

Title	既存薬剤を用いたPKM2活性剤の探索と癌治療への早期応用戦略
Sub Title	The applied strategic research for the sake of cancer treatment ; the discovery of puruvate kinase M2 (PKM2) activator out of existing drugs
Author	玉田, 真由美(Tamada, Mayumi) 佐谷, 秀行(Saya, Hideyuki)
Publisher	
Publication year	2015
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2014.)
Abstract	<p>近年, pyruvate kinase M2(PKM2)が癌特有な好気性解糖の制御因子であり, その活性剤が抗癌効果をもつ可能性が報告されている。過去に報告した如く(Tamada et al., Cancer Res 2012), PKM2活性上昇は, 間接的に癌の糖消費抑制を誘導することから, 糖消費抑制するものにはPKM2活性剤が含まれると考え, 当研究室構築の既存薬ライブラリーを使用し, 糖消費・解糖系最終産物の乳酸産生抑制・PKM2チロシンリン酸化抑制を評価し, PKM2活性剤候補を選別した。酵素活性測定, 解糖系から正常細胞が主に利用するミトコンドリア呼吸への代謝変動, 抗癌効果の評価も進行中である。</p> <p>Recently, PKM2 has been reported to be one of the most important factors to maintain glycolic phenotype which is the unique character of cancer. Thus, the possibility of PKM2 activator as an anti-cancerous drug has attracted attention. We investigated to discover PKM2 activator, which induce the metabolic shift from aerobic glycolysis to mitochondrial respiration mainly used by normal cells, out of existing drugs.</p> <p>We examined whether there was the drug which inhibits glucose consumption, lactate production, and tyrosine phosphorylation of PKM2 out of existing drugs, based on our idea that PKM2 activator may be included in the drugs which inhibit glucose consumption. We have already found some candidate drugs, and advance examination such as measurement of PKM2 enzyme activity, metabolic shift, and anti-cancerous effect.</p>
Notes	研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2013 ~ 2014 課題番号: 25870717 研究分野: 癌の代謝
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_25870717seika

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870717

研究課題名(和文)既存薬剤を用いたPKM2活性剤の探索と癌治療への早期応用戦略

研究課題名(英文)The applied strategic research for the sake of cancer treatment; the discovery of pyruvate kinase M2 (PKM2) activator out of existing drugs

研究代表者

玉田 真由美 (Tamada, Mayumi)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号：80528133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：近年、pyruvate kinase M2(PKM2)が癌特有な好気性解糖の制御因子であり、その活性剤が抗癌効果をもつ可能性が報告されている。過去に報告した如く(Tamada et al., Cancer Res 2012)、PKM2活性上昇は、間接的に癌の糖消費抑制を誘導することから、糖消費抑制するものにはPKM2活性剤が含まれると考え、当研究室構築の既存薬ライブラリーを使用し、糖消費・解糖系最終産物の乳酸産生抑制・PKM2チロシンリン酸化抑制を評価し、PKM2活性剤候補を選別した。酵素活性測定、解糖系から正常細胞が主に利用するミトコンドリア呼吸への代謝変動、抗癌効果の評価も進行中である。

研究成果の概要(英文)：Recently, PKM2 has been reported to be one of the most important factors to maintain glycolic phenotype which is the unique character of cancer. Thus, the possibility of PKM2 activator as an anti-cancerous drug has attracted attention. We investigated to discover PKM2 activator, which induce the metabolic shift from aerobic glycolysis to mitochondrial respiration mainly used by normal cells, out of existing drugs. We examined whether there was the drug which inhibits glucose consumption, lactate production, and tyrosine phosphorylation of PKM2 out of existing drugs, based on our idea that PKM2 activator may be included in the drugs which inhibit glucose consumption. We have already found some candidate drugs, and advance examination such as measurement of PKM2 enzyme activity, metabolic shift, and anti-cancerous effect.

研究分野：癌の代謝

キーワード：癌 糖代謝 pyruvate kinase M2 代謝変動 既存薬

1. 研究開始当初の背景

多くの癌細胞は、酸素の有無に関係なくエネルギー産生に解糖系を主に使用する。この代謝は好気性解糖(Warburg effect)とよばれ、正常とは異なる癌特有の代謝として注目されている。糖取り込み・解糖系亢進により、癌は素早くエネルギーを産生し、その中間代謝物を原料として増殖のために必要な要素を十分得ることができる。また、ミトコンドリア呼吸を抑え、解糖系を主として使用することは、ミトコンドリア呼吸で発生する活性酸素(ROS)の産生を抑制できるほか、解糖系の側副路であり、NADPH 産生経路でもあるペントースリン酸経路使用の亢進による還元型グルタチオン(GSH)産生にもつながり、活性酸素(ROS)発生を抑制することができる。ROS の発生を抑制することは、癌にとって増殖に有利であるだけでなく、治療抵抗性の原因の一つともなっている。

近年、解糖系の酵素の一つである pyruvate kinase M2 (PKM2)が Warburg effect の重要な制御因子であることが報告された。PKM2 発現およびその酵素活性が低いことが解糖系を維持するための必須条件であり、癌細胞にとって増殖に有利な環境を作り出している。PKM2 が着目された当初、癌細胞での高発現を認めたことから、PKM2 阻害薬が治療標的となるのではと考えられていた。しかし、正常細胞ではPKM1の発現が主であるが、中にはPKM2を発現するものもあること、ノックダウンによっても、細胞増殖が完全には抑えられなかったことがという問題点として報告され、現在では PKM2 の酵素活性上昇による抗癌作用が注目されている。

癌細胞で発現する PKM2 は二量体として存在しその酵素活性は低い。一方、正常細胞で発現している PKM2 は四量体として存在し酵素活性が高いという違いをもつ。また核内PKM2 は二量体として存在していることが報告されていることから、PKM2 活性剤は非常に少ない毒性で 癌特有の代謝である解糖系亢進を抑制し正常の代謝へ近づける 四量体に保つことで PKM2 の核内移行を阻止し、核内における PKM2 の非代謝効果を抑制するという、“代謝”・“非代謝”両面からのアプローチにより抗癌効果を期待することができる。活性剤の開発には cell-based assay が重要であること、すでにヒトでの安全性が保証され、副作用も把握できている既存薬の中から、活性剤を見出すことができれば、スムーズに臨床応用に結びつくと考えられ、本研究が癌治療に対する新たな可能性を見出す重要な研究であると考えた。

2. 研究の目的

本研究は当研究室で構築した既存薬ライブラリーを用いて、PKM2 の酵素活性を上昇させ、解糖系からミトコンドリア呼吸への代謝変動を誘導(癌特有の代謝から正常に近い代謝への変動)するもの、PKM2 核内移行を

抑制するものを、人体への副作用が少ないことがわかっている既存薬の中から見出し、癌細胞増殖抑制や細胞死誘導、既存治療との併用による相乗効果があるかなどを評価することで、癌治療への応用を目指す。

3. 研究の方法

本研究は、本研究室で構築した既存薬ライブラリーを用い、PKM2 活性作用をもつ薬剤の同定を cell-based assay を中心に行う。

(1) 既存薬ライブラリーを用いた糖消費抑制剤のスクリーニング

形態変化を利用したスクリーニング

これまでの予備実験により、癌細胞株を培養した際、培地内の糖が欠乏すると、細胞が縮みを起こし最終的には細胞死を起こし浮遊すること、これらの現象は p53 欠損・変異癌細胞株や低酸素環境といった解糖系がより亢進する環境で行うとより顕著な傾向にあることを確認した。形態変化を起こした細胞では培養液内の糖が検出以下であり、この変化は培養液内の糖濃度依存性に起こることを見出した。我々は、解糖系からミトコンドリア呼吸へ代謝変動させることにより、間接的に Glucose transporter1 の発現低下・糖取り込み減少、糖消費抑制が誘導されることを報告しており(Tamada et al., Cancer Research 2012)、糖取り込み抑制を示すものの中にはミトコンドリアへの代謝変動が原因となるものがあること、上記の細胞変化が顕著であることから、上記細胞変化を抑制する薬剤をスクリーニングする。

糖消費測定

上記の形態変化を遅延させた薬剤の中には、糖取り込み・糖消費抑制以外の原因が影響している可能性も否定できないため、選別された薬剤を使用した状態での糖消費量の測定を行う。

(2) 解糖系からミトコンドリア呼吸へ代謝変動を起こす薬剤のスクリーニング

好気性解糖が抑制されるとその最終産物である乳酸産生量が減少することから、(1)で選別された薬剤を使用した状態での乳酸産生量を測定する。解糖系が亢進した癌細胞ではミトコンドリア ATP 合成阻害薬であるオリゴマイシン感受性が低い。しかし我々は、ミトコンドリア呼吸への代謝変動を誘導すると、オリゴマイシン感受性が亢進し、増殖抑制を起こすことをすでに確認している。そこで、選別された薬剤を使用し、オリゴマイシン感受性亢進を誘導する薬剤を更に選別するため、マルチウェルタイムラプス顕微鏡を用いた細胞増殖試験を行う。

(3) PKM2 活性作用をもつ薬剤の同定

PKM2 酵素活性は、チロシンリン酸化を受け

二量体として存在する場合は酵素活性抑制状態（解糖系促進）、チロシンリン酸化が外れ四量体として存在する場合は活性状態（ミトコンドリア呼吸促進）であることが報告されていることから、ウエスタンブロット法を用いた PKM2 チロシンリン酸化(Tyr105)レベルの評価、クロスリンク法による二量・四量体の評価を行う。

4. 研究成果

エネルギー産生を主に解糖系に依存して行っている p53 欠損ヒト大腸癌細胞 (HCT116 p53 knockout) を用い、以下の実験を行った。

(1) 既存薬ライブラリーを用いた糖消費抑制・乳酸産生量抑制を誘導する薬剤のスクリーニング

形態変化を利用したスクリーニング
(図 1)

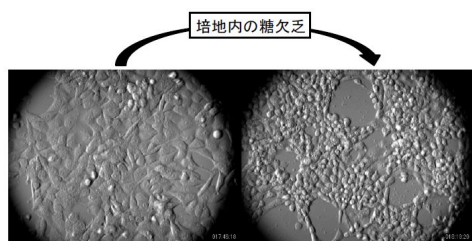


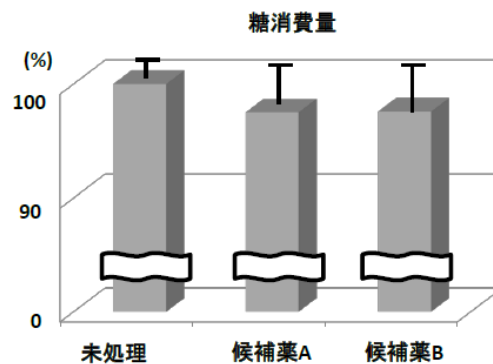
図 1 に示すように、癌細胞株を培養した際、培地内の糖が欠乏すると、細胞が縮みを起こし、最終的には浮遊してしまう現象を利用し、この現象を遅延させる薬剤のスクリーニングを行った。この現象は解糖系がより亢進する条件下（低酸素状態）で行うと顕著となるため、1%酸素下の状況で細胞培養を行った。予備実験で行った際より、差が顕著でないものも多かったことから、条件検討からやり直し、再現性を重視して、少しでも差がでた薬剤に関しては、同実験を繰り返し行った。

糖消費測定・乳酸産生量測定

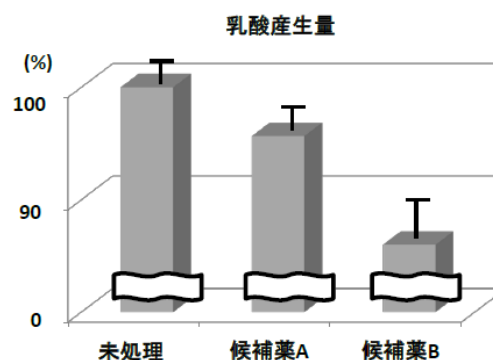
で形態変化の遅延を誘導した薬剤を使用し、グルコースの消費量および解糖系最終産物である乳酸産生量を、それぞれ測定した。

糖消費のみ抑制されるもの、乳酸産生量のみ抑制されるもの、糖消費・乳酸産生量とも抑制されるもの、いずれも抑制されないものに分類し、糖消費および乳酸産生量ともに抑制された薬剤に着目した。選別された薬剤は、癌細胞の解糖系使用を抑制し、ミトコンドリア呼吸へ代謝変動を誘導している可能性があり、また、PKM2 酵素活性に影響を与える薬剤である可能性も高いことから、再現性を重視し、同実験を繰り返し行った。(図 2, 3)

(図 2)



(図 3)



(2) PKM2 チロシン残基リン酸化の評価

PKM2 酵素活性は、チロシンリン酸化 (Tyr105) と連動することから、候補となる薬剤処理を行った細胞の溶解産物を用いて、ウエスタンブロットによる評価を行い、チロシンリン酸化が抑制される、つまり酵素活性が高い状態でミトコンドリア呼吸促進を促すことが予想される薬剤をスクリーニングした。

上記(1)、(2)の結果が一致した薬剤を中心に、現在、研究方法に示したオリゴマイシン感受性の評価を進めている。その結果が一致する薬剤があれば、実際に PKM2 酵素活性を調べる方針である。また、(1)と(2)の結果が一致しなかった薬剤に関しては、PKM2 以外の要因についても検索中である。

薬剤の濃度を薄め、条件を厳しくしても同様の結果を得られるかの検討や、再現性を重視し、調査を繰り返したため、当初の予定より、研究の進行具合は遅れているが、選別薬剤は絞られてきている。段階をおったスクリーニングを行うことで、時間はかかるが、単純に増殖抑制するだけでなく、PKM2 を介した、癌の糖代謝へ影響する薬剤であると証明できる。

安全性が確認され、副作用も少ないことがわかっている既存薬剤の中から PKM2 活性剤としての作用をもつものを見出すことができれば、併用により現行の癌治療の効果をアップさせる可能性が高く、臨床応用への近道であることを考えると、インパクトのある研

究結果を導き出せると考えている。

(参考文献・引用文献)

Tamada et al., Cancer Research 2012;
72 (6):1438-1448

Tamada et al., Clinical Cancer
Research 2012; 18: 5554-5561

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

- (1) Ohmura M, Hishiki T, Yamamoto T,
Nakanishi T, Kubo A, Tsuchihashi K,
Tamada M, Toue S, Kabe Y, Saya H,
Suematsu M

“Impacts of CD44 knockdown in cancer
cells on tumor and host metabolic
systems revealed by quantitative
imaging mass spectrometry”

Nitric Oxide 2015 Apr 30;46:102-13.

査読有り

doi: 10.1016/j.niox.2014.11.005.

[学会発表](計 2件)

- (1) 玉田真由美、末松誠、佐谷秀行

“がん幹細胞マーカーCD44とPKM2の相互
作用を介した糖代謝制御”

第1回がん代謝研究会

2013年10月30日～11月1日

慶應義塾大学先端生命科学研究所

鶴岡メタボロームキャンパス レクテ

ャーホール 山形県 鶴岡市

- (2) Tamada M, Suematsu M, Saya H

“Metabolic change by CD44 ablation
enhances ROS level of glycolytic cancer
cells and improves the drug
resistance”

AACR (American Association for Cancer
Research) annual meeting 2013

2013年4月6日～4月10日 Washington,

DC 米国

[図書](計 1件)

- (1) 玉田真由美、佐谷秀行

“がん幹細胞マーカーCD44による細胞内グ
ルタチオン制御”

月刊「細胞」ニューサイエンス社

Vol.46 No.3, 2014;13(115)-16(118)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

玉田 真由美 (Tamada Mayumi)

慶應義塾大学・医学部・特任助教

研究者番号: 80528133

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

佐谷 秀行 (Saya Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号: 80264282