

令和元年5月28日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01941

研究課題名(和文) グルコース非依存性がん代謝機構を標的とした小分子阻害剤の開発

研究課題名(英文) Development of small-molecule inhibitors targeting glucose-independent cancer metabolism

研究代表者

川谷 誠 (Kawatani, Makoto)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：50391925

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：がんの特異的な代謝機構は有望な創薬標的になると考えられるが、がん代謝の詳細な制御機構は不明な点が多い。本研究では、ヒト骨肉腫MG-63細胞がグルコース非依存的に増殖することを見出したので、本細胞を用いてグルコース非依存性ながん代謝機構を標的とした小分子阻害剤を探索した。その結果、MG-63細胞のグルコース非依存性増殖を選択的に阻害する化合物として、微生物培養抽出液からbikaverinおよび化合物1、また、NPDepo化合物ライブラリーからNPL40330およびRCOP8154を見出した。さらに、化学生物学的手法により、これら化合物の作用機序の一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの代謝機構は多様性や適応性、不均一性を有しており、詳しいメカニズムは未だ不明な点が多いのが現状である。本研究で得られた化合物は、このような複雑ながん代謝制御機構を理解する有用な化学ツールになる。さらに、今後抗がん剤としての有用性を示せば、がん特異的な代謝機構を標的とした新たな治療法の確立にもつながる。このように、学術的にも社会的にも本研究の意義は大きいと思われる。

研究成果の概要(英文)：Cancer-specific metabolic pathways are expected to be promising therapeutic targets, but the detailed mechanisms of cancer metabolism remain unclear. We found that human osteosarcoma MG-63 cells can grow without glucose, and thus explored small-molecule inhibitors targeting glucose-independent cancer metabolism using MG-63 cells. By cell-based screening, we found that bikaverin, compound 1, NPL40330 and RCOP8154 from NPDepo chemical library and microbial broth library inhibit glucose-independent growth of MG-63 cells. Moreover, we revealed a part of the mechanism of action of those compounds using chemical biological technique.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：がん 代謝 阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) がん細胞は、その旺盛な増殖や転移を可能にするため、正常細胞とは異なる代謝機構を有することが知られている。このような代謝リプログラミングは、がんの主要な特性の一つであることが明らかになり、近年新たな創薬標的として注目されている。しかし、がんの代謝機構は細胞ごとに多様であり、また、過酷な環境下でも生存できるように代謝を適応させる能力を有する。そのため、このような複雑な代謝多様性や代謝適応性を理解して制御することが、新たながん治療法を確立するうえで重要である。

(2) 申請者は、様々なヒトがん細胞の代謝特性を調べていく過程で、骨肉腫細胞の一つである MG-63 細胞が、培地中にグルコースやピルビン酸がなくてもコントロールと同程度に増殖することを見出した。検討した他の大部分のがん細胞では、程度に差はあるが増殖が抑制されていた。また、MG-63 細胞のエネルギー代謝を細胞外フラックスアナライザーで調べたところ、意外なことに、グルコースに依存して解糖系やミトコンドリア呼吸は正常に機能していた。つまり、MG-63 細胞はグルコースを代謝する能力を有するが、グルコースが欠乏している環境下でも増殖が可能となるよう別の代謝機構を備えているか適応させているものと考えられる。このような生存のためのグルコース非依存的な代謝機構は、がん細胞を選択的に傷害する薬剤を開発するうえで非常に有用な標的になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、MG-63 細胞の代謝特性を利用して、グルコース非依存的ながん代謝機構を標的とした小分子阻害剤を開発することを目的とする。具体的には、MG-63 細胞のグルコース非依存性増殖を選択的に阻害する化合物を探索し、得られたヒット化合物の標的分子を明らかにする。候補化合物を用いてグルコース非依存的ながん特異的代謝機構を明らかにするとともに、候補化合物の抗がん剤としての有用性を *in vitro* で検証する。

3. 研究の方法

(1) 化合物および機器

スクリーニング化合物は、理研天然化合物バンク (RIKEN Natural Products Depository, NPDepo) に収蔵されている化合物ライブラリー、微生物プロスライブラリーおよび微生物プロスフラクションライブラリーを用いた。吸光度の測定には PerkinElmer 社のマイクロプレートリーダー Wallac ARVO SX を用いた。蛍光・発光の測定には Thermo Fisher 社のプレートリーダー VARIOSKAN LUX を用いた。LC/MS は Waters 社の Waters Acquity UPLC H-class / ABSciex API3200 を用いた。細胞のエネルギー代謝の測定には Agilent Technologies 社の細胞外フラックスアナライザー XFe96 (XFe Extracellular Flux Analyzers) を用いた。細胞蛍光観察は Olympus 社の共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 を用いた。ウエスタンブロットの検出にはエムエス機器社の FUSION SOLO S を用いた。

(2) 細胞培養

MG-63 細胞 (ヒト骨肉腫由来細胞株) および HeLa 細胞 (ヒト子宮頸がん由来細胞株) は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) に、MCF-7 細胞 (乳がん由来細胞株)、MDA-MB-231 細胞 (乳がん由来細胞株) は RPMI1640 に、それぞれ 10 % Fetal Bovine Serum、0.5 % 抗生物質 (penicillin/streptomycin) を添加した培地中、37 °C、5 % CO₂ の恒温培養器内で維持した。

(3) 細胞増殖阻害活性評価

化合物のがん細胞に対する増殖阻害活性は WST-8 法を用いて評価した。細胞を 96 ウェルプレートに播種し、翌日化合物を添加した。化合物添加から 72 時間後に、WST-8 試薬を添加し、一定時間反応後、マイクロプレートリーダーを用いて吸光度 (450 nm) を測定し、細胞生存率を求めた。

(4) エネルギー代謝フラックス解析

化合物のエネルギー代謝に及ぼす影響は、細胞外フラックスアナライザーを用いて評価した。酸素消費速度 (OCR) および細胞外酸化化速度 (ECAR) を指標として、ミトコンドリア呼吸能を測定するミトストレステスト (MST) および解糖能を測定する解糖ストレステスト (GST) を行った。

(5) ウエスタンブロット

化合物を処理した細胞を RIPA バッファーで可溶化後、各サンプルのタンパク質濃度をそろえた。その後、SDS サンプルバッファーを加え、100 °C で 5 分間加熱することで細胞ライゼートを調製した。サンプルを SDS-PAGE で分離後、ウエスタンブロット法でタンパク質の発現量を解析した。

(6) ミトコンドリア呼吸鎖複合体の酵素アッセイ

ミトコンドリア呼吸鎖の各複合体の酵素アッセイは、単離ミトコンドリアあるいはジギトニ

ン処理したセミインタクト細胞を用いて行った。

4. 研究成果

(1) アッセイ系の構築

MG-63 細胞のグルコース非依存性増殖を選択的に阻害する化合物を探索する目的で、実験の簡便性やデータの安定性を考慮してセルベースアッセイ系を構築した。すなわち、MG-63 細胞を 96 ウェルプレートに播種して 24 時間後にグルコース含有培地 (+Glc) あるいはグルコース不含培地 (-Glc) に交換し、その後化合物を添加して 72 時間後に細胞生存率を WST-8 法で測定した。

(2) セルベーススクリーニング

上記のアッセイ系を用いて、理研 NPDepo の化合物ライブラリー、微生物プロスライブラリーおよび微生物プロスフラクシオンライブラリーからおよそ 30,000 サンプルをスクリーニングした。その結果、細胞生存率が +Glc で 80%以上かつ -Glc で 50%以下、または、+Glc で 50%以上かつ -Glc で 20%以下をヒットのクライテリアとしておよそ 150 サンプルを取得した。次に、これらのヒットサンプルについて濃度を細かく分けて同様の検討を行い、 IC_{50} 値が 10 倍以上の選択活性をヒットのクライテリアとしておよそ 30 サンプルを取得した。最終的に、活性の強さや文献調査の結果から 4 サンプルに絞り込んだ。

(3) Bikaverin

微生物プロスフラクシオンライブラリーの 16040WB サンプルに活性を見出した。活性成分の単離、精製、構造解析を行い、活性本体として bikaverin を同定した。Bikaverin を処理した細胞では、ミトコンドリア膜電位の低下、ミトコンドリア呼吸 (OCR) の阻害および細胞内 ATP 量の減少が観察された。このことから、bikaverin はミトコンドリアの機能を阻害することが示唆された。

(4) 化合物 1

微生物プロスライブラリーの RK17-F0007 サンプルに活性を見出した。活性成分の単離、精製、構造解析を行い、活性本体として化合物 1 を同定した。化合物 1 はこれまでに報告のない立体構造を有していることがわかった。

(5) NPL40330

NPL40330 は、MG-63 細胞のグルコース非依存性増殖を選択的に阻害する化合物として、化合物ライブラリーから見出した。細胞外フラックスアナライザーを用いてエネルギー代謝に与える影響を調べた結果、NPL40330 はミトコンドリア呼吸を阻害することが示唆された。ジギトニンで処理したセミインタクト細胞および単離ミトコンドリアを用いた酵素活性測定により、NPL40330 は呼吸鎖複合体 I を阻害することを明らかにした。

(6) RCOP8154

RCOP8154 は、NPL40330 と同様に化合物ライブラリーからヒット化合物として見出した。RCOP8154 が自家蛍光をもつことを見出し、蛍光顕微鏡で細胞を観察したところ、本化合物はミトコンドリアに局在することがわかった。RCOP8154 は長時間処理で酸素消費 (OCR) の低下を引き起こしたが、呼吸鎖複体のいずれも直接阻害しなかったことから、標的がミトコンドリア呼吸鎖とは異なることが示唆された。光親和型化合物固定化法で作製した RCOP8154 固定化ビーズを用いて結合タンパク質をアフィニティ精製した結果、ミトコンドリア機能の維持に重要ないくつかのタンパク質を同定した。同定した結合タンパク質のノックダウン実験等により、RCOP8154 の作用機序を検証した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

Futamura Y., Muroi M., Aono H., Kawatani M., Hayashida M., Sekine T., Nogawa T., and Osada H. Bioenergetic and proteomic profiling to screen small molecule inhibitors that target cancer metabolisms. *Biochim Biophys Acta*. 1867, 28-37 (2019) 査読有
DOI: 10.1016/j.bbapap.2018.06.001

Nagumo Y., Motoyama T., Hayashi T., Hirota H., Aono H., Kawatani M., Osada H., and Usui T. Structure-activity relationships of terpendole E and its natural derivatives. *ChemistrySelect* 2, 1533-1536 (2017) 査読有
DOI: org/10.1002/slct.201602015

Ohmae S., Noma N., Toyomoto M., Shinohara M., Takeiri M., Fuji H., Takemoto K., Iwaisako K., Fujita T., Takeda N., Kawatani M., Aoyama M., Hagiwara M., Ishihama Y., and Asagiri M. Actin-binding protein coronin 1A controls osteoclastic bone resorption by regulating lysosomal secretion of cathepsin K. *Sci. Rep.* 7, 41710 (2017) 査読有

DOI: 10.1038/srep41710

Kumar A., Kawamura T., Kawatani M., Osada H., and Zhang K. Y. Identification and structure-activity relationship of purine derivatives as novel MTH1 inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* 89, 862-869 (2017) 査読有

DOI: 10.1111/cbdd.12909

Kawatani M., Muroi M., Wada A., Inoue G., Futamura Y., Aono H., Shimizu K., Shimizu T., Igarashi Y., Takahashi-Ando N., and Osada H. Proteomic profiling reveals that collismycin A is an iron chelator. *Sci. Rep.* 6, 38385 (2016) 査読有

DOI: 10.1038/srep38385

Kawamura T.*, Kawatani M.*, Muroi M., Kondoh Y., Futamura Y., Aono H., Tanaka M., Honda K., and Osada H. Proteomic profiling of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival. *Sci. Rep.* 6, 26521 (2016) *, equal contribution 査読有

DOI: 10.1038/srep26521

Katsuyama S., Sugino K., Sasazawa Y., Nakano Y., Aono H., Morishita K., Kawatani M., Umezawa K., Osada H., and Simizu S. Identification of a novel compound that inhibits osteoclastogenesis by suppressing nucleoside transporters. *FEBS Lett.* 590, 1152-1162 (2016) 査読有

DOI: 10.1002/1873-3468.12146

Lim C. L., Nogawa T., Okano A., Futamura Y., Kawatani M., Takahashi S., Ibrahim D., and Osada H. Unantimycin A, a new neoantimycin analogue isolated from a microbial metabolite fraction library. *J. Antibiot.* 69, 456-458 (2016) 査読有

DOI: 10.1038/ja.2015.124

Shinohara Y., Kawatani M., Futamura Y., Osada H., and Koyama Y. An overproduction of astellolides induced by genetic disruption of chromatin remodeling factors in *Aspergillus oryzae*. *J. Antibiot.* 69, 4-8 (2016) 査読有

DOI: 10.1038/ja.2015.73

[学会発表](計 22 件)

室井誠、永澤生久子、池野あゆみ、小川直子、川谷誠、長田裕之「2次元電気泳動を用いた化合物に相互作用するたんぱく質の解析法(2DE-CETSA)の開発」日本農芸化学会 2019年度大会、2019年3月24-27日

河村達郎、二村友史、室井誠、川谷誠、Erchang Shang、Petra Janning、近藤恭光、野川俊彦、Slava Ziegler、渡辺信元、Herbert Waldmann、長田裕之「がん細胞に活性酸素種産生を誘導する化合物 RKN9055 の発見と作用解析」日本農芸化学会 2019年度大会、2019年3月24-27日

野川俊彦、川谷誠、岡野亜紀子、青野晴美、清水猛、長田裕之「糸状菌 RK17-F0007 より単離した BR-050 立体異性体の構造と活性評価」日本農芸化学会 2019年度大会、2019年3月24-27日

Makoto Kawatani, Marina Hayashida, Harumi Aono, Makoto Muroi, Yushi Futamura, Hiroyuki Osada 「Exploration of small-molecule inhibitors targeting glucose-independent cancer metabolism」30th EORTC-NCI-AACR Symposium 'Molecular Targets and Cancer Therapeutics', Nov 13th - 16th, 2018

Yushi Futamura, Makoto Muroi, Harumi Aono, Makoto Kawatani, Hiroyuki Osada「NPL40330: A novel oxidative phosphorylation inhibitor identified by bioenergetic and proteomic profiling」30th EORTC-NCI-AACR Symposium 'Molecular Targets and Cancer Therapeutics', Nov 13th - 16th, 2018

Marina Hayashida, Makoto Kawatani, Harumi Aono, Yushi Futamura, Makoto Muroi, and Hiroyuki Osada 「Analysis of the mechanism of action of RCOP8154 that inhibits glucose-independent cancer metabolism」第77回日本癌学会学術総会、2018年9月27-29日

Ikuko Nagasawa, Makoto Muroi, Makoto Kawatani, and Hiroyuki Osada 「Target identification of bioactive small molecules using thermal shift assay based on 2-D electrophoresis」第77回日本癌学会学術総会、2018年9月27-29日

林田莉奈、川谷誠、青野晴美、二村友史、室井誠、長田裕之「グルコース非依存性がん代謝機構を阻害する RCOP8154 の作用機序解析」日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会、2018年6月11-13日

永澤生久子、室井誠、川谷誠、長田裕之「2D-DIGE に基づいた CETSA による薬剤標的分子解析システムの開発」日本ケミカルバイオロジー学会第13回年会、2018年6月11-13日
青野晴美、二村友史、川谷誠、室井誠、長田裕之「Exploration of small-molecule inhibitors targeting cancer metabolism」第9回日韓ケミカルバイオロジーシンポジウム、2018年5月24-26日

二村友史、青野晴美、永澤生久子、河村達郎、室井誠、川谷誠、長田裕之「プロテオミク

スを用いた抗がん活性天然化合物 pyrenolide A の作用解析」第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2018 年 5 月 16 - 18 日

永澤生久子、室井誠、川谷誠、長田裕之「新規薬剤標的分子解析システム 2DE-CETSA の構築と応用」第 22 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2018 年 5 月 16 - 18 日

室井誠、二村友史、青野晴美、川谷誠、関根朋美、野川俊彦、林田莉奈、長田裕之「がん代謝阻害剤スクリーニングと呼吸阻害作用解析」日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 15 - 18 日

二村友史、青野晴美、佐竹華子、室井誠、川谷誠、野川俊彦、井本正哉、長田裕之「がん代謝を阻害するプレニルフラボノイドの作用機序解析」日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 15 - 18 日

佐竹華子、二村友史、室井誠、野川俊彦、川谷誠、井本正哉、長田裕之「がん代謝研究を加速するオミックス解析基盤の構築」日本農芸化学会 2018 年度大会、2018 年 3 月 15 - 18 日

Makoto Kawatani, Harumi Aono, Yushi Futamura, Makoto Muroi, and Hiroyuki Osada「Screening of small-molecule inhibitors targeting glucose-independent cancer metabolism」The 4th CSRS-ITbM Joint Workshop, Jan 15th, 2018

Makoto Kawatani, Harumi Aono, Yushi Futamura, Makoto Muroi, and Hiroyuki Osada「Screening of small-molecule inhibitors targeting glucose-independent cancer metabolism」第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28 - 30 日

川谷誠、青野晴美、二村友史、室井誠、長田裕之「グルコース非依存性がん代謝機構を標的とした小分子阻害剤の探索」第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2017 年 6 月 14 - 16 日

Tatsuro Kawamura, Makoto Kawatani, Makoto Muroi, Yasumitsu Kondoh, Yushi Futamura, Harumi Aono, Miho Tanaka, Kaori Honda, and Hiroyuki Osada「Characterization of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival」The 3rd CSRS-ITbM Joint Workshop, Jan 12th, 2017

Tatsuro Kawamura, Makoto Kawatani, Makoto Muroi, Yasumitsu Kondoh, Yushi Futamura, Harumi Aono, Miho Tanaka, Kaori Honda, and Hiroyuki Osada「Proteomic profiling of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival」28th EORTC-NCI-AACR International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics, Nov 29th-Dec 2nd, 2016

⑳ 河村達郎、川谷誠、室井誠、青野晴美、二村友史、長田裕之「Characterization of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival」第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 - 8 日

㉑ 川谷誠、河村達郎、室井誠、青野晴美、二村友史、田中美帆、長田裕之「酸化ヌクレオチド加水分解酵素 MTH1 阻害剤の作用解析」第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2016 年 5 月 30 - 6 月 1 日

〔その他〕

ホームページ

<http://www.cbrg.riken.jp/csrs/ja/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：林田 莉奈

ローマ字氏名：Marina Hayashida

研究協力者氏名：野川 俊彦

ローマ字氏名：Toshihiko Nogawa

研究協力者氏名：室井 誠

ローマ字氏名：Makoto Muroi

研究協力者氏名：二村 友史

ローマ字氏名：Yushi Futamura

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、研究者個人に帰属されます。