

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16440

研究課題名(和文)糖代謝リプログラミングを標的とした難治性がんに対する効果的薬物療法の立案

研究課題名(英文) Establishment of effective drug therapy for drug-resistant cancers focusing on reprogramming of glucose metabolism

研究代表者

青木 重樹 (Aoki, Shigeki)

千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号：30728366

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)：がん細胞は一般に解糖系からATPを産生して生存しているが、その抑制時にはミトコンドリア代謝系へとリプログラミングすることが示唆されている。膵臓がん細胞を用いてその代謝変動をメタボローム解析から評価したところ、TCA回路中間体の減少が認められ、ミトコンドリアにおける代謝が亢進していることが明らかとなった。また、解糖系の抑制時にはオートファジーが亢進し、増加したアミノ酸がTCA回路の原料となっていることが見出された。さらに、ミトコンドリア特異的オートファジーであるマイトファジーの活性化によってミトコンドリアが賦活化され、代謝リプログラミングに寄与している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん薬物治療を行ううえでがん細胞内の代謝環境のリプログラミングは、治療の失敗を招きかねない重要な問題である。がん細胞は特に解糖系に強く依存して生存しているが、その抑制時にはミトコンドリアを賦活化させて生存し続けることが明らかとなった。つまり、解糖系の阻害のみではなく、代謝のリプログラミングを抑制することで、がんに対するより高い奏効率が得られることが期待された。特に、がん細胞特異的なミトコンドリア代謝系への変化やマイトファジーを抑制することで、副作用が少ない効率的ながん治療が行えると確信している。

研究成果の概要(英文)：Most cancer cells rely on glycolysis to generate ATP, even when oxygen is available. However, merely inhibiting the glycolysis cannot eradicate cancer cells because they have the potential to reprogram their intracellular metabolism to mitochondrial manner. Through metabolomic analyses using pancreatic cancer cells, the levels of all intermediates of the TCA cycle were dramatically reduced in glycolysis-suppressed cancer cells, indicating that mitochondrial metabolism was enhanced in these cells. It was also found that autophagy was continuously induced by the suppression of glycolysis. Several amino acids, glutamine and glutamate, produced by the autophagy was consumed in the TCA cycle for generating ATP. Furthermore, mitophagy, a selective autophagy that degrades damaged mitochondria, was activated, suggesting that the mitophagy contributes to the increase in mitochondrial function and metabolic reprogramming.

研究分野：医療薬学

キーワード：代謝リプログラミング 解糖系 ミトコンドリア オートファジー マイトファジー 膵臓がん メタボローム PINK1

1. 研究開始当初の背景

がん薬物治療を行ううえで薬物耐性・抵抗性は患者の予後をも揺るがす大きな問題である。その耐性機構は一次耐性と二次耐性に分類されるが、特に薬物治療を継続している中で生じる二次耐性は、患者の治療選択肢をも狭めてしまう。二次耐性が生じる機序として、薬物排出トランスポーターの発現亢進やシグナル伝達・アポトーシス関連分子の遺伝子変異などが従来から言われているが、近年、がん細胞内代謝環境のリプログラミングによりがん細胞が生き続けるための“抜け道”を作り出し、生存状態を維持していることが指摘されている。

がん細胞は、好氣的な環境下でも解糖系より生存エネルギーATPを産生する独特の代謝機構を有する。しかし、解糖系を抑制してもミトコンドリア代謝系を亢進させて生存し続けることが可能であることが示唆されてきており、自身の糖代謝系を巧みにリプログラミングしているものと考えられる。また、その糖代謝変動はオートファジー依存的であることや抗がん剤の曝露時にも起こることが見出されてきている。そこで、がん細胞内の代謝変動の仕組みを理解すれば、一見薬物耐性・治療抵抗性と考えられるがんに対しても、治療を成功に導けるはずである。

今日のがん薬物療法における問題点は、“がん細胞が死なない”または“増殖し続ける”様子を認めれば、安易に『抵抗性』を獲得したと片付けて薬物治療方針が変えられることにある。しかし実際は、細胞内の代謝環境が変化したことによって抗がん剤に対する効果が減弱している可能性も十分考えられる。よって、特に細胞内の代謝環境を緻密に理解し、どのような機序で代謝のリプログラミングが生じているのかを明らかにすることが、これからのがん治療を考えるうえで必須となる。

2. 研究の目的

本研究では、解糖系抑制時の糖代謝リプログラミングに焦点を当て、特に解糖系を抑制されたがん細胞がどのような代謝変動を示して生存し続けるのか、メタボローム解析などから詳細に明らかとすることを目的とした。また、解糖系抑制時の代謝変動を見るうえで、ATP産生オルガネラであるミトコンドリアに着目することも重要である。そこで、あまり明らかにされていないがん細胞におけるミトコンドリアの機能が、解糖系の抑制時にどのように変動し、ミトコンドリアによる代謝回転がどのような代謝物によって駆動されているのか検討した。さらに、解糖系を抑制したがん細胞でオートファジーが亢進することが示唆されていることから、ミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーについても評価することで、糖代謝リプログラミングの制御様式を広く検討した。糖代謝リプログラミング時にマイトファジーが亢進することで、ミトコンドリアの新陳代謝・ミトコンドリア機能の賦活化が進み、がん細胞が効率的にATPを得るようになっていていると考えている。しかし、そのような働きを担いうるがん細胞におけるマイトファジーの制御機構についてはほとんど明らかとされておらず、その機構にも触れることで、将来的に代謝リプログラミングを標的とした新規がん治療戦略に繋げることを期待する。ここで、難治性のがん細胞として、膵臓がん細胞を主な細胞として用いた。

3. 研究の方法

(1) 解糖系抑制時のミトコンドリア機能評価

ヒト膵がん細胞株としてPANC-1細胞を用い、培養液であるRPMI1640中の糖源を通常の2 g/Lのグルコース(Glc)から2 g/Lのガラクトース(Gala)や0.2 g/Lの低濃度グルコース(Low-glc)に置換することで解糖系の抑制を図った。また、解糖系抑制時のミトコンドリア機能を、ミトコンドリア染色試薬であるJC-1を用いて評価した。ミトコンドリアの膜電位が上昇すると、ミトコンドリア内に取り込まれたJC-1はモノマーからポリマーとなり、励起波長および蛍光波長の組み合わせが490および530 nmから525および590 nmへと変化する。データは共焦点顕微鏡LSM700を用いて取得した。さらに、解糖系の抑制に伴うミトコンドリア呼吸の亢進を、PreSens Sensor Dish Readerを用いて培地中の酸素濃度の減少を指標に測定した。加えて、解糖系抑制時のPANC-1細胞のミトコンドリア代謝への依存度を、ミトコンドリアATP合成酵素(ミトコンドリア複合体V)の阻害薬であるOligomycin(20 ng/mL)の曝露後にCellTiter-Gloを用いて細胞内ATP量を測定することで評価した。

(2) 解糖系抑制時の細胞内代謝変動の評価

解糖系の抑制に伴うPANC-1細胞内代謝環境の変化をキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置CE-TOFMSを用いたメタボローム解析によって評価した。具体的には、PANC-1細胞を5%マンニトール溶液で洗浄し、メタノールにて溶解した後に水/クロロホルム溶液を加えて除タンパクを行い、水相に含まれる中心炭素代謝を中心とした110の代謝物の濃度をCE-TOFMSを用いて検量した。

(3) オートファジーとマイトファジーの評価

解糖系抑制時のオートファジー活性については、オートファゴソームマーカーLC3 のフラックスアッセイによって評価した。具体的には、それぞれの糖源を含む培地中で培養した PANC-1 細胞を 10 μ M の Chloroquine 存在下で 48 時間さらに培養し、その後に細胞を固定して細胞内に蓄積した LC-3 を免疫染色によって確認した。また、オートファゴソームの形成に関して、電子顕微鏡を用いた観察も行った。ここでは、培養ディッシュ上の PANC-1 細胞を 2.5% の glutaraldehyde で固定し、細胞の回収後に四酸化オスmiumによる後固定を行った。次に、エタノールで十分に脱水を行い、エポキシ樹脂に包埋した後、70 nm の薄切を作製し、JEM-1400 電子顕微鏡を用いて 4,000~10,000 倍の電子顕微鏡像を取得した。

解糖系抑制時のマイトファジー活性については、ミトコンドリアへのターゲティング配列を付加した Keima-Red (mtKeima) ベクターを細胞に導入し、励起波長の変化を共焦点顕微鏡 LSM700 で捉えることによって評価した。マイトファジーが亢進した場合には、ミトコンドリアが酸性環境下に置かれるため、ミトコンドリアに局在した mtKeima の励起波長が中性環境下の 440 nm から 586 nm へと変化する (実際には 488 および 555 nm の励起光を当てた)。

(4) 解糖系抑制時のミトコンドリア TCA 回路駆動力の評価

解糖系を抑制された PANC-1 細胞におけるグルタミン・グルタミン酸の利用を評価するにあたって、グルタミン酸から α -ケトグルタル酸への変換を制御する glutamate dehydrogenase 1 (GDH1) の阻害剤である Epigallocatechin gallate (EGCG) を用いた。それぞれの糖源を含む培地中で培養した PANC-1 細胞を 25 μ M の EGCG 存在下で 48 時間さらに培養し、細胞の生存率を MTT アッセイによって評価した。GDH1 の阻害に加えて、dimethyl- α -ketoglutarate (DM- α -KG、2 mM) を用いた α -ケトグルタル酸のレスキュー実験も併せて行った。

(5) PTEN-induced kinase 1 (PINK1) 依存的なミトコンドリア機能の評価

PINK1 はセリン/スレオニンキナーゼであり、正常細胞ではマイトファジーによるミトコンドリアの新陳代謝を促進させる働きを有する。解糖系抑制時の PINK1 の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR 法によって定量した。また、siRNA を用いて PINK1 の発現をノックダウンした際のミトコンドリア膜電位の低下を、JC-1 による染色像の共焦点顕微鏡 LSM700 を用いた観察から確認した。

4. 研究成果

(1) 解糖系抑制に伴うミトコンドリアの賦活化

PANC-1 細胞の培養液中の糖源を Glc から Gala や Low-glc に置換することで、培養液中への乳酸の放出量が顕著に減少したことから、解糖系の抑制が確認された。解糖系の抑制によって細胞増殖速度の低下も観察されたが、細胞の生存率はほぼ変化せず、解糖系の抑制時に細胞内代謝システム・ATP 獲得経路をリプログラミングすることで生存を維持していることが示唆された。

そこで、解糖系抑制時のミトコンドリア活性を評価したところ、JC-1 ポリマーの蓄積量の増加が認められ (図 1 a))、ミトコンドリア膜電位の上昇が観察された。また、解糖系の抑制時に培地中の酸素消費速度が増加したこと (図 1 b))、解糖系の抑制によってミトコンドリア呼吸が亢進し、ミトコンドリアの賦活化が起きていたと考えられる。そこで、解糖系を抑制した PANC-1 細胞がミトコンドリアの酸化的リン酸化による ATP 供給に依存して生存しているのか検討したところ、Oligomycin に対する感受性の顕著な増大が認められ (図 1 c))、ミトコンドリアへの強い依存が示唆された。

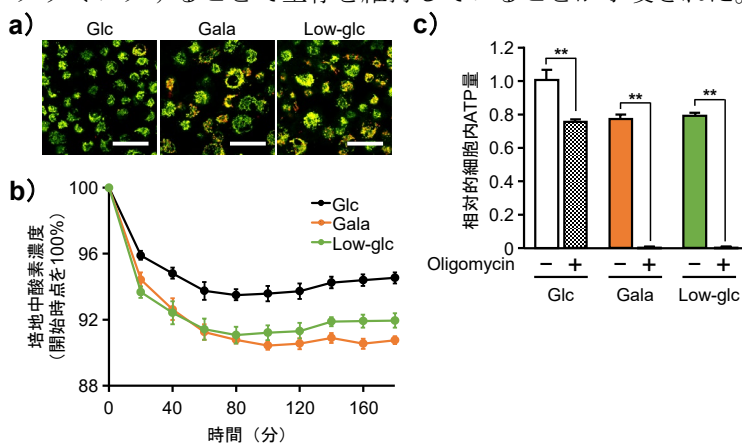


図1. PANC-1細胞における解糖系抑制時のミトコンドリア活性の上昇

- a) それぞれの糖源で培養したPANC-1細胞をJC-1で染色し、488 nmまたは555 nmで励起した際のJC-1の蛍光強度を観察した。(スケールバー: 50 μ m)
b) それぞれの糖源で培養したPANC-1細胞の培地中酸素濃度を測定した。(N=3、平均値 \pm SD)
c) それぞれの糖源で培養したPANC-1細胞のOligomycinに対する感受性を評価した。ANOVAの後にBonferroni解析を行った。(N=3、平均値 \pm SD、** P < 0.01)

(2) 解糖系抑制に伴う細胞内代謝のダイナミックな変動

解糖系を抑制された PANC-1 細胞は、ミトコンドリアが賦活化されてその機能が亢進しており、特に酸化的リン酸化を介した ATP 供給に強く依存して生存していることが示唆された。よって、解糖系やミトコンドリアにおける TCA 回路など、細胞内代謝環境も大きく変化していることが想定された。

そこで、CE-TOFMS を用いたメタボローム解析によって、中心炭素代謝に関係する解糖系や TCA 回路、アミノ酸などの 110 の代謝物量を測定したところ、確かに Gala や Low-glc といった解糖系の抑制環境下において、TCA 回路の中間産物の減少や多くのアミノ酸の増加が観察された (図 2)。また、Gala や Low-glc の条件で認められた代謝物量の変化は、Oligomycin (0.8 ng/mL) の処理によって抑制された (図 2)。解糖系の抑制によって多くのアミノ酸量が増加した一方で、グルタミンやグルタミン酸、アスパラギン酸の量は顕著に低下しており、糖代謝のリプログラミングに利用された可能性が考えられる。また、TCA 回路の中間産物の減少も、回路の亢進により消費された結果ではないかと想定された。これらの結果から、糖代謝を中心とした細胞内代謝のリプログラミングは、ミトコンドリア機能依存性的であることが示唆された。

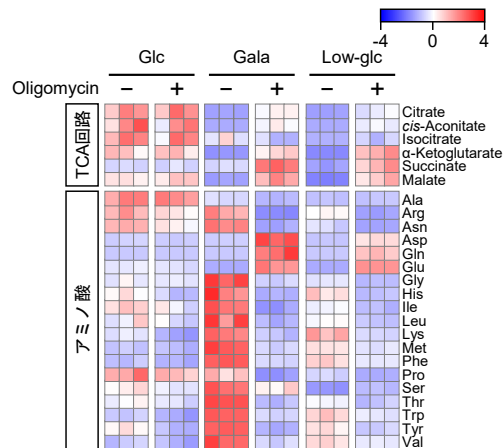


図2. PANC-1細胞における解糖系抑制に伴う細胞内代謝物の変動
Oligomycin存在下 (+) または非存在下 (-) において、それぞれの糖源で培養したPANC-1細胞より代謝物を抽出し、CE-TOFMSを用いてその量を測定した。細胞内タンパク質量で補正後、Zスコアによるヒートマップとして表した (青から赤になるにつれて量的に多いことを示している)。(N=2)

(3) 解糖系抑制に伴うオートファジー・ミトファジーの亢進

CE-TOFMS を用いたメタボローム解析から、解糖系の抑制された PANC-1 細胞では、大半のアミノ酸量が顕著に増加していることが明らかとなった。細胞内のアミノ酸の代表的な供給経路の一つとして、タンパク質分解系であるオートファジーが挙げられる。そこで、解糖系の抑制された PANC-1 細胞においてオートファジーが亢進しているのか、その活性をフラックスアッセイによって評価した。その結果、確かにフラックスを止める Chloroquine の存在下でオートファゴソームマーカー LC3 の顕著な蓄積が認められ

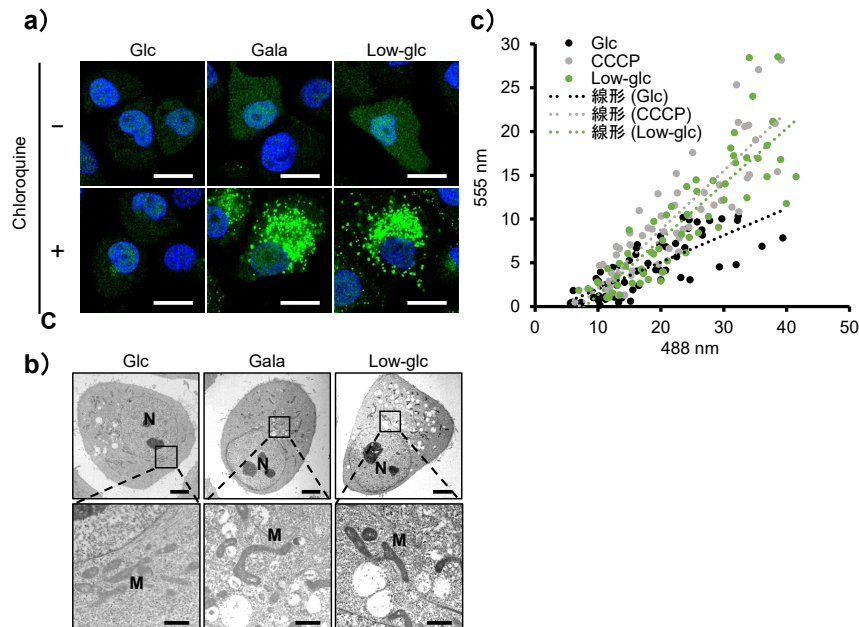


図3. 解糖系が抑制されたPANC-1細胞のオートファジー・ミトファジーの上昇

a) それぞれの糖源で培養したPANC-1細胞をChloroquineの存在下・非存在下でさらに培養し、細胞の固定後、内因性のLC3を染色した。ドット状のLC3がオートファゴソームの形成を表している。(スケールバー: 20 μ m, 緑: LC3, 青: 核)
b) それぞれの糖源で培養したPANC-1細胞を固定した後、電子顕微鏡によって細胞内構造を観察した。(スケールバー (上段): 5 μ m, スケールバー (下段): 1 μ m, N: 核, M: ミトコンドリア)
c) それぞれの糖源で培養したPANC-1細胞中のミトファジー活性を、導入したmtKeimaの励起波長の変化から評価した。それぞれの波長で励起した際の蛍光強度を示しており、励起波長555 nmにおける蛍光強度が強いほど、ミトファジーが亢進していることを表している。CCCP (ミトコンドリアの脱共役剤) は陽性対照である。

(図 3 a))、解糖系を抑制された PANC-1 細胞におけるオートファジーの亢進が示唆された。

次に、電子顕微鏡を用いた細胞内構造の観察から、ミトコンドリアの活性化やオートファジーの亢進が認められるか評価を行った。その結果、Gala や Low-glc といった解糖系を抑制された PANC-1 細胞では、ミトコンドリア内の電子密度の上昇や fusion・fission と思われる構造体が認められたことから (図 3 b))、ミトコンドリアの機能が亢進し、その活性も高い状態で維持されていることが示唆された。また、オートファゴソームと考えられる細胞内の膜構造体も多数観察され (図 3 b))、解糖系の抑制によってオートファジーが活発に起きていることが確認できた。

これらの結果を踏まえ、さらに、ミトコンドリア選択的オートファジーであるミトファジーが亢進することでミトコンドリアの新陳代謝・機能維持が行われている可能性を検討した。その結果、解糖系の抑制時には、ミトコンドリアに局在する mtKeima が酸性環境下に置かれやすいことが分かり (図 3 c))、ミトコンドリアとリソソームとが融合して起こるミトファジーが亢進していることが示唆された。ゆえに、糖代謝リプログラミングにおけるオートファジーやミトファジーの関与が考えられた。

(4) 解糖系抑制時の TCA 回路へのアミノ酸の流入

先述のとおり、メタボローム解析の結果から、他のアミノ酸と比して、グルタミンやグルタミン酸、アスパラギン酸の量は顕著に低下しており、糖代謝リプログラミング時に利用されていた可能性がある。中でも、グルタミン・グルタミン酸は、 α -ケトグルタル酸へと変換されて TCA 回路に流入することができる。よって、その可能性を検証するため、グルタミン酸から α -ケトグルタル酸への変換酵素 GDH1 を EGCG を用いて阻害したところ、解糖系の抑制時には顕著に細胞生存率が低下した (図 4)。また、この影響は、 α -ケトグルタル酸 (DM- α -KG) の添加によって回復した (図 4)。以上の結果から、解糖系を抑制された PANC-1 細胞では、グルタミン・グルタミン酸を TCA 回路へ流入させて ATP 産生を亢進させていることが示唆された。

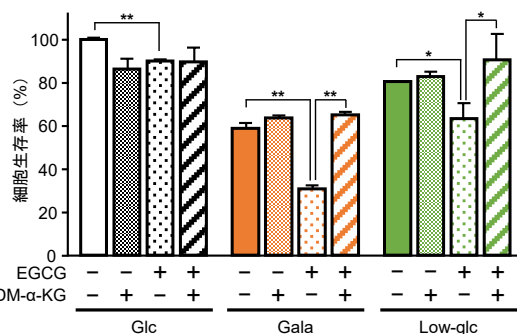


図4. 解糖系が抑制されたPANC-1細胞へのグルタミン酸の流入
それぞれの糖源で培養したPANC-1細胞をEGCGやDM- α -KGの存在下・非存在下でさらに培養し、MTTアッセイによって細胞生存率を評価した。ANOVAの後にBonferroni解析を行った。(N=3、平均値 \pm SD、* P < 0.05、** P < 0.01)

(5) 解糖系抑制時の PINK1 依存的なミトコンドリア機能の調節

正常細胞におけるマイトファジーは PINK1 によって制御されることがよく知られている。そこで、解糖系抑制時のがん細胞においても同様に PINK1 による制御がある可能性を考え、PANC-1 細胞における PINK1 発現を確認したところ、その mRNA の有意な上昇が認められた (図 5 a)。また、PINK1 の発現を siRNA を用いて抑制したところ、解糖系の抑制に伴う JC-1 ポリマーの蓄積が抑制された (図 5 b)。ゆえに、PINK1 依存的なマイトファジーが解糖系抑制時の PANC-1 細胞におけるミトコンドリア機能調節や代謝リプログラミングに関与していることが示唆された。

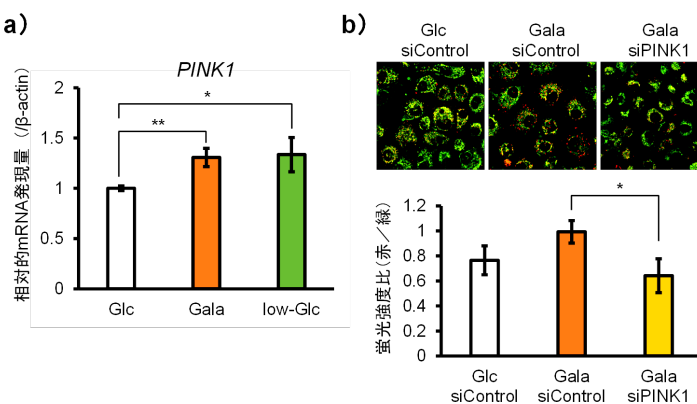


図5. PANC-1細胞におけるPINK1依存的なミトコンドリア膜電位の上昇
a) それぞれの糖源で培養したPANC-1細胞におけるPINK1のmRNA発現を定量した。B-actinのmRNA発現量で補正を行った。ANOVAの後にBonferroni解析を行った。(N=3、平均値 \pm SD、* P < 0.05、** P < 0.01)
b) GlcまたはGalaで培養したPANC-1細胞をJC-1で染色し、488 nmまたは555 nmで励起した際のJC-1の蛍光強度を観察した。グラフは5視野の平均値を示している。ANOVAの後にBonferroni解析を行った。(N=3、平均値 \pm SD、* P < 0.05)

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 Aoki Shigeki, Shimizu Kengo, Ito Kousei	4. 巻 527
2. 論文標題 Autophagy-dependent mitochondrial function regulates osteoclast differentiation and maturation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 874 ~ 880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.04.155	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 Shiratori Reika, Furuichi Kenta, Yamaguchi Masashi, Miyazaki Natsumi, Aoki Haruna, Chibana Hiroji, Ito Kousei, Aoki Shigeki	4. 巻 9
2. 論文標題 Glycolytic suppression dramatically changes the intracellular metabolic profile of multiple cancer cell lines in a mitochondrial metabolism-dependent manner	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18699
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-55296-3	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10件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 青木重樹、宮崎菜摘、青木春菜、古市健多
2. 発表標題 膵臓がん細胞における解糖系抑制時のミトコンドリア活性
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 古市健多、青木春菜、宮崎菜摘、青木重樹
2. 発表標題 細胞内代謝に着目した非小細胞肺癌細胞における分子標的薬に対する薬剤寛容機構の検討
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 青木春菜、古市健多、宮崎菜摘、伊藤晃成、青木重樹
2. 発表標題 膵臓がん細胞における細胞内エネルギー代謝に与えるLSD1阻害剤SP2509 の影響
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宮崎菜摘、白鳥麗香、青木重樹
2. 発表標題 膵臓がん細胞におけるPINK1依存的ミトファジーの代謝リプログラミングへの関与
3. 学会等名 日本薬学会 第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Reika Shiratori, Kenta Furuichi, Shigeki Aoki, Kousei Ito
2. 発表標題 Reprogramming of energy metabolism via autophagy in pancreatic cancer cells
3. 学会等名 19th Symposium for Gene Design and Delivery (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白鳥麗香、古市健多、伊藤晃成、青木重樹
2. 発表標題 がん細胞における解糖系抑制時の糖代謝リプログラミング
3. 学会等名 第7回 がん代謝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古市健多、白鳥麗香、伊藤晃成、青木重樹
2. 発表標題 非小細胞肺癌における分子標的薬による細胞内エネルギー代謝変動の理解
3. 学会等名 第7回 がん代謝研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古市健多、白鳥麗香、青木重樹
2. 発表標題 非小細胞肺癌における分子標的薬による細胞内エネルギー代謝変動の理解
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 白鳥麗香、古市健多、青木重樹
2. 発表標題 がん細胞における解糖系抑制時の糖代謝リプログラミング
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 Shigeki Aoki
2. 発表標題 Cellular energy metabolic reprogramming and homeostasis -Mitochondria and autophagy-
3. 学会等名 Dean 's Grand Rounds, Fac. Of Pharmacy & Pharm Sciences, University of Alberta (招待講演) (国際学会)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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