

Title	接着分子CD44による癌細胞糖代謝制御機構の解明とその阻害に基づく癌治療薬の開発
Sub Title	Analysis of the molecular mechanism of CD44-mediated glucose metabolism in cancer cells for the development of new cancer therapy
Author	永野, 修(Nagano, Osamu)
Publisher	
Publication year	2012
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2011.)
JaLC DOI	
Abstract	本研究は、癌幹細胞の主要なマーカーであるCD44によって制御される糖代謝シグナルが癌治療の新たなターゲットとなりえるかについて検討することを目的として研究を行った。まず、CD44の細胞内領域とPKM2の相互作用が癌細胞の糖代謝に関与することが明らかになったため、グルコース代謝の重要なステップを触媒する酵素pyruvate kinase M2の活性に関わるチロシンリン酸化ステータスの変化を検討した。その結果、CD44の発現抑制はPKM2のチロシンリン酸化状態を低下させるとともに、その活性を負に制御することで、癌細胞の好気性解糖経路を促進することが分かった。以上のようにCD44を介した癌細胞の糖代謝制御が、癌治療のための新たな分子標的となり得ることが明らかとなった。
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2010～2011 課題番号：22790326 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_22790326seika

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.

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790326

研究課題名(和文) 接着分子CD44による癌細胞糖代謝制御機構の解明とその阻害に基づく
癌治療薬の開発研究課題名(英文) Analysis of the molecular mechanism of CD44-mediated glucose metabolism
in cancer cells for the development of new cancer therapy

研究代表者

永野 修 (NAGANO OSAMU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30404346

研究成果の概要(和文)：本研究は、癌幹細胞の主要なマーカーであるCD44によって制御される糖代謝シグナルが癌治療の新たなターゲットとなりえるかについて検討することを目的として研究を行った。まず、CD44の細胞内領域とPKM2の相互作用が癌細胞の糖代謝に関与することが明らかになったため、グルコース代謝の重要なステップを触媒する酵素pyruvate kinase M2の活性に関わるチロシンリン酸化ステータスの変化を検討した。その結果、CD44の発現抑制はPKM2のチロシンリン酸化状態を低下させるとともに、その活性を負に制御することで、癌細胞の好気性解糖経路を促進することが分かった。以上のようにCD44を介した癌細胞の糖代謝制御が、癌治療のための新たな分子標的となり得ることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：To examine whether the CD44-mediated modulation of glucose metabolism could be a new target for cancer therapy, we investigated the effect of CD44 expression on the activity of PKM2, a key enzyme for glycolysis. PKM2 was interacted with CD44 and such interaction increased the tyrosine phosphorylation of PKM2 leading to the augmentation of the glycolytic phenotype of cancer cells. Thus, CD44-mediated modulation of glycolysis pathway was found to be a new molecular target for cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合 計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総 計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：癌、遺伝子、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

多くの癌細胞は、正常細胞とは異なる代謝経路を用いて、エネルギー（アデノシン三リン酸：ATP）を産生していることが知られている。つまり、癌細胞は好气的環境下においても、主としてグルコースを代謝し、乳酸を産生する解糖系を利用することで、細胞に有害な活性酸素(ROS)の発生を抑制している。この癌細胞に特有な、解糖系に依存したエネルギー

ギー産生は Warburg effect と呼ばれ、癌細胞における糖代謝メカニズムの詳細を明らかにすることは、新たな癌治療ターゲットの発見に繋がることが期待できる。

2. 研究の目的

これまでの研究によって、我々は CD44 の発現抑制が解糖系に依存して増殖する癌細胞においてミトコンドリアを介した酸化的リ

ン酸化経路への代謝シフトを引き起こし、増殖抑制に繋がることを見出した。そこで、CD44 を介したシグナルがどのように癌細胞の糖代謝機構を制御しているのかを明らかにすると共に、その阻害による新規癌治療法の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1)数種類の野生型および p53 変異癌細胞株を用いた RNAi、CD44 中和抗体処理を行い、グルコース代謝および酸化的リン酸化の変化を癌細胞のグルコース消費量、乳酸産生量、ROS などにより代謝の変化を測定する。

(2)また、CD44 によって制御される糖代謝機構に関わる分子を同定し、CD44 との相互作用機序ならびにその意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1)CD44 の発現抑制による癌細胞代謝の影響について検討を行った。図 1 のように p53 のステータスの異なる癌細胞について CD44 の RNAi による発現抑制の影響を調査した。癌細胞は p53 野生型として A549 および HCT116WT を、p53 の機能欠失細胞として HCT116p53KO および U251MG 細胞を用いた。その結果 p53 の機能が正常な癌細胞株では CD44 発現抑制効果が認められないのに対し p53 の不活化された癌細胞では著明にグルコース消費量が減少しており癌細胞の好気性糖代謝の表現系が減弱していると考えられた。

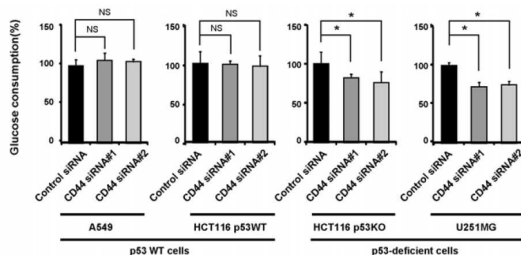


図 1 癌細胞における CD44 発現抑制によるグルコース消費量の変化

(2)次に CD44 がどのように癌細胞のグルコース代謝を制御するのかを調べるために、CD44 細胞質内ドメイン(CD44ICD)と相互作用する分子を in vitro virus (IVV)法を用いて探索した。その結果、グルコース代謝経路における重要な酵素であるピルビン酸キナーゼ M2(pyruvate kinase M2: PKM2)と相互作用することを見出した。(図 2) この結果から、CD44 は PKM2 と結合することで、その酵素活性を調節し、癌細胞の好気性糖代謝を促進していることが示唆された。

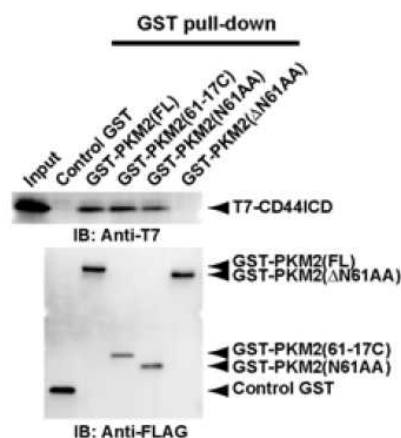


図 2 CD44ICD と PKM2 の結合

(3)PKM2 はグルコース代謝経路において、ホスホエノールピルビン酸からピルビン酸への変換を触媒する酵素であり、主に癌細胞ではチロシンリン酸化を受けることで活性が抑制され、ペントースリン酸化経路への流入を増加することで、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) の産生を促進することが知られている。産生された NADPH は、抗酸化物質である還元型グルタチオンの量を増加させ、抗癌剤耐性に繋がる癌細胞の抗酸化能に強く寄与していることが知られている。そこで、CD44 の発現が PKM2 のチロシンリン酸化に関与しているかを確認するために CD44 の発現抑制後、PKM2 の活性に関わる 105 番目のチロシン残基のリン酸化特異的抗体を用いてイムノブロット解析を行った。その結果、CD44 の発現抑制は PKM2 のチロシンリン酸化ステータスを低下させることが分かった。すなわち、CD44 の細胞内領域と PKM2 との結合は PKM2 のチロシンリン酸化を誘導し、その活性を抑制することで、好気性糖代謝を促進することが示唆された。

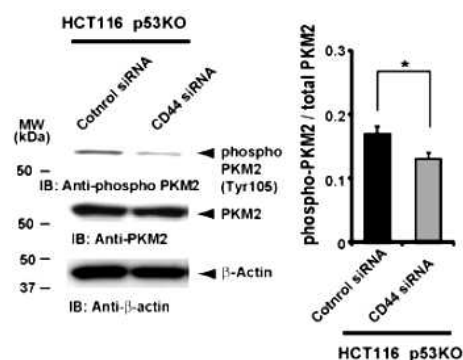


図 3 CD44 の発現は PKM2 のチロシンリン酸化状態に関与する

(4)次に、CD44 の発現抑制が癌細胞のペントースリン酸経路へのグルコース代謝物の流入を変化させるかについて検討した。CD44 の RNAi をおこなった細胞において、ラベルしたグルコースの代謝経路をメタボロームアッセイを行ってみると、図4で示す通り、明らかにラベル体のペントースリン酸経路への流入は減少していたことから、CD44 の発現低下は癌細胞における好気性糖代謝を阻害し、その結果ペントースリン酸経路への流入を低下させることが示された。

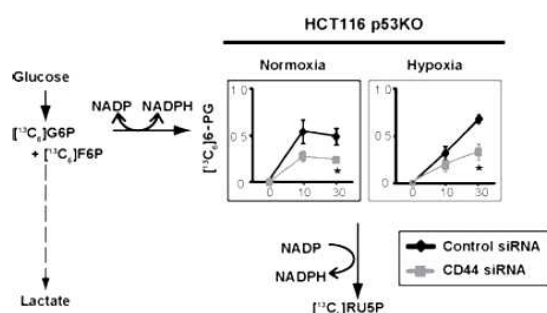


図 4 CD44 発現抑制によるペントースリン酸経路流入の低下

(5)以上の結果から、癌細胞の CD44 によって促進される好気性糖代謝経路は癌細胞の抗酸化能を亢進させ、活性酸素を誘導し細胞障害を引き起こす抗癌剤に対して抵抗性を示す一因となり得ることが考えられた。そこで実際に、CD44 の発現抑制が抗癌剤に対する感受性の亢進に繋がるかについて検討した。CD44 依存的な好気性糖代謝の亢進を認めた HCT116p53KO 細胞において CD44 の発現を抑制した後抗癌剤であるシスプラチン(CDDP)を処理し誘導される細胞死の割合についてフローサイトメーターを用いて、検討した。その結果、細胞死が誘導されている sub-G1 の割合は CD44 の発現抑制によって増加することが分かった (図5)。

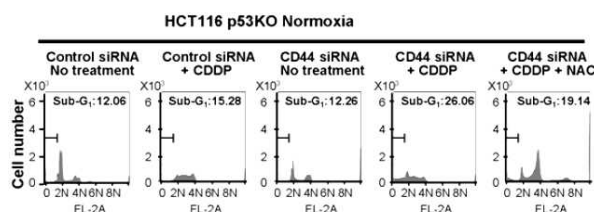


図 5 CD44 の発現抑制による抗癌剤感受性の増強

(6)活性酸素を誘導し細胞障害作用を発揮する抗癌剤の効果は、低酸素状態では低下す

ることが知られている。さらに CD44 陽性の癌幹細胞は腫瘍の中でも低酸素領域に位置していると考えられている。そのため、低酸素環境の癌細胞においても同様に CD44 の発現抑制が抗癌剤感受性の亢進に繋がるかについて検討を行った。低酸素環境において HCT116WT 細胞は、解糖系に依存したエネルギー産生を示すようになる。そこで、抗癌剤の効果を同様に検討したところ、低酸素環境の癌細胞においても CD44 の発現抑制は抗癌剤感受性の増強を引き起こすことが可能であることが分かった (図6)。

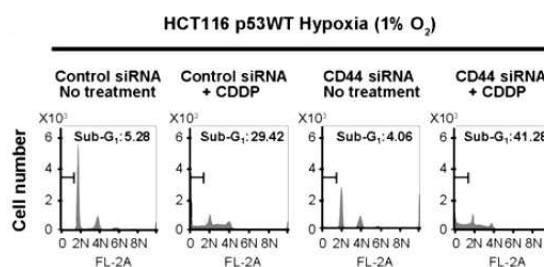


図 6 低酸素環境に置かれた癌細胞での CD44 の発現抑制による抗癌剤感受性の増強

(7)結論

これらの実験結果からCD44がPKM2と相互作用することによって促進される好気性糖代謝を標的とすることで、CD44を高発現する癌幹細胞や低酸素に置かれた癌細胞に対して抗癌剤の感受性を増強しうることが示唆された。したがってCD44を介した癌細胞の糖代謝制御が、癌治療のための新たな分子標的となり得ることが明らかとなった。

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1件)

- ① Tamada M, Nagano O, Tateyama S, Ohmura M, Yae T, Ishimoto T, Sugihara E, Onishi N, Yamamoto T, Yanagawa H, Suematsu M, Saya H. Modulation of Glucose Metabolism by CD44 Contributes to Antioxidant Status and Drug Resistance in Cancer Cells. Cancer Research, 72, 2011, 1438-1448, 査読有

〔学会発表〕(計6件)

- ① 永野修, CD44 variant isoform regulates antioxidant status in cancer cells via cystine transporter xCT stabilization. 第26回日本整形外科学会, 2011年10月

20 日、ベイシア文化ホール（群馬）

- ② 永野修、CD44 variant isoform regulates antioxidant status in cancer cells via cystine transporter xCT stabilization.
第 70 回日本癌学会、2011 年 10 月 4 日、名古屋国際会議場（名古屋）
- ③ 永野修、CD44 バリエントアイソフォームはシスチントランスポーターxCT の安定化を誘導し癌細胞の抗酸化システムを制御する
第 4 回 SYMPHONY 研究会(招待講演)、2011 年 9 月 10 日、ホテルメトロポリタンエドモント（東京）
- ④ 永野修、CD44 variant isoform regulates antioxidant status in cancer cells via cystine transporter xCT stabilization.
第 29 回骨代謝学会、2011 年 7 月 30 日、グランキューブ大阪（大阪）
- ⑤ 永野修、Impact of CD44 Variant Form in Gastric Cancer. SGCC 4th Annual Scientific Meeting（招待講演）、2011 年 7 月 6 日、National University of Singapore（シンガポール）
- ⑥ 永野修、CD44 variant isoform regulates antioxidant status in cancer cells via cystine transporter xCT stabilization.
第15回分子標的学会、2011年6月24日、ホテル日航東京（東京）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.genereg.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

永野 修 (NAGANO OSAMU)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：30404346