

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590457

研究課題名(和文) Drs 癌抑制遺伝子による代謝シフト制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of metabolic shift by drs tumor suppressor gene

研究代表者

巨部 幸博 (Tambe, Yukihiro)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50283560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：drs遺伝子は、癌細胞のアポトーシスやオートファジーを制御する癌抑制遺伝子だが、正常細胞における役割は未詳である。本研究ではdrs遺伝子欠損細胞において、乳酸脱水素酵素(LDH)の蛋白発現と酵素活性の上昇を介して、好氣的条件下でも解糖系が優位になるグルコース代謝のシフト(ワールブルグ効果)が生じることを明らかにした。drsが解糖系の調節に関与し、癌の悪性化過程で見られるdrsの発現消失が、ヒト癌でのワールブルグ効果の誘導に寄与すると考えられた。また癌細胞へのdrs遺伝子導入やLDH阻害剤が代謝シフトや癌化形質を抑制することも見出し、新しい癌治療法への応用が期待された。

研究成果の概要(英文)：The drs gene is the tumor suppressor gene that regulates apoptosis and autophagy in cancer cells. However, its physiologic function in normal cells is unclear. In this study, by using drs knockout (KO) mouse embryonic fibroblast cells, we found that genetic loss of drs induces the metabolic shift toward aerobic glycolysis by increasing the expression and activity of lactate dehydrogenase (LDH). It is suggested that drs participates in the regulation of glucose metabolism and down-regulation of drs during tumorigenesis is involved in the induction of Warburg effect in human cancers. We also found that the induction of drs into KO cells and the treatment of cancer cells with LDH inhibitor could suppress the metabolic shift and the malignant transformation. Further investigations will contribute toward developing a new anticancer therapy.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：実験病理学

キーワード：癌 代謝 癌抑制遺伝子 メタボローム

1. 研究開始当初の背景

drs は、ウイルス癌遺伝子 *v-src* による細胞癌化を抑制するものとして我々が新規に分離した癌抑制遺伝子である。*drs* mRNA は、ほぼすべての正常組織で恒常的に発現しているが、大腸癌、膀胱癌、肺癌、成人T細胞白血病など、様々なヒト癌において、悪性化に伴って *drs* mRNA の発現が消失しており、ヒト癌の発生にも密接に関与していると考えられる。我々はこれまで、*drs* はさまざまなストレスシグナルを受けて、アポトーシスやオートファジーなど多様なストレス応答を誘導することを明らかにしており、細胞のストレスシグナル伝達の調節分子としての機能を担っていると考えられたが、正常細胞における本来の生理機能は解明されていない。申請者は、正常細胞において *drs* の遺伝子発現が消失するとワールブルク効果様の代謝シフトが起きることを見いだした。

ヒト癌ではグルコース取込みの亢進や、好気条件下でも解糖系が優位となるグルコース代謝の変化である「ワールブルク効果」が生じることが古くから知られている。ワールブルク効果の誘導は、ヒト癌の悪性化と密接に関係すると考えられているが、その分子機構を含めて、まだ未解明な点も多い。

2. 研究の目的

本研究は癌抑制遺伝子 *drs* が制御する代謝シフトの機構解明と、癌の悪性化との関連について、主に以下の点について明らかにすることを目的とする。

(1) *drs* 遺伝子の発現消失と代謝シフトの関連は？ (現象の解明)

① *drs* ノックアウト (KO) マウス由来線維芽細胞 (MEF) では代謝物質群がどう変化するか (ワールブルク効果と同じ現象か?)

② Drs KO MEF に *drs* 遺伝子を導入することで、代謝シフトをキャンセルできるか。

・他の細胞 (筋細胞、脂肪細胞、ヒト癌細胞の初期/後期) でも MEF と同じ現象が見られるか。

(2) *drs* 発現消失による代謝シフト誘導のメカニズムは？ (分子機構の解明)

① *drs* の発現のある/なしで、細胞の解糖・呼吸系の代謝酵素の発現や活性はどう変わるのか。

② *drs* が制御するエネルギー代謝制御分子の探索と、制御のメカニズムの検討。

③ *drs* は酸化ストレスや低酸素ストレス時に生じる代謝系の変化の調節にも関与しているのか。

(3). *drs* 発現消失による代謝シフト誘導の生体での役割は？ (病理的意義の解明)

① *drs* が制御する代謝シフトは癌などの疾患の発生に影響しうるのか。

3. 研究の方法

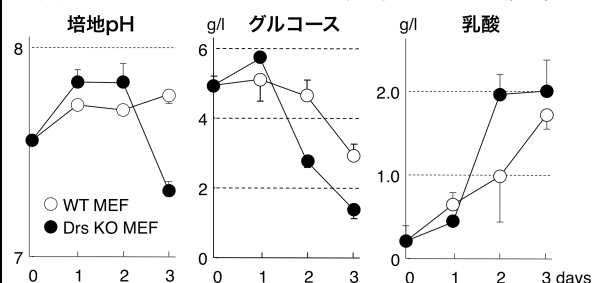
(1) 野生型 (WT) MEF と Drs KO MEF を通常条件下で培養したときの代謝産物の変化を明らかにする。細胞外 pH やグルコース消費量、乳酸産生の変化を検討し、さらにメタボローム解析によって細胞内代謝産物を網羅的に解析し、どのような代謝経路に変化が生じているかを明らかにする。また Drs KO MEF への遺伝子再導入実験を行い、*drs* が直接、代謝調節能を有するかどうかを検証する。

(2) WT MEF および Drs KO MEF において、各種のグルコース代謝調節分子の発現やリン酸化等による活性化を、ウェスタンブロッティングや定量 RT-PCR などの手法を用いて比較検討し、Drs KO MEF で生じる代謝シフトが、どのようなメカニズムによるものかを明らかにする。

(3) Drs KO MEF および *drs* が発現抑制されているヒト癌細胞株について、上記 (2) で特定した *drs* が作用する代謝調節分子の発現の変化をウェスタンブロッティングなどの手法を用いて検討する。またこれらの細胞において、グルコース代謝調節と悪性化進行の関連を調べるため、軟寒天法 (ソフトアガーアッセイ) やヌードマウス造腫瘍法を用いた実験を行う。

4. 研究成果

(1) *drs* によるグルコース代謝シフトの調節



① 通常条件下での培養において、Drs KO MEF では WT MEF に比べて培地 pH の顕著な低下が認められた。このとき培地中のグルコース消費量と乳酸産生量が Drs KO MEF で増加していることから、グルコース代謝系のうち解糖系が好气的条件下でも亢進する、好气的解糖あるいはワールブルク効果と同様の現象であることが示唆された。

② メタボローム解析の結果から Drs KO MEF では、細胞外 pH 等に変化が生じるのに先立って、既に複数の細胞内代謝物の濃度に WT MEF との違いが認められた。これらの解析から、Drs KO MEF では解糖系およびそこから分岐するペントースリン酸経路が活性化していることが示唆された。一方でクエン酸回路の亢進は認められなかった。このことからグ

ルコース代謝全体の活性化ではなく、解糖系優位となる代謝シフトであることを確認した。この現象をさらに、フラックスアナライザーを用いて、生細胞における酸素消費速度および細胞外酸化速度を測定して確認した。なお Drs KO MEF では酸素消費速度自体には有意な変化は認められなかったものの、ミトコンドリアの予備酸化能が低下していることを見いだしており、呼吸以外の細胞での酸素消費に関しても何らかの代謝シフトが生じている可能性が示唆された。

③ メタボローム解析の結果、アミノ酸や核酸代謝にも変化が生じていることを見だし、Drs KO MEF においては癌細胞の増殖促進に繋がる、物質代謝が亢進していることも明らかになった。さらに培養期間を延長した際のメタボローム解析の結果から、培養後期になるとさらに多くの代謝物の変化が認められた。このことは、*drs* 遺伝子の消失に伴う代謝変化が、細胞の生育環境にも影響を及ぼし、それによって生じる環境ストレスからのフィードバックを受けて、さらに細胞内代謝が変化する機構が存在することが示唆された。

④ Drs KO MEF にレトロウイルスベクターを用いて *drs* 遺伝子再導入を行った結果、ベクターのみを導入した細胞と比べて、細胞外酸化速度の低減が認められた。これらの結果から、*drs* は細胞のグルコース代謝経路のうち、解糖系を抑制的に制御する活性を有することが示唆された。

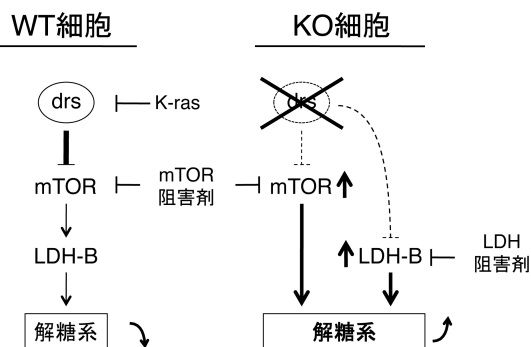
(2) *drs* が調節する代謝制御経路と標的分子

① 解糖系の制御と発癌の両方に関与することがこれまで報告されているタンパク質のうち、細胞内ピルビン酸代謝を調節する、LDH-A, LDH-B, PDK4 の発現が、Drs KO MEF で上昇していることを見いだした。細胞外酸化速度のタイムコースとの相関から、特に LDH-B の発現上昇が、Drs KO MEF における解糖系の亢進に重要であると考えられた。

② Drs KO MEF での LDH-B 発現上昇のメカニズムを検討した結果、*LDH-B* mRNA の転写レベルは WT MEF に比べてむしろ抑制されていた。一方、³⁵S 取り込み法によって、 α -tubulin などの細胞内タンパク質合成が抑制されているのに対し、LDH-B タンパク質の新規合成が亢進していることを見いだした。我々はこれまでにウイルス感染時に Drs KO MEF では宿主細胞のタンパク合成が抑制される一方で、ウイルスタンパク合成が特異的に亢進する現象を見いだしており、同様のタンパク合成過程での調節機構の関与が示唆された。

③ *drs* による LDH-B の発現調節のメカニズムが mTOR 経路を介するものかどうかを検討す

るため、mTOR 標的タンパク質の活性化や mTOR 阻害剤を用いた解析を行った。*drs* 遺伝子が正常に働く WT MEF では、細胞増殖に伴って *drs* mRNA の発現が上昇し、これと相関して mTOR 活性の低下が認められ、また mTOR 阻害剤によって LDH-B タンパク発現が抑制されたことから、*drs* が mTOR 経路を介して LDH-B 発現を調節する可能性が示唆された。一方、Drs KO MEF では増殖に伴う mTOR 活性の低下は見られなかったが、mTOR 阻害剤による処理とは無関係に LDH-B タンパクの過剰発現が認められた。このことから、*drs* 発現のあるなしによって、LDH-B の発現は異なるメカニズムによって調節されていることが示唆された。



④ *drs* が解糖系以外に、ミトコンドリアの予備酸化能 (spare capacity) やペントースリン酸経路の調節に関与する可能性が示唆されたことから、酸化ストレス応答との関連について検討を行った。Drs KO MEF では過酸化水素に対する感受性が増加しており、*drs* が抗酸化シグナルの制御に関与する可能性が示唆された。Drs KO MEF においては HIF や Nrf2 等の酸化ストレス関連タンパク質の増加は認められず、これらとは別のメカニズムで抗酸化応答に関与する可能性が示唆された。

(3) *drs* による代謝シフト調節の病理的意義

① WT MEF と Drs KO MEF の細胞癌化能について検証した結果、*drs* 遺伝子を欠損させた場合で、転移浸潤能の指標であるマトリゲルアッセイでは有意な亢進が認められたが、足場依存性増殖の指標であるソフトアガーアッセイや、*in vivo* 造腫瘍能の指標であるヌードマウス造腫瘍試験では、顕著な亢進が認められなかった。一方、ヒト癌の発症との関連が報告されている活性型 *K-Ras* を両細胞に遺伝子導入した場合、これらの細胞癌化能は、Drs KO MEF において顕著かつ有意に亢進された。このことから解糖系への代謝シフトは細胞癌化の悪性化進行に密接に関与するが、それ単独では、細胞癌化の十分条件にはならないことが示唆された。

② LDH 阻害剤であるオキサム酸ナトリウムは、WT および Drs KO MEF において、解糖系亢進の指標である細胞外酸化速度を抑制した。

またオキサム酸ナトリウムはソフトアガーアッセイでのコロニー形成を部分的に抑制し、LDH 阻害剤が本実験系において抗腫瘍活性を示すことが明らかになった。

③ 癌細胞株を含む各種のヒト細胞株について *drs* mRNA の発現と LDH-B 発現の関連を検討したところ、*drs* が発現抑制されている癌細胞株では、正常なヒト細胞株 (HUVEC, WI38 など) に比べて LDH-B の発現が亢進していることが明らかになった。またこれらの LDH-B 高発現の癌細胞株を、LDH 阻害剤で処理したところ、ソフトアガーアッセイでのコロニー形成が抑制された。このことから、ヒト癌においても *drs* の遺伝子発現と LDH-B 発現亢進には相関が認められることと、LDH 阻害剤の、*drs* 発現消失したヒト癌治療への応用も期待された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Yukihiro Tambe, Chul Jang Kim, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Takahiro Isono, Hiromichi Sonoda, Tomoharu Shimizu, Gen Kondoh, Hirokazu Inoue. Female-specific rectal carcinogenesis in cyclin D1b transgenic mice. *Carcinogenesis*. 査読有, Vol 35, 2014. 227-236.
doi: 10.1093/carcin/bgt293
- ② Yukihiro Tambe, Naomi Okuyama, Tatsuya Nakagawa, Akifumi Muramoto, Masahiro Hasebe, Tokuhiko Chano, Hirokazu Inoue. Suppression of viral replication by *drs* tumor suppressor via mTOR dependent pathway. *Cancer Letters*. 査読有 Vol. 314 2012, 82-91.
doi:10.1016/j.canlet.2011.09.015
- ③ Chul Jang Kim, Kanami Sakamoto, Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue. Opposite regulation of epithelial to mesenchymal transition and cell invasiveness by periostin between prostate and bladder cancer cells. *Int J Oncol*. 査読有, Vol.38, 2011, 1759-1766.
doi: 10.3892/ijo.2011.997

[学会発表] (計 10 件)

- ① Yukihiro Tambe, Chul Jang Kim, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Hirokazu Inoue. Molecular mechanism of female-specific rectal carcinogenesis in

cyclin D1b transgenic mice 第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸

- ② Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue. Molecular mechanism of the regulation of Warburg effect by the *drs* tumor suppressor gene. 第 72 回日本癌学会総会、2013 年 10 月 5 日、横浜
- ③ Chul Jang Kim, Yukihiro Tambe, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Hirokazu Inoue. Molecular mechanism of female specific rectal carcinogenesis in cyclin D1b transgenic mice. 第 72 回日本癌学会総会、2013 年 10 月 4 日、横浜
- ④ Yukihiro Tambe, Chul Jang Kim, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Takahiro Isono, Hiromichi Sonoda, Tomoharu Shimizu, Gen Kondoh, Hirokazu Inoue. Female-specific development of rectal cancers via serrated pathway in cyclin D1b-transgenic mice. 第 35 回分子生物学会年会、2012 年 12 月 14 日、福岡
- ⑤ Masahiro Hasebe, Akitsugu Yamamoto, Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue. *Drs* tumor suppressor gene is involved in regulation of Warburg effect. 第 35 回分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡
- ⑥ Hirokazu Inoue, Yukihiro Tambe, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Takahiro Isono, Gen Kondoh, Chul Jang Kim In vivo and in vitro oncogenic potential of human cyclin D1b variant. 第 71 回日本癌学会総会、2012 年 9 月 21 日、札幌
- ⑦ Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue. The *drs* tumor suppressor gene is involved in regulation of Warburg effect. 第 71 回日本癌学会総会、2012 年 9 月 20 日、札幌
- ⑧ Chul Jang Kim, Yukihiro Tambe, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Takahiro Isono, Gen Kondoh, Hirokazu Inoue. Studies on the oncogenic potential of rectal tumor developed in cyclic D1b transgenic mice. 第 71 回日本癌学会総会、2012 年 9 月 19 日、札幌
- ⑨ Yukihiro Tambe, Hirokazu Inoue. Role of the *drs* tumor suppressor in regulation of energy metabolism. 第 70 回日本癌学会総会、2011 年 10 月 3 日、名古屋

- ⑩ Chul Jang Kim, Yukihiro Tambe, Takahiro Isono, Ken-ichi Mukaisho, Hiroyuki Sugihara, Gen Kondoh, Hirokazu Inoue. Role of cyclin D1b variant in rectal tumorigenesis. 第70回日本癌学会総会、2011年10月3日、名古屋

[その他]

ホームページ等

<http://www.shiga-med.ac.jp/~hqmicro/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

旦部 幸博 (TAMBE, Yukihiro)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50283560