慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

| | |
|---|---|
| Title | 局所代謝を反映した微小管修飾による化学治療抵抗性獲得機構の解明 |
| Sub Title | Augmented glycolysis and its blanched pathway by microtubule-stabilizing reagent determine the chemosensitivity of breast cancer cell via the sulfur metabolism. |
| Author | 山本, 雄広(Yamamoto, Takehiro) |
| Publisher | |
| Publication year | 2020 |
| Jtitle | 科学研究費補助金研究成果報告書 (2019. ) |
| JaLC DOI | |
| Abstract | 近年、代謝経路切り替えががん細胞のストレス耐性獲得に寄与する事が明らかになりつつある。タキサン系抗がん剤であるパクリタキセルは微小管を安定化させることで細胞分裂を阻害し効果を発揮するが、我々は乳がん細胞のパクリタキセル耐性株において、解糖系からセリン生合成経路を経て含硫アミノ酸代謝への経路が活性化し、antioxidantsが増加することを見出した。その際、硫化水素産生酵素の発現レベルによって複数の代謝酵素群のチオール基の可逆的な修飾変化が認められた。これらのことから、解糖系由来の炭素源が硫黄代謝へ利用されることがパクリタキセル薬剤耐性獲得の必要条件であることが示唆された。<br>Metabolic reprogramming of central carbon metabolism played important roles in the acquisition of anti-oxidative capacity in various types of cancer cells. In this study, we focused the metabolic interactions between cytoskeleton and glycolytic enzymes to acquire chemoresistance. We observed higher modification levels of glycolytic enzymes in paclitaxel-resistant cells than control cells. Furthermore, we compared metabolic characteristics between naive and Paclitaxel-resistant cells using mass-labelled glucose. Using metabolome analyses, we demonstrated metabolic features in Paclitaxel-resistant cells; activation of glycolysis, Serine synthetic pathway, and sulfur-containing amino acid metabolism. Our results illustrate that carbon derived from glucose is used for the production of antioxidants from sulfur-containing metabolites. |
| Notes | 研究種目：挑戦的研究 (萌芽)<br>研究期間：2017～2019<br>課題番号：17K19614<br>研究分野：代謝生化学 |
| Genre | Research Paper |
| URL | https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_17K19614seika |

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　２ 年　 ６ 月　 ５ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：挑戦的研究（萌芽）
研究期間：2017～2019
課題番号：１７Ｋ１９６１４

研究課題名（和文）局所代謝を反映した微小管修飾による化学治療抵抗性獲得機構の解明

研究課題名（英文）Augmented glycolysis and its blanched pathway by microtubule-stabilizing reagent determine the chemosensitivity of breast cancer cell via the sulfur metabolism.

研究代表者
山本　雄広（YAMAMOTO, Takehiro）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：５０３８３７７４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,800,000円

研究成果の概要（和文）：近年、代謝経路切り替えがん細胞のストレス耐性獲得に寄与する事が明らかになりつつある。タキサン系抗がん剤であるパクリタキセルは微小管を安定化させることで細胞分裂を阻害し効果を発揮するが、我々は乳がん細胞のパクリタキセル耐性株において、解糖系からセリン生合成経路を経て含硫アミノ酸代謝への経路が活性化し、antioxidantsが増加することを見出した。その際、硫化水素産生酵素の発現レベルによって複数の代謝酵素群のチオール基の可逆的な修飾変化が認められた。これらのことから、解糖系由来の炭素源が硫黄代謝へ利用されることがパクリタキセル薬剤耐性獲得の必要条件であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義
元来、抗がん剤に対する耐性獲得機構は遺伝子変異によって説明されているのが多いが、本研究では特定の酵素の翻訳後修飾レベルの変化によっても化学治療に対する感受性が変化することを見出した。また、微小管安定化剤によって解糖系が亢進し、分岐経路より耐酸化ストレス能が増すことから本研究をさらに発展させ、人為的介入により分岐経路を遮断することでストレス脆弱性を惹起できる可能性が示唆される。また、エネルギー代謝酵素の修飾レベルを調べることで有糸分裂阻害型抗がん剤の治療効果の奏効を予測するマーカーとなりうるのではないかと考えている。

研究成果の概要（英文）：Metabolic reprogramming of central carbon metabolism played important roles in the acquisition of anti-oxidative capacity in various types of cancer cells. In this study, we focused the metabolic interactions between cytoskeleton and glycolytic enzymes to acquire chemoresistance. We observed higher modification levels of glycolytic enzymes in paclitaxel-resistant cells than control cells. Furthermore, we compared metabolic characteristics between naive and Paclitaxel-resistant cells using mass-labelled glucose. Using metabolome analyses, we demonstrated metabolic features in Paclitaxel-resistant cells; activation of glycolysis, Serine synthetic pathway, and sulfur-containing amino acid metabolism. Our results illustrate that carbon derived from glucose is used for the production of antioxidants from sulfur-containing metabolites.

研究分野：代謝生化学

キーワード：解糖系　翻訳後修飾　硫化水素　細胞骨格　抗がん剤

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## １．研究開始当初の背景

正常細胞とがん細胞間ではエネルギー代謝特性において大きく差異がある。がん細胞は好気条件下においても自身の ATP 産生を TCA 回路や電子伝達系に頼らず、エネルギー産生の時間的効率の良い解糖系に依存するという代謝的特徴を持っている。この様な代謝特性は HIF1 や p53 などの転写因子による発現上昇のみに依存するのではなく、リン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾による活性制御も重要であることがわかってきた。我々はこれまでに、解糖系の律速段階調節酵素である PFKFB3(6-phospho-fructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3)、PKM2(pyruvate kinase muscle isozyme 2)がアルギニンメチル化修飾を受ける事を報告してきた。

がん治療における問題点の一つとして、抗がん剤に対する耐性獲得が挙げられる。がん細胞は抗がん剤に長く暴露されると、自らの遺伝子発現や代謝特性を変えることで耐性を獲得する。例えば、白金製剤である抗がん剤シスプラチンは DNA 二重鎖にインターカレートすることで細胞死を誘導するが、グルタチオンに代表されるチオール含有物を枯渇させることで酸化ストレス耐性を身につける事が分かっている。我々による先行研究では解糖系酵素 PFKFB3 のメチル化レベルの低下が、ペントースリン酸回路を活性化させることで NADPH 量を増加させ還元型グルタチオンを維持することでシスプラチンに対する耐性獲得の機序の一端を解明した。一方、パクリタキセル（以下、Ptx）もまた代表的な抗がん剤であるが、こちらはタキサン系抗がん剤に分類され、細胞骨格分子チューブリンの安定化を促し、細胞分裂を阻害することで効果を発揮する。幾つかの解糖系酵素はアクチンやチューブリンなどの骨格分子と会合することが古くから知られているが、その意義はよくわかっていない。そのなか、我々は予備実験として、Ptx を添加したがん細胞では上記の解糖系酵素のメチル化レベルの亢進することを見出し、Ptx の細胞内の作用機序として解糖系の制御が関与することが示唆された。

## ２．研究の目的

本研究では、がん細胞が栄養条件や外界のストレス刺激によって如何に翻訳後修飾の空間的制御を介して細胞骨格の再編成にどのように寄与するか、またその際、局所でのエネルギー代謝がどのように制御されるかという分子メカニズムを提案することを最終目標にしている。細胞骨格への解糖系酵素群（Aldolase, GAPDH, PFK など）の結合に関して古くは 1960 年代より報告はあるものの（Arnold, H. & Pette, D., 1968 ほか）、結合・解離のダイナミクスや遊走エネルギーの供給など、極めて重要と思われる代謝面からの考察は久しく為されてこなかった。このような細胞骨格再編は初期発生やがん細胞の転移浸潤における上皮間葉転換(EMT)や、神経細胞や免疫担当細胞などの走化性など生体恒常性の維持のみならず、病態形成にも非常に重要なイベントである。本課題では上記の予備実験で明らかになった Ptx 処理による解糖系活性化機構を明らかにし、Ptx の耐性獲得時にどのような代謝リモデリングに関するイベントについて乳がん細胞株をモデルに生化学的手法によって明らかにするものであり、人為的に代謝系を操る（発現、活性、修飾等）ことで、増殖能、細胞運動能、抗がん剤感受性をコントロールできるか否かを検証する。これにより、エネルギー代謝酵素局在と微小管ダイナミクスとのクロストークががんの悪性形質獲得にどのように寄与するかを明らかにする。

## ３．研究の方法

本研究は、主に以下の実験手法を基に遂行した。

### （１）　パクリタキセル耐性乳がん細胞株の樹立

ヌードマウス（BALB/cA Jcl-nu/nu 系統）1 匹に対し、等量のマトリゲルと混合した $1x10^6$ 個の MDA-MB-231 細胞を接種した。一定サイズに腫瘍が増殖後、パクリタキセルを 1 週間に 2 回、4 週間の間腹腔投与した。パクリタキセルの投与期間終了後、腫瘍を摘出し、Tumor Dissection Kit, human (ミルテニー社)を用いて MDA-MB-231 細胞を回収した。回収週後の細胞は上記と同様のサイクルを合計 3 度繰り返した。投与したパクリタキセルの用量は、20mg/kg（1 ターン目）、30mg/kg（2 ターン目）、60mg/kg（3 ターン目）とした。樹立した Ptx 耐性株はすべて Ptx 感受性

が低下していることを確認して実験に使用した。

（２）メタボローム解析

対照群、耐性細胞それぞれを 100mm ディッシュに $1x10^7$ 個ずつ回収前日に撒いた。標識体グルコースの代謝の流れを調べるために安定同位体ラベルされた 13C6-グルコースをグルコース非含有 DMEM 培地に 1g/L となるように添加し、15 分間細胞に取り込ませた。その後、5%(v/v)マンニトールで 2 回洗浄し、メタノール・クロロホルム処理により、細胞を変性させ、ライセートを回収・精製した。測定結果は代謝物回収時に発生した細胞残渣からタンパク質を抽出し、タンパク質濃度を決定し算出した。

（３） 細胞死判定

細胞死アッセイは Promega 社の CellTOX Green Cytotoxicity assay キットを用いて測定した。対照群および耐性細胞を 96well プレートにまき、様々な濃度のパクリタキセル（LKT Laboratories, Inc.）で約 16 時間処理した。細胞には予め Hoechst Dye を添加しておき、蛍光プレートリーダーにて CellTOX 励起 488nm/蛍光 520nm、Hoechst 励起 355nm/蛍光 415nm にて測定した CellTOX 由来の蛍光測定値は Hoechst で得られる生細胞由来の蛍光測定値で割り、Normalize した。

（４） チオール修飾の検出

MDA-MB-231 細胞を 100mm 径の dish に撒き、80-90%コンフルエントまで増やした。ハンクス平衡塩で細胞をリンス後、終濃度 10mM EZ-link Iodoaceyl-PEG2-Biotin (Thermo Fisher 社, #21334) となるようにハンクス平衡塩で希釈し、3 時間細胞をラベルした。回収した細胞は 1ml の Lysis buffer (40mM HEPES, 50mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1% CHAPS, 1% protease inhibitor cocktail)で溶解し、Bradford 法にてタンパク定量を行った。500μg 分のラベル済み Lysate を 100μl の NeurlAvidin Agarose (Thermo Fisher 社, #29200)と混合し室温で 1 時間インキュベートした。アガロースビーズは TE バッファーで 3 回洗浄したのち、20mM DTT を含む TE バッファーで室温 1 時間 aggitation し、S3 画分を溶出した。溶出後のビーズは 1x サンプルバッファーと懸濁し、5 分間熱変性させ溶出した（S4 画分）。

４．研究成果

（１） Ptx 耐性株の作出

Ptx 耐性株を作成するために、ヌードマウスに乳がん細胞株 MBA-MD231 細胞を移植し、腫瘍形成後パクリタキセルを定期的に一定濃度を腹腔投与した。腫瘍は投与 4 週間後摘出し、トリプシン消化により細胞を単離し培養した。増殖した腫瘍由来細胞を再びマウスへ移植するというサイクルを三回行うことで Ptx 耐性株を複数作出した。単離した細胞が Ptx 耐性を持つかどうかを検証するために、対照群として移植していない MDA-MB231 細胞として、各種 Ptx 濃度中で培養した際の細胞死を CellTOX アッセイキットにて測定した。その結果、耐性株ではすべて Ptx に対する感受性を喪失しており、以後これを用いて実験を行なった。

（２）MDA-MB-231 Ptx 耐性株における代謝特性

上記（１）で樹立した耐性株を用い、炭素の安定同位体である $^{13}C$ を含んだグルコース取り込ませ、そのラベル体のグルコースがどのような代謝系に利用されるかをメタボローム解析によって追跡、対照群と比較した。その結果、以下の意外な特徴が認められた。①解糖系の G-6-P(Glucose-6-phosphate)、F-6-P(Fructose-6-phosphate)、F-1,6-BP(Fructose-1,6-bisphosphate)の産生量が上昇していた。②解糖系から分岐する代謝系であるセリン合成系の代謝物に注目すると、対照群に比べて耐性獲得細胞の方が明らかにラベル体セリン量が上昇していた。③抗酸化物質であるヒポタウリンと GSSG(酸化型グルタチオン)の産生が増えていた。

次に、両者の間で代謝酵素の発現量に差異があるかを確認するために、Western blotting を行っ

た。その結果、予備実験である Ptx の一過性添加系において認められたのと同様、解糖系の亢進の指標である PFKFB3 と PKM2 のメチル化修飾発現が亢進しているとともに、セリン合成を司る酵素群と CBS（cystathionine β-synthase）、CSE (cystathionine γ-lyase)など含硫アミノ酸代謝酵素の発現が亢進していることが判明した。この結果は上述の代謝特性と合致しており、Ptx 耐性株では解糖系の中間代謝物である 3PG を基質とし、グルコースの炭素源を利用して硫黄代謝を行なっている事が示唆される。また、グルタチオンの酸化還元比はさほど変化は認められないことに対し、システインから分岐するヒポタウリンの含量が耐性株では増加していることが分かった。ROS 産生量が耐性株では低下していることから、酸化ストレス軽減のメカニズムとして、グルタチオン以外のチオール化合物の存在が示唆される。近年、乳がん、肺がん、脳腫瘍においてセリンの生合成系の活性化が悪性形質の獲得に重要であるとの報告がなされている。Voursden らはセリン代謝を介した葉酸サイクル（1-炭素代謝）の活性化による核酸、NADPH、S-adenosylmethionine（SAM）の供給が旺盛な増殖能を賄うために重要であると報告している。その中、我々による研究成果は解糖系由来の炭素源が含硫アミノ酸代謝の炭素骨格として酸化ストレス軽減に作用することを重要なメカニズムを示唆している。

（３）セリン代謝の遮断はパクリタキセル感受性を増強する

上記（１）で作成した Ptx 耐性株を親株に様々な代謝酵素のノックダウン株を作出し、Ptx に対し感受性が増加する株を探索した。その結果、セリン代謝の律速段階を制御する PHGDH、および含硫アミノ酸代謝酵素 CSE をノックダウンした株では Ptx 感受性が増強していた。（２）の実験結果と合わせて考えると、解糖系から経路を切り替えてセリン代謝への代謝流量を増やすことで含硫アミノ酸代謝を活性化し、ヒポタウリン等の抗酸化物質を増やすことが酸化ストレス軽減の主なメカニズムであることが示唆された。我々は、このメカニズムは乳がんのみならず、大腸がん肝転移モデル、卵巣がんにおいてもヒポタウリンが酸化ストレス軽減に作用することを報告している（塩田、納谷、山本ら、(2018) Nat Commun ほか、一部投稿中）。今までは CD44/xCT システムを介した細胞内へのシスチンの流入がグルタチオン合成の直接の材料であることがし総説として知られていたが、本研究のよって解糖系から代謝経路を切り替えてその炭素骨格を含硫代謝物合成に利用することでヒポタウリンをはじめとした antioxidants を合成することで抗酸化能を補償するという、まったく新しい機構の存在を提示できた。

（４）パクリタキセル耐性株におけるチオール修飾レベルの変化

上記（２）の結果より、Ptx 耐性株では含硫アミノ酸代謝が活性化していることを見出した。近年の研究から含硫アミノ酸代謝からは副産物である硫化水素（$H_2S$）もがん細胞の増殖制御に寄与することは明らかになってきた。$H_2S$ は NO、CO に次ぐ第 3 のガスメディエーターであり、強い還元作用を有するとともに、システイン残基のもつチオール基の修飾動態を変化させること作用を発揮する事が知られている。乳がん細胞株において $H_2S$ 合成酵素である CSE の発現が Ptx 耐性株では増強していることから対照群と耐性株ではタンパク質のチオール修飾レベルに差異があるのではないかと考え、複数の方法でチオール基のスルフヒドリル化（-S-SH）を調べた。その結果、多くの代謝酵素においてスルフヒドリル化レベルに変化が見られた。興味深いことに細胞骨格タンパク質においても修飾レベルに差異が見られ、これらの一部は CSE の発現を低下させると cancel できた。このことは CSE 由来の含硫化合物がスルフヒドリル化修飾に作用することを示唆している。

これまで化学治療における耐性獲得メカニズムは遺伝子の突然変異によるもので、すなわち一度書き換えられてしまった場合戻すことが難しい不可逆的なものだと考えられてきた。しかし本研究により、Ptx 耐性株において特徴的な代謝特性および酵素の発現特性を見出した。また、特定の翻訳後修飾においても耐性株では変化していることがわかったが、翻訳後修飾の基質ドナー分子は中間代謝物質であることから、修飾の種類によっては代謝制御に人為的に介入することで可逆的に書き換えることができる反応である。今後はこれらの修飾同定や修飾による活性制御機構の解明などの追加実験が必要だが、本研究によって明らかになった代謝特性を治療標的とすることで、一度獲得してしまった抗がん剤耐性を喪失させることができるような技術開発に繋がる重要な知見となるものと考えている。

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　3件）

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Nurkanto A, Jeelani G, Yamamoto T, Hishiki T, Naito Y, Suematsu M, Hashimoto T, Nozaki T | ４．巻<br>9 |
| ２．論文標題<br>Biochemical, metabolomic, and genetic analyses of dephospho coenzyme A kinase involved in coenzyme A biosynthesis in the human enteric parasite Entamoeba histolytica. | ５．発行年<br>2018年 |
| ３．雑誌名<br>Frontiers in Microbiology, section Infectious Diseases | ６．最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3389/fmicb.2018.02902 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Shiota M, Naya M, Yamamoto T, Hishiki T, Tani T, Takahashi H, Kubo A, Koike D, Itoh M, Ohmura M, Kabe Y, Sugiura Y, Hiraoka N, Morikawa T, Takubo K, Suina K, Nagashima H, Sampetrean O, Nagano O, Saya H, Yamazoe S, Watanabe H, Suematsu M | ４．巻<br>9 |
| ２．論文標題<br>Gold-nanofeve surface-enhanced Raman spectroscopy visualizes hypotaurine as a robust anti-oxidant consumed in cancer survival. | ５．発行年<br>2018年 |
| ３．雑誌名<br>Nature Communications | ６．最初と最後の頁<br>- |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s41467-018-03899-1 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>－ |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Nurkanto A, Jeelani G, Yamamoto T, Naito Y, Hishiki T, Mori M, Suematsu M, Shiomi K, Hashimoto T, Nozaki T | ４．巻<br>8 |
| ２．論文標題<br>Characterization and validation of Entamoeba histolytica pantothenate kinase as a novel anti-amebic drug target. | ５．発行年<br>2018年 |
| ３．雑誌名<br>International Journal of Parasitology: Drugs and Drug resistance | ６．最初と最後の頁<br>125-136 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.ijpddr.2018.02.004 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>－ |

〔学会発表〕　計4件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

| |
|---|
| １．発表者名<br>山本雄広、折田 巧、伊藤真衣、末松 誠 |
| ２．発表標題<br>極小発光タグHiBiTシステムを用いた中心代謝酵素の局在移行能アッセイ系の構築 |
| ３．学会等名<br>第42回日本分子生物学会年大会 |
| ４．発表年<br>2019年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>山本雄広 |
| ２．発表標題<br>アルギニンメチル化が制御するがん細胞のエネルギー代謝 |
| ３．学会等名<br>第92回　日本生化学会年大会シンポジウム |
| ４．発表年<br>2019年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>山本雄広 |
| ２．発表標題<br>アルギニンメチル化によるがん細胞のエネルギー制御 |
| ３．学会等名<br>第43回日本微小循環学会 |
| ４．発表年<br>2018年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>山本雄広、伊藤真衣、高野直治、石渡恭子、倉堀智一、末松　誠 |
| ２．発表標題<br>翻訳後修飾を介した解糖系酵素PKM2の核移行メカニズムの解析 |
| ３．学会等名<br>第40回日本分子生物学会（生命科学系合同学会ConBio2017） |
| ４．発表年<br>2017年 |

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| 慶應義塾大学医学部医化学教室HP<br>www.gasbiology.com<br>表面増強ラマンによる非標識・無染色でのがん代謝の可視化に成功（プレスリリース）<br>https://www.jst.go.jp/pr/announce/20180419-2/index.html |

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|