しても腫瘍形成能は回復した。これらの結果から、PDHを介したエネルギー代謝は、腫瘍形成後期で有効である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内の乳がん患者数は年々増加しており、女性のがん罹患者の中で最も多い。本研究により、代謝酵素の一つPDHを乳がん細胞株でノックアウトすることにより、腫瘍形成が抑制されることが明らかになった。このことから、PDH抑制は乳がん増殖を阻害するための効果的なアプローチとなることが期待される。一方で、PDHは体内で幅広く発現しており、その活性を常時・全身性に抑制することは、さまざまな副作用を引き起こすことが予想される。本研究の成果は、PDHが腫瘍形成後期で重要な役割を担うことを示しており、PDH阻害薬を後期に限定して使用することで、副作用少なく、効果の高い乳がん治療法に結びつく展望が描かれた。

研究成果の概要(英文)：We aim to understand the role of energy metabolism during tumor development. First, we generated PDH knockout (KO) breast cancer cell line. These cells showed reduced cell proliferation. When these cells were inoculated into immunodeficient mice, tumor formation was significantly reduced. Next, we introduced an expression vector of PDH which can be induced by drug into these cells. When PDH expression was induced in PDH KO cells, tumor formation was recovered. Furthermore, when PDH was induced three weeks after cell inoculation, recovery of tumor formation was still observed. These results indicate that energy metabolism mediated by PDH plays an important role during later phase of tumor formation.

研究分野：腫瘍生化学

キーワード：腫瘍 ピルビン酸脱水素酵素 代謝 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

グルコースの代謝は、酸素が十分に存在する環境下では、解糖系から TCA 回路、電子伝達系へと進み、効率的にエネルギーが産生される。この過程で、ピルビン酸からアセチル CoA を産生し、解糖系と TCA 回路を連絡する酵素が、ピルビン酸脱水素酵素 PDH である。PDH は通常ミトコンドリアに局在し、正常な代謝を促進する。一方、PDH の活性が抑制されると、ピルビン酸は乳酸に変換されるようになり、解糖系に大きく依存した代謝（解糖代謝）に切り換わる。低酸素下では、PDH がリン酸化され、その活性が抑制されるため、解糖代謝が起こる。

がん細胞は、通常酸素下でも解糖代謝に依存した異常な代謝様式であるワールブルグ(Wb) 効果を引き起こすことが知られている。解糖代謝を主体とする Wb 効果はエネルギーの産生効率が悪いにもかかわらず、がん細胞が、なぜこのような代謝様式をとるのかは依然明確ではなく、近年、改めて注目されている。

## 2. 研究の目的

PDH のリン酸化は、その酵素活性を抑制して、解糖代謝を引き起こし、腫瘍を増大させるとの報告がある。一方、PDH のノックダウン(KD)も、PDH 活性を低減させ、解糖代謝を引き起こすが、この時に、腫瘍増殖は抑制されることを我々は明らかにした (*Cancer Res* 2018)。このことは、二つの可能性を示唆している。一つは、KD 細胞で形成される常時の解糖代謝は、がんにとって不利となる可能性である。もう一つは、リン酸化され、代謝酵素としては不活化された状態でも、PDH は代謝制御とは別の役割を持ち、腫瘍を増大させる。PDH がノックダウンされるとその活性が低減するために腫瘍は小さくなる可能性である。そこで本研究は、代謝異常がんが悪性形質を示すのに必須の要素は何か、という疑問を中心に据え、これら二つの可能性の検証を進めた。

本研究は、がんの進展過程におけるエネルギー代謝状態の変化が、がん形成においてどのような意義を持つのかを明らかにすることを第一の目的とする。さらに、新たに見出した核に局在する PDH の解析から、PDH のがん促進作用に関与する遺伝子の同定とその制御機構を明らかにすることを第二の目的とする。これらの知見を統合し、PDH ががんのエネルギー代謝と遺伝子発現を連携させ、がん促進因子として作用する分子機序を明らかにすることをめざした。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞株と培養

本研究には乳がん細胞株 MCF7、MDA-MB231、ならびに、大腸がん細胞株 HCT116 を用いた。細胞は 10%FBS と抗生物質を含む DMEM 培地で培養した。細胞は 5% CO<sub>2</sub>, 37°C で維持されたインキュベータ内で培養した。低酸素培養は、1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C に設定された低酸素ワークステーション内で実施した。

### (2) ウェスタンブロット法

PDH の発現を検証するために、ウェスタンブロット法を用いた。野生型、ノックアウト細胞から調製したタンパク質抽出液を 10%ゲル上にアプライし、電気泳動した。ゲル内のタンパク質は、ニトロセルロース膜に転写され、PDH など、目的タンパク質

に対する特異的抗体液中で反応させた。次いで、HRP と結合した二次抗体と反応させ、ECL により検出した。

### (3) 細胞増殖アッセイ

$5 \times 10^4$  個の細胞を 24-well plate にまき、通常酸素 72 時間まで培養した。経時的に細胞を固定して、crystal violet で染色し、吸光度を測定することで、細胞数の変化を計測した。

### (4) ノックアウト細胞とレスキュー細胞の樹立

CRISPR/Cas9 システムのベクターに PDHE1 $\alpha$ , PDHE1 $\beta$  遺伝子をノックアウトするような鑄型配列を導入した。このベクターを細胞内にトランスフェクション試薬を用いて導入し、puromycin 耐性を指標に選択した。選択した細胞をクローン化して、ゲノム配列とタンパク質発現を確認することで、ノックアウト効率を判定した。高効率でノックアウトされた細胞を選択して、解析に使用した。さらに、PDH ノックアウト細胞に、doxycycline の添加によって PDH の発現が誘導できる Tet-on ベクターを導入して、レスキュー実験に使用した。

### (5) マウスでの腫瘍形成実験

免疫不全ヌードマウスの乳腺皮下に、 $1 \times 10^6$  個の乳がん細胞を移植した。その後、8 週目まで経時的に、腫瘍形成を観察・測定した。8 週経過後にマウスを安楽死させ、腫瘍の重さを計測した後、固定、ならびに、凍結して腫瘍試料とした。

## 4. 研究成果

### (1) PDH ノックアウト細胞の樹立

これまでの研究において、PDH を構成的にノックダウンすることにより乳がん細胞株のマウスにおける腫瘍形成能が顕著に低下することを明らかにしてきた。そこで、まず、PDH の発現を完全に消失させた PDH ノックアウト乳がん細胞株の作製を、CRISPR/Cas9 システムを用いて行った。Guide RNA と Cas9 が発現するベクターを細胞内に導入し、puromycin 入り選択培地で選択したところ、puromycin に耐性を持った細胞から、PDH を構成する二つのサブユニット (PDHE1 $\alpha$ , PDHE1 $\beta$ ) がそれぞれノックアウトされた細胞を複数クローン樹立することができた。樹立した各クローンは、PDH の遺伝子配列に変異が導入されていることをシーケンズ解析で確認し、PDH ノックアウト細胞として使用した。

### (2) PDH ノックアウト細胞の解析

(1) で樹立した PDH ノックアウト細胞において、PDH の発現が消失していることをウェスタンブロットにより確認した。興味深いことに、PDHE1 $\alpha$  を KO すると、PDHE1 $\beta$  の発現量も低下していた。この現象は、逆に PDHE1 $\beta$  を KO した時にも、PDHE1 $\alpha$  が低下するという様式で見られ、両者の発現は強い相互依存性を示すことが明らかになった。PDH KO 細胞では、培養培地中に乳酸が放出され酸性化する現象が観察され、グルコースからピルビン酸を経て乳酸を産生する代謝経路が亢進していることが示唆された。次に、この細胞の増殖能を計測した。通常酸素、ならびに、低酸素条件下で経時的に細胞数をカウントしたところ、PDHE1 $\alpha$ , PDHE1 $\beta$  のどちらをノッ

クアウトしても、細胞増殖が抑制されることが明らかになった (図1)。さらに、低グルコース培地では、増殖抑制がより顕著に認められた。これらの結果は、これまで得ているノックダウン細胞を用いた実験データと整合性のあるものであった。

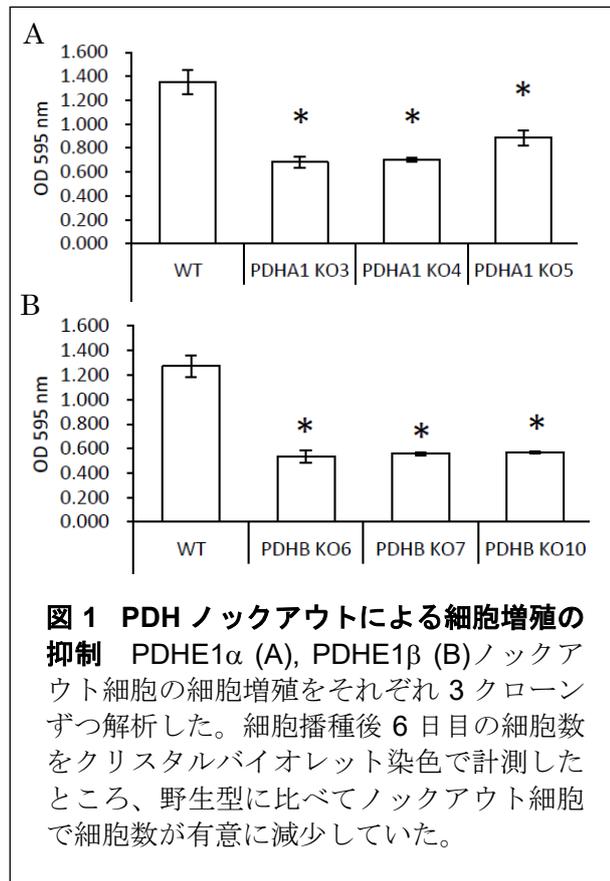
### (3) PDH ノックダウン細胞の遺伝子発現解析

PDH が核内に移行することでどのような役割を果たすのかを、網羅的遺伝子発現解析により検証した。RNA-seq 解析を、複数クローンの結果を統合する形で再解析した。その結果、複数のクローン間で共通して発現が上昇する遺伝子、または、低下する遺伝子が同定された。PDH ノックダウン細胞で発現が上昇する遺伝子の中には、

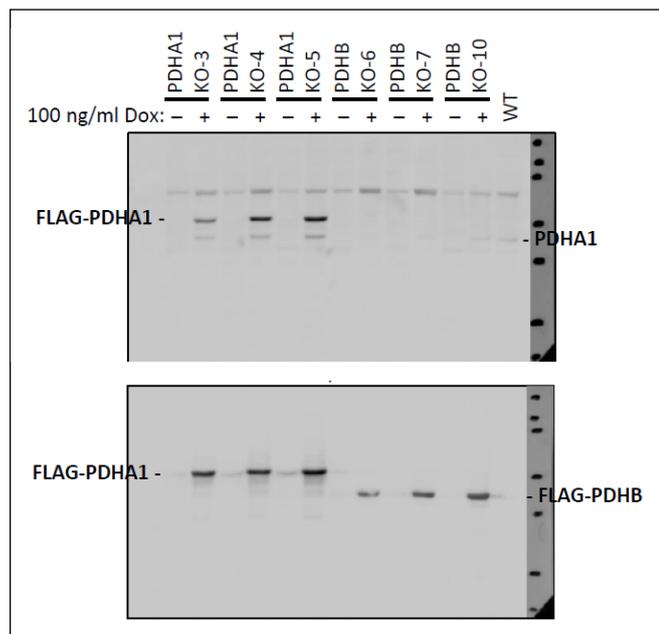
炎症に関与するものや生殖細胞の発生に関与するもの、発現が低下する遺伝子の中には、タンパク質分解に関与するものやタンパク質分解酵素の阻害因子などが含まれていた。今後は、これらの因子の発現の増減が腫瘍形成にどのように作用するのかを検証したい。

### (4) PDH レスキュー細胞の樹立

PDH ノックアウト細胞に、ドキシサイクリン添加により PDH の発現が誘導される Tet-on 型のベクターを導入し、レスキュー実験を行った。PDHE1 $\alpha$ , PDHE1 $\beta$ それぞれのレスキュー細胞に関して、ドキシサイクリンの濃度を検討して、毒性を示さず、内在性遺伝子と同等の発現量が得られる濃度条件 (100 ng/ml) を決定した。この濃度でドキシサイクリンを添加したところ、それぞれの PDH サブユニットの発現がレスキューされることが確認された (図2)。



**図1 PDH ノックアウトによる細胞増殖の抑制** PDHE1 $\alpha$  (A), PDHE1 $\beta$  (B)ノックアウト細胞の細胞増殖をそれぞれ3クローンずつ解析した。細胞播種後6日目の細胞数をクリスタルバイオレット染色で計測したところ、野生型に比べてノックアウト細胞で細胞数が有意に減少していた。



**図2 PDH レスキュー細胞の樹立**

PDHE1 $\alpha$ ノックアウト細胞に PDHE1 $\alpha$ を導入した3クローン (左から1-6レーン目)、PDHE1 $\beta$ を導入した3クローン (左から7-12レーン目) は、ドキシサイクリン(Dox)添加により、各PDHサブユニットの発現が回復した。

#### (5) PDH ノックアウト細胞の腫瘍形成能の回復

PDH を誘導性に発現させることにより、PDH ノックアウトをレスキューできる乳がん細胞 (KO レスキュー細胞) をマウスに移植して、異なるタイミングでドキシサイクリンを投与した時の腫瘍形成能を検証した。この KO レスキュー細胞をヌードマウスに移植したところ、その腫瘍形成能が抑制されていることが確認された。並行して、この細胞を移植したマウスにドキシサイクリン(Dox)を投与してレスキュー実験を実施したところ、抑制されていた腫瘍形成能が回復することが明らかとなった (図 3)。さらに、このレスキュー実験において、Dox 添加のタイミングを変えて、Dox 添加を移植直後に3週間のみ行う、移植後3週間経過してから行う、の二種類のタイミングで解析したところ、後者の方法で腫瘍形成能が回復する傾向がみられ、PDH によるレスキューは、腫瘍形成過程の後期で有効である可能性が示唆された。

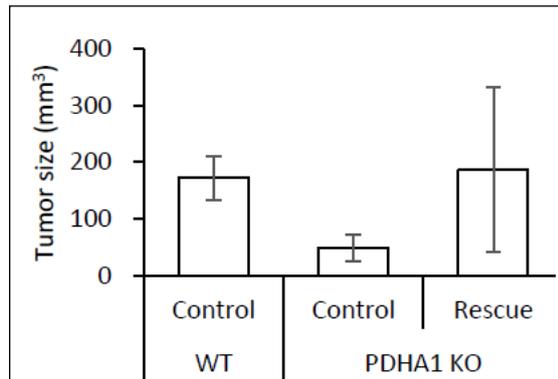


図3 PDH ノックアウト細胞の腫瘍形成能の回復

PDHE1 $\alpha$ ノックアウト細胞に PDHE1 $\alpha$ を導入した乳がん細胞株を免疫不全マウスに移植した。PDHE1 $\alpha$ ノックアウトで抑制された腫瘍形成能が、ドキシサイクリン添加により PDHE1 $\alpha$ を発現誘導することで、野生型と同程度にまで回復した。

(参考文献)

Yonashiro R., Eguchi K., Wake M., Takeda N., and **Nakayama K.\*** Pyruvate dehydrogenase PDH-E1 $\beta$  is downregulated under prolonged hypoxic conditions and controls tumor progression by altering the metabolic status of cancer cells. *Cancer Res.*, 78, 1592-1603, (2018)

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakayama K. 他5名	4. 巻 33
2. 論文標題 Large-scale mapping of positional changes of hypoxia-responsive genes upon activation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mol. Biol. Cell.	6. 最初と最後の頁 ar72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E21-11-0593	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 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 5件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林 之乃、中山 恒
2. 発表標題 Suppression of tumor spheroid formation by matrix metalloproteinase 19 (MMP19) in pyruvate dehydrogenase-E1b (PDH-E1b) knockdown (KD) cells
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 長期低酸素下における低酸素応答シグナルと小胞体ストレス応答シグナルの相互作用
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Koh Nakayama
2. 発表標題 Induction of Nuclear Gene Repositioning in response to Hypoxia -a Large Scale Analysis of Hypoxia-Responsive Genes-
3. 学会等名 CellBio23（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 Regulation of gene expression during early and late phase of hypoxic response
3. 学会等名 第74回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 早期と長期の低酸素応答を制御する分子機構
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 谷内秀輔、中山 恒
2. 発表標題 低酸素環境で誘導される小胞体ストレス応答のタンパク質分解による制御機構
3. 学会等名 日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林之乃、中山 恒
2. 発表標題 乳がんの腫瘍形成におけるピルビン酸デヒドロゲナーゼPDH-E1b の機能解明
3. 学会等名 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 Regulatory mechanism of gene expression during early and late phase of hypoxic response
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 がんの低酸素応答における早期と長期の遺伝子発現制御機構の解析
3. 学会等名 日本薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 アタナヤケ バンダラ、中山 恒
2. 発表標題 Hypomethylation under chronic hypoxia leads to upregulation of oncogenes in breast cancer
3. 学会等名 第34回北海道薬物作用談話会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山 恒
2. 発表標題 クロマチン動態から考える低酸素下の遺伝子発現制御
3. 学会等名 がんとハイポキシア研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

旭川医科大学 薬理学講座HP  
<https://www.asahikawa-med.ac.jp/dept/mc/pharma/>

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
研究協力者	谷内 秀輔  (Taniuchi Shusuke)	旭川医科大学・医学部・助教  (10107)	
研究協力者	小林 之乃  (Kobayashi Yukino)	旭川医科大学・医学部・助教  (10107)	
研究協力者	アタナヤケ パンダラ  (Atthanayake Bandara)	旭川医科大学・医学部・客員助教  (10107)	

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