

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07480

研究課題名(和文) エネルギー代謝を標的にしたKRAS変異難治癌に対する新規抗癌剤の開発

研究課題名(英文) Anti-tumor activity of potent PDK4 inhibitors from plants for KRAS-mutated intractable cancers

研究代表者

井上 寛一 (Inoue, Hiromasa)

滋賀医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：30176440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞ではエネルギー代謝のシフトが生じており、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。我々はピルビン酸をアセチルCoAに代謝するPDHを抑制するPDK4を阻害する活性を持つ低分子化合物Cryptotanshinon(CTN)を見出した。CTNは膵臓癌細胞株及び大腸癌細胞株に対して1-10 μ Mの低濃度でPDHのリン酸化を抑制し、mutant K-Ras蛋白の発現を抑制することでin vitro及びin vivoの実験系で癌化を抑制した。また、CPTはmutant K-Rasの発現抑制を介して脂質代謝を抑制し活性酸素産生を亢進することで癌の悪性化を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞の代謝を標的にした新たな抗癌剤の開発が始まっているが臨床レベルで標準治療として使用できる薬剤はまだ出てきていない。CPTはその活性のひとつとして活性化Ras蛋白の発現抑制があるのでRasが活性化した膵臓癌などの難治癌に対する有効な治療薬になることが考えられる。KRAS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治療薬は必須である。K-Rasは解糖系、グルタミン代謝、脂質代謝系などの上流で働きエネルギー代謝の調節作用がある。難治癌の代謝を変える新しい治療法としてCPTは今後その有効性が十分期待できる考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pyruvate dehydrogenase kinase 4 (PDK4) is an important regulator of energy metabolism. Knockdown of PDK4 by specific siRNA suppressed the expression of KRAS and the proliferation of cancer cells. We found a novel small molecule, cryptotanshinone (CPT), which inhibits PDK4 activity, suppressed the 3D-spheroid formation and tumorigenesis of KRAS-activated human pancreatic cancer cells. In this study, we examined the molecular mechanism of tumor suppression by CPT in human pancreatic cell lines. CPT treatment decreased glutamine and lipid metabolism, and increased ROS production in a pancreatic cancer cell line MIAPaCa-2 containing mutant KRAS. By knockdown experiments of activated K-Ras, we demonstrated that CPT suppresses tumorigenesis by inhibiting lipid metabolism and promoting ROS production in a mutant KRAS-dependent manner. This PDK4 inhibitor represents a novel therapeutic drug for KRAS-driven intractable cancers by altering cell metabolism.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：Cryptotanshinone PDK4 K-Ras 膵臓癌 脂質代謝 活性酸素

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

癌細胞では、細胞の増殖・生存に必要なグルコース、グルタミン、脂質など代謝のリプログラミングが起こっている。特によく知られているのは好気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)で、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。また、高頻度で *KRAS* 変異が起こっている膵臓癌では酸化ストレスや活性酸素種(ROS)の制御に密接に関わるグルタミン代謝や脂質代謝の変化が癌の悪性化に深く関わっていることも明らかになってきた。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エネルギー代謝の制御にも関与しており、ピルビン酸からアセチル CoA への反応を抑制してミトコンドリア代謝系を抑制するピルビン酸脱水素酵素キナーゼ 4 (PDK4) がその標的であることを見出した。さらに中医学の丹参の成分であるクリプトタンシノン(cryptotanshinone, CPT) が数 μM の IC_{50} で PDK4 を阻害する活性を有することを見出した。この CPT は *KRAS* 癌遺伝子の変異、活性化しているヒト膵臓癌細胞株や大腸癌細胞株、*HRAS* 変異のある膀胱癌細胞株の 3 次元スフェロイド形成を 10-20 μM 濃度で抑制した。さらに、我々は変異 K-Ras 蛋白の発現や癌幹細胞マーカー CD44 の発現も CPT 処理によって抑制されることも明らかにしてきた。CPT は in vivo でもヌードマウスでの同所性膵臓腫瘍モデルでヒト膵臓癌細胞株による腫瘍形成を顕著に抑制した。

2. 研究の目的

今回の研究では、この PDK4 を標的とする低分子化合物 CPT がグルコース代謝、グルタミン代謝、脂質代謝と ROS 産生にどのような影響を及ぼすのか、さらに K-Ras 発現抑制との関連、癌の悪性化の抑制にどのように関わるのか、を明らかにする。また、転移浸潤に対する CPT の抑制効果を高転移性膵臓癌を用いた in vivo マウス転移実験系で検証し、転移性難治癌に対する CPT の臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

細胞は mutant K-ras 及び wild-type(WT) K-ras を持つヒト膵臓癌細胞株 MIAPaCa-2 (mutant), BxPC-3(WT)、さらに大腸癌細胞株 DLD-1(mutant), DK04(WT)を用いた。癌化のアッセイは in vitro では三次元スフェロイド形成法、in vivo ではヌードマウスでの同所性膵臓腫瘍細胞株移植実験系を用いた。これらの実験系で、Cryptotanshinone(CPT)による抑制効果を検討した。代謝のアッセイはグルタミン消費測定、Lipid droplet(脂質合成)測定、 H_2O_2 (活性酸素)

測定を行った。関連蛋白の発現は特異抗体による Western blotting 法を用いて調べた。siRNA 導入はリポフェクトアミン法を用いた。

4. 研究成果

(1) CPT の増殖抑制効果と mutant K-ras との関連を明らかにするために、mutant K-ras 及び wild-type(WT) K-ras を持つヒト膵臓癌細胞株 MIAPaCa-2 (mutant), BxPC-3(WT)、さらに大腸癌細胞株 DLD-1(mutant), DKO4(WT)について CPT による三次元スフェロイド形成に対する抑制効果を検討した。その結果、CPT による抑制効果は mutant K-ras を持つ癌細胞株の方が有意に高いことを見出した。この時、CPT 処理による K-Ras 蛋白の発現抑制も mutant K-ras を持つ細胞株の方が高かった。さらにこれらの細胞株について増殖のグルタミン依存性についても解析したところ、mutant K-ras を持つ細胞の方がグルタミン依存性が高いこともわかった。

(2)次に、膵臓癌細胞株 (MIAPaCa-2, BxPC-3) について CPT のグルタミン代謝、脂質代謝、活性酸素産生に対する影響を検討した。その結果、mutant K-ras を持つ MIAPaCa-2 の方が、WT K-ras を持つ BxPC-3 に比べて、CPT 処理によってグルタミン消費量、脂質産生量は抑制され、逆に活性酸素産生量は亢進されることがわかった。そこでグルタミン代謝、および脂質代謝に関与する酵素について、CPT の影響を検討したところ、MIAPaCa-2 ではグルタミン代謝に関わる GOT1, GLS, IDH1 の発現が CPT によって抑制されることを見出した。さらに脂質代謝に関わる FASN, ACC1, ACLY の発現も CPT によって抑制された。BxPC-3 細胞についてはこれらの抑制はほとんど認められなかった。これらの結果から、CPT は mutant K-ras を持つ膵臓癌細胞株についてはグルタミン代謝、脂質代謝を抑制し、活性酸素産生を亢進する活性があることがわかった。

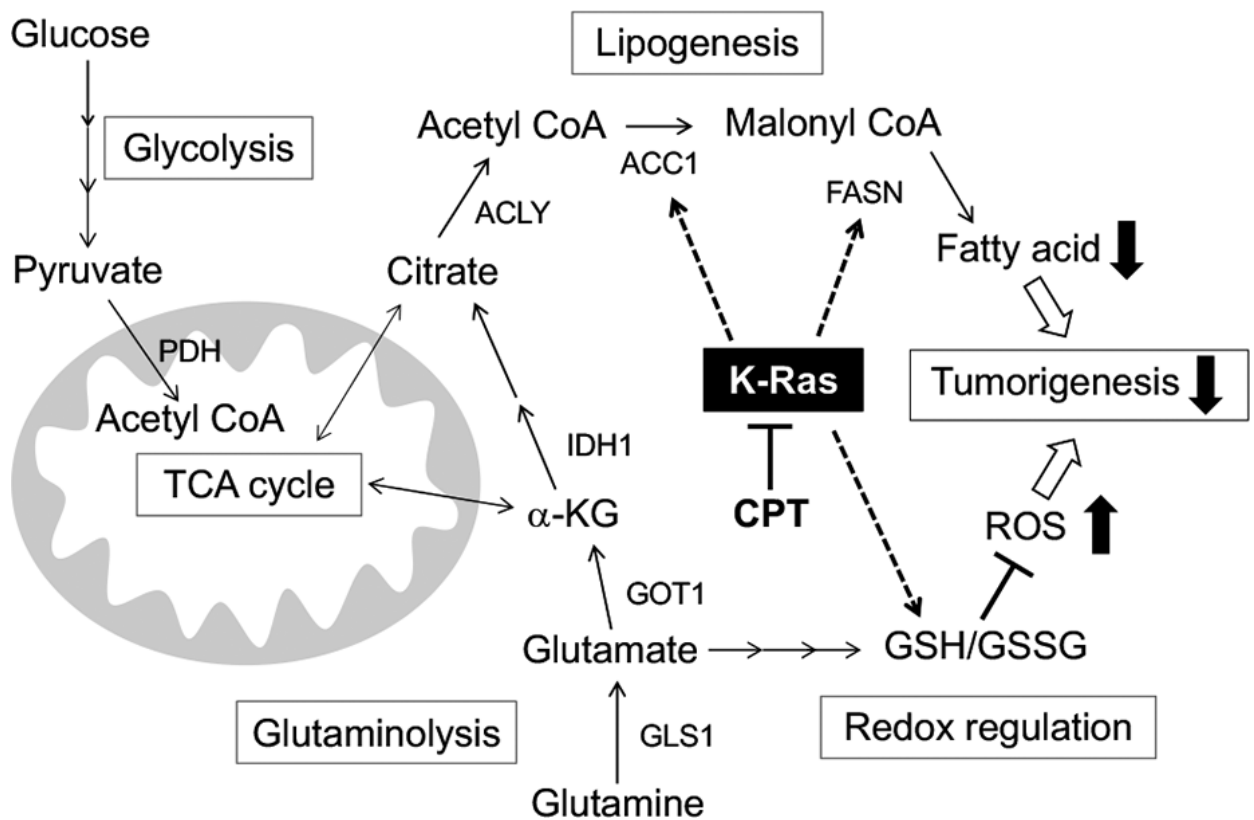
(3)これらの代謝の変化が mutant K-ras の抑制に依存しているかどうかを検討するために K-ras 特異的 siRNA を MIAPaCa-2 細胞に導入した。K-Ras ノックダウンによって 3D スフェロイド形成は顕著に抑制され、CPT によって発現抑制が認められた代謝関連蛋白のうち、脂質代謝に関わる ACC1 と FASN の発現が抑制された、この時、脂質合成も抑制され、活性酸素の産生は促進された。さらに FASN 特異的 siRNA を使って同様のノックダウン実験を行った。FASN siRNA によって 3D スフェロイド形成は部分的に抑制され、活性酸素の産生も部分的に促進された。これらの結果から、CPT による癌化抑制には K-ras に依存する経路と依存しない経路があることがわかった。K-ras 依存性経路の方が癌化抑制には中心的な役割を果たし FASN や ACC を介した脂質合成の抑制は K-ras の下流で働いていると考えられるが、活性酸素産生促進も K-ras 抑制によって誘導されることもわかった。K-ras 非依存性の経路には GOT1, GLS, IDH1 を介したグルタミン代謝の抑制も関与している可能性も考えられる。

(4)CPT が in vivo で抗転移活性を持つかどうかを検証するために、高転移性膵臓癌細胞株 SUIT-2 を用いて、ヌードマウスでの同所性膵臓癌細胞株の移植実験系を樹立した。この実験系

を用いて、CPT の膵臓腫瘍形成と転移（播種）に対する抑制効果調べたところ、CPT は腫瘍の成長だけでなく播種も顕著に抑制することがわかった。薬剤の副作用はこの実験においては認められなかった。

以上の結果から CPT は膵臓癌細胞株において mutant K-ras の発現抑制を介して脂質合成を抑制し活性酸素産生を亢進することで、癌の悪性を抑制することがわかった（下図参照）。癌細胞の代謝リプログラミングを変えることで癌の成長と転移（播種）を抑制する新たな治療法として臨床応用も可能であると考えられる。

図 CPT による K-Ras を介した代謝制御と癌化抑制



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Terado, T., Kim, C. J., Ushio, A., Minami, K., Tambe, Y., Kageyama, S., Kawauchi, A., Tsunoda, T., Shirasawa, S., Tanaka, H. and Inoue, H.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Cryptotanshinone suppresses tumorigenesis by inhibiting lipogenesis and promoting reactive oxygen species production in KRAS-activated pancreatic cancer cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Chul Jang Kim, Tokio Terado, Yukihiro Tambe, Ken-ichi Mukaisho, Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi, Hirokazu Inoue	4. 巻 59
2. 論文標題 Cryptotanshinone, a novel pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitor, suppresses cell invasiveness in bladder cancer cells via the mTOR/ -catenin/N-cadherin axis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Oncology	6. 最初と最後の頁 40-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ijo.2021.5220	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 Tambe, Y., Terado, T., Kim, C. J., Mukaisho, K., Yoshida, S., Sugihara, H., Tanaka, H., Chida, J., Kido, H., Yamaji, K., Yamamoto, T., Nakano, H., Omura, S. and Inoue, H.	4. 巻 58
2. 論文標題 Antitumor activity of potent pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitors from plants in pancreatic cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Carcinogenesis 58, 1726-1737, 2019	6. 最初と最後の頁 1726-1737
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mc.23045	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7件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Tokio Terado, Yukihiro Tambe, Chul Jang Kim, Hiroyuki Tanaka, Hirokazu Inoue
2. 発表標題 A PDK4 inhibitor, cryptotanshinone, inhibits lipid metabolism to suppress tumorigenesis of KRAS-activated cancer cells
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 hul Jang Kim, Tokio Terado, Yukihiro Tambe, Ken-ichi Mukaisho, Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi, Hirokazu Inoue
2. 発表標題 Cryptotanshinone, a novel PDK4 inhibitor, suppresses cell invasiveness in bladder cancer cells via -catenin/N-cadherin
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chul Jang Kim, Tokio Terado, Yukihiro Tambe, Ken-ichi Mukaisho, Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi, Hirokazu Inoue
2. 発表標題 Cryptotanshinone, a novel PDK4 inhibitor, suppresses invasion and metastasis in human bladder and pancreatic cancers via -catenin.
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tokio Terado Yukihiro Tambe, Chul Jang Kim, Hiroyuki Tanaka, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Hirokazu Inoue
2. 発表標題 A novel PDK4 inhibitor cryptotanshinone inhibits glutamine metabolism to suppresses tumorigenesis of KRAS-activated cancer cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 A novel PDK4 inhibitor cryptotanshinone suppresses the tumorigenesis of KRAS-activated cancer cells via PI3K/Akt pathway
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金哲将、寺戸勅雄、巨部幸博、河内明宏、向所賢一、杉原洋行、井上寛一
2. 発表標題 Suppression of invasion and metastasis by a novel PDK4 inhibitor in pancreatic and bladder cancers
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 巨部幸博、寺戸勅雄、金哲将、向所賢一、中野洋文、井上寛一
2. 発表標題 新規PDK4阻害剤クリプトタンシノンの膵臓癌に対する抗腫瘍作用
3. 学会等名 日本分子生物学会年会
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
研究協力者	巨部 幸博 (Tambe Yukihiro)		
研究協力者	寺戸 勅雄 (Terado Tokio)		
研究協力者	金 哲将 (Kim Chul Jang)		

6. 研究組織（つづき）

	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	向所 賢一 (Mukaisho Ken-ichi)		
研究協力者	中野 洋文 (Nakano Hirofumi)		

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