

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430112

研究課題名(和文) 情報基盤定量法によるがんのワールブルグ効果の分子機構解明

研究課題名(英文) Elucidating the molecular mechanism of Warburg effect in cancer cells with iMRM

研究代表者

押川 清孝 (Oshikawa, Kiyotaka)

九州大学・生体防御医学研究所・研究員

研究者番号：50380051

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)：がん細胞においては好気条件下での解糖亢進(ワールブルグ効果)などの特殊な代謝が行われていることは古くから知られていたが、代謝システムの相互ネットワークによる複雑性のために、その全体像を捉えることが困難であった。本申請課題では、正常細胞とがん化細胞の差異を明らかにするために、われわれが開発した網羅的な代謝酵素の絶対定量システム『情報基盤定量法(iMRM)』を利用してワールブルグ効果の実体解明を試みた。その結果、がん化細胞特異的に上昇する代謝酵素群を特定した。これらを正常細胞に過剰発現させると、好气的条件下でのグルコース消費量および乳酸産生量が亢進し、ワールブルグ効果を引き起こすことが判明した。

研究成果の概要(英文)：The metabolic network is specific changed in cancer cells. Warburg effect (that is enhanced the glycolysis in normoxia) is first identified cancer-specific metabolic shift, but the precise mechanism is poorly understood. By comparing cancer cells with normal cells, we established cancer cell lines by oncogenes overexpression in normal diploid fibroblast. To quantify the metabolic enzyme levels in normal and cancer cell lines, we performed the in vitro proteome assisted MRM for protein absolute quantification (iMRM). We identified three metabolic enzymes which were upregulated in cancer cell lines. Overexpression of three metabolic enzymes in normal cells enhanced glucose consumption and lactate production in normoxia.

研究分野：プロテオミクス

キーワード：プロテオミクス がん代謝 ワールブルグ効果

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の特徴として無限増殖能・造腫瘍能・転移能の獲得に加え、好気条件下での解糖促進、いわゆるワールブルグ効果が古くから知られている。通常、好氣的条件下では正常細胞はミトコンドリアの好氣的呼吸鎖を利用することで大量のATPを得ることができる。一方、がん細胞は好氣的呼吸鎖を利用せずにATP産生効率の低い解糖系代謝経路を利用する。つまり、がん細胞は酸素状態に関わらず常に解糖系代謝が亢進している状態にある。その結果、がん細胞では乳酸産生量、グルコース取り込み量がともに増加しており、この特徴を利用して、がんの診断にPET (*positron emission tomography*) 検査が行われている。しかしワールブルグ効果を引き起こす分子機構は依然として不明の点が多く残されている。近年、解糖系代謝酵素であるピルビン酸キナーゼ M2 (PKM2) のスプライシングスイッチによる発現亢進がワールブルグ効果を引き起こすことが示された [Christofk, et al., *Nature* 2008]。このスプライシングスイッチに c-Myc の関与が知られていることから、非常に注目を集めた。さらに M2 アイソフォームの発現抑制が細胞増殖能を抑制することも示され、PKM2 発現がワールブルグ効果を引き起こすことで細胞がん化を促進している可能性も示唆された。しかしながら、他のグループが 31 種類のがん組織およびがん細胞株を用いて PKM2 のタンパク質の絶対定量解析を行い、PKM2 のがん特異的な発現量増加が認められないことを示した [Bluemlein, et al., *Oncotarget* 2011]。このように、がん細胞において最も古くから知られているワールブルグ効果すらその分子論的解釈は不十分であり、実際にはがん細胞で起きていると思われる複雑な代謝異常の解明には多大なる時間と労力を必要とすると思われる。

以上の背景を踏まえ、申請者は正常細胞とがん細胞における代謝酵素の網羅的かつ定量的な比較がワールブルグ効果の分子機構の解明の糸口を提供するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本申請課題は『情報基盤定量法』を用いた定量プロテオミクスから、がん細胞の細胞内代謝酵素の発現量情報を定量的に取得し、ワールブルグ効果の分子機構の解明に貢献することを目的とする。

3. 研究の方法

本申請課題では、『情報基盤定量法』による定量プロテオミクスを用いた細胞内代謝酵素量の大規模解析を行うことで、ワールブルグ効果の分子機構の理解に貢献する。具体的には以下の項目に従い目標達成を目指した。

1) 質量分析計を用いてペプチド座標の決定後、その情報を用いてこれらの代謝関連タンパク質の情報基盤定量法による同時検出法を確立する。

2) 本方法を用いてがん化モデル細胞の全代謝関連タンパク質の大規模絶対定量を行う。

3) がん化モデル細胞のメタボローム解析およびトランスクリプトーム解析を行う。

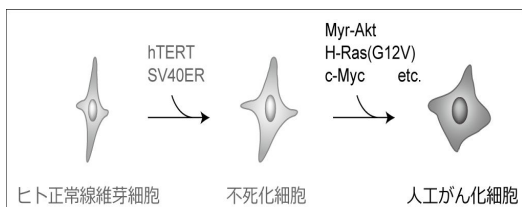
4) がん化に依存して変化する代謝酵素、代謝物および転写産物の定量情報を統合し、バイオインフォマティクスによる知識発見や仮説形成を行い、これをもとに実証実験を遂行する。

4. 研究成果

【人工がん化細胞の樹立】

本来、ワールブルグ効果はがん組織を用いて古典的な実験手法において見出された現象であり [Warburg, *Science* 1956]、

これまでに培養細胞株を用いてワールブルグ効果を再現した例はほとんどない。種々のがん細胞株を用いた予備的検討においても、われわれはワールブルグ効果を確認することはできなかった。そこで細胞株でのワールブルグ効果を検出する



ため、正常細胞へのがん遺伝子導入により人工的にがん化させた細胞を樹立した。

【代謝酵素関連タンパク質の情報基盤定量の実施】

1) ペプチド情報データベースの構築

われわれが開発した『情報基盤定量法』は多数のタンパク質の絶対量を同時に測定する新技術である。代謝酵素関連タンパク質の組換えタンパク質を小麦胚芽抽出液を用いた無細胞発現系を用いて作製し、その消化物を用いて LC-MS/MS 解析によって感度良く検出されるペプチドの選定とその座標 (LC 上の保持時間、質量、および部分質量) の決定を行った。これらの情報を基にして質量分析計を用いた選択的定量法である MRM (multiple reaction monitoring) 法を実施すれば大規模なタンパク質の絶対定量が可能となる。本研究では代謝酵素 (約 1,000 種類) のペプチド情報の取得と定量のための最適化を行った。

2) 情報基盤定量法による代謝酵素の絶対定量

実際に、本方法を用いてがん化モデル細胞からの代謝酵素の大規模絶対定量を行った。加えて転写産物の定量解析も行い、得られた大規模データから、がん化特異的に上昇する代謝酵素群を抽出し、ワールブルグ効果の主因代謝酵素の特定を行った。これら

の中で、GPI (glucose-6-phosphate isomerase), PFKM (phosphofructokinase, muscle), LDHB (lactate dehydrogenase B) を単独で正常細胞に過剰発現させると、好氣的条件下でのグルコース消費量および乳酸産生量が亢進し、ワールブルグ効果を引き起こすことが判った。そのなかで、GPI をがん化細胞でノックダウンすると、足場非依存性増殖能が低下したことから、GPI はがん化モデル細胞特異的な代謝機構およびワールブルグ効果の主因代謝酵素である可能性が示唆された。

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 0 件)
なし

〔学会発表〕 (計 3 件)

中山敬一 . 次世代プロテオミクスを用いたがん特性の解明 . 第 45 回ヒューマンサイエンス総合研究セミナー「がんの多様性に応じた研究・治療 - 創薬のパラダイムシフト -」 . 東京 (1/13, 2015)

松本 雅記, 押川 清孝, 松崎 芙美子, 五島 直樹, 夏目 徹, 中山 敬一 . 次世代ターゲットプロテオミクスによるヒト全代謝経路の絶対定量マッピング . 第 87 回生化学会大会 . 京都 (10/17, 2014)

中山敬一 . 全タンパク質の絶対定量によるがん代謝シフトの解明 . 第 14 回日本蛋白質科学会年会 . 横浜 (6/25, 2014)

〔図書〕 (計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)
なし

取得状況 (計 0 件)
なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/saibou/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

押川 清孝 (OSHIKAWA, Kiyotaka)

九州大学生体防御医学研究所・研究員

研究者番号：50380051

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

中山 敬一 (NAKAYAMA, Keiichi)

九州大学生体防御医学研究所・主幹教授

研究者番号：80291508