

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：72801

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15333

研究課題名(和文)細胞外GAPDHの細胞増殖抑制活性を利用した抗がん剤の開発

研究課題名(英文)Development of anti-cancer drug utilizing extracellular GAPDH activity

研究代表者

吉田 潤次郎(Yoshida, Junjiro)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：20712706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)は、解糖系で働く代謝酵素としてよく知られているが、近年では様々な局在や機能が報告されている。我々はこれまでに、胃の線維芽細胞がGAPDHを分泌し、この細胞外GAPDHががん細胞の増殖を抑制する活性があることを報告した。本研究課題では、GAPDHの分泌を促進する化合物の特定を目的としており、スクリーニングの結果nojirimycin関連化合物を見出した。また、これらの化合物の作用標的から、GAPDHの分泌にはゴルジ装置を介した分泌経路が関与することが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、GAPDHの細胞外への分泌を誘導する化合物として、nojirimycin関連物質を特定した。細胞外GAPDHはがん細胞に対して増殖を抑制する活性を示すため、腫瘍内がん細胞の周辺に存在する線維芽細胞を介した新しい機序で作用する抗がん剤開発へ応用できる可能性がある。また、本研究で得たGAPDH分泌誘導活性を示す化合物はglucosidaseなどゴルジ輸送に関わるタンパクの阻害活性が報告されており、GAPDHの分泌にゴルジ輸送の関与が考えられた。GAPDHは多様な活性を有するタンパクとして近年報告されているが、細胞外GAPDHについて本研究結果により新しい制御機構が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is well known as a metabolic enzyme in glycolysis, but in recent years, various localizations and functions have been reported. We have previously reported that gastric fibroblasts secrete GAPDH, and this extracellular GAPDH has the activity of suppressing the growth of cancer cells. The purpose of this research is to identify compounds that promote the secretion of GAPDH, and as a result of screening, nojirimycin-related compounds were found. In addition, from the action targets of these compounds, it was considered that the secretion pathway via the golgi apparatus is involved in the secretion of GAPDH.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：GAPDH ケミカルバイオロジー がん-間質相互作用 新規抗がん剤 天然物スクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでの研究成果から我々は、間質細胞から分泌された GAPDH は、がん細胞の細胞表面に存在する E-cadherin に結合し、mTOR-p70S6K 経路を抑制することでがん細胞の増殖を抑制することを明らかにしている。さらに我々は GAPDH の細胞増殖抑制活性における活性部位の特定を試み、C末端領域の 4-81 アミノ酸残基がこの活性に必須であることを明らかにした。これまでに、いくつかの臓器由来の間質細胞から GAPDH が分泌され、がん細胞の増殖を抑制することを見いだしている。GAPDH は解糖系を構成する主要な酵素であるが、近年、解糖系における機能に加え、GAPDH の多様な局在および機能が明らかにされつつある。核内移行した GAPDH によるオートファジーやアポトーシスの制御等が例に挙げられるが、さらに山地ら(大阪府立大)の報告によれば、GAPDH は COS-7, HEK293, MCF-7, HepG2, PC-12, neuro-2a 等の多様な細胞から細胞外へ分泌され、増殖は阻害せずに細胞の伸展阻害活性を示す。しかしながら、がん細胞の増殖に対する GAPDH の活性についての報告は我々の研究以外に無い。

がん治療の標的として腫瘍を構成するがん細胞以外の間質に焦点を当てた戦略としては、がん細胞の増殖を促進するサイトカインや増殖因子のシグナルの抑制等が挙げられる。一方、我々は間質によるがん細胞の増殖抑制に焦点を当て、これを促進するような新しいがん治療法を検討してきた。この結果、我々はこれまでにほぼ報告が無かった、間質細胞が分泌するがん細胞の増殖抑制因子 GAPDH を先行して特定しており、これを創薬に応用することを目的としている点は、腫瘍微小環境を標的とした治療応用において極めて重要である。

2. 研究の目的

我々はこの相互作用の細胞外機能分子として GAPDH を同定し、間質細胞が分泌した GAPDH ががん細胞の増殖を抑制することを報告した。我々はこの細胞外 GAPDH の活性に着目し、間質細胞からの GAPDH の分泌を促進する活性を有する化合物の探索(1)を行うことにより、『GAPDH を介したがんと間質相互作用による制がん機構』を利用した抗がん剤の開発を目指す。また、間質細胞による GAPDH の分泌機構を解析する(2)事で、がん間質相互作用におけるシグナル分子としての GAPDH の学術的な機能の解明および、本研究が目指す治療法に有効ながん種のバイオマーカーに応用する。

3. 研究の方法

(1)細胞外 GAPDH の分泌を促進する化合物のスクリーニング

細胞外 GAPDH の測定は GFP を標識した GAPDH を発現させた HEK293 細胞 (293/GAPDH-GFP) を用い、細胞培養上清中の GFP の蛍光値により GAPDH の分泌量を測定した。96-well プレートで微生物培養液を添加して 293/GAPDH-GFP を培養し、3 日後の細胞培養上清を回収し、GFP 蛍光値を測定した。細胞培養に用いる培地は、通常の DMEM では蛍光のバックグラウンドが強いため、蛍光を低減した培地を用いた。また、微生物培養液による細胞傷害によって細胞内 GAPDH が漏出する可能性を考え、培養上清を回収した後、新しい培地を添加したプレートを用いて MTT アッセイを行い、細胞に対する毒性についても同時に検討した。一次スクリーニングでヒットした微生物培養液については、濃度依存的な活性があるかを二次スクリーニングで検討した。微生物培養液は蛍光値が高く出るものもあるため、二次スクリーニングで細胞を入れない well を作り、微生物培養液由来の蛍光値を除外した。

(2) GAPDH の分泌機構の解析

GAPDH の細胞外への分泌機構については、まずはエクソソームによる分泌経路を検討した。今回は、スクリーニング系の準備段階として実施した標準阻害剤キットを用いた検討から、標的が明らかな阻害剤がヒットしたため、これを用いて 293/GAPDH-GFP 由来のエクソソームを精製し、GAPDH の分泌が促進されているかについて検討した。

4. 研究成果

(1)細胞外 GAPDH の分泌を促進する化合物のスクリーニング

表 1 標準阻害剤キットを用いた GAPDH 分泌誘導化合物のスクリーニング

Color of solution	Category	Compound	CAS No.	MW	Fold change
-	glucosidase I, II	Deoxynojirimycin	73285-50-4	199.6	2.31
-	a-mannosidase	Swainsonine	72741-87-8	173.2	2.54

最初に、先端モデル支援プラットフォームで配布されている標準阻害剤キット (364 化合物)

について 293/GAPDH-GFP を用いたスクリーニングを実施した。この結果、コントロールと比較して 2 倍以上の値を示す化合物がいくつかヒットした。この中で、glucosidase I, II の阻害剤である Deoxynojirimycin (DNJ)、mannosidase の阻害剤である Swainsonine (SWI) に着目した(表 1)。これらの化合物の標的はゴルジ輸送に関わる分子である。さらに、DNJ、SWI を用いて、濃度依存的な GAPDH の分泌誘導を検討した。この結果、SWI は活性が弱いことが分かったが、DNJ は濃度依存的に GAPDH の分泌を促進することが分かった(図 1)。また、約 5,000 種類の放線菌由来の微生物培養液を用いたスクリーニングの結果、4 種類のサンプルが濃度依存的に GAPDH の分泌を誘導することが分かった(図 2)。この内、最も強い活性を示した Broth-4 は、DNJ の類縁体である 1-deoxygalactonojirimycin (DGJ) を生産する放線菌由来であることが分かった。

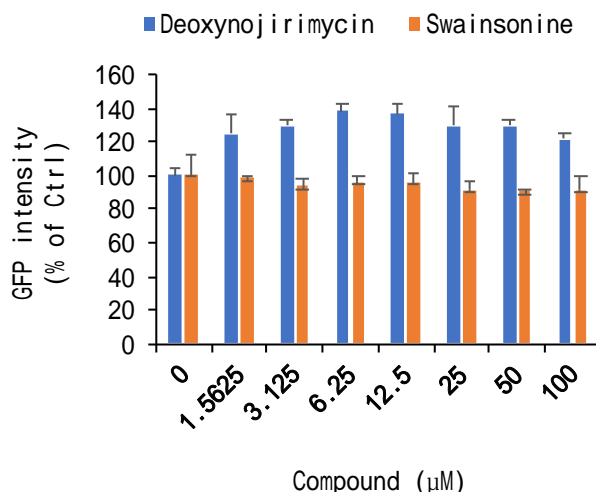


図 1 293/GAPDH-GFP細胞に対する GAPDH分泌誘導活性

(2) GAPDH の分泌機構の解析

GAPDH の分泌誘導については、我々の過去の報告から、MEK inhibitor I が活性を有することがわかっているが、同じく MEK の阻害剤である U0126 は GAPDH 分泌誘導活性を示さない。このことから、MEK inhibitor I による GAPDH の分泌誘導は MEK 以外の標的に作用した結果であると考えられたが、その標的については明らかになっていない。今回、本研究課題で実施した阻害剤キットを用いたスクリーニングの結果、DNJ が GAPDH の分泌を誘導する活性を示すことが分かった。DNJ は標的が明らかであるため、GAPDH の分泌機構の解析においては DNJ を用いることで、GAPDH の分泌に関連する経路を検討した。

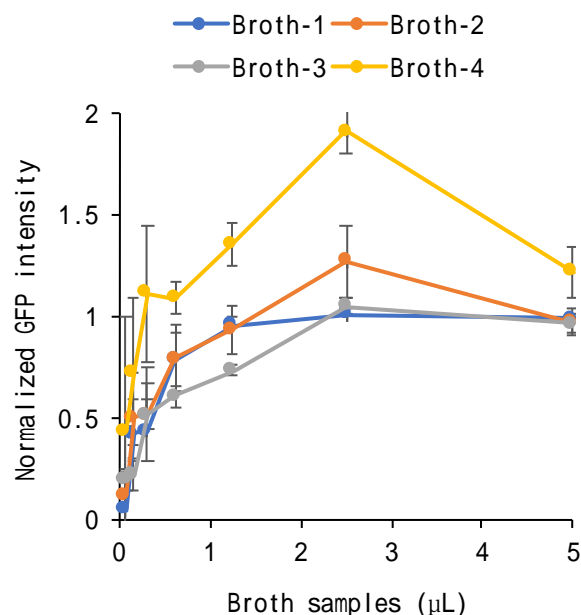


図 2 微生物培養液の GAPDH 分泌誘導活性

最初に、GAPDH の分泌経路としてエクソソーム によるタンパク分泌について評価した。293/GAPDH-GFP 細胞に DNJ、エクソソーム 生成の阻害剤である GW4869 を処理し、培養情勢からエクソソーム を精製し、ウェスタンブロット によりエクソソーム 中の GAPDH 量を評価した。この結果、DNJ 処理によってエクソソーム 中の GAPDH 量が増加することが分かった。また、この GAPDH の増加は GW4869 処理によってキャンセルされた(図 3)。この結果から、DNJ 処理は GAPDH のエクソソーム への動員を誘導していると考えられるが、エクソソーム マーカーである CD63 も DNJ 処理によって増加していることから、エクソソーム 量自体も増加していることが考えられる。

微生物培養液のスクリーニングの結果得られたヒットサンプル Broth-4 は、DGJ 生産菌由来であることが分かったため、この培養液中で活性を示す物質は DGJ であると考えた。最後に、DNJ および DGJ をヒトの胃の線維芽細胞 Hs738 に処理し、培養上清中の GSAPDH 量をウェスタンブロット により評価した。この結果、DNJ は Hs738 に対しても GAPDH の分泌誘導活性を示した。DGJ は DNJ と比較して活性が弱いことが分かった(図 4)。

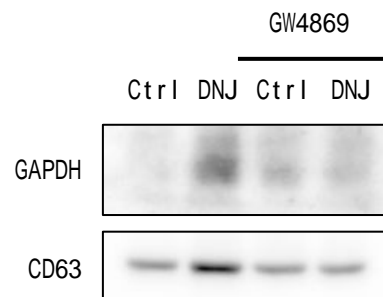


図 3 DNJ処理はエクソソームによる GAPDH分泌を促進する

本研究課題の結果から、間質細胞からの GAPDH の分泌を促進する活性を有する化合物の探索(1)については、GAPDH の分泌を促進する化合物として DNJ を同定した。また、微生物培養液を用いたスクリーニングの結果、DNJ 関連物質の DGJ も活性を有することが考えられた。また、GAPDH の分泌機構の解析(2)の結果、GAPDH はエクソソームを介して細胞外に分泌されることがわかった。

阻害剤キットを用いたスクリーニングの結果から、GAPDH 分泌誘導活性を示す化合物として DNJ および SWI を得た。これらの化合物はそれぞれゴルジ装置に関わる glucosidase I, II および α -mannosidase の阻害剤である。エクソソームは、エンドサイトーシスを出発点としてエンドソームから成ることが知られているが、近年ではゴルジ装置を介したエクソソームの形成機構も報告されている。このことから、ゴルジ装置に作用する化合物はエクソソームの分泌に影響を与える可能性が考えられ、今回得た DNJ もこうした理由から GAPDH の分泌を誘導したと考えられる。また、GAPDH はゴルジ装置における物質輸送に関与することが報告されている。DNJ 処理 293/GAPDH-GFP ではエクソソームに含まれる GAPDH が増加しており、ゴルジ装置において DNJ が GAPDH の修飾に影響し、結果としてエクソソーム中の GAPDH 量が増加したと考えられた。GAPDH は細胞内外において様々な局在、機能が報告されているが、細胞外 GAPDH の制御として、エクソソーム分泌という新しい機構を示唆するデータが得られた。また、これまでに報告されていない GAPDH の分泌促進を誘導する化合物として、DNJ を同定することができた。

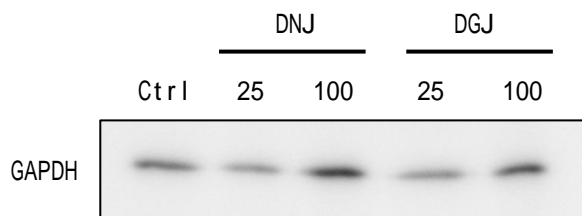


図4 DNJ、DGJは線維芽細胞に対しても GAPDH分泌を促進する

<引用文献>

- Kawada, et al. PLoS One 2015 18;10(3):e0119415.
- Collet, et al. Cell 2007 1;129(5):983-97.
- Yamaji, et al. Biochim Biophys Acta 2005 30;1726(3):261-271
- Mellor, et al. Biochem J. 2004 381(3):867-875.
- Elsen, et al. EMBO J. 2001 15;20(12):3008-3017.
- Jeppesen, et al. Cell 2019 4;177(2):428-445
- Kwon, et al. J Biol Chem. 2016 2;291(49):25462-25475.
- Tristan, et al. Cell Signal. 2011 23(2):317-323.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 J. Yoshida, T. Ohishi, H. Abe, S. Ohba, H. Inoue, I. Usami, M. Amemiya, R. Oriez, C. Sakashita, S. Dan, M. Sugawara, T. Kawaguchi, J. Ueno, Y. Asano, A. Ikeda, M. Takamatsu, G. Amori, Y. Kondoh, K. Honda, H. Osada, T. Noda, T. Watanabe, T. Shimizu, M. Shibasaki and M. Kawada	4. 巻 24
2. 論文標題 Mitochondrial complex I inhibitors suppress tumor growth through concomitant acidification of the intra- and extracellular environment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103497 ~ 103497
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.103497	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田潤次郎, 雨宮昌秀, 立田大輔, 大石智一, 大庭俊一, 井上裕幸, 阿部 光, 渡辺 匠, 柴崎正勝, 川田 学
2. 発表標題 新規呼吸鎖complex I阻害剤による腫瘍微小環境の調節を介した抗がん剤の創薬研究
3. 学会等名 第24回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田潤次郎, 雨宮昌秀, 立田大輔, 大石智一, 大庭俊一, 井上裕幸, 阿部 光, 渡辺 匠, 柴崎正勝, 川田 学
2. 発表標題 新規ミトコンドリアcomplex I阻害剤によるがん微小環境の調節を介した抗がん剤の創薬研究
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 吉田潤次郎, 雨宮昌秀, 立田大輔, 大石智一, 大庭俊一, 井上裕幸, 阿部 光, 渡辺 匠, 柴崎正勝, 川田 学
2. 発表標題 新規ミトコンドリアcomplex I阻害剤による微小環境の調節を介したがん細胞の増殖抑制
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

微生物化学研究所HP
<https://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
--	---------------------------	-----------------------	----

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