

令和元年6月4日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08711

研究課題名(和文)ピルビン酸代謝を標的にする新規低分子化合物による抗腫瘍治療法の確立

研究課題名(英文) Development of anti-tumor therapy by novel compounds targeting pyruvate dehydrogenase kinase

研究代表者

井上 寛一 (Inoue, Hiromasa)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30176440

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)：ヒト癌細胞では好氣的環境下でも解糖系が有意に働くグルコース代謝のシフト(Warburg効果)が生じており、環境ストレス下での癌細胞の生存や悪性化進行に密接に関係していると考えられている。PDK4は解糖系から呼吸系への分岐点でピルビン酸をアセチルCoAに代謝するPDHを抑制する調節分子であり解糖と呼吸のバランスを制御するRegulatorの1つである。我々はPDK4阻害活性を持つ低分子化合物(KIS)に着目し、ヒト膵臓癌細胞株を中心としたin vitro及びin vivoの腫瘍モデルを用いてその抗腫瘍効果と作用メカニズムを明らかにした。特にこの薬剤はKRAS変異のある難治癌に有効であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

K-ras遺伝子変異が90%を占める膵臓癌は癌の中でも最も10年生存率が低い難治性癌であり、有効で副作用の少ない新規分子標的治療薬の開発は大きな課題である。また、大腸癌は最も罹患率が高い癌で、特にK-ras遺伝子変異は44%を占めこれらは予後が悪く難治性が高い。米国でも癌治療の最重要課題として”The RAS project”を立ち上げているが、これまでのRas阻害剤では未だ有効な臨床的成果を上げていない。これらの難治癌に対する新しい作用機作の抗腫瘍剤の開発は重要であり、我々が見出したピルビン酸代謝を標的としたKIS化合物の抗腫瘍活性を示した今回の成果は臨床での治験にも直接つながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Most proliferating tumor cells preferentially metabolize glucose via glycolysis even under aerobic conditions. This metabolic shift, the Warburg effect, is a hallmark of malignant cancer cells. We found that the novel specific inhibitors of PDK4 (KIS) significantly suppressed the malignant phenotypes of human colon and pancreatic cancer cells in vitro. A novel PDK4 inhibitor, KIS37 (cryptotanshinone), reduced the phosphorylation of pyruvate dehydrogenase and the expression of mutant K-Ras protein in human pancreatic and colon cancer cell lines. KIS37 also suppressed the phosphorylation of PI3K-Akt-mTOR pathway and expression of cyclin D1 protein. Furthermore, KIS37 suppressed pancreatic tumor formation in orthotopic model of nude mouse without detectable adverse effects. These results indicate that this novel PDK4 inhibitor can be a potential therapeutic drug for mutant KRAS-containing intractable pancreatic and colorectal cancers.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：KRAS ピルビン酸代謝 膵臓癌 PDK4 cryptotanshinone

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞では、好氣的環境下でも解糖系によるエネルギー産生が優位となるグルコース代謝のシフト(ワールブルグ効果)が生じており、増殖に必要な物質やエネルギー生産の亢進、酸化ストレス回避などを介して、悪性化進行に寄与していると考えられている。我々は新規に分離した**癌抑制遺伝子 *drs***の機能解析の過程でこの遺伝子が解糖系の制御にも関与しており、その標的として**ピルビン酸脱水素酵素キナーゼ 4(PDK4)**を同定した。PDK4はピルビン酸からアセチル CoA への反応を介するピルビン酸脱水素酵素(PDH)の活性をリン酸化によって抑制して TCA 回路(ミトコンドリア活性)を抑制し解糖系を亢進する。

申請者はこれまで、癌の悪性化進行に関与するいくつかの遺伝子(*drs*, *periostin*, *cyclin D1b*)に注目し、その生理機能と癌の悪性化との関連について研究を続けてきた。その中で、***drs* 遺伝子**はウイルス癌遺伝子 *v-src* やヒトの活性化 *K-ras* など各種の癌遺伝子によってその遺伝子発現が抑制される。また、大腸癌、膵臓癌や肺腺癌など多くのヒト癌においても *drs* 遺伝子発現が抑制されていることも明かにしてきた。また *drs* ノックアウト(KO)マウスの約30%に生後半年でリンパ腫や肺腺癌などの悪性腫瘍が発生することを見だし、*drs* が生体内で癌抑制遺伝子として働くことも証明した。この遺伝子産物は小胞体を介するアポトーシス誘導、低血清条件下でのオートファジー誘導や mTOR を介したウイルス感染防御など、様々なストレス応答に関与する多機能分子であることも明らかにしてきた。さらに、*drs* KO 細胞を用いた解析から、*drs* 遺伝子が乳酸脱水素酵素(LDH)や PDK4 などの**ピルビン酸代謝調節分子**の発現調節を介してワールブルグ効果の誘導に関与していることを新たに見出した。*drs* KO 細胞では野生型(wild-type)細胞と比べて LDH と PDK4 の発現が亢進していた。また、*drs* 発現が抑制されているヒト癌細胞株(大腸癌細胞株 DLD-1、膵臓癌細胞株 MIAPaCa-2、膀胱癌細胞株 T24、子宮頸癌細胞株 HeLa など)ではヒト正常細胞株(HaCaT や HEF)に比べて LDH と PDK4 の発現が亢進していることも見出した。そこで、これらの分子を標的とする新たな癌治療法の検討を始めた。まず、ピルビン酸から乳酸への変換を媒介する LDH の阻害剤(オキサム酸ナトリウム)がワールブルグ効果を抑制するとともに癌細胞株の悪性化形質の足場非依存性増殖を抑制することを見出した。しかしながらこの抑制には mM オーダーの濃度が必要で効果も限定的であった。そこで、PDK4 などに対して  $\mu\text{M}$  オーダーで阻害作用を有する低分子化合物を探索していた北里大の大村智先生と東工大(現在、東海大)の中野洋文先生らと提携して新規 PDK4 阻害剤のスクリーニングを行い、中医学で利用される薬用植物、丹参(*Salvia miltiorrhiza*)の薬効成分、Cryptotanshinone(KIS37)をはじめ、 $\mu\text{M}$  オーダーでヒト膵臓癌や大腸癌細胞株の足場非依存性増殖や3次元スフェロイド形成を顕著に抑制する活性を有する複数の候補化合物を見出した。

## 2. 研究の目的

本申請では、この PDK4 を分子標的とする新しい低分子化合物に着目して、ワールブルグ効果を抑制することによる抗腫瘍活性を *in vitro* 培養細胞系 および *in vivo* のマウス腫瘍モデル実験系を用いて解析し、既存の抗がん剤と異なる作用機作の薬剤を用いた副作用が少ない新たな治療法を開発する。また、その作用機序も明らかにする。

## 3. 研究の方法

これらの化合物の薬理作用には未詳の点が多く、その代謝調節作用や抗腫瘍作用についても十分には判っていない。また、これらの低分子化合物を新規抗がん剤として臨床応用するためには *in vitro* の培養細胞レベルの作用だけでなく、*in vivo* のマウス発癌モデルにおける抗腫瘍作用や副作用などの検証が必須である。本研究では、ヒト膵臓癌細胞株を皮下に移植する *Zenograft* マウスモデルに加えて、膵臓に膵臓癌細胞株を同所性に移植して膵臓腫瘍を作らせる実験系を用いてこれらの化合物の抗腫瘍作用の検証を行う。ヒト膵臓癌細胞株および大腸癌細胞株を用いて、下記の方法で新たな治療法を開発する。

- (1) 新規 PDK4 阻害剤の *in vitro* 細胞培養系における癌化形質および解糖系の抑制作用の検討
- (2) 新規 PDK4 阻害剤の *in vivo* 異所性（皮下）マウスモデルにおける抗腫瘍作用の検討
- (3) 新規 PDK4 阻害剤の *in vivo* 同所性（膵臓）マウスモデルにおける抗腫瘍作用の検討

#### 4. 研究成果

下記のような研究成果を得た。

- (1) KRAS 遺伝子に活性化変異を持つヒト大腸癌細胞株 DLD-1、LoVo、HCT116、膵臓癌細胞株 MIA PaCa-2、Panc-1 について KIS37 (Cryptotanshinone) が、1-10 $\mu$ M の低濃度で足場非依存性増殖や 3 次元スフェロイド形成能などの悪性化形質を顕著に抑制することを明らかにした。このときアポトーシスなどの細胞死誘導は認められなかった。一方、KRAS 変異を持たない大腸癌細胞株 WiDr や HT29 に対しては同じ濃度での抑制効果は低かった。また、この濃度では HaCaT や HEF などのヒト正常細胞株には増殖抑制や細胞毒性を示さなかった。
- (2) これらの KRAS 変異ヒト癌細胞株については KIS37 によって PDK4 の標的である PDH のリン酸化が抑制された。KIS37 が確かに PDK4 を主要な標的として癌細胞の増殖を抑制していることを証明するために、膵臓癌細胞株 MIA PaCa-2 において PDK4-siRNA で PDK4 の発現を抑えた時の KIS37 の増殖抑制効果を調べた。その結果、siRNA による PDK4 の抑制によって KIS37 による増殖抑制が有意に抑制され、確かに KIS37 による増殖抑制は PDK4 阻害を介していることがわかった。
- (3) KIS37 は変異 K-Ras 蛋白の発現を抑制することも新たに見出した。MIA PaCa-2 細胞について代謝への影響をさらに調べたところ、KIS37 処理によってグルコース消費は少し促進されたが乳酸の産生量には大きな変化は認められなかった。その代わりにグルタミン消費や活性酸素 (ROS) 産生は KIS37 によって顕著に抑制された。これらの結果から、KIS37 は膵臓癌細胞のエネルギー代謝機構に影響を与えていることがわかった。
- (4) 膵臓癌細胞株 MIA PaCa-2 の非接着培養条件下での実験では、KIS37 によって K-Ras の下流の PI3K-Akt-mTOR 経路のリン酸化かも抑えられていた。また、細胞周期の G1-S 移行に関わる cyclin D1 の発現と Rb 蛋白のリン酸化も KIS37 によって抑えられた。KIS37 による増殖抑制に PI3K-Akt 経路が重要であることを証明するために、恒常的に活性化した Akt (MyrAkt) を MIA PaCa-2 細胞に発現させ KIS37 による増殖抑制を調べたところ、MyrAkt によって抑制が阻害された。この結果から Akt 抑制が KIS37 による増殖抑制に必要であることがわかった。

- (5) MIAPaCa-2細胞株については、KIS37を投与すると膵臓癌の癌幹細胞マーカーであるCD44やEpCAM、ALDH1A1の発現が抑制されることも見出した。この結果はKIS37の癌幹細胞への抗腫瘍効果も期待できることを示している。
- (6) MIAPaCa-2細胞株についてはヌードマウスの皮下に移植し腫瘍形成させる異所性移植実験において、KIS37を腹腔内投与(20mg/kg)することで腫瘍形成を顕著に抑制できることを明らかにした。
- (7) MIAPaCa-2細胞株をヌードマウスの膵臓に移植し腫瘍形成させる同所性移植実験においても、KIS37を腹腔内投与(20mg/kg)することで腫瘍形成を顕著に抑制できることを明らかにした。このとき腫瘍組織では増殖の指標であるKi67と幹細胞マーカーであるALDH1A1の発現も抑制されていた。この濃度の薬剤処理によって、肝臓、腎臓、肺、心臓などの主要臓器や身体全体について副作用と思われる異常は認められなかった。
- (8) 高転移性膵臓癌細胞株SUIT-2を用いて、ヌードマウスの膵臓にこの細胞株を接種し同所性に膵臓腫瘍を形成し転移させる実験系を確立した。この実験系で、KIS37の腹腔内投与によって膵臓腫瘍の増殖および転移(播種)がKIS37によって有意に抑制されることを明らかにした。KIS37は高転移性の悪性膵臓癌の治療にも有効である可能性も示された。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Tambe, Y., Hasebe, M., Kim, C. J., Yamamoto, A., Inoue, H. The drs tumor suppressor regulates glucose metabolism via lactate dehydrogenase-B. *Mol. Carcinog.* 55, 52-63, 2016.
2. Kim, C. J., Tambe, Y., Mukaisho, K., Sugihara, H., Kawauchi, A., Inoue, H. Akt-dependent activation of Erk by cyclin D1b contributes to cell invasiveness and tumorigenicity. *Oncol. Lett.*12, 4850-4856, 2016.
3. Kim, C. J., Tambe, Y., Mukaisho, K., Sugihara, H., Kageyama, S., Kawauchi, A., Inoue, H. Periostin suppresses in vitro invasiveness via PDK1/Akt/mTOR signaling pathway in a orthotopic model of bladder cancer. *Oncol. Lett.*13, 4247-4284, 2017.
4. Ishigaki, H., Maeda, T., Inoue, H., Akagi, T., Sasamura, T., Ishida, H., Inubushi, T., Okahara, J., Shiina, T., Nakamura, M., Otoh, Y., Ogasawara, K. Transplantation of iPS-derived tumor cells with a homozygous MHC haplotype induces GRP94 antibody production in MHC-matched macaques. *Cancer Res.* 77, 6001-6010, 2017. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0775.
5. Kim, C. J., Terado, T., Tambe, Y., Mukaisho, K., Suguhara, H., Kawauchi, A., Inoue, H. Anti-oncogenic activities of cyclin D1b siRNA on human bladder cancer cells via induction of apoptosis and suppression of cancer cell stemness and invasiveness. *Int. J. Oncol.* 52, 231-240, 2018.

6. Tambe, Y., Terado, T., Kim, C. J., Mukai, K., Yoshida, S., Sugihara, H., Tanaka, H., Chida, J., Kido, H., Yamaji, K., Yamamoto, T., Nakano, H., Omura, S. and Inoue, H. Antitumor activity of potent pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitors from plants in pancreatic cancer. Mol. Carinog. in press.

doi.org/10.1002/mc.23045

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 旦部幸博、金哲将、中野洋文、井上寛一 「ヒト膵臓癌細胞株に対する PDK4 阻害剤の作用」 2016年10月 日本癌学会学術総会 (横浜)
2. 金哲将、旦部幸博、河内明宏、井上寛一 「ヒト膀胱癌細胞株に対する Cyclin D1b siRNA の抗腫瘍作用の検討」 2016年10月 日本癌学会学術総会 (横浜)
3. 旦部幸博、寺戸勅雄、金哲将、中野洋文、向所賢一、杉原洋行、井上寛一 「ヒト膵臓癌細胞株の in vivo 造腫瘍能と癌幹細胞性に対する PDK4 阻害剤の作用」 2017年9月 日本癌学会学術総会 (横浜)
4. 金哲将、寺戸勅雄、旦部幸博、向所賢一、杉原洋行、河内明宏、井上寛一 「Cyclin D1b によるアポトーシス誘導と癌幹細胞特性の抑制を介したヒト膀胱癌細胞に対する抗腫瘍活性の検討」 2017年9月 日本癌学会学術総会 (横浜)
5. 金哲将、寺戸勅男、旦部幸博、中野洋文、河内明宏、井上寛一 「新規 PDK4 阻害剤による H-Ras と癌細胞性の抑制を介した膀胱癌に対する抗腫瘍活性」 2018年9月 日本癌学会学術総会 (大阪)
6. 旦部幸博、寺戸勅男、金哲将、中野洋文、向所賢一、杉原洋行、井上寛一 「膵臓癌における KRAS 発現抑制を介した新規 PDK4 阻害剤 Cryptotanshinone の抗腫瘍活性」 2018年9月 日本癌学会学術総会 (大阪)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：金 哲將、向所賢一、旦部幸博、牛尾明代、中野洋文、大村智

ローマ字氏名：Chul Jang Kim, Ken-ichi Mukaisho, Yukihiro Tambe, Akiyo Ushio, Hirofumi Nakano, Satoshi Omura

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。