

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860247

研究課題名(和文) 脱接着誘導性細胞死に伴う解糖系の抑制機構とその意義

研究課題名(英文) The mechanisms underlying repression of glycolysis by detachment and its significance in detachment-induced cell death

研究代表者

石川 文博 (ISHIKAWA, FUMIHIRO)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60515667

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)：本課題は、がん細胞の転移能と密接な関係にある「接着喪失時に誘導される細胞死(DICD)に対する抵抗性」の解明のために、DICDと糖代謝変化に注目して解析を行った。手がかりとして、正常ヒト乳腺上皮細胞にDICDを誘導した際、フルクトース6リン酸(F6P)が蓄積する事を見出した。F6Pは解糖系とヘキサミン経路の代謝物であるが、接着の喪失は解糖系の抑制を起こさなかったため、後者が抑制される結果DICDが起こる事が予想された。そこでこの経路の律速酵素の阻害剤を用いて検討した結果、その抑制は非接着状態に関わらず細胞死を誘導した。従って、ヘキサミン経路の抑制がDICDの誘導に関わる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the relationship between detachment-induced cell death (DICD) and changes in glucose metabolism for a better understanding of resistance to DICD acquired by metastatic cancer cells. First, we observed the accumulation of fructose-6-phosphate (F6P) in normal human mammary epithelial cells during DICD. Because F6P is a metabolic intermediate in both glycolysis and the hexamine pathways and detachment scarcely suppressed glycolysis, it was assumed that the hexamine pathway was suppressed in response to detachment, which resulted in DICD. To examine whether inhibition of the hexamine pathway is sufficient to induce cell death, we used the inhibitor of the rate-limiting enzyme, azaserine, in the hexamine pathway. Treatment with azaserine remarkably evoked cell death even under adherent condition. Thus, it was suggested that DICD may be mediated by repression of the hexamine pathway.

研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：がん 足場依存的生存 代謝 DICD

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物は嫌氣的解糖とミトコンドリアによる酸素を利用した好氣的呼吸を協調的に共役させ、効率的にエネルギー産生を行うことで、その複雑な生命活動を支えている。しかし正常細胞とは対照的に、がん細胞は好氣的条件下でもエネルギー産生を主に嫌氣的解糖に依存していることが古来より広く知られている (Warburg 効果)。この現象は、急速に増大する腫瘍組織の中で、低酸素下におかれたがん細胞が生存するための一つの戦略として考えられている。しかし、Warburg 効果による解糖系の亢進は、劣悪な環境への適応という概念だけでは理解できない。例えば、低酸素下のがん細胞ほど悪性度が高いという報告や、解糖系が亢進しているがん細胞ほど転移能が高いという報告が存在する。これらのことは、「がん細胞が解糖系を亢進することにより、転移能をはじめとする悪性形質を獲得している可能性」を示唆している。しかし、その実体は不明であり、分子的理解も進んでいない。このような状況の下、最近、申請者らはメタボローム解析の結果から解糖系の変化と足場依存的生存・増殖能との接点を見出した。具体的には、

1) 正常上皮細胞 (乳腺) の場合、接着喪失による細胞死 (detachment-induced cell death; DICD) が誘導されるが、その際に解糖系の第三段階であるフルクトース 6 リン酸 (F6P) からフルクトース 1,6 ビスリン酸 (F1,6BP) への代謝が著しく低下していることを観察した。この過程は解糖系の律速段階の一つであり、ホスホフルクトキナーゼ 1 (PFK1) により触媒される事が知られている。また、逆反応はフルクトースビスリン酸フォスファターゼによって担われているが、その発現は確認できなかった。従って、脱接着状態では PFK1 の発現または活性の低下により、F1,6BP への代謝が抑制される可能性が考えられた。そこで次に

2) 解糖系の抑制が細胞死につながるかどうかを 2 デオキシグルコース処理により検討したところ、予想通り顕著な細胞死が認められた。

以上の結果は接着喪失により、PFK1 の発現または活性が低下することで、F1,6BP への代謝が滞り、細胞内 ATP の減少が一因となって細胞死が誘導される可能性を示唆している。一方、がん細胞では、脱接着状態でも当該経路の抑制は観察されなかった。従って、がん細胞ではこの PFK1 の抑制的制御の破綻により、足場非依存的増殖能を獲得した可能性が考えられた。

### 2. 研究の目的

本課題では主たる検討内容として、第一に、正常細胞において接着喪失に伴い引き起こされる PFK1 の抑制的制御機構を分子レベルで解析し、転移性がん細胞と比較検討する。第二に、その制御機構を遺伝子操作すること

により、当該代謝変化の DICD への寄与を明らかにとする。最終的に、遺伝子操作することにより、がん細胞で消失している感受性が回復するかどうかについて検討を加え、PFK1 をがん転移抑制のための新たな標的として提示する。

### 3. 研究の方法

正常乳腺上皮細胞 (HMEC) において接着喪失に伴い引き起こされる PFK1 の抑制的制御機構に関わるメカニズムを明らかにするため、転写制御と翻訳後の制御の両方について検討を行う。

#### (1) 転写制御の可能性

これまでに PFK1 の転写制御に関わることが知られる転写因子および上流配列から結合が予想される転写因子について、PFK1 mRNA 量を指標に siRNA を用いて機能的スクリーニングを行う。いずれも影響が見られなかった場合には、それぞれの PFK1 アイソフォーム遺伝子上流を用いたレポーターアッセイにより脱接着応答領域を絞り込み、さらに点変異を導入したレポータープラスミドを用いて最終的に脱接着応答配列 DRE を同定する。得られた DRE 配列を基に、その発現を制御する転写因子をデータベース上で検索する。予想できない場合は、DRE 配列がタンデムに繰り返される二本鎖 DNA を用いたアフィニティー精製を行い、目的タンパク質を同定する。同定された因子について、siRNA もしくは shRNA を用いて個々にノックダウンを行い、接着喪失に伴う PFK1 の発現制御への関与を検討する。

#### (2) PFK1 タンパク質の量的変化および翻訳後の制御の可能性

まず接着喪失によって PFK1 タンパク質量が変化するかをウエスタンブロットで調べる。量的変化が見られない場合には、これまでに PFK1 の活性制御に関わることが知られるリン酸化と O-グリコシル化および F2,6BP によるアロステリック制御について、接着喪失により変化が起こるかどうか検討を行う。

リン酸化: 通常のウエスタンブロットでは未知のセリン/スレオニンのリン酸化は検出が難しいことから、チロシンを含む全てのリン酸化を検出可能な Phos-tag アクリルアミドを用いたバンドシフトを指標にその変化を捉える。もし変化が見られた場合には、これまでに同定されているキナーゼの構成活性化型またはドミナントネガティブ型を導入して検討を行う。既知のキナーゼの影響が見られなかった際には、接着喪失によりシフトが観察されたバンドをゲルから切り出し、転写制御因子同定と同様に質量分析装置を用いた MS/MS 解析によってリン酸化部位を同定する。その後、当該アミノ酸残基に変異を導入した PFK1 を HMEC へ導入してその影響を検討する。

O-グリコシル化：PFK1の抑制的な修飾であるO-グリコシル化について、まず抗O-GlcNAcを用いたウエスタンブロットによりその変化を調べる。変化が見られた際には接着喪失下でO-グリコシル化を抑制するために脱GlcNAc酵素であるOGAを過剰発現することで影響を調べる。

F2,6BPによるアロステリック制御：これらの翻訳後修飾のいずれにも変化が見られなかった際には、PFK1のアロステリックな活性化因子であることが知られるF2,6BPの量的変化について、酵素カップリング法を用いて調べる。接着喪失によりF2,6BP量が減少した際にはPFK2の活性が変化している可能性が考えられるため、PFK2を過剰発現もしくはRNAiによる発現抑制することでその重要性を調べる。

相互作用因子の同定：上述した変化がいずれも観察できなかった場合には、新たな知見を得るために相互作用因子の以下のようにして同定を試みる。まずPFK1をTAP (tandem-affinity purification) タグ発現ベクターに挿入した後、細胞にレトロウィルスを用いて導入する。細胞を溶解後、IgG磁気ビーズでTAP-PFK1と相互作用因子複合体を回収し、TEVプロテアーゼ処理にてプロテインA部分を切断する。続いて上清をカルモジュリンビーズにて再度複合体を回収し、EGTAによりビーズから複合体を分離し、上述と同様に質量分析を行うことで網羅的に相互作用因子を同定する。

#### 4. 研究成果

接着喪失時に正常乳腺上皮細胞(HMEC)に誘導される細胞死に解糖系の代謝変化が関与している可能性を調べるため、その律速段階の一つであるF6PからF1,6BPへの代謝を担うPFK1の脱接着に伴う抑制制御機構に注目して解析を行った。まず転写レベルでの制御の可能性について、3つのPFK1アイソフォームについて、脱接着によりmRNAが低下するかどうかをreal time RT-PCR法で調べたところ、筋型と血小板型の低下が認められた。タンパク質も低下が認められるかどうかを調べたが、予想に反していずれのアイソフォームも変化しなかった。従って、PFK1の量的変化が解糖系の抑制につながる可能性は否定された。そこで、次にPFK1の翻訳後修飾について、促進的に調節するリン酸化と抑制性のO-グリコシル化に注目して解析を行った。まずPhos-tagアクリルアミドを用いてリン酸化の変化を調べたが、脱接着によるPFK1のバンドシフトは見られなかった。また、O-グリコシル化についても変化は認められなかった。従って、接着喪失によって、いずれの翻訳後修飾も変化しないことが分かった。最後にアロステリックな制御機構について、活性化制御因子であるフルクトース2,6-ビスリン酸(F2,6BP)の量的変化について検討を行った。F2,6BPによって活性化され

るPPi-PFKを用いた酵素法により細胞内のF2,6BP量を測定したが、接着喪失によって全く変化がなかった。加えて、PFK1の逆反応を担うフルクトースビスフォスファターゼ1の発現を調べたが変化は見られなかった。以上の結果から、PFK1の量的変化、翻訳後修飾、アロステリック制御は、いずれも脱接着により変化しないという結論を得た。

一方、上記の解析過程で、DICDには従来から観察されているアポトーシス(アノキス)以外にも複数の細胞死のタイプが混在することを見出した。すなわち、DICDは、アポトーシス過程を経ることなしに形質膜の崩壊に至る“ネクローシス”、浮遊細胞同士の共食いによる“エントーシス”、さらには皮膚と同様に分化の最終に起こる“角質化”の三種類の細胞死の複合死である可能性が示唆された。

PFK1の変化が認められないという結果を受け、解糖系第三段階の抑制により最終的に解糖系の抑制が起こっているかを確認するために、解糖系の最終産物であるピルビン酸を酵素法ならびにLC-MS解析により測定したが、メタボローム解析の結果と異なり脱接着による低下を認めなかった。そこで、LC-MS解析により、いくつかの解糖系代謝物について定量を行った結果、メタボロームの結果と一致して、脱接着によりF6Pの量が増加することが確認できた。F6Pは解糖系の構成因子であるとともに、O-グリコシル化の糖供与体であるUDP-GlcNAcの合成に関わるヘキサミン経路の構成因子でもあることが知られている。そこでF6Pのヘキサミン経路への利用低下がDICDへ影響を及ぼすかを調べるために、ヘキサミン経路の律速酵素GFAT(グルタミン:F6Pトランスアミナーゼ)の阻害剤アザセリンを用いて検討した。その結果、接着状態であっても細胞死が誘起され、その効果は脱接着時により顕著であった。この結果からヘキサミン経路の抑制は細胞死を誘導するに十分であることが示唆された。ヘキサミン経路の抑制は最終的なタンパク質O-グリコシル化の低下につながると考えられたため、O-グリコシル化酵素であるO-グルコシルトランスフェラーゼ(OGT)を過剰発現してDICDへの影響を検討した。その結果、若干ではあるがDICDが抑制される傾向が得られた。

以上より本課題の成果として、脱接着状態では、解糖系ではなく、ヘキサミン経路の活性が低下することにより糖供与体であるUDP-GlcNAcの合成が低下し、タンパク質のO-グリコシル化の抑制が起こる結果、DICDが誘起される可能性が示唆された。しかしながら、今回の結果からは、接着状態の喪失が如何にしてヘキサミン経路を制御するのかについては明らかにすることができなかった。F6Pの利用が低下していることから、おそらく接着喪失によってGFATの活性が制御されていると考えられるが、今後はその点を

含めて分子レベルでより詳細に解析する必要がある。

#### 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 1件)

Ishikawa, F., Ushida, K., Mori, K., Shibamura, M. Loss of anchorage primarily induces non-apoptotic cell death in a human mammary epithelial cell line under atypical focal adhesion kinase signaling *Cell Death and Disease* (2015) 6, e1619. 査読有 doi:10.1038/cddis.2014.583

〔学会発表〕(計 2件)

石川 文博、森 一憲、柴沼 質子、TRAIL regulates detachment-induced cell death via p38 MAPK activation、日本癌学会、2014年09月25日～2014年09月27日、「パシフィコ横浜 (神奈川・横浜)」

〔その他〕

<http://www10.showa-u.ac.jp/~cancer/index.htm>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

石川 文博 (ISHIKAWA FUMIHIRO)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60515667