

令和 4 年 6 月 3 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：19K07663

研究課題名(和文) 癌抑制遺伝子Drsによるレドックス制御と癌の悪性化との関連

研究課題名(英文) Association between redox regulation by the tumor suppressor gene Drs and malignant transformation of cancer

研究代表者

巨部 幸博 (TAMBE, YUKIHIRO)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50283560

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)：Drsタンパクは、ヒト癌の悪性化と密接に関連している癌抑制遺伝子産物である。本研究ではDrsが細胞内レドックス制御に関わる機構について検討を行った。Drsノックアウト細胞では過酸化水素に対する感受性が亢進しており、Drsが活性酸素除去と関連することを見出した。ただし本活性はDrsによるグルコース代謝制御を介して行われる間接的な作用である可能性が高いことが示唆された。またDrs下流で働くPDK4の阻害剤が抗腫瘍活性と代謝制御作用を持つを新たに見出し、この機構がDrsによるレドックス制御にも寄与す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

発癌の過程には多数の癌遺伝子や癌抑制遺伝子に関係しており、その多くが細胞周期制御やシグナル伝達など、細胞の基本的な生理応答に関与することが知られている。一方、我々が新規に報告した癌抑制遺伝子Drsの本来の生理機能は未解明だったが、本研究から糖やアミノ酸、脂質などの代謝調節を通じて抗腫瘍活性を示している仮説が補強された。またその応用として新規PDK4阻害剤クリプトタンシノンの抗腫瘍活性を見出しており、新たな抗癌剤開発につながる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Drs protein is a tumor suppressor gene product closely associated with malignant transformation of human cancers. In this study, we investigated the mechanism by which Drs is involved in intracellular redox regulation, and found that Drs is associated with ROS removal, as Drs knockout cells show an increased sensitivity to hydrogen peroxide. However, this activity is likely to be an indirect effect mediated through the regulation of glucose metabolism by Drs. We also found that inhibitors of PDK4, which act downstream of Drs, have anti-tumour activity and metabolic regulation, suggesting that this mechanism may also contribute to redox regulation by Drs.

研究分野：実験病理学

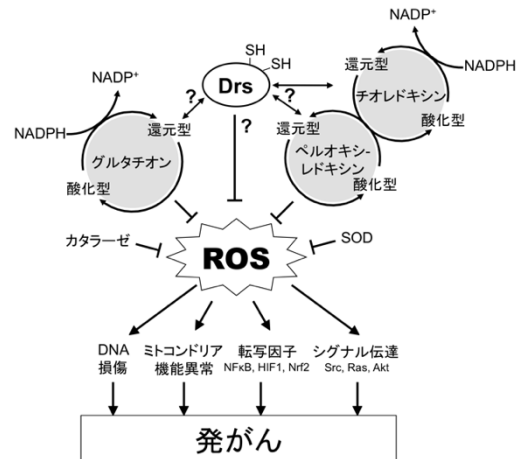
キーワード：癌抑制遺伝子 レドックス制御 Drs クリプトタンシノン ビルビン酸脱水素酵素4

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物の体内では活性酸素 (ROS) が絶えず生成されている。これらは細胞内シグナル伝達や生体防御などに有効利用される一方で、DNA 損傷や酸化ストレス応答、アポトーシスを誘導して細胞傷害を引き起こす二面性を有している。このため生物には過剰な ROS を除去する機構が備わっており、ヒト細胞の場合、①カタラーゼやスーパーオキシドディスムターゼ(SOD)などの活性酸素除去酵素、②グルタチオン、ペルオキシレドキシシン、チオレドキシシンなどのチオール (SH) 分子、③ペントースリン酸回路(PPP)で発生する NADPH、などの複数の抗酸化分子によって「多段階」で酸化還元状態の恒常性が保たれている。この恒常性の破綻は、種々の疾患の発生や進行にも関係する。癌の場合は、環境ストレスなどによるエネルギー代謝シフト (Warburg 効果) やミトコンドリア機能異常に伴う細胞内 ROS の上昇がしばしば報告されている。これは発生初期の癌細胞にアポトーシスを誘導して腫瘍抑制的に働く一方で、p53 変異などによってアポトーシスを回避した段階の癌細胞に対しては、より一層、悪性化を進行させる二面性を持つと考えられている。

我々はこれまで、癌の悪性化進行を抑制する癌抑制遺伝子 Drs に着目し、その生理機能の研究を行ってきた。その過程で Drs がアポトーシスやオートファジー、グルコース代謝シフトの調節に関与することを、培養細胞やノックアウトマウスを用いた実験により明らかにし、さまざまなかたちで生体防御に関与する多機能な分子であることを見出してきた。一方、Pawlowski らのグループはバイオインフォマティクスによる機能予測から、Drs の C 末端領域に存在する DUDES ドメインが、ペルオキシレドキシシンと類似していることから、過酸化水素 (H_2O_2) の除去に特化した抗酸化分子であると推定した (Pawlowski K et al. BMC Genomics. 21:11:590, 2010)。ただし Drs が実際に抗酸化作用を示すかどうかについて実験的には証明されていなかった。



2. 研究の目的

本研究では、癌抑制遺伝子 Drs が ROS の消去と細胞内レドックス制御に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とする。また、関与が認められるのであれば、その分子メカニズムが、ペルオキシレドキシシンと同様のかたちで作用しているのか、あるいは別のメカニズムによるものなのかを検討する。さらにその結果を通じて、Drs およびその関連分子に対する阻害剤を利用した癌治療法への応用可能性についても検討を加える。

3. 研究の方法

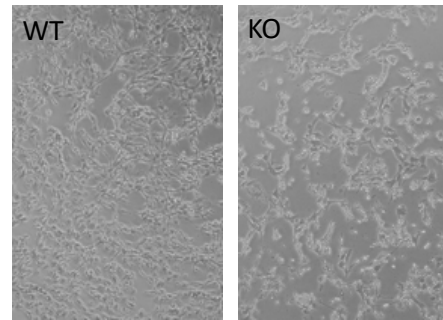
(1) 抗酸化能の解析: Drs の抗酸化作用について Drs ノックアウト(KO)および野生型(WT)マウス由来の胎児線維芽細胞(MEF)を用いて H_2O_2 に対する反応性の違いを検討した。また DrsKO ならびに WT MEF について ROS や GSH などの抗酸化物質の量、またそれらの制御に関係する各種タンパク質の発現の差異について各種測定キットを用いた定量法やメタボローム解析、イムノブロット等により比較検討した。また、Drs 遺伝子ならびにその欠損ミュータントを、トランスフェクション法によって遺伝子導入して高発現させた 293T 細胞や、レトロウイルスベクターを用いて遺伝子再導入した DrsKOMEF を用いて、Drs の DUDES ドメインが抗酸化作用を示すかどうかを同様の手法により検討した。

(2) 抗酸化メカニズムの検討: Drs と構造の類似が指摘されたペルオキシレドキシシンでは SH 基間の結合状態がレドックス制御に関係することが知られている。そこで上記の解析で認められた、Drs が抗酸化作用を示す状態における SH を介する Drs タンパク同士の重合や、ペルオキシレドキシシンとの相互作用が見られるかどうか、免疫沈降法とイムノブロット法により検討した。また低グルコース培地による培養条件下での抗酸化能を検討し、代謝依存性の検討を行った。

(3) 新規 PDK4 阻害剤の抗腫瘍および抗酸化作用の検討: 我々はこれまでに Drs がグルコース代謝を調節する際に抑制する下流分子の一つとして、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDK4) を見出している。そこで PDK4 の特異的阻害剤であるクリプトタンシノンについて、膵臓癌細胞株や大腸癌細胞株に対する抗腫瘍作用ならびに抗酸化作用、代謝に対する影響を検討した。

4. 研究成果

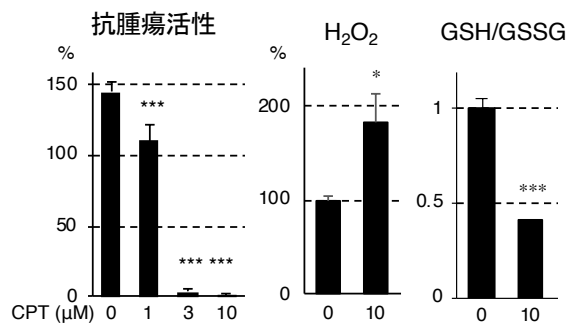
(1) Drs の抗酸化能： DrsKOMEF では、WTMEF に比べて H_2O_2 により誘導される細胞死の亢進が認められた (右図)。さらに Drs 遺伝子の再導入によって、この細胞死が抑制されたことから、Drs が H_2O_2 に対する抗酸化能を持つことが示唆された。また細胞内 ROS の量や GSH/GSSG 比から、DrsKOMEF の方が WTMEF に比べてもともと活性酸素種の量が多いことが見出された。また、Drs の欠損ミュータントを用いた再導入実験の結果から、Drs の DUDES ドメインのみでも活性を示すこと、DUDES ドメインを欠いたタンパク質では活性が減弱することが判明した。以上の結果から、Drs が DUDES ドメインを介して抗酸化的に働いている可能性が示唆された。



野生型(WT)およびDrsノックアウト(KO)胎児線維芽細胞における H_2O_2 (100 μ M, 6hr)による細胞死

(2) 抗酸化メカニズム：免疫沈降実験ならびに非還元 SDS-PAGE によるイムノブロットの結果において、 H_2O_2 処理した細胞において Drs (全長) や DUDES ドメインのみのタンパク質が SH 基を介して重合体を形成していた。ただし二量体だけでなく、さらに高分子量の複合体も多く認められたことや、異常タンパクの蓄積によって誘導される分子シャペロン BiP の発現増加と Drs への結合の亢進が認められたことから、非生理的なジスルフィド結合の増加により生じたアーティファクトである可能性が疑われた。そこで我々は次に Drs がグルコース代謝の調節を介して、エネルギー産生時に生じる ROS の調節にも関わっている可能性を検討した。細胞内 ROS の制御に関与するペントールリン酸回路、脂質合成経路に関与する複数のタンパク質が亢進していることが、イムノブロットの結果から示された。また低グルコース培養条件下では、 H_2O_2 に対する反応性の差異が消失したことから、Drs の抗酸化能は直接作用というよりも、エネルギー代謝調節に伴って生じる間接的な作用である可能性が示唆された。

(3) PDK4 阻害剤の抗腫瘍・抗酸化活性：我々は Drs またはその下流分子に作用する低分子化合物が、抗腫瘍活性と抗酸化作用を示す可能性を考えた。そこで新規 PDK4 阻害剤であるクリプトタンシノンを用いて、ヒト膵臓癌細胞株 MIAPaCa-2、ヒト大腸癌細胞株 DLD-1、膀胱癌細胞株 T24 等に対する抗腫瘍活性ならびに、細胞内 ROS の量に与える影響を検討した。その結果、クリプトタンシノンは各種癌細胞に対して 10 μ M 以下の低濃度で *in vitro* 抗腫瘍活性を示すことが明らかになった (Tambe *et al.* 2019, Kim *et al.* 2021, Terado *et al.* in preparation)。この活性は、変異型 K-Ras を有する癌細胞株で特に顕著であり、これらの細胞株においてクリプトタンシノンは H_2O_2 の増加や GSH/GSSG 比の低下などの細胞内 ROS の増加を亢進させることが示された (Terado *et al.* in preparation)。また、クリプトタンシノンはグルコース取込量だけでなくグルタミン取込みや、脂質代謝を制御する酵素 (FASN, ACC1 など) の発現に対しても阻害作用を示した。このことからグルコース代謝だけでなく、グルタミンや脂質を含めた総合的な物質代謝の調節が、Drs や PDK4 による抗腫瘍活性や抗酸化作用に関係していることが示唆された。



ヒト膵臓癌細胞株MIAPaCa-2に対する、PDK4阻害剤クリプトタンシノン(CPT)の作用:3次元スフェロイド法を用いた抗腫瘍活性試験および細胞内の酸化還元状態(H_2O_2 およびGSH/GSSG定量)の結果

(参考) Terado T, Tambe Y, Ushio A *et al.* Cryptotanshinone suppresses tumorigenesis by inhibiting lipogenesis and promoting reactive oxygen species production in KRAS-activated pancreatic cancer cells. *Int. J. Oncol.* in preparation

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kim Chul-Jang, Terado Tokio, Tambe Yukihiro, Mukaisho Ken-Ichi, Kageyama Susumu, Kawauchi Akihiro, Inoue Hirokazu	4. 巻 59
2. 論文標題 Cryptotanshinone, a novel PDK 4 inhibitor, suppresses bladder cancer cell invasiveness via the mTOR/ β -catenin/N β -cadherin axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 40
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 Tambe, Y, Terado, T, Kim, C. J, Mukaisho, K, 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 Molecular Carcinogenesis	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 -

〔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 金 哲将, 寺戸 勅雄, 旦部 幸博, 向所 賢一, 影山 進, 河内 明宏, 井上 寛一
2. 発表標題 ヒト膀胱・膵癌における PDK4 阻害剤としてのクリプトタンシノンによる浸潤・転移抑制
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（広島）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺戸 勅雄;旦部 幸博;金 哲将;田中 裕之;向所 賢一;杉原 洋行;井上 寛一
2. 発表標題 新規 PDK4 阻害剤 cryptotanshinone はグルタミン代謝を阻害して KRAS 活性化癌を抑制する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（広島）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yukihiro Tambe, Tokio Terado, Chul Jang Kim, Hirofumi Nakano, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Hirokazu Inoue
2. 発表標題 A novel PDK4 inhibitor cryptotanshinone suppresses the tumorigenesis of KRAS-activated cancer cells via PI3K/Akt pathway
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Chul Jang Kim, Tokio Terado, Yukihiro Tambe, Akihiro Kawauchi, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Hirokazu Inoue
2. 発表標題 Suppression of invasion and metastasis by a novel PDK4 inhibitor in pancreatic and bladder cancers
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 旦部 幸博, 寺戸 勅雄, 金 哲將, 向所 賢一, 中野 洋文, 井上 寛一
2. 発表標題 新規PDK4阻害剤クリプトタンシノンの膵臓癌に対する抗腫瘍作用
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺戸 勅雄, 旦部 幸博, 金 哲將, 田中 裕之, 井上 寛一
2. 発表標題 PDK4 阻害剤クリプトタンシノンは、脂質の代謝を阻害し、KRAS活性化癌細胞の腫瘍化を抑制する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（横浜）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 金 哲將, 寺戸 勅雄, 旦部 幸博, 向所 賢一, 影山 進, 河内 明宏, 井上 寛一
2. 発表標題 ヒト膀胱癌細胞における beta-catenin/N-cadherin を介した新規PDK4 阻害剤クリプトタンシノンによる浸潤抑制
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会 (横浜)
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
研究協力者	金 哲將 (KIM Chul-Jang)		
研究協力者	寺戸 勅雄 (TERADO Tokio)		
研究協力者	井上 寛一 (INOUE Hirokazu)		

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