

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01970

研究課題名（和文）がん微小環境における代謝可塑性の理解と制御

研究課題名（英文）Exploration of small molecules that target cancer specific metabolism

研究代表者

二村 友史（Futamura, Yushi）

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・研究員

研究者番号：70525857

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：がんは低栄養・低酸素条件において特殊な代謝機構（代謝可塑性）を獲得し、生存に必要なエネルギーを捻出している。本研究では、代謝可塑性を標的とした制がん剤の発見を目指し、種々のがん細胞の代謝パターンによる分類とモデル系の構築、フラックスアナライザーを用いたがん特異的な代謝阻害剤の探索、セミインタクト細胞や酵素活性測定系を用いた作用機序解析を実施し、ユニークな生理活性物質を多数見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本分野では、培養細胞を使った適切なモデル系がなかったこと、また伝統的な酸素分極を用いた解析手法はスループットが低いこと、から探索研究が進んでいなかった。本研究でがん微小環境の解析に適した細胞株を選定し、フラックスアナライザーを用いた評価系を構築したことは、従来の問題を克服し、学術的なインパクトは大きかった。また見出した代謝阻害物質を新しい治療薬開発に繋げることが重要な社会的意義であり、今後も研究開発に精進したい。

研究成果の概要（英文）：Cancer cells can reprogram their metabolic machinery to survive. This altered metabolism, which is distinct from the metabolism of normal cells, is thought to be a possible target for the development of new cancer therapies. In this study, we classified various cancer cell lines in terms of the metabolic profiles, and constructed a screening system using specific cell lines and Flux analyzer that can monitor bioenergetic profiles (specifically oxygen consumption rate and extracellular acidification rate). Thus, small molecules that target cancer-specific metabolism were investigated. We screened the chemical library of RIKEN NPDepo and found several mitochondrial respiration inhibitors. Furthermore, we developed an in vitro reconstitution assay method for mitochondrial electron transport chain using semi-intact cells with specific substrates for each complex of the mitochondrial electron transport chain and detailed the mechanisms of action of hit compounds.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：がん代謝 微小環境 ケミカルバイオロジー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞における好氣的解糖現象「ワーバーグ効果」が提唱されて1世紀。当初、多くのがんはこの特殊な代謝機構に依存していると考えられ、様々な解糖系阻害剤が開発されてきた。しかし、現在までにこれらの薬剤ががん治療薬として奏功した例は報告がない。そもそもがん細胞は腫瘍塊に進展するに従い、その性質上、グルコース飢餓・低酸素状態（微小環境）に晒されることになる。微小環境におかれたがん細胞は積極的に代謝経路を再構築し、グルコース以外の栄養源を異化する代謝可塑性を獲得して環境適応を図っているのではないかと考えられるようになってきた。実際、最近になってグルタミンなどを起点としたバイパスの存在が少しずつ明らかになっている（Ma L, Cell 2013; Vincent EE, Mol Cell, 2015; Cristovão MS, Nature 2016）。従って、がん微小環境に特異な代謝機構の発見とそれを標的とした薬剤の開発は、新規抗がん剤創出の足がかりになることが期待できる。

ところで、興味深い表現型を誘起する化合物（バイオブローブ）を探索する表現型スクリーニングは、時に人知を超えた化学構造や生物活性を有する化合物の発見やそれを起点としたケミカルバイオロジー研究によって新奇創薬標的の発見をもたらしてきた。私はこれまでに作用が明らかな生物活性物質が誘導する細胞形態変化をデータベース化した「モルフォベース」を作製し、様々な天然由来バイオブローブの発見とそれらを利用した生命機能解析研究に携わってきた。そこで本研究では、微小環境での増殖を特異的に阻害する化合物を表現型スクリーニングで探索し、その細胞内標的分子の同定を通じて、がん微小環境に特異的な代謝機構を解明しようと考えた。がん特異な代謝可塑性を標的とした薬剤を見出すためには、どんな細胞を使って、いかに簡便に代謝を評価するかが、一番の鍵である。前者では、病理組織由来の初代培養細胞を利用できれば理想的ではあるが、入手が困難であり、実際の解析には不向きである。においては、CE-MSなどの質量分析機器の技術革新により代謝物質の一斉解析が可能になり、代謝変動の全容を俯瞰できるようになった（Kami K, Metabolomics 2013）が、多額の委託費が必要であり、ルーティンかつ多検体の解析には適さない。従って、本研究を進めていくにあたって、代謝可塑性を解析する研究基盤の整備から実施することとした。

### 2. 研究の目的

近年、がんは微小環境において代謝可塑性を獲得し、生存に必要なエネルギーを取得していることが明らかになってきた。従って、微小環境におけるがん細胞の代謝可塑性の理解と制御はがん治療の開発につながる重要な課題である。本研究では、がん代謝を制御する薬剤の探索や代謝可塑性を解析する研究基盤を構築し、新規抗がん剤開発への道筋を拓くことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) フラックスアナライザーを用いた表現型プロファイリング

解糖系と酸化的リン酸化は細胞内の二大エネルギー産生機構である。細胞外フラックスアナライザーは細胞外酸性化速度（ECAR）と細胞酸素消費量（OCR）を指標に細胞のエネルギー状態を評価する。ここでは、がん細胞株の代謝特性、特に解糖能や呼吸能、の違いや代謝阻害剤の薬効を検証するため、細胞外フラックスアナライザーを用いたミトストレステストを実施した。実験では試験細胞を無血清 DMEM、CO<sub>2</sub>フリーで1時間前培養した後、oligomycin A、FCCP、antimycin/rotenoneを段階的に処理しOCR/ECARを経時的に測定した。

#### (2) セミンタクト系を用いたミトコンドリア阻害機構の解析

ジギトニン処理した HeLa 細胞に、電子伝達系の各複合体の基質（I: Pyruvate/malate, II: Succinate, III: Duroquinol, IV: TMPD/ascorbate）を加えて、OCRの変化を細胞外フラックスアナライザーで評価した。阻害パターンを比較することで、どの複合体を標的とするかを推測することができるようになった。

### 4. 研究成果

微小環境に適応するがん細胞の選定では、代謝多様性を広範にカバーできるよう、様々な組織由来の株化がん細胞 12 種（A431, MCF7, MDAMB231, MG63, HeLa, HepG2, HT1080, LNCap, MiaPaCa, Panc1, PC3, VMRC）を用意し、栄養欠損培地や低酸素下で72時間培養したときの生存・増殖に与える影響を試験した。またこれらの細胞のエネルギー代謝特性を細胞外フラックスアナライザーで評価した。その結果、株化がん細胞でもいわゆるワーバーグ効果を示すがんと示さないがんが大別できることを見出した。また骨肉腫 MG63 細胞や線維肉腫 HT1080 細胞は低栄養・低酸素環境でも生存できる特異な細胞株であることを明らかにした。そこで様々な化合物や微生物エキスを HT1080 細胞や MG63 細胞に添加し、低酸素、低グルコース状態で選択的に細胞毒性を発揮する化合物を選別した。20,000 種近くのサンプルについて評価を行なったが、HT1080 に対しては活性を示す化合物を見いだすことはできなかった。一方 MG63 細胞に低グルコース下で選択毒性を示したカビ RK17-F0007 株のエキスから活性物質として metarhizin C を同定した（Nogawa et al, J Antibiotics, 72: 996-1000, 2019）

評価系の構築に際しては、代謝パターンが比較的中庸な HeLa 細胞を用いて約 60 種類の既存代謝阻害剤が誘導する OCR/ECAR の変化パターンを分類した。その結果、解糖系阻害剤、ミトコンドリア複合体阻害剤、脱共役剤などは特異な表現型変化を誘導し、容易にプロファイリングで

きるようになった。またこれまでに所属研究室で構築された ChemProteoBase ( 296 種のタンパク質変動を基盤とした薬剤の細胞応答を解析するシステム ) について二次元電気泳動上のスポット情報をもとに高度化し、代謝関連酵素にフォーカスしたターゲットプロテオミクスの開発を試みた。解析に使う 296 種のスポットの中には 8 種の解糖系に関わるタンパク質と 9 種類の TCA サイクルに関わる酵素が含まれていたのがこれらの変動をスコア化し、エネルギー代謝に関わるタンパク質増減の傾向を簡易的に評価できるようになった。これら 2 つの表現型プロファイリングシステムを組み合わせたスクリーニングを実施し、放線菌 RK88-1355 株より単離された unantimycin A とライブラリー化合物 NPL40330 がミトコンドリア呼吸阻害剤と類似の表現型を誘導する事を見出した。さらにこれらの薬剤のミトコンドリア阻害活性の詳細を明らかにするため、セミインタクト細胞と電子伝達系の各複合体の基質を用いたミトコンドリア呼吸活性再構成系を構築した。この方法により unantimycin A が複合体 III の活性を、NPL40330 が複合体 I の活性を阻害することを推定し、単離ミトコンドリアを用いた *in vitro* 酵素活性評価でその阻害効果を実証した ( Futamura et al, BBA, 1867: 28-37, 2019 )。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Futamura Y, Muroi M, Aono H, Kawatani M, Hayashida M, Sekine T, Nogawa T, Osada H.	4. 巻 1867
2. 論文標題 Bioenergetic and proteomic profiling to screen small molecule inhibitors that target cancer metabolisms.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.	6. 最初と最後の頁 28-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2018.06.001.	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 -
1. 著者名 Subedi A, Muroi M, Futamura Y, Kawamura T, Aono H, Nishi M, Ryo A, Watanabe N, Osada H.	4. 巻 593
2. 論文標題 A novel inhibitor of tumorspheres reveals the activation of the serine biosynthetic pathway upon mitochondrial inhibition.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Lett.	6. 最初と最後の頁 763-776
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1873-3468.13361.	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 -
1. 著者名 Robke Lucas, Futamura Yushi, Konstantinidis Georgios, Wilke Julian, Aono Harumi, Mahmoud Zhan, Watanabe Nobumoto, Wu Yao-Wen, Osada Hiroyuki, Laraia Luca, Waldmann Herbert	4. 巻 9
2. 論文標題 Discovery of the novel autophagy inhibitor aumitin that targets mitochondrial complex I	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemical Science	6. 最初と最後の頁 3014~3022
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c7sc05040b	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 -
1. 著者名 Nogawa Toshihiko, Kawatani Makoto, Okano Akiko, Futamura Yushi, Aono Harumi, Shimizu Takeshi, Kato Naoki, Kikuchi Haruhisa, Osada Hiroyuki	4. 巻 72
2. 論文標題 Structure and biological activity of Metarhizin C, a stereoisomer of BR-050 from Tolypocladium album RK17-F0007	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 996~1000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41429-019-0229-1	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 -

1. 著者名 Yamamoto Kai, Futamura Yushi, Uson-Lopez Rachael A., Aono Harumi, Shimizu Takeshi, Osada Hiroyuki	4. 巻 72
2. 論文標題 Y0-001A, a new antifungal agent produced by Streptomyces sp. Y015-A001	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 986 ~ 990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-019-0239-z	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 -

1. 著者名 Sako Kaori, Futamura Yushi, Shimizu Takeshi, Matsui Akihiro, Hirano Hiroyuki, Kondoh Yasumitsu, Muroi Makoto, Aono Harumi, Tanaka Maho, Honda Kaori, Shimizu Kenshirou, Kawatani Makoto, Nakano Takeshi, Osada Hiroyuki, Noguchi Ko, Seki Motoaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Inhibition of mitochondrial complex I by the novel compound FSL0260 enhances high salinity-stress tolerance in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8691
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65614-9	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Aono H, Futamura Y, Kawatani M, Muroi M, Osada H.
2. 発表標題 Exploration of small-molecule inhibitors targeting cancer metabolism
3. 学会等名 The 9th Japan-Korea Chemical Biology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Futamura Y, Muroi M, Aono H, Kawatani M, Osada H.
2. 発表標題 NPL40330: A novel oxidative phosphorylation inhibitor identified by bioenergetic and proteomic profiling
3. 学会等名 30th EORTC-NCI-AACR Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二村 友史, 青野 晴美, 川谷 誠, 長田 裕之
2. 発表標題 エネルギー代謝を標的とした小分子化合物の探索
3. 学会等名 日本がん分子標的治療学会第21回学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Futamura Y, Aono H, Kawatani M, Osada H
2. 発表標題 Exploration of small molecules targeting cancer metabolism.
3. 学会等名 The 76th Annual Meeting of Japanese Cancer Association
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青野 晴美, 二村 友史, 長田 裕之
2. 発表標題 神経芽腫NB-1細胞を用いたがん代謝阻害物質の探索
3. 学会等名 日本ケミカルバイオロジー学会第14回年会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----