

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591313

研究課題名(和文) 合成致死性を応用した解糖系制御遺伝子の効率的網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive screening of glycolysis-related genes by synthetic lethality

研究代表者

坂本 毅治 (Sakamoto, Takeharu)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70511418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：解糖系は重要な代謝システムであるがその制御の全容は明らかでない。そこで、本研究では新規解糖系制御遺伝子を探索するためゲノムワイドshRNAライブラリーを用いたスクリーニングを実施し、5種類の遺伝子を同定した。その中でRNF126について詳細な解析を行った結果、RNF126はPDKのコピキチンリガーゼとして働くことで、ピルビン酸からアセチルCoAへの変換が促進することがわかった。RNF126欠損により軟寒天培地のコロニー形成やマウスでの造腫瘍能が抑制された。さらに、RNF126はがんのanoikis耐性に関わるERKシグナルにより発現誘導がかかることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Glycolysis is a vital metabolic system. However, our understanding on glycolysis remains limited. To identify new genes involved in glycolysis regulation, we have performed a genome-wide gene knockdown analysis in human lung carcinoma PC8 cells using a mitochondrial inhibitor oligomycin and an shRNA library carried by a lentiviral vector, and finally identified five genes. Among them, we further focused on RNF126. RNF126 was found to act as a ubiquitin ligase for PDKs, resulting in their proteasomal degradation. This decrease in PDK levels allowed pyruvate dehydrogenases to catalyze the conversion of pyruvate to acetyl CoA. Moreover, depletion of RNF126 in cancer cells suppressed colony formation in soft agar as well as tumorigenicity in mice. RNF126 expression was found to be under the control of the ERK signaling pathway, which is essential for anoikis resistance. Thus, RNF126 is an attractive molecule for treating cancer by selectively targeting anchorage-independent growth.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん 解糖系 スクリーニング コピキチンリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

解糖系は細胞質での一連のグルコース代謝反応であり、グルコース1分子から細胞のエネルギー源であるATPを2分子生成する。この代謝反応は酸素非依存的であるため、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化(OXPHOS)によるエネルギー産生が行えない低酸素下では、解糖系は細胞にとって重要なエネルギー産生源となる。また、マクロファージ、好中球、ES細胞や一部の幹細胞、癌細胞などは通常酸素下でも解糖系を主なエネルギー産生源にしていることが知られている(1、2)。解糖系が関連する疾患は、溶血性貧血、癌、免疫疾患、心不全、糖尿病など多岐にわたることから、解糖系を制御することは臨床的にも非常に重要である。解糖系酵素は20世紀前半に同定され、解糖系の酵素反応自体は生化学的に解明されており、現在では*in silico*での解糖系反応のシミュレーションも可能になってきている。しかし、解糖系の各分子の発現や活性がどのように制御されているか、解糖系というシステム全体がどのような細胞内・外のイベントと関連付けられているか、細胞種による解糖系への依存度が何に規定されているか、といった解糖系の制御レベルでの研究はまだ道半ばである。

2. 研究の目的

本研究では、酵母遺伝学等で良く用いられる「合成致死」の概念と、解糖系とOXPHOSを同程度利用してATP産生を行っている癌細胞株の特性を応用し、癌細胞株をOXPHOS阻害剤oligomycin存在下で培養することでATP産生での解糖系依存状態を作り出し、その際著しく生存・増殖が抑制されるshRNA配列を同定することで解糖系に直接影響を与える遺伝子を網羅的かつ効率よく同定し、同定された遺伝子の解糖系制御メカニズムと癌やなど疾患モデルでの解析を目指した。

3. 研究の方法

ゲノムワイドshRNAライブラリースクリーニング:

肺癌細胞株PC-8にゲノムワイドshRNAライブラリーであるGeneNet Human 50K siRNA Library (SBI)を導入したものを利用しスクリーニングを行った。oligomycinをライブラリー導入細胞へ加え、3日間培養する。この培養細胞群と溶媒だけを加えたコントロール培養細胞群からtotal RNAを回収し、逆転写を行い、siRNAカセット部分をPCRで増幅しAffymetrix U133+2 GeneChip Arrayで解析を行った。

4. 研究成果

肺癌細胞株PC-8にゲノムワイドsiRNAライブラリーGeneNet Human 50K siRNA Library (SBI)を導入し、溶媒またはoligomycinを加えた状態で細胞を3日間培養後、細胞群からtotal RNAを回収し、逆転写を行い、siRNAカセット部分をPCRで増幅しArray解析を行った。その結果、19の候補遺伝子のshRNA配列がoligomycin存在下で培養した細胞で変化していた。アレイ解析で選出された解糖系制御候補遺伝子に対して、再度shRNAを導入してノックダウン細胞を作製し、oligomycin存在下での培養を行った結果、5種類の遺伝子で再現がとれた。5種類の遺伝子のうち1種類はメカニズムが予想される代謝酵素であったが、他の4種類の遺伝子については代謝との関係が報告されていないことから、これら遺伝子の代謝への役割を解明することで新たな代謝制御機構が明らかになると考えられた。これら4遺伝子のうち、RNF126が先行研究で酸素分圧依存的に細胞増殖を制御する遺伝子として同定されていたことから(3)、RNF126とミトコンドリア機能について研究を進めた。

まず、ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231細胞でRNF126をノックダウンした際のメタボローム解析を行ったところ、通常培養下では大きな

変化は見られなかったが、浮遊培養下でTCAサイクルの代謝産物の低下が観察された。そこで、解糖系機能とミトコンドリア機能に着目してさらに解析を進めた結果、RNF126ノックダウンにより糖消費量は変化が見られないにも関わらず、解糖系最終代謝産物の乳酸産生の上昇、ミトコンドリアでの酸素消費およびATP産生の低下が観察され、これらの表現型は浮遊培養下で強まることが明らかとなった。続いて、RNF126の代謝制御のメカニズムの解析を行った結果、RNF126が、解糖系とミトコンドリアのTCAサイクルへの代謝フラックスの制御に関わるpyruvate dehydrogenase kinase (PDK)の分解を促進するユビキチンリガーゼであることを明らかにした。

RNF126について、造腫瘍能に対する影響を評価した結果、RNF126をノックダウンした乳癌細胞株MDA-MB-231、肺癌細胞株A549では、解糖系・TCAサイクルへのフラックス異常を反映して、造腫瘍能が低下し、がん細胞のアポトーシスが促進することが明らかとなった。また、がんで亢進していることが知られるERKシグナルがRNF126の発現を促進していることを明らかにした。

続いて、ヒト臨床検体におけるRNF126の発現についてデータベースを用いた解析を行った。Oncomineデータベースを用いた解析から、乳腺正常組織に比べ、乳がん組織でRNF126の発現が上昇していた。Prognoscanデータベースを用いた解析からRNF126の発現が高い乳癌患者群では遠隔転移無し生存期間の低下が確認された。これらの結果から、RNF126はヒトの乳がんで高発現し、乳癌の転移に関わることが明らかとなった。

以上の結果から、RNF126ががんで亢進しているERKシグナルの標的分子であり、エネルギー代謝を制御することで乳がんの悪性化に関わることが明らかとなった(4)。

<引用文献>

1. Cramer T et al., Cell, 2003;112:645-657
2. Gatenby RA and Gillies RJ. Nat. Rev. Cancer, 2004;4:891-899
3. Yoshino S et al., PLoS ONE, 2012;7(4):e35590.
4. Yoshino S et al., Cell Discov., in press.

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 6件)

1. Yoshino S, Hara T, Nakaoka HJ, Kanamori A, Murakami Y, Seiki M, Sakamoto T. The ERK-signaling target RNF126 regulates anoikis resistance in cancer cells by changing the mitochondrial metabolic flux. Cell Discovery, 査読有, in press.
2. Nakaoka HJ, Hara T, Yoshino S, Kanamori A, Matsui Y, Shimamura T, Sato H, Murakami Y, Seiki M, Sakamoto T. NECAB3 Promotes Activation of Hypoxia-inducible factor-1 during Normoxia and Enhances Tumorigenicity of Cancer Cells. Sci Rep., 査読有, 2016 Mar 7;6:22784. doi: 10.1038/srep22784.
3. Temma T, Hanaoka H, Yonezawa A, Kondo N, Sano K, Sakamoto T, Seiki M, Ono M, Saji H. Investigation of a MMP-2 Activity-Dependent Anchoring Probe for Nuclear Imaging of Cancer, PLoS One., 査読有, 2014 Jul 10;9(7):e102180.
4. Sakamoto T, Weng JS, Hara T, Yoshino S, Kozuka-Hata H, Oyama M, Seiki M. Hypoxia-Inducible Factor 1 Regulation through Cross Talk between mTOR and MT1-MMP. Mol Cell Biol., 査読有, 2014, 34(1), 30-42.

5. Nishida C, Kusubata K, Tashiro Y, Gritli I, Sato A, Ohki-Koizumi M, Morita Y, Nagano M, Sakamoto T, Koshikawa N, Kuchimaru T, Kizaka-Kondoh S, Seiki M, Nakauchi H, Heissig B, Hattori K. MT1-MMP plays a critical role in hematopoiesis by regulating HIF-mediated chemokine/cytokine gene transcription within niche cells. *Blood*, 査読有, 2012; 119(23):5405-16.

6. Yoshino S, Hara T, Weng JS, Takahashi Y, Seiki M, Sakamoto T. Genetic screening of new genes responsible for cellular adaptation to hypoxia using a genome-wide shRNA library. *PLoS ONE*, 査読有, 2012;7(4):e35590.

[学会発表](計 48件)

1. Takeharu Sakamoto et al., Control of metastatic niche formation by targeting APBA3/Mint3 in inflammatory monocytes, Tenth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, 2016/02/17, Maui (USA).
2. 坂本 毅治 他、RNF126 はミトコンドリアへの代謝フラックスの制御を介してがん細胞の足場非依存的な増殖を補助する、第 38 回日本分子生物学会年会、2015/12/4、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)。
3. 坂本 毅治 他、炎症性モノサイトにおける APBA3/Mint3 を標的とした転移ニッチ形成の制御、第 74 回日本癌学会学術総会、2015/10/9、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
4. 坂本 毅治 他、炎症性モノサイトにおける Mint3 を標的とした転移性ニッチの制御、第 33 回日本ヒト細胞学会学術集会(招待講演) 2015/08/22、ホテルスカイタワー(宮崎県宮崎市)
5. Takeharu Sakamoto et al., Control of metastatic niche formation by targeting APBA3/Mint3 in inflammatory monocytes, the 3rd Conference of the Japanese Association for Hypoxia Biology, 2015/07/26, 早稲田大学(東京都新宿区)
6. Takeharu Sakamoto, Roles of MT1-MMP in cancer malignancy: invasion, metabolism, and more!, 第 24 回日本がん転移学会学術集会・総会(招待講演), 2015/7/24, シティプラザ大阪(大阪府大阪市)
7. 坂本 毅治 他、Mint3 は炎症性モノサイトの解糖系と VEGF 産生を介して転移ニッチ形成を制御する、第 3 回がんと代謝研究会、2015/7/16、石川県立音楽堂交流ホール(石川県金沢市)
8. 坂本 毅治 他、炎症性モノサイトにおける Mint3 を標的とした転移性ニッチ形成の制御、第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2015/6/11、松山全日空ホテル(愛媛県松山市)
9. 坂本 毅治 他、線維芽細胞における Mint3 のがん悪性化における役割、第 13 回がんとハイポキシア研究会、2015/6/5、国立遺伝学研究所(静岡県三島市)
10. Takeharu Sakamoto et al., Control of metastatic niche formation by targeting Mint3 in inflammatory monocytes、平成 26 年度「個体レベルで

- のがん研究支援活動」ワークショップ、
2015/2/6、琵琶湖ホテル(滋賀県大津市)
11. 坂本 毅治 他、炎症性モノサイトにおける Mint3 を標的とした転移性ニッチの制御、日本癌学会シンポジウム、
2015/1/21、石川県立音楽堂交流ホール
(石川県金沢市)
 12. 坂本 毅治 他、HIF 活性化分子・Mint3 による炎症性モノサイトの機能制御ががん転移を促進する、第 37 回日本分子生物学会年会、2014/11/26、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 13. 坂本 毅治 他、炎症性モノサイトにおける Mint3 を標的とした転移性ニッチの制御、第 12 回がんとハイポキシア研究会、2014/11/21、ホテルマリターレ創世佐賀(佐賀県佐賀市)
 14. Takeharu Sakamoto et al., Role of the novel HIF activator Mint3 in macrophages, China-Japan Join Laboratory Workshop 2014, 2014/11/15, Beijing (China).
 15. Takeharu Sakamoto et al., Mint3 is a possible target for cancer therapy by regulating the tumor microenvironment, 第 73 回日本癌学会学術総会(招待講演), 2014/9/26, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 16. 坂本 毅治 他、Mint3 による炎症性モノサイトの遊走制御が E-selectin 発現誘導を介して転移を成立させる、第 23 回日本がん転移学会学術集会・総会、
2014/7/10、金沢市文化ホール・金沢ニューグランドホテル(石川県金沢市)
 17. Takeharu Sakamoto et al., Mint3 in monocytes/macrophages promotes cancer metastasis, 15th International Biennial Congress Metastasis Research Society, 2014/6/30, Heidelberg (Germany).
 18. 坂本 毅治 他、mTOR と MT1-MMP のクロストークを介した HIF-1 の制御、文部科学省新学術領域・がん支援「化学療法基盤支援活動」第 3 回 シンポジウム、
2014/5/12、万国津梁館(沖縄県名護市)
 19. 坂本 毅治 他、新規 HIF 活性化分子 Mint3 は単球・マクロファージにおいてがん転移を促進する、第 11 回がんとハイポキシア研究会、2013/12/14、東北大学片平さくらホール(宮城県仙台市)
 20. 坂本 毅治 他、新規 HIF 活性化分子 Mint3 は単球・マクロファージにおいてがん転移を促進する、第 36 回日本分子生物学会年会、2013/12/03、ポートアイランド神戸(兵庫県神戸市)
 21. 坂本 毅治 他、MT1-MMP/Mint3 を介した mTOR による HIF-1 活性化、第 1 回がん代謝研究会、2013/10/31、慶應義塾大学先端生命科学研究所(山形県鶴岡市)
 22. 坂本 毅治 他、マクロファージにおける Mint3 はがん転移を促進する、第 72 回日本癌学会学術総会、2013/10/4、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
 23. 坂本 毅治 他、新規 HIF 活性化分子 Mint3 のマクロファージでのがん悪性化における役割、第 22 回日本がん転移学会学術集会・総会、2013/07/11、ホテルブ

エナビスタ（長野県松本市）

24. 坂本 毅治 他、新規 HIF 活性化分子 Mint3 のマクロファージでのがん悪性化における役割、第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2013/06/13、国立京都国際会館（京都府京都市）

25. Takeharu Sakamoto et al., Mint3 promotes tumor malignancy in cancer and stromal cells, Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference（招待講演）, 2013/02/24, Maui (USA).

26. 坂本 毅治 他、新規 HIF 活性化因子・Mint3 の生体における機能の解析、第 85 回日本生化学会大会（招待講演）2012/12/14、福岡国際会議場（福岡県福岡市）。

27. Takeharu Sakamoto et al., Mint3 promotes tumor malignancy in cancer and stromal cells, 第 71 回日本癌学会学術総会（招待講演）, 2012/09/20, ホテルロイトン札幌（北海道札幌市）

他 21 件

〔図書〕（計 3 件）

1. 坂本毅治、メディカルレビュー社 THE LUNG perspectives 「MT1-MMP/Mint3 による HIF-1 活性化メカニズム」、vol.23 No.3、79-83, 2015

2. 坂本毅治、羊土社 実験医学、「生体における水酸化シグナルを介した低酸素応答」、2015 年 7 月号、1719-1723, 2015

3. 坂本毅治、南山堂：「次世代がん戦略研究 update がん基盤生物学 - 革新的シーズ育

成に向けて - 」、「13. MT1-MMP 及び周辺分子を標的としたがん組織制御薬剤の開発」、2013, p71-75.

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

1. 名称：Mint3 阻害剤

発明者：坂本毅治、清木元治、長田裕之、斉藤臣雄、近藤恭光、清水猛

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2015-53939

出願年月日：2015 年 3 月 17 日

国内外の別：国内

2. 名称：Mint3 阻害剤

発明者：坂本毅治、清木元治、長田裕之、斉藤臣雄、近藤恭光、清水猛

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2016/058408

出願年月日：2016 年 3 月 16 日

国内外の別：国外（PCT）

〔その他〕

ホームページ等

東京大学医科学研究所人癌病因遺伝子分野 HP

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/hitogan/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂本 毅治（SAKAMOTO, Takeharu）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70511418