

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15000

研究課題名（和文）栄養飢餓環境におけるがん特異的代謝リプログラミング機構の解明

研究課題名（英文）Cancer metabolic reprogramming in human pancreatic cancer cells under nutrient-deprived conditions

研究代表者

小野寺 威文 (Onodera, Takefumi)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所 沼津支所・研究員

研究者番号：20733166

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）：がん細胞は、増殖・生存に必要なエネルギー獲得のため、解糖系に高度に依存した代謝リプログラミングを行っている。がんの代謝リプログラミング機構を創薬のターゲットとすることは、新しい抗がん剤戦略として有望である。本研究では、栄養欠乏下において発現量が著しく上昇するトランスケトラーゼ関連遺伝子を見出し、その遺伝子機能解明とがん治療における分子標的候補としての検討を行った。その結果、トランスケトラーゼ関連遺伝子をノックダウンすると細胞増殖の抑制及びin vivoにおける腫瘍増殖を抑制することが分かった。トランスケトラーゼ関連遺伝子は抗がん剤開発のための魅力的な標的であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん微小腫瘍環境を一つである栄養欠乏状態を模倣した環境において、ペントースリン酸経路内のトランスケトラーゼ関連遺伝子が高発現していることを見出し、がんにおけるトランスケトラーゼ関連遺伝子の機能解明を行った。これまで、トランスケトラーゼ関連遺伝子の機能についての詳細はよく分かっていなかったが、in vitroおよびin vivo実験結果から、トランスケトラーゼ関連遺伝子を抑制すれば、腫瘍増大を阻止できることが示唆された。本研究は、トランスケトラーゼ関連遺伝子産物の阻害剤の開発および、エネルギー代謝を標的とした新しいがん治療法の科学的基盤になることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Cancer tissues maintain growth and survival by metabolic reprogramming to adapt tumor microenvironments such as hypoxia and nutrient-deprived conditions. Targeting cancer-specific metabolism to molecular-targeted therapeutics holds promise as a novel anticancer strategy. In the present study, we found that the expression level of transketolase family genes that function in the pentose phosphate pathway greatly increased under nutrient-deprived conditions. Therefore, we investigated the role of these genes and evaluated the potential for candidate gene in cancer treatment. As a result, overexpression of transketolase family genes promoted cell proliferation, and knockdown of the genes reduced cell proliferation. These findings suggest that transketolase family genes may be attractive targets for anticancer drug therapy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん代謝 低栄養 ペントースリン産経路 膵がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、がん細胞が示す特徴的な代謝が次々と発見され、がん細胞は正常細胞と異なる代謝を利用して、エネルギーを獲得していることが明らかとなってきた。がん細胞は代謝リプログラミングと呼ばれる細胞内の代謝改変によって、細胞の生存により有利な代謝機構を利用している。しかしながら、実際の腫瘍組織の環境下において、がん細胞がどのような代謝経路を介して生存しているのかについて詳細な説明は進んでいない。本研究では、栄養欠乏環境におけるがんの代謝リプログラミングは創薬のターゲットとなり得ると考え、新規標的分子の探索を行ったところ、解糖系から分岐したペントースリン酸経路に関わるトランスケトラーゼファミリー遺伝子の一つである Transketolase-like 1 (TKTL1) の発現量が大きく増大していることを見出した。また、低酸素環境下における TKTL1 発現量を栄養環境および栄養欠乏下で比較したところ、TKTL1 は低酸素応答には依存せず、栄養欠乏環境においてのみ適応する応答反応の可能性が示された。また、TKTL1 の活性化はペントースリン酸経路の亢進につながる可能性が示唆された。現在のところ、栄養欠乏環境における TKTL1 の機能に関する報告は非常に少なく、また、がん微小環境におけるペントースリン酸経路の重要性についても議論の余地が多分に残されていた。

2. 研究の目的

栄養欠乏環境において発現量の増大が見出された TKTL1 遺伝子の代謝リプログラミングにおける機能解明を研究目的とした。ペントースリン酸経路の亢進は、がん微小環境におけるがん細胞の生存戦略の一つとして考えられる。TKTL1 遺伝子が、がん細胞の代謝リプログラミングにおいてどのような機能的役割を担っているのか、さらには、がんの特異的代謝を標的とした新規抗腫瘍薬の探索に向けた基盤形成を目指す。

3. 研究の方法

(1) 栄養欠乏環境における TKTL1 の発現量解析

6 穴プレートにヒト膵がん PANC-1 細胞を播き、24 時間後にグルコース及びアミノ酸欠乏培地 (栄養欠乏培地) もしくは DMEM 培地 (栄養培地) に置換した。さらに 24 時間培養後に、RNA 及び細胞ライセートを調製した。続いて、リアルタイム PCR 及びウエスタンブロッティングにて、栄養環境と栄養欠乏環境における TKTL1 の発現量の変化を解析した。

(2) TKTL1 遺伝子安定発現細胞株とノックダウン細胞株の栄養欠乏環境耐性能

ヒト膵がん PANC-1 細胞に対して、レンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入による TKTL1 安定発現細胞株及び shRNA を用いたノックダウン細胞株を作製した。作製した TKTL1 安定発現細胞株及びノックダウン細胞株を播き、24 時間後に栄養欠乏培地に置換後、さらに 72 時間培養した。MTT assay にて細胞生存率を測定した。

(3) ヒト TKTL1 タンパク質の精製とトランスケトラーゼ活性測定

哺乳類細胞発現系 (CHO-K1) で、C 末端に FLAG tag を付加した TKTL1 タンパク質を大量発現させ、アフィニティ精製にて TKTL1 タンパク質を精製した。精製したタンパク質は SDS-PAGE にて純度を確認した。トランスケトラーゼ活性測定は、NADP⁺/NADPH の変化による 340 nm での吸光度低下に基づく従来法に沿って測定した。

(4) 遺伝子安定発現細胞株とノックダウン細胞株の造腫瘍性評価

作製した TKTL1 遺伝子安定発現細胞株とノックダウン細胞株を用いて、 1×10^6 cells の細胞を 7 週齢の BALB/c ノードマウスに接種し、*in vivo* 造腫瘍性試験を行った。

4. 研究成果

(1) 栄養欠乏環境における TKTL1 の発現量解析

ヒト膵がん細胞株を用いて、栄養環境と栄養欠乏環境における TKTL1 の発現量の変化をリアルタイム PCR 及びウエスタンブロッティングにて解析した。TKTL1 は栄養欠乏環境においてのみ、その発現量が増大することを確認した。また、栄養欠乏環境で培養後、一定時間経過後に栄養培地に交換すると、TKTL1 の発現量の低下が見られた。このことから、TKTL1 は、栄養欠乏環境特異的に遺伝子発現が誘導されることが明らかとなった。

(2) 遺伝子安定発現細胞株とノックダウン細胞株の細胞増殖能

TKTL1 の遺伝子機能を解析するために、ヒト膵がん細胞を用いた TKTL1 遺伝子安定発現細胞株およびノックダウン細胞株を作製し、細胞増殖に対する影響を調べた。TKTL1 遺伝子安定発現細胞株は、栄養欠乏環境において細胞増殖能が亢進した。一方、TKTL1 ノック

クダウン細胞株は、栄養欠乏環境において細胞増殖能が有意に抑制された。これらの結果から、TKTL1 遺伝子は、栄養欠乏環境における細胞増殖に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

(3) ヒト TKTL1 タンパク質のトランスケトラーゼ活性測定

哺乳細胞タンパク質発現系を用いて、ヒト TKTL1 タンパク質を発現及び精製した。ヒト Transketolase (hTKT) は、トランスケトラーゼ活性を有しているとの報告がある。従って、hTKT のトランスケトラーゼ活性と比較することで、TKTL1 の酵素活性の有無を判断した。その結果、TKTL1 タンパク質は、TKT より弱い活性を示したものの、トランスケトラーゼ活性を有していることが強く示唆された。

(4) 遺伝子安定発現細胞株とノックダウン細胞株の造腫瘍性評価

TKTL1 遺伝子安定発現細胞株接種群は、対照群と比較して、有意な腫瘍の増大が認められた。また、TKTL1 ノックダウン細胞株接種群は、対照群と比較して、腫瘍増殖の顕著な抑制が見られた。以上より、TKTL1 は腫瘍増殖に大きく関わっていることが明らかとなった。TKTL1 はがん治療において、魅力的な分子標的である可能性が示唆された。

以上により、本研究で見出されたペントースリン酸経路の TKTL1 は、がん微小環境の一つである栄養欠乏環境において、がん細胞の増殖に大きく関与していることが明らかとなった。また、TKTL1 はトランスケトラーゼ活性を有している可能性が強く示唆された。今後本研究をさらに発展させ、新規がん分子治療薬の標的候補としての可能性を探求し、がん代謝を標的とした抗がん剤の開発につなげていく予定である。

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 Takefumi Onodera, Isao Momose, Manabu Kawada | 4. 巻 67 |
| 2. 論文標題 Potential anticancer activity of auranofin | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Chemical and Pharmaceutical Bulletin | 6. 最初と最後の頁 186-191 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1248/cpb.c18-00767 | 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 Isao Momose, Takefumi Onodera, Hiroyasu Doi, Hayamitsu Adachi, Masatomi Iijima, Yohko Yamazaki, Ryuichi Sawa, Yumiko Kubota, Masayuki Igarashi, Manabu Kawada | 4. 巻 82 |
| 2. 論文標題 Leucinostatin Y: A Peptaibiotic Produced by the Entomoparasitic Fungus <i>Purpureocillium lilacinum</i> 40-H-28 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Natural Products | 6. 最初と最後の頁 1120-1127 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00839 | 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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 百瀬功、小野寺威文、坂本修一、川田学 |
| 2. 発表標題 低栄養環境におけるがん特異的代謝リプログラミング機構の解明 |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 百瀬功、小野寺威文、山崎洋子、大庭俊一、安達勇光、川田学 |
| 2. 発表標題 レドックス制御システムの阻害による栄養欠乏選択的細胞毒性 |
| 3. 学会等名 第23 回日本がん分子標的治療学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Inhibitory effect of a redox system by auranofin in pancreatic cancer cells under nutrient-deprived conditions |
| 2. 発表標題 Takefumi Onodera, shun-ich Ohba, Isao Momose, Manabu Kawada |
| 3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小野寺威文、百瀬功、川田学 |
| 2. 発表標題 低栄養環境におけるレドックス制御分子を標的としたAuranofinのがん抑制効果 |
| 3. 学会等名 先端モデル動物支援若手技術講習会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小野寺威文、百瀬功、川田学 |
| 2. 発表標題 栄養飢餓選択的細胞毒性を示すAuranofinの作用機序 |
| 3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Takefumi Onodera, Isao Momose, Manabu Kawada |
| 2. 発表標題 Auranofin, an Inhibitor of Thioredoxin Reductase, Exhibits Preferential Cytotoxicity Under Nutrient-deprived Conditions in Human Pancreatic Cancer Cell |
| 3. 学会等名 4th International Symposium for Medicinal Sciences (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takefumi Onodera, Isao Momose, Manabu Kawada |
| 2. 発表標題 Auranofin exhibits preferential cytotoxicity to human pancreatic cancer cells under nutrient-deprived conditions |
| 3. 学会等名 The 22nd JFCR-ISCC: New Antitumor Agents under Development in the US, Europe and Japan (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小野寺威文、百瀬功、川田学 |
| 2. 発表標題 栄養飢餓選択的細胞毒性を示すAuranofinの作用機序 |
| 3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| (公財)微生物化学研究会 微生物化学研究所 HP http://www.bikaken.or.jp |
|---|

| 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 | 百瀬 功 (Momose Isao) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 坂本 修一 (Sakamoto Shuichi) | | |
| 研究協力者 | 大庭 俊一 (Ohba Shun-ichi) | | |