

学位申請論文

がん細胞特異的な
Warburg 効果を標的とした新たな制がん戦略

平成 30 年 3 月

嶋田 奈実

目次

目次.....	1
略語表.....	2
第1章 序論.....	4
1-1 緒言	
1-2 がん細胞の特徴的な代謝リプログラミング 「Warburg 効果」	
1-3 制がん剤創製の標的分子 Glyoxalase I (GLO I)	
1-4 Warburg 効果を標的とした制がん剤研究	
第2章 新規 GLO I 阻害剤の探索、及び GLO I の SNP による酵素活性、阻害剤に対する感受性の解析.....	13
2-1 緒言	
2-2 実験材料及び実験方法	
2-3 結果	
2-4 考察	
第3章 GLO I 阻害による代謝シフト誘導「スイッチングキーファクター」の同定.....	43
3-1 緒言	
3-2 実験材料及び実験方法	
3-3 結果	
3-4 考察	
第4章 Warburg 効果/グルタミノリシスを標的とした新規がん併用化学療法の開発.....	61
4-1 緒言	
4-2 実験材料及び実験方法	
4-3 結果	
4-4 考察	
第5章 総括.....	86
参考文献.....	90
謝辞.....	97

略語表

ARE	Antioxidant response element
ATP	Adenosine triphosphate
BPB	Bromophenol blue
BPHC-GSH	<i>S</i> -(<i>N</i> -4-bromophenyl- <i>N</i> -hydroxycarbamoyl)glutathione
DHAP	Dihydroxyacetone phosphate
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DTT	Dithiothreitol
EC ₅₀	The half maximal (50%) effective concentration (in cells)
FBP	Fructose-1,6-bisphosphate
FDG	2-deoxy-2[18F]fluoro-D-glucose
GA-3-P	Glyceraldehyde-3-phosphate
GLO I	Glyoxalase I
GLS	Glutaminase
GLUT	Glucose transporter
GSH	Glutathione
HIF1 α	Hypoxia induced factor 1 α
HPLC	High performance liquid chromatography
IC ₅₀	The half maximal (50%) inhibitory concentration (<i>in vitro</i>)
IDH	Isocitrate dehydrogenase
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
IKK	I κ B kinase
MG	Methylglyoxal
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
NF- κ B	Nuclear factor-kappa B
PARP	Poly(ADP-ribose) polymerase
PCR	Polymerase chain reaction
PDH	Pyruvate dehydrogenase
PDK	Pyruvate dehydrogenase kinase
PDP	Pyruvate dehydrogenase phosphatase
PET	Positron emission tomography
PFK	Phosphofructokinase
PKM	Pyruvate kinase muscle

QOL	Quality of life
RNA	Ribonucleic acid
SCO2	Synthesis of cytochrome c oxidase 2
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SNP	Single nucleotide polymorphism
TCA	Tricarboxylic acid
TIGAR	TP53-inducible glycolysis and apoptosis regulator
UV	Ultraviolet

第 1 章

序論

1-1 緒言

多くの疾患の中でがんが死因となる割合は、世界的に年々増加している。日本では1981年以降、死因の第一位となっており、毎年約30万人を超す人ががんで亡くなっている（厚生労働省 人口動態統計より）。近年、日本においてがん罹患者数は増え続け、最近では総死亡の3割を占めており、新規制がん剤の開発及び新たながん治療法の確立が急務となっている。

手術や放射線治療と並んで、がんの三大治療法の1つとなっている化学療法は、薬剤の服用や点滴によって全身のがん細胞に対して治療を行うことができる。化学療法で用いられる制がん剤は当初、がん細胞の特徴である異常な細胞増殖能を標的として開発されてきた。そのような制がん剤として、アルキル化剤、トポイソメラーゼ阻害薬、代謝拮抗薬、白金製剤、微小管阻害薬が挙げられる。これらの制がん剤による化学療法は効果的ではあるが、QOLの低下や重篤な副作用をもたらすことも問題となっている。これは細胞分裂ががん細胞特異的なものではなく、正常組織においても細胞分裂の盛んな細胞では制がん剤による毒性が強く現れてしまうからである。21世紀に入ると、がん細胞選択性の高い分子標的治療薬が臨床で用いられるようになってきている。このような分子標的薬は、がん細胞特有の増殖・転移に関わる分子の阻害を作用機序とするため、重篤な副作用が従来の制がん剤より比較的少ないと考えられている。

2000年、HanahanとWeinbergは、がん細胞の特性として自己増殖の維持、増殖抑制シグナルに対する感受性の低下、アポトーシスの回避、無制限な複製能、持続的な血管新生、浸潤・転移の活性化という6つの特徴を示した[1]。さらに2000年代後半になると、「がんの代謝」が注目されるようになってきた。次節でも詳しく述べるが、がんの代謝は約90年前にはがん細胞の特徴として発見されたものだったが、当時の研究では代謝と発がんの関係を十分に説明できず、長らく下火になっていた。しかし、近年の研究手法の発展により、がんの代謝変化（解糖系の亢進と酸化的リン酸化の抑制）は、ほとんど普遍的であることが判明し、「がんの代謝」は再び注目を集めるようになっていく[2]。

本論文では、この「がん特有のエネルギー代謝」に着目し、多くのがん細胞で高発現している解糖系関連酵素 Glyoxalase I を主標的として、制がん戦略について論じるものである。

1-2 がん細胞の特徴的な代謝リプログラミング 「Warburg 効果」

正常細胞は酸素存在下では解糖系につづく TCA サイクルに共役した電子伝達系における酸化リン酸化によりエネルギー (ATP) を産生している。しかし、がん細胞はグルコースを活発に取り込み、解糖系を亢進させ、酸素が存在していても酸化リン酸化よりも解糖系優位に ATP を産生する代謝リプログラミングが起こしている (図 1-1)。この現象は 1920 年代にドイツの Otto Warburg 博士が発見し、Warburg 効果として広く知られている[3]。一般的に、解糖系では 1 分子のグルコースから 2 分子のピルビン酸と 2 分子の ATP が生成され、さらにつづく TCA サイクルと電子伝達系では約 30 分子の ATP が産生される。がん細胞が酸化リン酸化を抑制して解糖系を亢進させているこの現象は、エネルギー産生という点において効率が悪いように思える。この代謝のリプログラミングが起こる理由として、解糖系を優位にすることによって、容易に ATP を産生するだけでなく、細胞増殖に必要な核酸、タンパク質、脂質などの生体高分子の原料を生合成できるためではないかと考えられている[4]。実際には、がん抑制遺伝子 *p53* の変異やがん遺伝子 *c-myc* による glucose transporter (GLUT) や解糖系酵素群の発現上昇、低酸素誘導因子 hypoxia induced factor 1 (HIF1) などの転写因子が解糖系の亢進に関与していると考えられている [5-8]。例えば、多くのがん細胞でみられる *p53* の機能異常では、IKK -NF- κ B 経路を介しての GLUT の発現量増加や、TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) の発現量減少による解糖系の律速酵素である phosphofructokinase (PFK) の抑制解除、synthesis of cytochrome c oxidase 2 (SCO2) の発現抑制によるミトコンドリア酸素消費量の低下などが報告されている [6-8]。がん遺伝子 *c-myc* の過剰発現は GLUT や解糖系酵素群の遺伝子発現を亢進させることが知られている[9]。また、がん組織の低酸素下で安定化する HIF も、GLUT や解糖系酵素群の遺伝子発現を亢進させ、さらに pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) の発現誘導を介してピルビン酸からアセチル CoA を産生する反応に必須な pyruvate dehydrogenase (PDH) をリン酸化して不活性化させ、酸化リン酸化を抑制する[10]。様々な要因によりがんの代謝は調節されているが、この代謝リプログラミングは、がん細胞の大きな特徴の一つだと考えられている[11]。

この特徴は、ヒトのがん組織でも同様であることが判明している。例えば、臨床で応用されている FGD-PET (positron emission tomography) 検査は、がんの進行度、治療効果、再発の有無などを診断するものであるが、グルコースと同様に GLUT により取り込まれる FDG (2-deoxy-2-[¹⁸F]fluoro-D-glucose) の取り込みをイメージングするもので、がん細胞の解糖系亢進を反映させているものである[12]。また、Hirayama らが行ったメタボローム解析では、各種がん組織でグルコースの減少および乳酸の蓄積が観察されている [13]。

このように多くのがん細胞は、特徴的な代謝リプログラミングを起こしていることから、Warburg 効果を標的としたがん化学療法が有効であろうと考えられる。

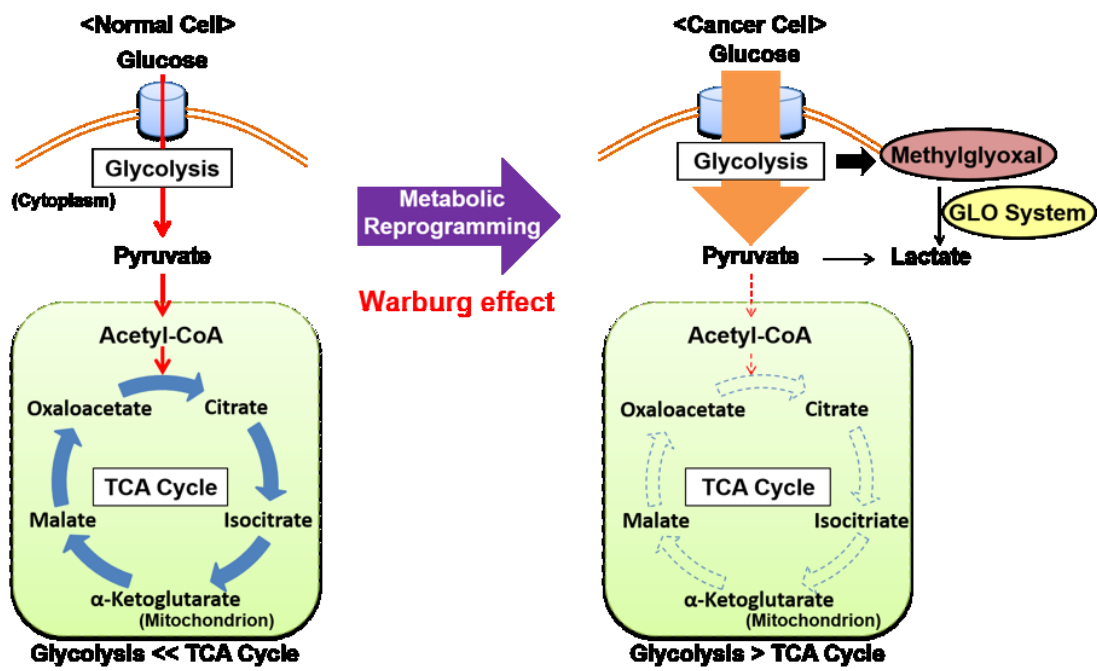
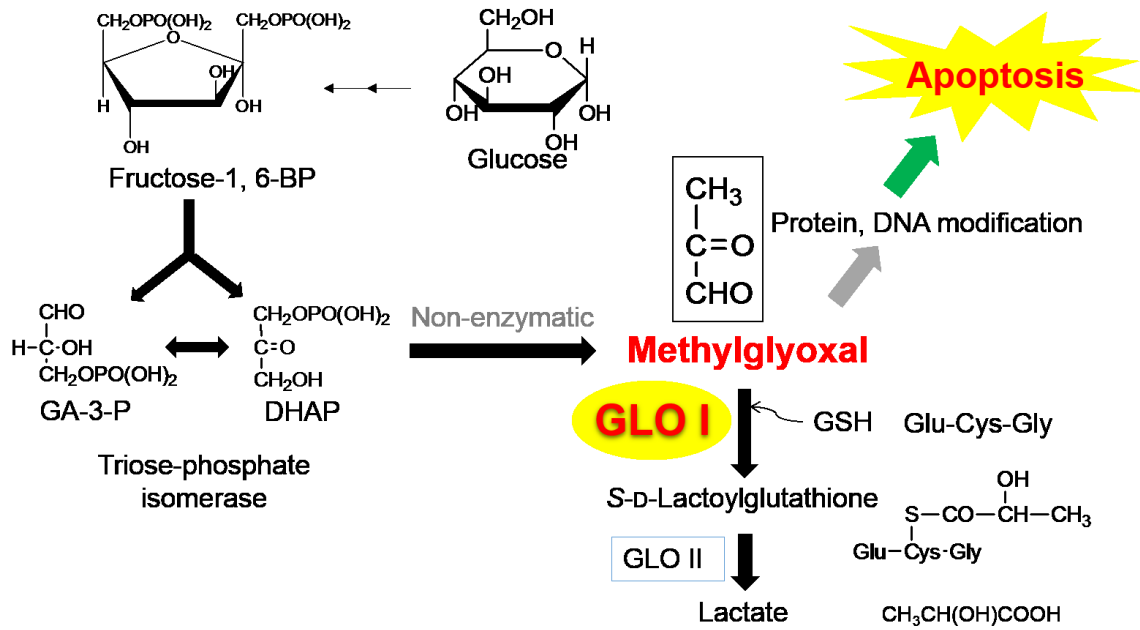


図 1-1 がん細胞のエネルギー代謝リプログラミング (Warburg 効果)

1-3 制がん剤創製の標的分子としての Glyoxalase I (GLO I)

Warburg 効果によるがん細胞の一つの大きな特性は、正常細胞には見られない glyoxalase (GLO) システムの発現である。このシステムの律速酵素が glyoxalase I (GLO I) [EC:4.4.1.5] であり、解糖系の反応過程で生成される有毒物質 methylglyoxal (MG) を glutathione (GSH) 存在下で無毒な S-D-lactoylglutathione に代謝し、lactate にして解毒する役割を果たしている (図 1-2) [14-16]。MG 形成の主要経路は、解糖系のジヒドロキシアセトンリン酸とグリセルアルデヒド-3-リン酸の非酵素的な反応であり、がん細胞が解糖系を利用する際、その形成は不可避である [17]。また、MG-GSH 複合体形成も非酵素的に行われる [18]。MG はアミノ酸のアルギニン残基、DNA、RNA のグアニンと反応し、タンパク質機能異常や細胞毒性をもたらすことから、MG の過剰な蓄積はアポトーシスを誘発するため、解糖系が亢進しているがん細胞では、この GLO システムを亢進させて MG を無毒化していると考えられている [19, 20]。実際に、GLO I はヒトの大腸がん、すい臓がん、悪性黒色腫、前立腺がん、乳がん、肺がんにおいて高発現がみられる [21-28]。さらに、抗がん剤耐性培養がん細胞株においても、GLO I の高発現が報告されている [29]。また、GLO I の高発現は、がんの予後不良因子となる報告もある [30-32]。これらのことから、GLO I 阻害剤は、MG が蓄積することによって、がん細胞選択的にアポトーシスを誘導するという新規作用機序による制がん剤として期待されている [33-35]。

これまでに、GSH 誘導体型 GLO I 阻害剤が数種報告されているが [36, 37]、GLO I 特異性が低いこと、また GSH がもつペプチド骨格が膜透過性・吸収性・安定性に影響を与えることから、制がん剤開発のリード化合物としては不適切であり、臨床応用は困難と考えられる。当研究室では、*in silico* 手法を用いて従来の GSH 誘導體とは異なる新規骨格を有した GLO I 特異的阻害剤 TLSC702 を見出しており、今後さらなる制がん作用の評価によって、Warburg 効果を標的とした新規制がん剤創製につながっていくことが期待される (図 1-3) [38]。

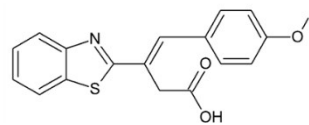


DHAP; Dihydroxyacetone phosphate

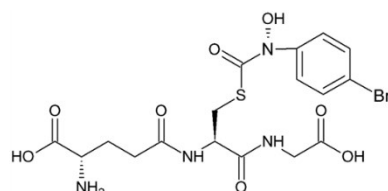
Fructose-1, 6-BP; fructose-1,6-bisphosphate

GA-3-P; Glyceraldehyde-3-phosphate

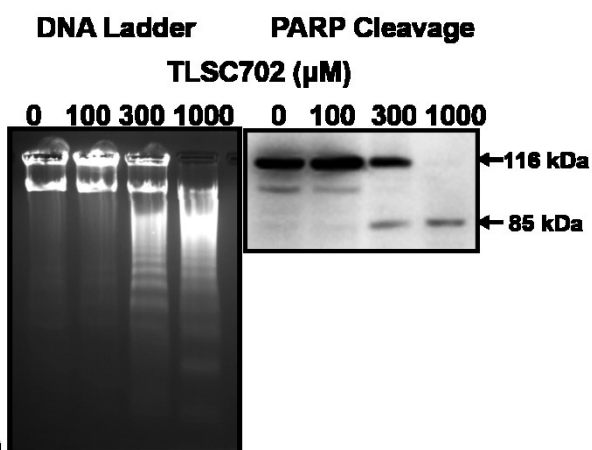
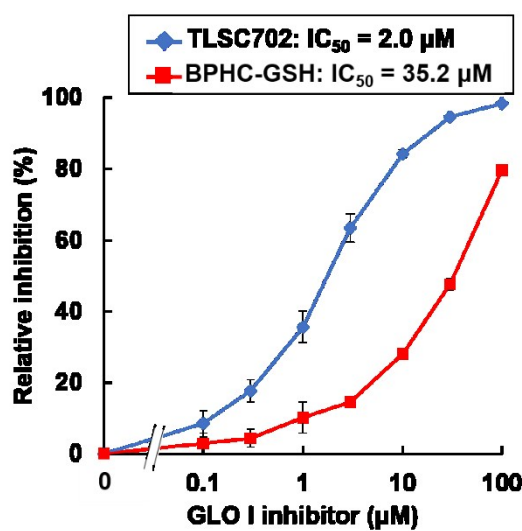
図 1-2 GLO システムによる methylglyoxal の解毒反応とアポトーシス誘導



TLSC702



GSH analog (BPHC-GSH)



BPHC-GSH; *S*-(*N*-4-bromophenyl-*N*-hydroxycarbonyl)glutathione

図 1-3 新規 GLO I 阻害剤 TLSC702 とアポトーシス誘導能

1-4 Warburg 効果を標的とした制がん剤研究

多くのがん細胞、がん組織は特徴的な代謝リプログラミング、Warburg 効果を起こしていることから、この Warburg 効果を標的としたがん化学療法が有効であると考えられる。現在、GLO1 阻害剤の他にもがん細胞の代謝の特徴に様々な面からアプローチしたいくつかの阻害剤の研究が進められている。以下に、最近着目されている阻害剤について述べる。

i. PKM2 阻害剤

第4章でも詳しく述べるが、解糖系の律速酵素の一つであるピルビン酸キナーゼのアイソザイムの一つである pyruvate kinase M2 (PKM2)はがん細胞で高発現しており、PKM2 はがん細胞選択的な標的分子となり得ると考えられる [2]。また、がん細胞の PKM2 を PKM1 に変換することで細胞増殖が顕著に抑制されることから、PKM2 はがん細胞の Warburg 効果に重要な役割を果たしていると考えられている [2]。PKM2 阻害剤として shikonin 等が報告されている [39]。

ii. GLS1 阻害剤

こちらも第4章で詳しく述べるが、がん細胞は解糖系の他に、グルタミンを用いた TCA サイクルの補充反応であるグルタミノリシスという経路も利用できる。グルタミノリシスの律速酵素 glutaminase 1 (GLS1)は、細胞質から取り込まれたグルタミンをグルタミン酸に変換する役割を果たす [38]。このグルタミン酸がさらに α -ケトグルタル酸 (α -KG)に変換され TCA サイクルをドライブしている。また、GLS1 には2つのスプライスバリエント、KGA form と GAC form が存在し、GAC form はがん細胞において高発現がみられるため、がん細胞特異的な標的分子になり得ると考えられている [40-43]。GLS1 阻害剤として BPTES, Dibenzophenanthridines, CB-839 等が報告されている[41-43]。

iii. Nrf2 阻害剤

多くのがん細胞において、転写因子 Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2) が安定化しており、がん細胞に酸化ストレスに対する抵抗性をもたせていることが知られている。通常 Nrf2 は Keap1 (Kelch-like EHC-associated protein 1)と結合することによりユビキチン化を受けて分解されてしまうが、酸化ストレスにさらされた際に Keap1 の構造が変化し、Keap1 の結合が解かれ Nrf2 が核内移行し、遺伝子プロモーターの ARE (antioxidant response element) 領域に結合することでペントースリン酸経路を活性化させて同化反応を促進し、また γ GCL を介したグルタチオン合成を促進させる。このため、Keap1-Nrf2 経路は酸化ストレスに対する生体防御の中で

重要な役割を果たしていると考えられる [44]。そこで、Nrf2 阻害剤は、がん細胞の同化反応の阻害による増殖抑制効果、がん細胞に活性酸素種を蓄積させることによる細胞死の誘導効果等の作用機序による制がん効果が期待されている。Nrf2 阻害剤として ML385 が報告されている [45]。

このように、Warburg 効果を標的としたいくつかの制がん剤の研究が進められているが、がんの代謝リプログラミングは様々な要因により調節されており、複数の因子に影響を与えていることから、こうした阻害剤は単独で用いるよりも、複数の阻害剤を組み合わせる併用療法が有効であると考えられる。また、今日の臨床現場でも、がん化学療法において、治療効果の増大を狙い複数の抗がん剤を併用して投与することが主流となっており、Warburg 効果を標的とした新たな制がん戦略の構築を目指す上でも、併用療法の開発は重要なポイントになると考えられる。

第 2 章

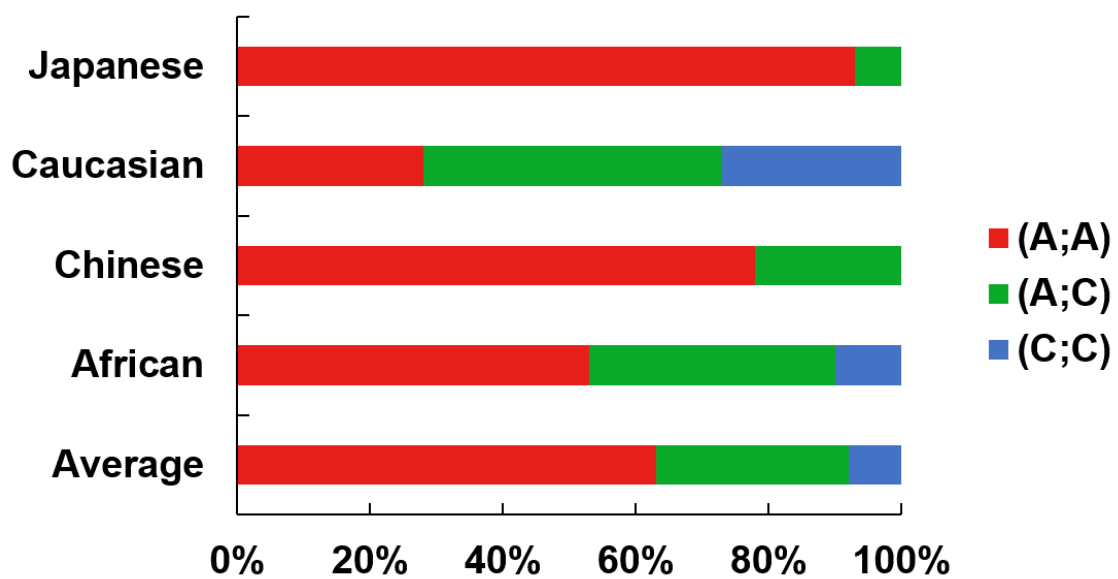
新規 GLO I 阻害剤の探索、及び GLO I の SNP による
酵素活性、阻害剤に対する感受性の解析

2-1 緒言

序論でも述べたが、GLO I 阻害剤は、MG を蓄積させることによって、がん細胞選択的にアポトーシスを誘導するという新規作用機序による制がん剤として期待されている。これまでに当研究室では、*in silico* 手法を用いて 4 位=O、5 位-OH フラボノイド化合物が GLO I 酵素反応の基質である MG/GSH 遷移状態をミミックするという予測から、特に高い GLO I 阻害能を有する *myricetin* を見出し、その構造に基づいたファーマコフォアを構築した[38]。本章では、このファーマコフォアモデルを利用した新たな GLO I 阻害剤リード化合物の創製について述べる。

一方、ヒト GLO I にはいくつかの遺伝子多型が報告されている。遺伝子多型とは「ある生物種集団のゲノム塩基配列中に一塩基が変異した多様性が見られ、その変異が集団内で 1%以上の頻度で見られる状態」と定義される。GLO I の一塩基多型 (SNP : Single Nucleotide Polymorphism) は 1975 年に J. Kömpf らによって初めて報告され、その後 70 の SNP が同定されてきた [46, 47]。その中でも GLO I の 332 番目の塩基がアデニンもしくはシトシンとなる SNP が一般的である。GLO I C332A となる SNP、つまり Ala111Glu はアミノ酸置換をもたらす唯一の多型である[48, 49]。これまでに GLO I C332A の SNP は、乳がん、前立腺がん、すい臓がん、慢性血液透析患者における血管合併症、自閉症、パニック障害といった疾患で臨床研究が行われている[50-54]。この SNP が GLO I に構造的変化をもたらし、その酵素活性に影響を与え、がんのリスクファクターになるのではないかと推察する報告もある [50, 51]。また、この SNP は人種差があるといわれている (図 2-1) [55]。しかし、この SNP が GLO I の酵素活性自身に影響を与えるか否かについては、いまだ不明のままである。また、この GLO I SNP が GLO I 阻害剤に対する感受性に影響を与えるか否かについても分かっていない。もし、影響がある場合には、制がん剤としての使用の際に、SNP を考慮して投薬量や薬剤選択を検討する必要がある。こうしたことから、SNP による酵素活性の差異や GLO I 阻害剤感受性などを解明することは、GLO I 阻害剤の開発、制がん剤としての利用を目指す上で重要である。

この章では、新規 GLO I 阻害剤の探索、及び GLO I の SNP による酵素活性、阻害剤に対する感受性の解析を行い、GLO I 阻害剤の制がん剤としての臨床応用の可能性について論じる。



(<http://www.snpedia.com/index.php/Rs2736654> より一部改変)

図 2-1 ヒトにおける GLO I の SNP の人種差

2-2 実験材料及び実験方法

材料

薬剤 ; 4-((1E)-2-phenylvinyl)phenol

Resveratrol

Oxyresveratrol

Piceatannol

3,3',4,5'-tetramethoxypiceatannol

3-(1, 3-benzothiazol-2-yl)-4-(4-methoxyphenyl)but-3-enoic acid (TLSC702)

(ナミキ商事)

S-(N-4-bromophenyl-N-hydroxycarbamoyl)glutathione (BPHC-GSH)

(本学薬学部内呂研究室にて合成)

抗体 ; mouse anti-GLO I (Novus Biologicals)

mouse anti-β-actin (SIGMA-ALDRICH)

horseradish peroxidase (HRP)標識 anti-mouse 二次抗体

(Jackson ImmunoResearch Laboratories)

In vitro GLO I assay

GLO I 活性評価は、MG/GSH を基質とし、GLO I 酵素反応の生成物である S-D-lactoylglutathione が 240 nm に吸収極大をもつことを利用した紫外可視吸光度測定法により行った。リコンビナントヒト GLO I (rhGLO I)25 μl を 384 well plate に分注し、室温で 15 分間プレインキュベートした基質溶液(反応系での最終濃度 7.9 mM MG, 1 mM GSH, 182 mM imidazole-HCl (pH 7.0), 14.6 mM MgSO₄) 25 μl を加えて反応を開始させ、10 秒ごとに 5 分間、240 nm における吸光度を測定した。比活性は、mmol S-D-lactoylglutathione formed/min/mg protein として算出した。また、このとき GLO I 阻害剤を加えた場合の S-D-Lactoylglutathione の生成量の減少度を GLO I 阻害剤の阻害能として阻害率を算出した。阻害率は下記の式により算出する。

$$\text{阻害率 (\%)} = [(S_b - S_i) / S_b] \times 100$$

S_b: 阻害剤 (-) の 5 分間の吸光度の傾き

S_i: 阻害剤 (+) の 5 分間の吸光度の傾き

阻害剤の各濃度とその時の阻害率からグラフを作成した。また、阻害率が 50%になる値を IC₅₀ (50% 阻害濃度) とした。IC₅₀ は阻害率 50%以上と 50%未満の 2 点の濃度とその時の阻害率から直線式を導出し、算出した。

細胞培養

使用した細胞株； ヒト前骨髄球性白血病細胞 HL-60 細胞

ヒト非小細胞肺癌細胞 NCI-H460 細胞

ヒト非小細胞肺癌細胞 NCI-H522 細胞

使用した培地； RPMI-1640 (Wako) supplemented 10% fetal bovine serum

細胞株を 37°C、5%CO₂ インキュベーター中で培養した。

Western Blot 法

2.0×10⁵ cells の NCI-H460 細胞、NCI-H522 細胞を 3.5 cm dish に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。回収した細胞に 1×SDS Sample Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v), 8% (v/v) glycerol, 50 mM DTT, 0.02% (w/v) BPB)を加えてソニケーションを行い、100°Cで 5 分間加熱処理したものを SDS-PAGE 用サンプルとした。

各サンプルを SDS-PAGE によって分離した後、ニトロセルロースメンブレンに転写した。その後、メンブレンをブロッキング溶液に浸し、室温で 1 時間ブロッキングした。メンブレンを TBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 400 mM NaCl, 0.05% (w/v) Triton X-100)で 10 分間×1 回洗浄し、検出対象に対する一次抗体反応液を用いて室温で 1 時間、または 4°Cで一晩抗原抗体反応を行った。一次抗体反応後のメンブレンを TBST で 10 分間×3 回洗浄し、適当な二次抗体反応溶液を用いて室温で 1 時間抗原抗体反応を行った。二次抗体反応後のメンブレンを TBST で 10 分間×3 回洗浄し、ImmunoStar[®] LD (Wako)を用いた化学発光システム及び Light Capture System (ATTO)によって可視化した。

WST assay

1) 3000, 1500, 750 cells の NCI-H522 細胞を 96 well plate に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。piceatannol (0, 10, 30, 50, 80, 100 μM in 0.1% DMSO)処理を行い 37°C、5%CO₂ の条件で 24, 48, 72 時間培養した。そこに Cell Counting Kit-8 (DOJINDO)溶液を 10 μL/100 μL 加え、37°C、5%CO₂ の条件で反応させた。マイクロプレートリーダー (Molecular Devices)を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

2) 3000, 1500, 750 cells の NCI-H460 細胞、NCI-H522 細胞を 96 well plate に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。piceatannol (50 μM in 0.05% DMSO)処理を行い 37°C、5%CO₂ の条件で 24, 48, 72 時間培養した。そこに Cell Counting Kit-8 (DOJINDO)溶液を 10 μL/100 μL 加え、37°C、5%CO₂ の条件で反応させた。マイクロプレートリーダー (Molecular Devices)を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

以上の実験から得られた吸光度について、細胞生存率を下記の式により算出する。

$$\text{細胞生存率 (\%)} = [(As - Ab)/(Ac - Ab)] \times 100$$

As: 阻害剤 (+) の吸光度

Ac: 阻害剤 (-) の吸光度

Ab: ブランクの吸光度

阻害剤の各濃度とその時の細胞生存率からグラフを作成した。また、細胞生存率が 50% になる値を EC₅₀ (50% 効果濃度) とした。EC₅₀ は阻害率 50%以上と 50%未満の 2 点の濃度とその時の細胞生存率から直線式を導出し、算出した。

細胞株への遺伝子導入

2.0×10⁵ cells の NCI-H522 細胞を 6 cm dish に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。その後、FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega)を用いて、GLO I 発現ベクター (pcDNA3.1/EcoRV/GLO I)を遺伝子導入し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。回収した細胞 3000 cells を改めて 96 well plate に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。piceatannol (0, 10, 30 μM in 0.03% DMSO)処理を行い 37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。そこに Cell Counting Kit-8 (DOJINDO)溶液を 10 μl/100 μl 加え、37°C、5%CO₂ の条件で反応させた。マイクロプレートリーダー (Molecular Devices)を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

111Ala-, 111Glu-GLO I 発現ベクターの作製

大腸菌タンパク質発現系による rhGLO I を精製するために、111Ala-, 111Glu-GLO I 発現ベクターを作製することとした。大腸菌発現用ベクター pET28a (N 末端 His-Tag) (Novagen)に 111Glu-GLO I タンパク質をコードする DNA 配列を挿入した発現ベクター pET28a/EcoRI/111Glu-GLO I を作製した。さらに、この発現ベクターから下記のプライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産物をライゲーションすることで 111Ala-GLO I タンパク質をコードする DNA 配列を得た。この DNA 配列を pET28a ベクターに挿入し、pET28a/EcoRI/111Ala-GLO I を得た。

(1) 5'-TTAGAATTCGCAGAACCGCAGCCCCCGT-3'

5'GTCGCATCATCTTCAGTGCCC-3',

(2) 5'-CCAGAGTTACCACAAT-3'

5'-AATGAATTCCTACATTAAGGTTGCCATTT-3'

大腸菌タンパク質発現系による rhGLO I の精製

rhGLO I タンパク質を得るために、大腸菌タンパク質上述で作製した GLO I 発現ベクターを大腸菌 BL21 株に導入し、2×YT プレート (+kanamycin)に播種して 37°C で約 16 時間培養し、コロニーを得た。得られたコロニーを 1 ml の 2×YT 培地に加えて 37°C で約 16 時間振盪培養した。この培養液を 100 ml の 2×YT 培地に加え OD₆₀₀ = 0.6 になるまで 37°C で振盪培養した。これに、終濃度 1 mM の IPTG を添加して発現誘導を行い、37°C で 3 時間振盪培養した。この培養液を 1,500×g、4°C で 5 分間遠心分離を行い、大腸菌として沈殿を回収した。回収した大腸菌に 5 ml の Lysis buffer (50 mM sodium

phosphate (pH 7.0), 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, 500 mM NaCl)を加え、ソニケーションを行い破碎した。破碎後、20,000×g、4°C で 20 分間遠心分離を行い、その上清に 100 μl の TALON® Metal Affinity Resins (Clontech)を加えて 6×His-rhGLO I を結合させた。これをオープンチップカラム (SARSTEDT)を用いて Wash buffer (50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 1 mM PMSF, 500 mM NaCl, 50 mM Imidazole)で洗浄し、Elution buffer (50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 500 mM NaCl, 300 mM Imidazole)で溶出した。溶出された rhGLO I について、SDS-PAGE、CBB 染色で精製度、目的のタンパク質の存在を確認し、Bradford 法およびゲル染色画像の解析によって目的タンパク質量を定量した。

タンパク質-阻害剤複合体の結晶構造解析

111Glu-GLO I と *S*-(*N*-hydroxy-*N*-*p*-iodophenylcarbonyl) glutathione (HIPC-GSH)との結晶構造は、Protein Data Bank から得た(PDB entry: 1QIN) [56]。ここから、111Ala-GLO I の予測構造を得るために、結晶構造上の 111 位の Glu の、Ala へのアミノ酸置換を、Swiss-PdbViewer ソフトウェアを用いて行った [57]。111Ala-, 111-Glu-GLO I/HIPC-GSH の構造を分子動力学シミュレーション (後述) により計算し、111Ala-, 111-Glu-GLO I/HIPC-GSH の構造を図示した。活性中心と 111 位アミノ酸の距離を DS viewerPro を用いて算出した。

分子動力学(MD)シミュレーション

MD シミュレーションは ff99 力場、周期的境界条件のもと、AMBER9 の sander モジュールを用いて実行した [58]。タンパク質-阻害剤複合体構造は、82 Å × 83 Å × 85 Å のボックス内に入れ、TIP3P 水分子モデルによる溶媒で満たした [59]。また、システムの総電荷が 0 になるように Na⁺イオンを追加した。このシステムは、250 ステップの最急降下法、続いて 250 ステップの共役勾配法によりエネルギー最小化を実施した。その後、NVT アンサンブルのもと、400 ピコ秒で 0 から 300K に温度を上昇させ、平衡状態とした。平衡状態に達した後、NPT アンサンブルで 1 ナノ秒の MD シミュレーションを実行した。トラジェクトリは 10 ピコ秒ごとに保存した。全ての水素原子と共有結合している原子は、SHAKE アルゴリズムによる制限を加えている [60]。

MM-GBSA 法

結合自由エネルギーは AMBER9 を用いて、MM/GBSA 法により計算を行った [61]。本方法では、単一のトラジェクトリを使っている [62]。結合自由エネルギーは、分子力場に基づくエネルギー ($\Delta E_{MM} = \Delta E_{elec} + \Delta E_{vdw}$)と溶媒和エネルギー(ΔG_{solv})の和として計算している。分子力場に基づくエネルギーは、MD シミュレーションと同じ分子力場を用いている。溶媒和エネルギーは、Generalized Born(GB)モデルによる静電的な溶媒和エネルギー(ΔG_{GB})と溶媒接触表面積に基づく非極性の溶媒和エネルギー(Δ

GSA)の和として計算している。静電的な溶媒和エネルギーは、Onufrievらにより開発された改良型 GB モデルを用い、タンパク質の内部と外部の誘電率はそれぞれ 1 と 80 とした [63]。非極性の溶媒和エネルギーは ICOSA 法を用いて溶媒接触表面積から算出した [64]。MD シミュレーションのトラジェクトリから得られたスナップショットを用いて結合自由エネルギーを計算した。

2-3 結果

新規 GLO I 阻害剤の探索

これまでに当研究室では、*in silico* 手法を用いて従来の glutathione 誘導体とは異なる新規骨格を有する GLO I 特異的合成阻害剤 TLSC702 を創製している。これは、*in silico* 解析によって 4 位=O、5 位-OH フラボノイド化合物が GLO I 酵素反応の基質である MG/GSH 遷移状態をミミックするという予測から、特に高い GLO I 阻害能を有する myricetin を見出し、その構造に基づき構築されたファーマコフォアにより創製されたものである。今回、天然有機化合物ライブラリに GLO I 阻害剤の新しい骨格を探索したところ、スチルベン骨格を見出した (Fig. 2-1)。スチルベン骨格をもつ化合物のうち、4-((1E)-2-phenylvinyl)phenol, resveratrol, oxyresveratrol, piceatannol, 3, 3', 4, 5'-tetramethoxypiceatannol の 5 つの化合物の GLO I 阻害能を、rhGLO I を用いた *in vitro* GLO I assay により調べたところ、piceatannol が強い GLO I 阻害能を有することが分かった (100 μ M 処理で約 90%阻害) (Fig. 2-2)。さらに rhGLO I に、piceatannol (0, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 μ M in 0.1% DMSO)を処理し、*in vitro* GLO I assay を行ったところ、IC₅₀ が 0.75 μ M であることが分かった (Fig. 2-3)。

Piceatannol による培養がん細胞への影響の解析

Piceatannol が GLO I の酵素活性を阻害することが分かったので、次に培養がん細胞株への影響を解析することとした。まず、培養がん細胞への影響を評価する細胞株として、GLO I への依存性が高い細胞株を用いようと考えた。そこで、ヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL-60 細胞, ヒト非小細胞肺癌細胞株 NCI-H460 細胞, NCI-H522 細胞の 3 つの細胞株の GLO I 発現量を Western blot 法により解析したところ、NCI-H522 細胞が GLO I 高発現細胞株であることが分かった (Fig. 2-4)。この NCI-H522 細胞を GLO I 高依存性細胞株とし、NCI-522 細胞に piceatannol (0, 10, 30, 50, 80, 100 μ M in 0.1% DMSO) を 24, 48, 72 時間処理した際の細胞生存率を WST assay により測定した。その結果、piceatannol 濃度依存的、また時間依存的に細胞生存率が低下した (EC₅₀: 24 h 49.9 μ M, 48 h 24.6 μ M, 72 h 20.3 μ M) (Fig. 2-5)。

また、この細胞生存率の低下が GLO I 阻害によるものか否かを解析するために、GLO I 低発現細胞株 NCI-H460 細胞と GLO I 高発現細胞株 NCI-H522 細胞における piceatannol 感受性の解析を行った。NCI-H460 細胞と NCI-H522 細胞に piceatannol (50 μ M in 0.05% DMSO)をそれぞれ 24, 48, 72 時間処理し、細胞生存率を WST assay により測定した。その結果、piceatannol 処理による細胞生存率の低下は、NCI-H460 細胞よりも NCI-H522 細胞で強くみられた(細胞生存率、NCI-H460 細胞: 24 h 約 90%, 48 h 約 40%, 72 h 約 50%, NCI-H522 細胞: 24 h 約 50%, 48 h 約 30%, 72 h 約 1%) (Fig. 2-6)。さらに、NCI-H522 細胞に GLO I を一過性過剰発現させた際の piceatannol 感受性の解析も行った。

GLO I 過剰発現ベクターを導入した NCI-H522 細胞に piceatannol (0, 10, 30 μM in 0.03% DMSO)を 72 時間処理した際の細胞生存率を WST assay により測定した。その結果、GLO I を過剰発現させた NCI-H522 細胞ではコントロールと比較して、piceatannol 処理による細胞生存率低下が有意に抑制された (細胞生存率 コントロール: piceatannol 10 μM 処理 約 70%, 30 μM 処理 約 40%, GLO I 過剰発現: piceatannol 10 μM 処理 約 100%, 30 μM 処理 約 70%) (Fig. 2-7)。

111Ala-, 111Glu-GLO I の立体構造の解析

GLO I の SNP により、活性に差異があるか否かを検討するために、Ala111Glu 変異が立体構造に変化をもたらすか否かを解析することとした。111Ala-GLO I と 111Glu-GLO I を合わせた PDB ファイルを用意し、111 番目のアミノ酸と GLO I の活性中心との結合距離を解析した。その距離は 111Ala-GLO I が 32.17 Å、111Glu-GLO I が 32.08 Å であった (Fig. 2-8A)。さらに、予想された立体構造から、2 つの構造にはほとんど違いがないことが示唆された (Fig. 2-8B)。

111Ala, 111Glu-GLO I タンパク質の精製

SNP による rhGLO I タンパク質は TALON を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した (Fig. 2-9A, B)。精製した GLO I のタンパク質量を、Bradford 法およびゲル染色画像の解析によって定量した (Fig. 2-10A, B)。

In vitro GLO I assay の至適バッファの検討

これまで、*in vitro* GLO I assay の手順は、Oray, Norton らによって報告され、様々な GLO I の研究に用いられてきた [65]。しかし、これは一つの酵素を対象としたもので、今回のように同じ酵素だが、SNP により構造や活性が異なる可能性のある酵素の活性を解析する際は、それぞれの酵素に至適なバッファを検討する必要があると考えた。

今回私は、SNP による両 GLO I の活性差異を比較解析するために、まず *in vitro* GLO I assay における至適バッファ条件の検討を行うことにした。至適バッファについて、GLO I 活性が高く保たれること、ヒトの生体内条件に近いことの 2 点を条件とし、実験を行った。

初めに従来 of バッファ (182 mM imidazole-HCl (pH 7.0), 14.6 mM MgSO_4) にならい、182 mM Imidazole-HCl (pH 7.0) 存在下で MgCl_2 濃度を 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 15 mM とし、111Ala, 111Glu-GLO I の活性を解析したところ、0.3 mM までは高い GLO I 活性を保つことがわかった (Fig. 2-11A)。通常、細胞内マグネシウム濃度は約 0.8 mM であることから、マグネシウム濃度を 1 mM と決定した。

次に pH の検討を行うこととした。Imidazole-HCl の pH を 6.2, 6.6, 7.0, 7.4, 7.8 とし、182 mM Imidazole-HCl、1 mM MgCl_2 存在下で両 GLO I 活性を解析したところ、pH 7.0

において最も高い GLO I 活性を示した (Fig. 2-11B)。このため、Imidazole-HCl の pH は 7.0 で用いることと決定した。

さらにバッファの濃度検討として、Imidazole-HCl (pH 7.0) の濃度を 50, 100, 150, 182 mM とし、1 mM MgCl₂ 存在下で検討したところ、Imidazole-HCl (pH 7.0) の濃度依存的に高い GLO I 活性を示した (Fig. 2-11C)。ここで、MG-GSH 基質複合体形成時に Imidazole-HCl (pH 7.0) の濃度を高くすると、興味深いことに、GLO I 活性が高く保たれることが判明した (Fig. 2-11D)。このとき、GLO I 酵素溶液に用いる Imidazole-HCl (pH 7.0) の濃度や NaCl 等の塩の存在が GLO I 活性に影響しないことも分かっている。以上のことから、GLO I 酵素溶液用 buffer を 20 mM imidazole-HCl (pH 7.0), 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂、GLO I 基質溶液用 buffer を 182 mM imidazole-HCl (pH 7.0), 1 mM MgCl₂ とし、反応系の最終濃度 52.4 mM imidazole-HCl (pH 7.0), 120 mM KCl, 1 mM MgCl₂ となるような、GLO I 活性が高く保たれ、かつ生体内条件に近い、至適バッファの条件を決定した。

111Ala, 111Glu-GLO I タンパク質の比活性

111Ala, 111Glu 各 GLO I タンパク質の比活性を調べるために、*in vitro* GLO I assay を行った。その結果、111Ala-GLO I と 111Glu-GLO I の比活性はそれぞれ 4.48±1.10、3.49±1.12 mmol/min/mg protein であり、比活性に有意差はなかった (Fig. 2-12A, B)。比活性は、mmol S-D-lactoylglutathione formed/min/mg protein を計算し、示している。

111Ala, 111Glu-GLO I の GSH 誘導体型 GLO I 阻害剤との結合様式

111Ala, 111Glu 各 GLO I と GSH 誘導体型 GLO I 阻害剤 (HIPC-GSH) との結合様式の違いを検討するために、*in silico* 手法を用いてそれらの結合様式を MM-GBSA 法により解析した。その結果、HIPC-GSH は 111Ala, 111Glu 各 GLO I タンパク質におおよそ同程度の結合自由エネルギー (MMGBSA value) で結合していることがわかった (Table 2-1)。

111Ala, 111Glu-GLO I への TLSC702 の阻害効果の解析

111Ala, 111Glu 各 GLO I における GSH 誘導体型 GLO I 阻害剤 BPHC-GSH と TLSC702 の阻害効果を評価するために、*in vitro* GLO I assay を行った。111Ala-GLO I と 111Glu-GLO I に対する BPHC-GSH の IC₅₀ は、それぞれ 8.8、7.7 μM であった (Fig. 2-13A)。一方、111Ala- and 111Glu-GLO I に対する TLSC702 の IC₅₀ は、それぞれ 1.9、2.6 μM であった (Fig. 2-13B)。両 GLO I において、二つの GLO I 阻害剤への感受性に有意差はなかった。

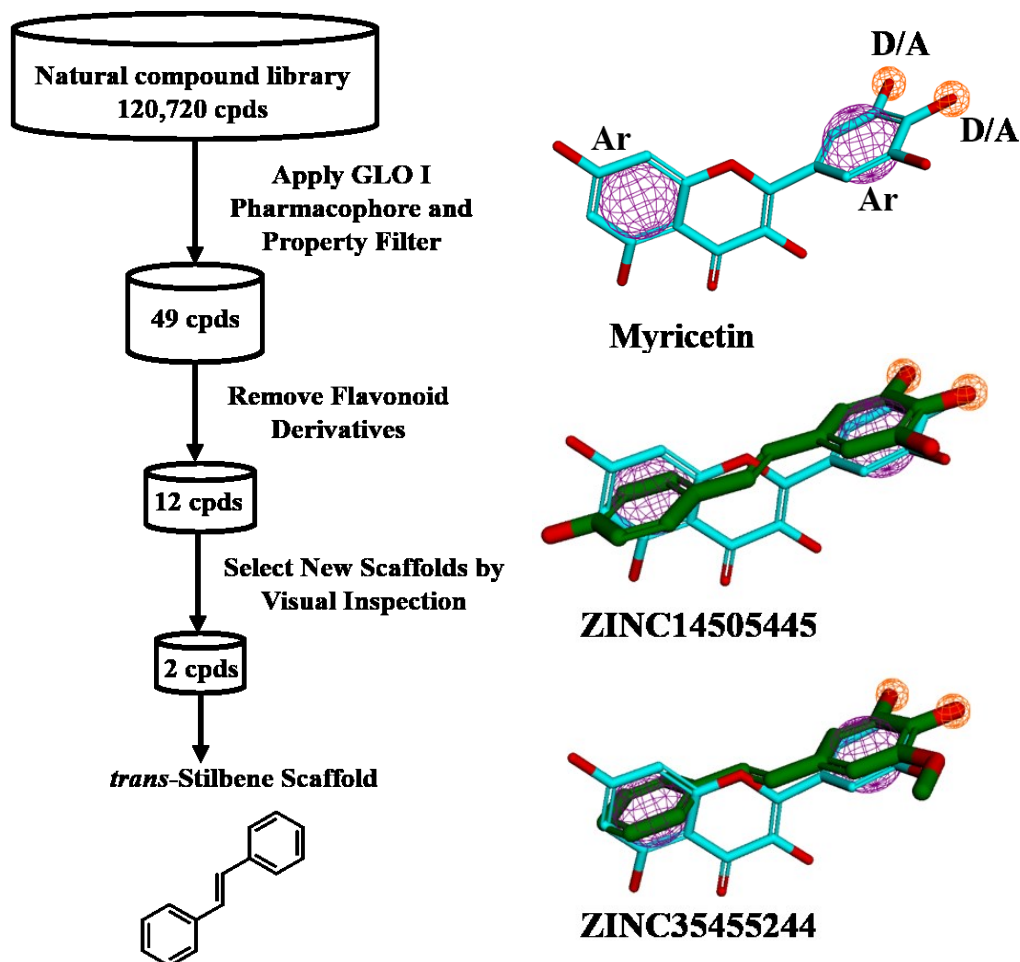
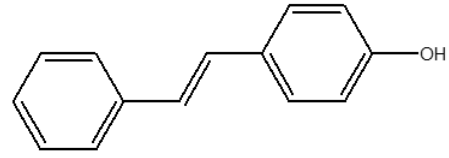
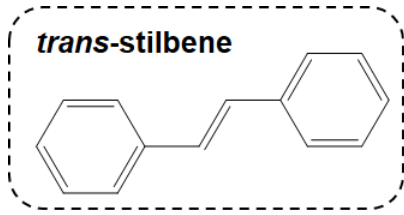


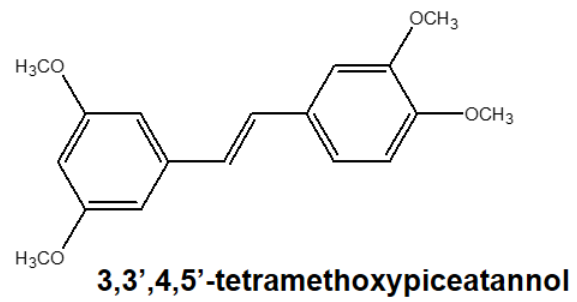
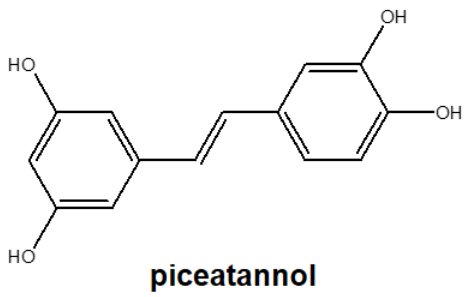
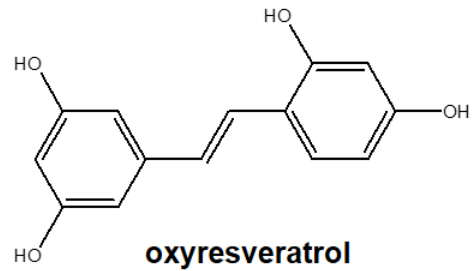
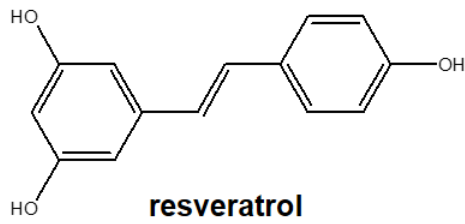
Fig. 2-1 The workflow of virtual screening strategy for the discovery of GLOI inhibitory new scaffold using the GLOI pharmacophore of myricetin

(A) Schematic representation of virtual screening approaches. Cpds stand for compounds. (B) The pharmacophore for GLO I inhibitors derived from myricetin (Ar: Aromatic; D: Hydrogen Donor; A: Hydrogen Acceptor). Carbon and oxygen atoms of myricetin are illustrated in marine and red sticks, respectively. (C) Screened compounds with the *trans*-stilbene scaffold in the current virtual screening. ZINC14505445 and ZINC35455244 are identification codes in ZINC database.²¹ Carbon and oxygen atoms of screened compounds are illustrated in green and red sticks, respectively.

A



4-((1E)-2-phenylvinyl)phenol



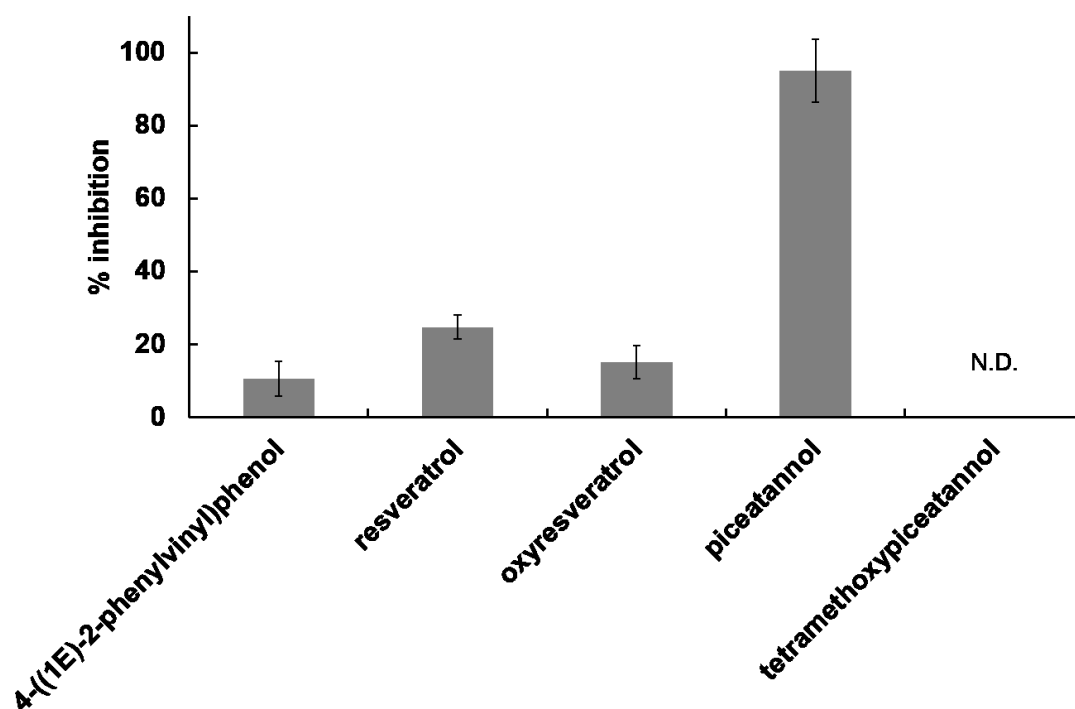
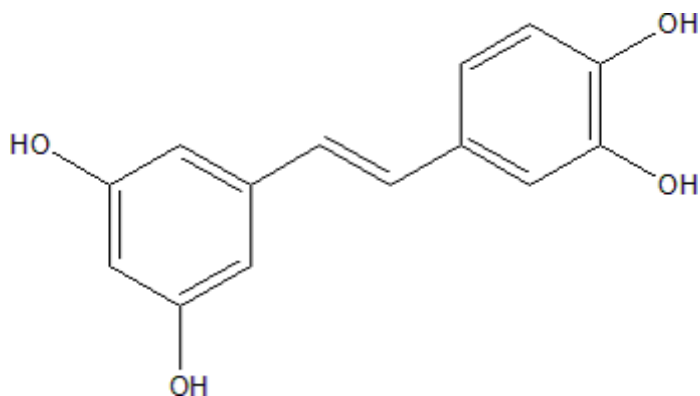


Fig. 2-2 The human GLO I inhibitory activities of *trans*-stilbene compounds

(A) The chemical structures of *trans*-stilbene compounds. (B) The inhibitory activities of the five *trans*-stilbene compounds to rhGLO I were investigated at the concentration of 100 μ M. Data are the averages of three independent experiments and bars show the SD values. N. D. means not detected.

A



B

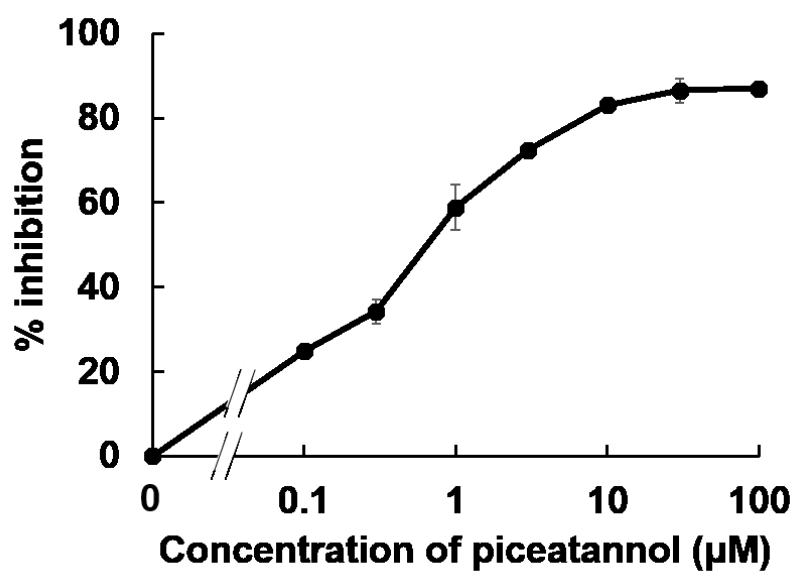


Fig. 2-3 The dose-dependency of human GLO I inhibitory activity of piceatannol

(A) The structure of piceatannol. (B) The dose-dependency of rhGLO I inhibitory activity of piceatannol was measured by *in vitro* GLO I assay. Data are the averages of three independent experiments and bars show the SD values.

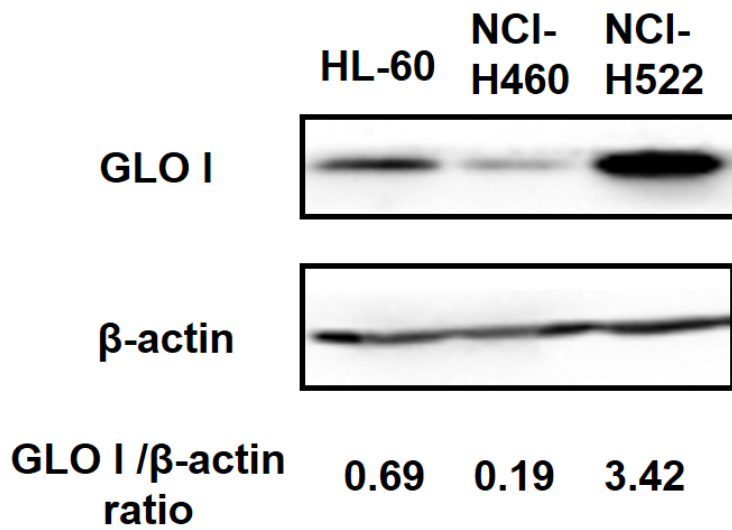


Fig. 2-4 Western blot analysis of GLO I protein levels in HL-60 cells, NCI-H522 and NCI-H460 cells

The expression levels of GLO I in HL-60 cells, NCI-H522 and NCI-H460 cells were analyzed by Western blot analysis as described in Materials and Methods. The values are the ratios of each GLO I to β -actin band intensities calculated by densitometric analysis.

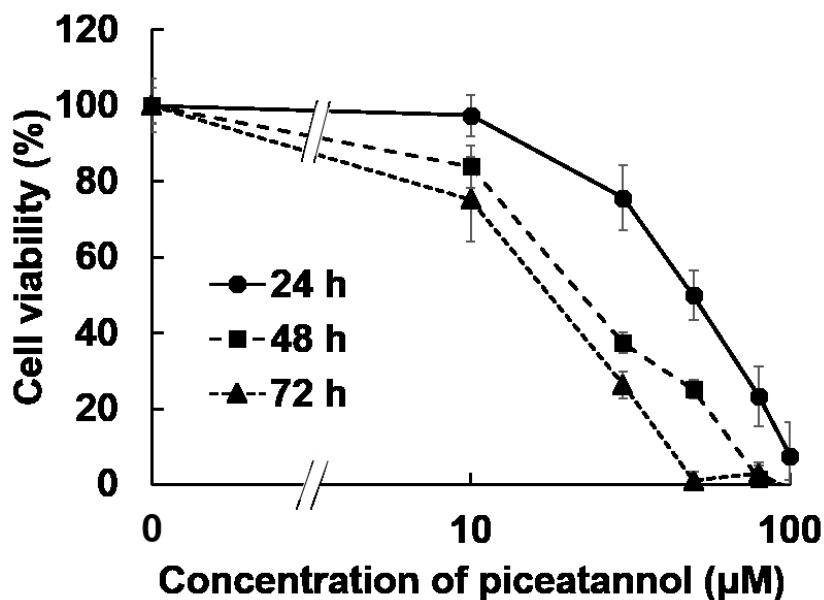


Fig. 2-5 The antiproliferative effect of piceatannol on NCI-H522 cells

NCI-H522 cells were treated with piceatannol (0, 10, 30, 50, 80, 100 μ M) for 24, 48 and 72 h. The cell viabilities (% of control) were measured by using WST assay. Data are the averages of three independent experiments and bars show the SD values.

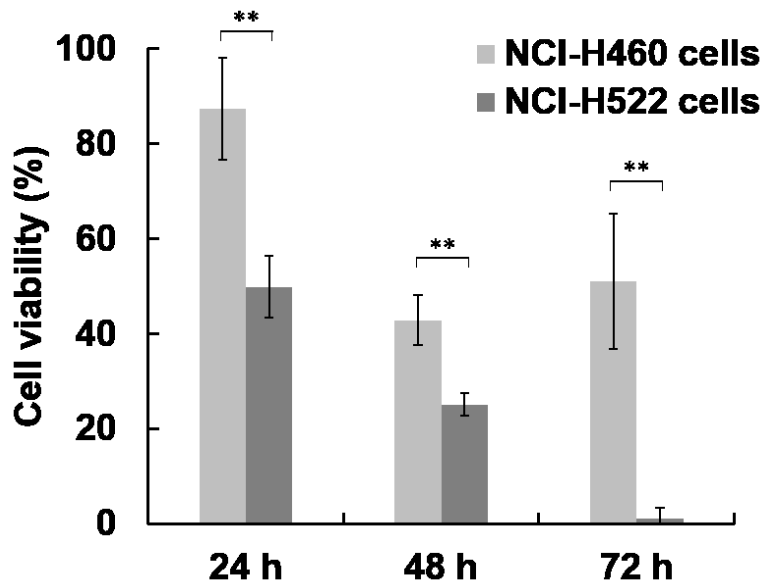


Fig. 2-6 The comparison of antiproliferative effects of piceatannol on NCI-H522 and NCI-H460 cells

NCI-H522 and NCI-H460 cells were treated with 50 μ M of piceatannol for 24, 48 and 72 h. The cell viabilities (% of control) were measured by using WST assay. Data are the averages of three independent experiments and bars show the SD values (**: $p < 0.01$). Statistical evaluations were performed using the Student's t test.

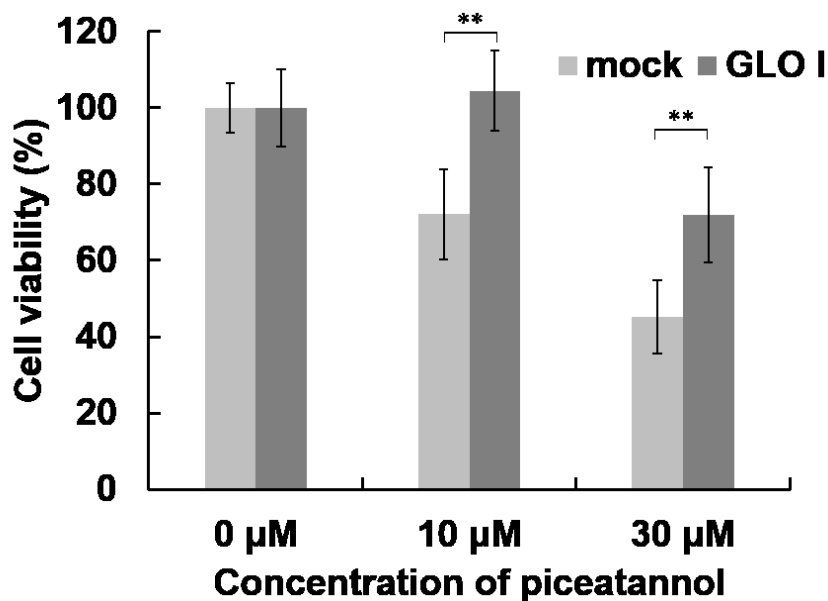
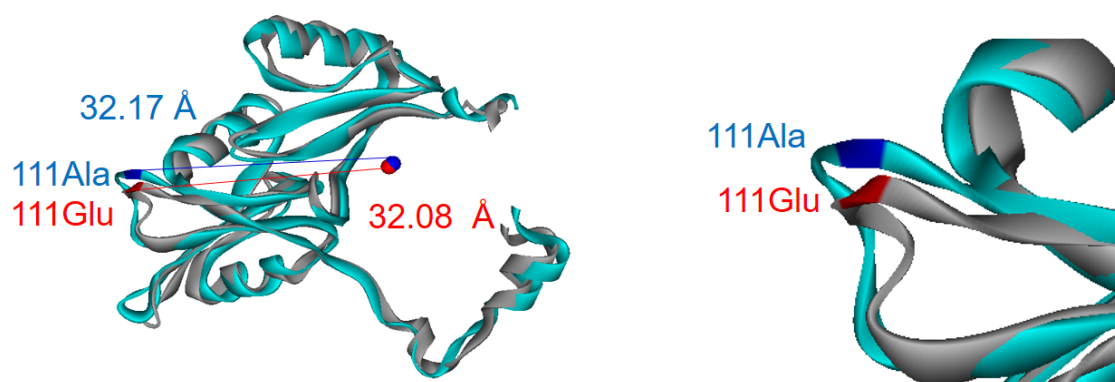


Fig. 2-7 The effect of transient overexpression of GLO I on the viability of piceatannol-treated NCI-H522 cells

NCI-H522 cells were transfected with the expression vector for human GLO I (GLO I) or mock-transfected with empty vector (mock). After 24 h post-transfection, the cells were treated with indicated concentrations of piceatannol for 72 h. The cell viabilities (% of non-transfected/nontreated control) were measured by using WST assay. Data are the averages of three independent experiments and bars show the SD values (**: $p < 0.01$). Statistical evaluations were performed using the Student's t test.



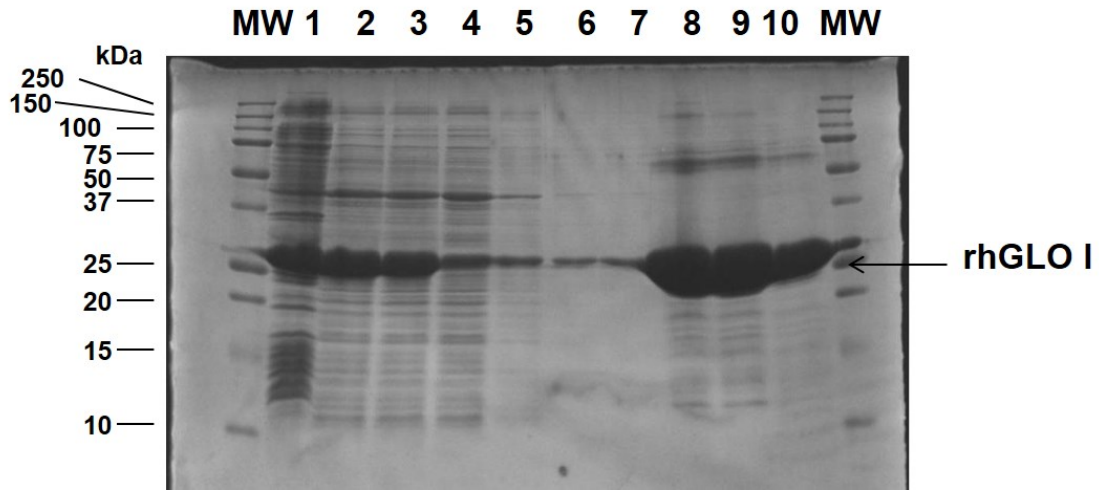
	Distance to the active center (Å)
111Ala-GLO I	32.17
111Glu-GLO I	32.08

Fig. 2-8 Schematic representation of the conformations of 111Ala- and 111Glu-GLO I variants schematic representation of GLO I

(A) The conformations of 111Ala- and 111Glu-GLO I variants, (B) Expanded figure of (A).

Zn as the active center is shown in a ball representation with colored red. The structure of compounds in the vicinity of Zn are GSH analog inhibitors. This analysis was carried out by DS viewerPro.

A



B

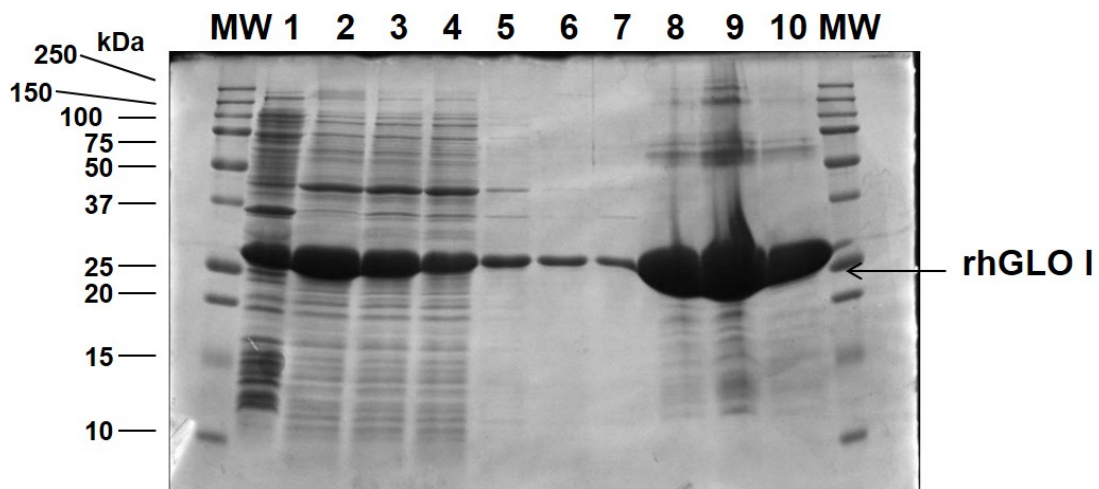


Fig. 2-9 The rhGLO I expression in E. coli and purification with TALON® resin

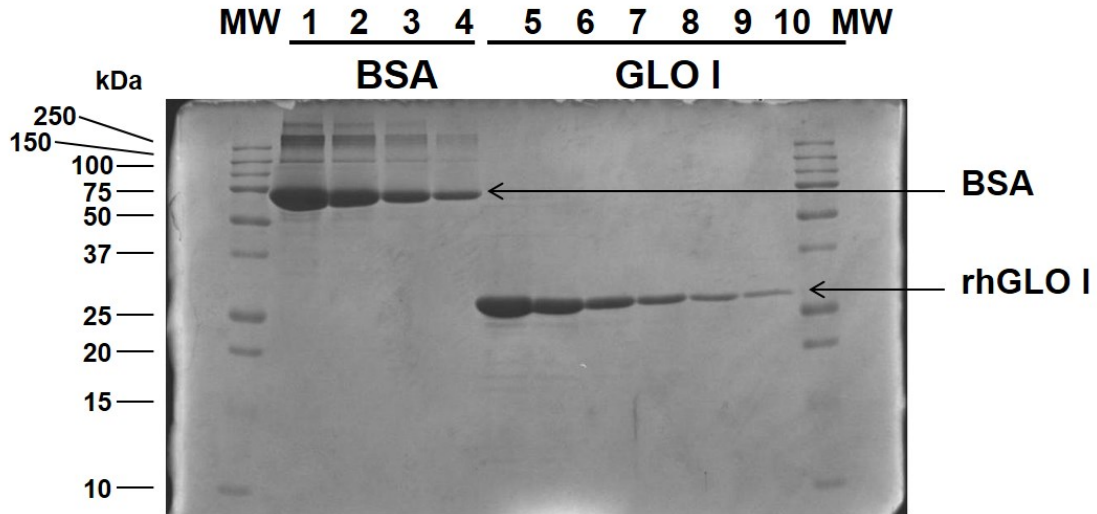
(A) 111Ala-GLO I, (B) 111Glu-GLO I

Lane MW: Molecular weight marker (Bio-Rad); Lane 1: insoluble fraction of lysate; Lane 2:

soluble fraction of lysate; Lane 3: resin/lysate mix; Lane 4: supernatant of resin/lysate mix;

Lane 5-7: Wash fractions; Lane 8-10: Elution fractions. The experiments were performed three times

A



B

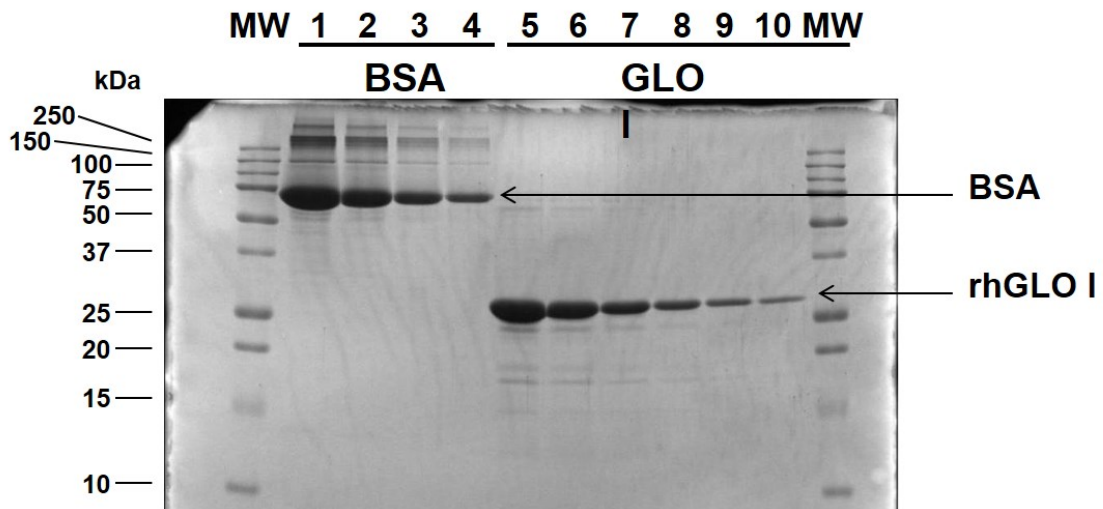
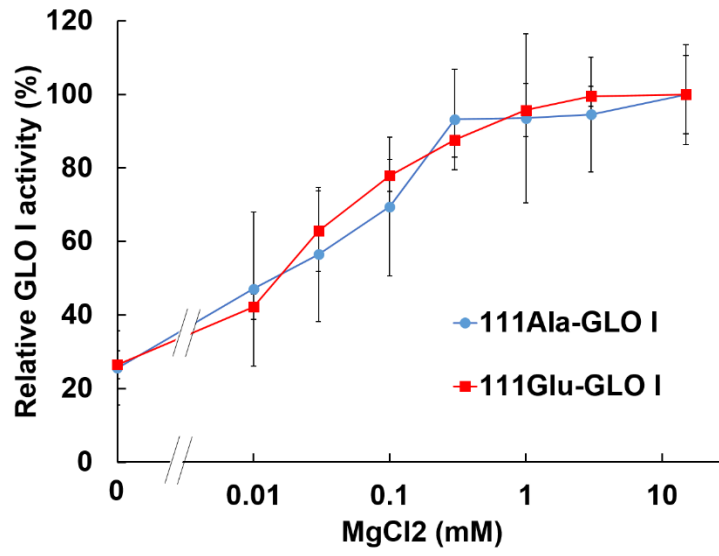


Fig. 2-10 Quantitation of rhGLO I by Bradford method and gel imaging by SDS-PAGE and CBB stain

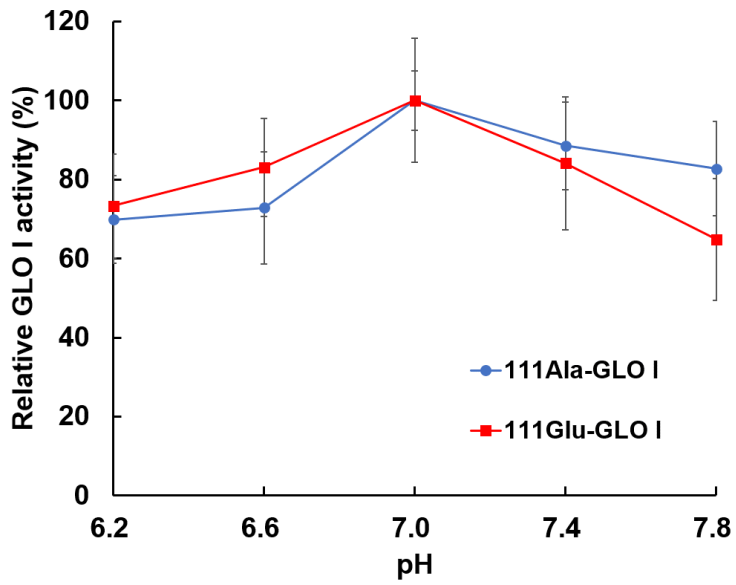
(A) 111Ala-GLO I, (B) 111Glu-GLO I

Lane MW: Molecular weight marker (Bio-Rad); Lane 1-4: BSA standards as the concentrations of 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$; Lane 5-10: rhGLO I as the concentrations of 1000 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 62.5 $\mu\text{g/ml}$, 31.25 $\mu\text{g/ml}$. The concentration of rhGLO I was calculated by protein assay. The experiments were performed three times

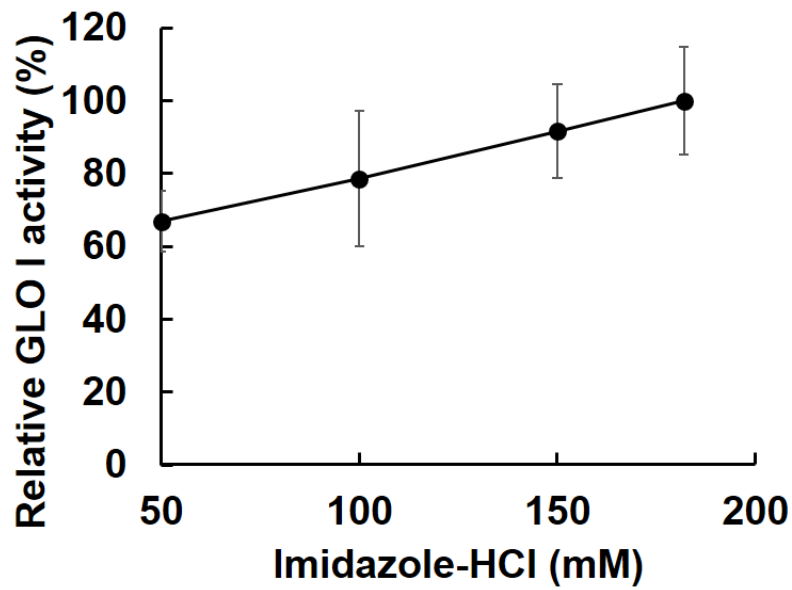
A



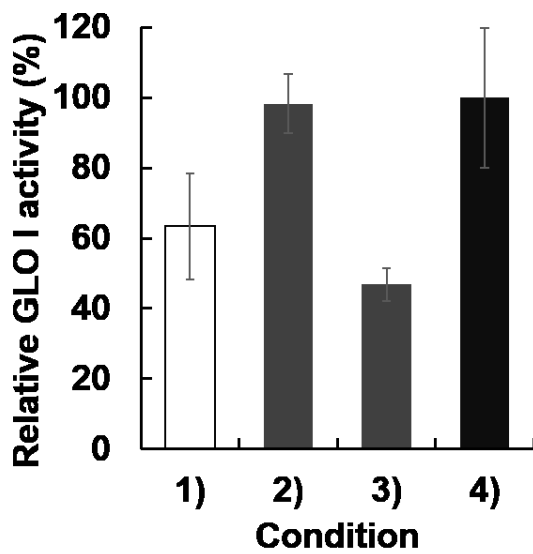
B



C



D



	Condition of Imidazole-HCl buffer (pH 7.0)	Relative GLO I activity (%)
1)	Enzyme: 50 mM Substrate: 50 mM	63.4 ± 15.1
2)	Enzyme: 50 mM Substrate: 182 mM	98.3 ± 8.4
3)	Enzyme: 182 mM Substrate: 50 mM	46.8 ± 4.6
4)	Enzyme: 182 mM Substrate: 182 mM	100 ± 19.9

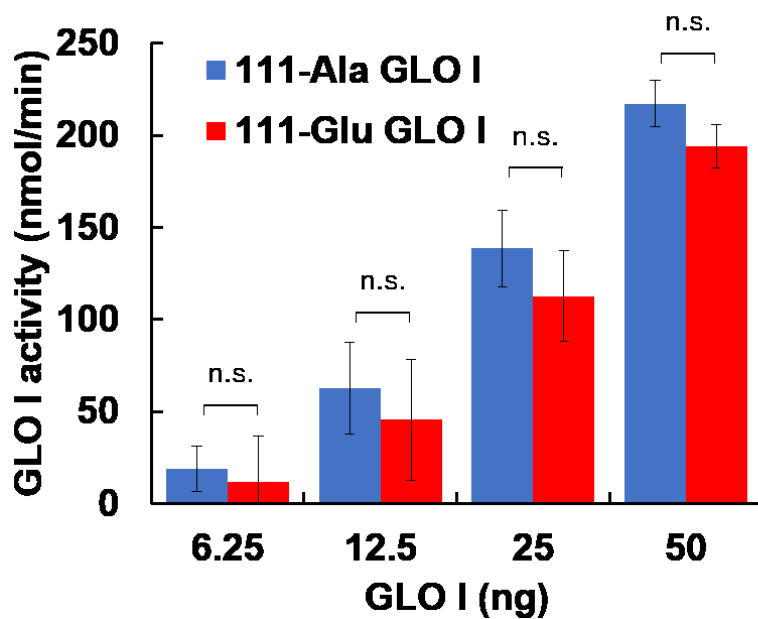
Fig. 2-11 Optimization of *in vitro* GLO I assay buffer conditions

(A) *In vitro* GLO I assay was performed to measure each rhGLO I activity in the presence of 182 mM Imidazole-HCl (pH 7.0) and MgCl₂ (0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 15 mM). The relative GLO I activity was calculated as 100% at 15 mM MgCl₂. The data are expressed as the mean ± SD from 3 independent experiments

(B) *In vitro* GLO I assay was performed to measure each rhGLO I activity in the presence of 1 mM MgCl₂ and 182 mM Imidazole-HCl (pH 6.2, 6.6, 7.0, 7.4, 7.8). The relative GLO I activity was calculated as 100% at 182 mM Imidazole-HCl (pH 7.0). The data are expressed as the mean ± SD from 3 independent experiments

(C) *In vitro* GLO I assay was performed to measure each rhGLO I activity in the presence of 1 mM MgCl₂ and Imidazole-HCl (pH 7.0) (50, 100, 150, 182 mM). The relative GLO I activity was calculated as 100% at 182 mM Imidazole-HCl (pH 7.0). The data are expressed as the mean ± SD from 3 independent experiments

(D) The effect of Imidazole-HCl buffer (pH 7.0) on GLO I activity during GLO I enzyme dilution or substrate complex formation in the presence of 1 mM MgCl₂. The relative GLO I activity was calculated as 100% at 182 mM Imidazole-HCl (pH 7.0) indicated in the condition of 4). The data are expressed as the mean ± SD from 3 independent experiments



	Specific Activity (mmol/min/mg)
111Ala-GLO I	4.48 ± 1.10
111Glu-GLO I	3.49 ± 1.12

Fig. 2-12 Specific activities of 111Ala- and 111Glu-GLO I variants

In vitro GLO I assay was performed to measure each rhGLO I activity, the specific activity of GLO I were calculated as described in “Materials and Methods”. Statistical evaluations were performed using the Student’s t test. The data are expressed as the mean ± SD from 3 independent experiments. n.s. means not significant.

Table 2-1 Calculated Binding Free Energies (ΔG_{Bind})^a of GLO I /HIPC-GSH complex

GLO I at position 111	ΔG_{Bind}	ΔE_{MM}		ΔG_{solv}	
		ΔE_{ele}	ΔE_{vdw}	ΔG_{GB}	ΔG_{SA}
ALA	-47.19	-180.82	-41.21	-7.34	182.18
GLU	-44.86	-187.68	-40.98	-7.06	190.86

^a The calculated binding free energies and the individual energy components (kcal/mol).

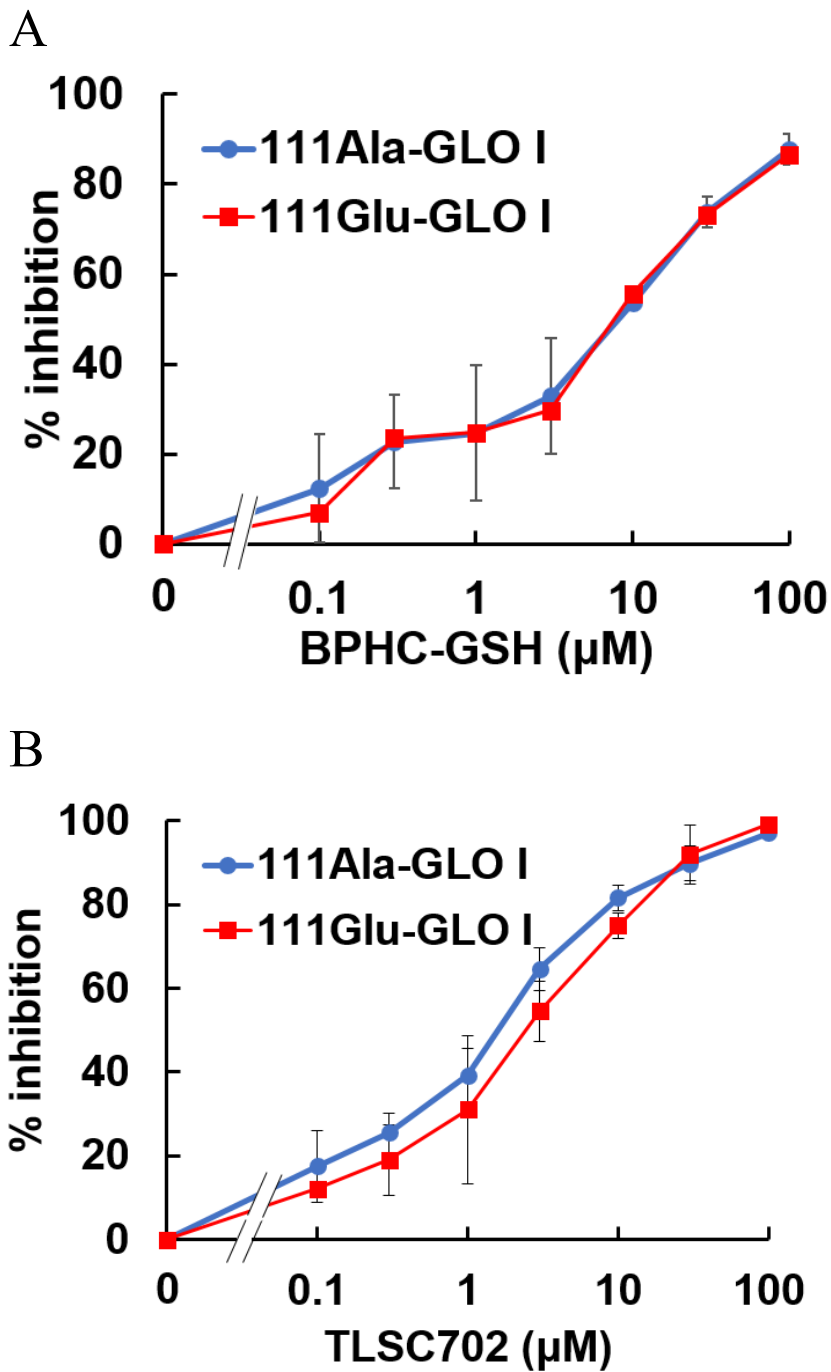


Fig. 2-13 Comparison of the potencies of GLO I inhibitors on 111Ala- and 111Glu-GLO I variants

In vitro GLO I assay was performed as described in “Materials and Methods”. (A)BPHC-GSH and (B)TLSC702. Each data are the averages of three independent experiments and bars show the SD values. There was no significant difference at any concentration. Statistical evaluations were performed using the Student’s t test.

2-4 考察

この章では、新規 GLO I 阻害剤の探索、及び GLO I の SNP による酵素活性、阻害剤に対する感受性の解析を行った。まず、今回、天然有機化合物ライブラリから GLO I 阻害剤の新しい骨格を探索したところ、スチルベン骨格を見出した (Fig. 2-1)。そして、スチルベン化合物の中でも piceatannol が強い GLO I 阻害能を有することを見出し (Fig. 2)、piceatannol の *in vitro* GLO I assay における IC₅₀ は 0.75 μM であった (Fig. 2-3)。今回検討したスチルベン化合物の中でも piceatannol が強い GLO I 阻害能を示した理由として、構造を比較して、piceatannol の 1,2-diol が重要なのではないかと考えられる。また、NCI-H522 細胞に piceatannol を処理した際、piceatannol 濃度依存的、また時間依存的に細胞生存率が低下した (Fig. 2-5)。さらに、piceatannol 処理による細胞生存率の低下が、GLO I 低発現細胞株の NCI-H460 細胞よりも GLO I 高発現細胞株 NCI-H522 細胞で強くみられたこと (Fig. 2-6) や、GLO I を過剰発現させた NCI-H522 細胞ではコントロールと比較して、piceatannol 処理による細胞生存率低下が有意に抑制された (Fig. 7) ことから、piceatannol 処理による細胞増殖抑制効果は、GLO I 阻害によるものである可能性が示唆された。このことは今後、piceatannol の構造を基にして、合成展開が可能な新規 GLO I 阻害剤リード化合物の創製へとつながるものと期待される。

続いて、GLO I 阻害剤の臨床応用を考えるにあたり、GLO I Ala111Glu の多型がその比活性と GLO I 阻害剤への感受性に影響を与えるか否かを解析することとした。まず、*in silico* 手法を用いて 111Ala-, 111Glu-GLO I タンパク質の結晶構造を解析し、111 番目のアミノ酸と GLO I 活性中心との距離を測ったところ、その距離はそれぞれ 32.17、32.08 Å であった (Fig. 2-8)。GLO I は、Gln33, Glu99, Glu172, His126 の 4 つのアミノ酸残基が活性中心の Zn²⁺ に配位し、Zn²⁺ とそれらのアミノ酸残基の距離はおおよそ 2.0 Å であると報告されている [66]。また、MG-GSH 基質複合体は活性中心の Zn²⁺ に配位し、グルタチオンの硫黄原子と Zn²⁺ の距離はおおよそ 3.7 Å であると報告されている [66]。今回の結果は、111 番目のアミノ酸の位置は活性中心から 30 Å 以上も遠いことを示しており、GLO I Ala111Glu の多型は、酵素の構造にはほとんど影響を与えないと考えられる。

次に、SNP による 111Ala-, 111Glu-GLO I タンパク質の酵素活性差異を比較解析することとした。ここで私は、SNP により構造や機能の違う可能性のある酵素の活性を解析する際は、それぞれの酵素に至適なバッファーを選択する必要があると考え、*in vitro* GLO I assay の至適バッファー条件の検討を行うこととした。至適なバッファー条件として、最も GLO I 活性が高く、生体内環境に近い条件を目指すこととした。従来の *in vitro* GLO I assay バッファーは、14.6 mM MgSO₄、182 mM Imidazole-HCl (pH 7.0) であり、imidazole が GLO I の活性に重要であることが報告されている [67]。そこで

私は従来のバッファーにならい、Imidazole-HCl バッファーを基に、マグネシウム濃度、Imidazole-HCl の pH、Imidazole-HCl 濃度を検討することとした。マグネシウムは MgSO₄ と MgCl₂ を用いて検討を行い、有意差がなかったことから MgCl₂ を用いることとした。その結果、MgCl₂ 濃度は 1 mM、Imidazole-HCl の pH を 7.0 と決定した (Fig. 2-11A, B)。また、Imidazole-HCl 濃度について、基質複合体形成時に Imidazole-HCl 高濃度であると高い GLO I 活性を示すことが判明した (Fig. 2-11D)。これは、高濃度 Imidazole 存在下において基質複合体形成の亢進がおきているためではないかと考えた。今回行った *in vitro* GLO I assay は基質複合体を形成させてから GLO I 酵素溶液と混合し、反応を開始させる実験系である。そのため、酵素溶液と基質溶液のバッファーを新たに設定することで、反応系における最終濃度を 52.4 mM Imidazole-HCl (pH 7.0)、120 mM KCl、1 mM MgCl₂ とする、より生体内条件に近く、111Ala-, 111Glu-GLO I タンパク質どちらに対しても高い GLO I 活性を示すバッファー条件を決定することができた。新たに決定したバッファー条件で 111Ala-, 111Glu-GLO I の比活性を解析したところ、それぞれ比活性が 4.48±1.10、3.49±1.12 mmol/min/mg protein となり、有意差がないことが判明した (Fig. 2-12)。以上の結果から、私は GLO I Ala111Glu の多型は酵素の構造にはほとんど影響を与えず、酵素活性にも差をもたらさないと結論付けた。

さらに、GLO I の SNP による阻害剤に対する感受性の解析を行った。*in silico* 手法を用いて 111Ala-, 111Glu-GLO I の GSH 誘導体型阻害剤 HIPC-GSH との結合様式を解析した。その結果、HIPC-GSH は 111Ala, 111Glu 各 GLO I タンパク質におおよそ同程度の結合自由エネルギー (MMGBSA value) で結合していることがわかった (Table 1)。実際、*in silico* による予想通り、*in vitro* GLO I assay において、GSH 誘導体型 GLO I 阻害剤 BPHC-GSH と当研究室で見出した GLO I 阻害剤 TLSC702 の 111Ala-, 111Glu-GLO I に対する感受性はほとんど差がないことが分かった (Fig. 2-13A, B)。これは、先に述べたように GLO I Ala111Glu の多型は、酵素の構造にはほとんど影響を与えず、ほとんど同じ比活性であることから、阻害剤に対する感受性にも影響を与えなかったためではないかと考えられる。重要なことに、TLSC702 は GSH 誘導体型 GLO I 阻害剤よりも効果的に 111Ala-, 111Glu-GLO I 両者を同程度に阻害することを明らかにした。

以上の結果をまとめると、今回私は、新規 GLO I 阻害剤の候補化合物として、スチルベン骨格を有する天然物 piceatannol を見出した。また、SNP による GLO I の酵素活性差異を比較解析するために *in vitro* GLO I assay における至適バッファー条件の検討を行い、*in vitro*, *in silico* 手法により GLO I Ala111Glu 多型は GLO I 比活性に影響を与えないことを初めて示した。さらに、従来の GSH 誘導体型 GLO I 阻害剤と、当研究室が見出した新規 GLO I 阻害剤 TLSC702 を用いて、111Ala-, 111Glu-GLO I タンパク質の GLO I 阻害剤への感受性を評価したところ、感受性にはほとんど差がないことを示した。このことは、がん患者にみられる GLO I Ala111Glu 多型は、GLO I の酵素活性自身、及び GLO I の活性中心を標的とした GLO I 阻害剤の有効性に影響を与えないことを示唆し

ており、GLO I 阻害剤が臨床使用において、SNP の差異を考慮せずに全ての GLO I に適応できる可能性があると考えられる。また、TLSC702 は GSH 誘導体型 GLO I 阻害剤よりも効果的に 111Ala-, 111Glu-GLO I を阻害した。したがって、111Ala-, 111Glu-GLO I において当研究室で見出した TLSC702 は、SNP の影響を受けず、強い阻害能をもつ阻害剤であることから、新規制がん剤開発のリード化合物としての展開が期待される。

第3章

GLO I 阻害による代謝シフト誘導 「スイッチングキーファクター」の同定

3-1. 緒言

GLO I 阻害剤は、MG を蓄積させることによって、がん細胞選択的にアポトーシスを誘導するという新規作用機序による制がん剤として期待されている [33-35]。当研究室ではこれまでに、*in silico* 手法を用いて従来の glutathione 誘導体とは異なる新規骨格を有する GLO I 特異的合成阻害剤 TLSC702 を見出している [38]。しかし、TLSC702 は、*in vitro* での GLO I 阻害能は強いものの、細胞レベルでのアポトーシス誘導には高い濃度を必要とすることが分かっている。その理由の一つとして、がん細胞は GLO I を阻害されると MG の蓄積を回避するために、解糖系に依存的なエネルギー代謝から TCA サイクル (ミトコンドリア呼吸) 依存的になるような「代謝シフト」を起こして生き延びてしまう可能性があるという仮説を立てた。この着想を得たのは、培養がん細胞株に TLSC702 を処理すると、未処理細胞と比較して培養液中フェノールレッドの色の変化が抑制されていたことを観察していたことによるものである。フェノールレッドは pH 指示薬として培養液中に含まれており、酸性領域では黄色に変化するが、これは培養細胞株の乳酸産生を反映している。そこで私は、TLSC702 処理により培養液中フェノールレッドの色の変化が抑制されることは、培養がん細胞株の乳酸産生量の低下、すなわち解糖系の利用度が低下しているのではないかと考えるに至った。

Warburg 効果をはじめ、がん細胞は細胞内外のさまざまな変化に応じてその代謝経路を切り替えることができると考えられており、一つの代謝経路を阻害しただけでは他の代謝経路を利用して生存してしまう可能性が高い [68]。よって、がん細胞が GLO I を阻害され「代謝シフト」を引き起こすのであれば、これを引き起こす「スイッチングキーファクター」の同定を行うことが、GLO I 阻害剤を制がん剤として利用するための重要なポイントであると考えた。

本章では、GLO I 阻害剤の処理によりがん細胞が代謝シフトを起こすか否かを解析するとともに、代謝シフトを引き起こす「スイッチングキーファクター」の同定を行い、Warburg 効果を標的とした新規がん併用化学療法確立のための基礎的知見を得ることを目的とした。

3-2 実験材料及び実験方法

材料

抗体 ; mouse anti-GLO I (Novus Biologicals)
mouse anti-MG (NOF CORPORATION)
mouse anti- β -actin (SIGMA-ALDRICH)
rabbit anti-PDP1 (Elabscience)
horseradish peroxidase (HRP)標識 anti-rabbit 二次抗体
(Jackson ImmunoResearch Laboratories)
horseradish peroxidase (HRP)標識 anti-mouse 二次抗体
(Jackson ImmunoResearch Laboratories)

薬剤 ; TLSC702 (ナミキ商事)

siRNA ; GLO I knockdown: ggtgattcaagatatttaccat
control: MISSION siRNA Universal Negative Control (Sigma-Aldrich)

細胞培養

使用した細胞株 ; ヒト非小細胞肺癌細胞 NCI-H522 細胞
ヒト胎児肺由来線維芽細胞 TIG-1 細胞
使用した培地 ; RPMI-1640 (Wako) supplemented 10% fetal bovine serum (Biosera)
and 100 U/100 μ g/ml Penicillin/Streptomycin (Gibco).
細胞株を 37°C、5%CO₂ インキュベーター中で培養した。

WST assay

3000, 1500, 750 cells の TIG-1 細胞と NCI-H522 細胞を 96 well plate に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。TLSC702 (0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M in 0.3% DMSO) 処理を行い 37°C、5%CO₂ の条件で 24, 48, 72 時間培養した。そこに Cell Counting Kit-8 (DOJINDO) 溶液を 10 μ L/100 μ L 加え、37°C、5%CO₂ の条件で反応させた。マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を用いて 450 nm の吸光度を測定した。EC₅₀ については第二章の 2-2 実験材料及び実験方法の WST assay の項に示している。

Western Blot 法

2.0 \times 10⁵ cells の NCI-H460 細胞、NCI-H522 細胞を 3.5 cm dish に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。回収した細胞に 1 \times SDS Sample Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v), 8% (v/v) glycerol, 50 mM DTT, 0.02% (w/v) BPB) を加えてソニケーションを

行い、100°Cで5分間加熱処理したものをSDS-PAGE用サンプルとした。

各サンプルをSDS-PAGEによって分離した後、ニトロセルロースメンブレンに転写した。その後、メンブレンをブロッキング溶液に浸し、室温で1時間ブロッキングした。メンブレンをTBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 400 mM NaCl, 0.05% (w/v) Triton X-100)で10分間×1回洗浄し、検出対象に対する一次抗体反応液を用いて室温で1時間、または4°Cで一晩抗原抗体反応を行った。一次抗体反応後のメンブレンをTBSTで10分間×3回洗浄し、適当な二次抗体反応溶液を用いて室温で1時間抗原抗体反応を行った。二次抗体反応後のメンブレンをTBSTで10分間×3回洗浄し、ImmunoStar® LD (Wako)を用いた化学発光システム及びLight Capture System (ATTO)によって可視化した。

細胞抽出液の作製

2.0×10^5 cellsのNCI-H522細胞を10 cm dishに播種し、37°C、5%CO₂の条件で24時間培養した。これにTLSC702 (0, 100 μM in 0.1% DMSO)を処理し、37°C、5%CO₂の条件で72時間培養した。回収した細胞にbuffer A (20 mM HEPES (pH 7.5), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA (2Na · 2H₂O), 1 mM DTT)を加え、26ゲージ針を付けたシリンジに通して破砕した後、16,000 × g、4°Cで30分間遠心分離を行い、その上清を細胞抽出液とした。

グルコース消費量と乳酸産生量の測定

3750 cellsのNCI-H522細胞を24 well plateに播種し、37°C、5%CO₂の条件で24時間培養した。これにTLSC702 (0, 30, 100 μM in 0.1% DMSO)を処理し、37°C、5%CO₂の条件で72時間培養した。その後、その培養上清を回収し、その上清を10 kDa Amicon Ultra-0.5 mL 遠心式フィルター (Merck Millipore)を用いて14,000 × g、4°Cで30分間遠心分離を行い、通過画分をGlucose assay, Lactate assay用のサンプルとした。Glucose assay kit (BioVision)を用いてグルコース標準液を調製した(0, 40, 80, 120 μM)。Glucose assay用のサンプルを150倍希釈し、Glucose Reaction mixと混合させ、37°C、遮光の条件で30分反応させた。マイクロプレートリーダー (Molecular Devices)を用いて570 nmの吸光度を測定した。また、Lactate assay kit (BioVision)を用いて乳酸標準液を調製した(0, 40, 80, 120 μM)。Lactate assay用のサンプルを100倍希釈し、Glucose Reaction mixと混合させ、室温、遮光の条件で30分反応させた。マイクロプレートリーダー (Molecular Devices)を用いて570 nmの吸光度を測定した。

マイクロアレイ解析

3.0×10^5 cellsのNCI-H522細胞を6 cm dishに播種し、37°C、5%CO₂の条件で24時間培養した。これにLipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific)を用いてsiRNA (コントロール、GLO I 発現抑制)を導入し、37°C、5%CO₂の条件で72時間培養した。そ

の後、 2.0×10^5 cells の NCI-H522 細胞を 10 cm dish に播種し直し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件で 72 時間培養した。回収した細胞に、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて RNA 抽出を行い、アジレント・テクノロジー株式会社にて Agilent Array 発現解析を行った。

RT-PCR 法

3.0×10^5 cells の NCI-H522 細胞を 6 cm dish に播種し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件で 24 時間培養した。これに Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて siRNA (コントロール、GLO I 発現抑制) を導入し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ の条件で 72 時間培養した。回収した細胞に NucleoSpin RNA Plus (Macherey-Nagel) を用いて RNA 抽出を行い、Prime Script RT reagent Kit (TaKaRa) を用いて cDNA を作製した。この cDNA を鋳型とし、PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa) と以下のプライマーを用いてそれぞれの標的遺伝子の増幅を行った。増幅した DNA を 2% アガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色を行い、Gel Doc XR+ (Bio-Rad) によってゲル画像を撮影し、mRNA 発現量の変化を解析した。

β -actin: 5' - CATGTACGTTGCTATCCAGGC - 3'

5' - CTCCTTAATGTCACGCACGAT - 3'

PDP1: 5' - TG TTCCTCATCGTACATTCCTCA - 3'

5' - AGAACTGACATTTTTGCCGTCAA - 3'

3-3 結果

GLO I 阻害剤 TLSC702 による培養細胞株への影響

GLO I 阻害剤 TLSC702 による培養細胞株への影響を解析するために、正常細胞としてヒト胎児肺由来線維芽細胞の TIG-1 細胞と、GLO I 依存性のヒト非小細胞肺癌細胞の NCI-H522 細胞に TLSC702 (0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μM in 0.3% DMSO) を 24, 48, 72 時間処理した際の細胞生存率を WST assay により測定した。その結果、正常細胞である TIG-1 細胞ではいずれの処理時間でも EC_{50} が 300 μM 以上であり、GLO I 依存性がん細胞株である NCI-H522 細胞では濃度時間的、時間依存的な細胞生存率の低下がみられた (EC_{50} : 24 h >300 μM , 48 h 240.8 μM , 72 h 172.0 μM) (Fig. 3-1A, B)。また、TLSC702 処理により培養がん細胞株に MG 蓄積が起こるのか否かを解析するために、NCI-H522 細胞に 300 μM TLSC702 を 0, 24, 48, 72 時間処理し MG 付加タンパク質を検出する抗体を用いて Western blot 法により解析を行ったところ、TLSC702 処理により MG 付加タンパク質の量が上昇していることが分かった (Fig. 3-1C)。さらに、TLSC702 処理により培養がん細胞株内の GLO I 活性が阻害されているか否かを解析するために、NCI-H522 細胞に TLSC702 (0, 100 μM in 0.1% DMSO) を 72 時間処理し。その細胞抽出液を作製し、GLO I assay を行った。その結果、100 μM TLSC702 処理した際の細胞では、その GLO I 活性が約 40% 阻害されていることが分かった (Fig. 3-1D)。

グルコース消費量と乳酸産生量の解析

がん細胞が GLO I 阻害剤 TLSC702 によりエネルギー産生を解糖系優位からミトコンドリア呼吸鎖優位になるような代謝シフトを起こすか否かを解析するために、NCI-H522 細胞に TLSC702 (0, 100 μM in 0.1% DMSO) を 72 時間処理した際の、細胞培養液中のグルコース量、乳酸量の変化を Glucose assay 及び Lactate assay により測定した。その結果、TLSC702 を 100 μM 処理した細胞の培養液中のグルコース量の増加、及び乳酸量の減少がみられた (グルコース消費量約 60% 低下、乳酸産生量約 20% 低下) (Fig. 3-2A, B)。

GLO I 発現抑制時の培養がん細胞株の遺伝子発現差異解析

上述の結果から、がん細胞は GLO I を阻害されると MG の蓄積を回避するために、解糖系に依存的なエネルギー代謝から TCA サイクル (ミトコンドリア呼吸) 依存的になるような「代謝シフト」を起こす可能性が示唆された。この「代謝シフト」をドライブする因子「スイッチングキーファクター」を同定するために、NCI-H522 細胞に siRNA 導入を行い、GLO I を発現抑制させた際の遺伝子発現量の変動についてマイクロアレイ解析を行った。

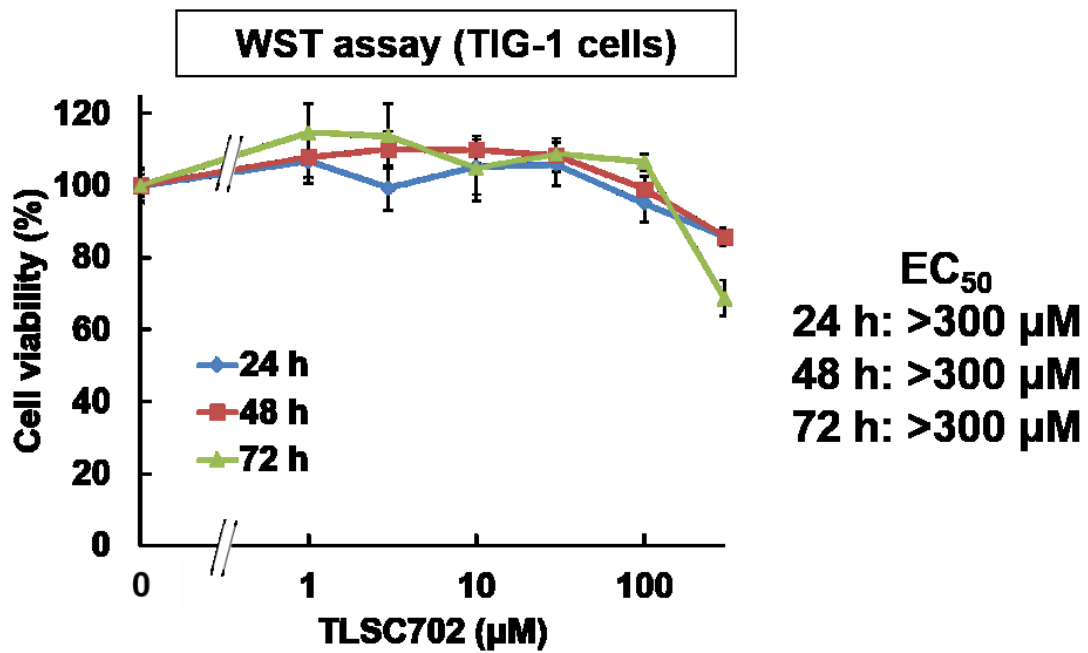
その結果、GLO I 発現抑制時の培養がん細胞株において様々な遺伝子発現量の変動が

みられた(Fig. 3-3)。その中でも「代謝シフト」の原因となる因子として pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 (PDP1)に着目し、その遺伝子発現量が約 4.2 倍上昇していたことが判明した (Fig. 3-4)。

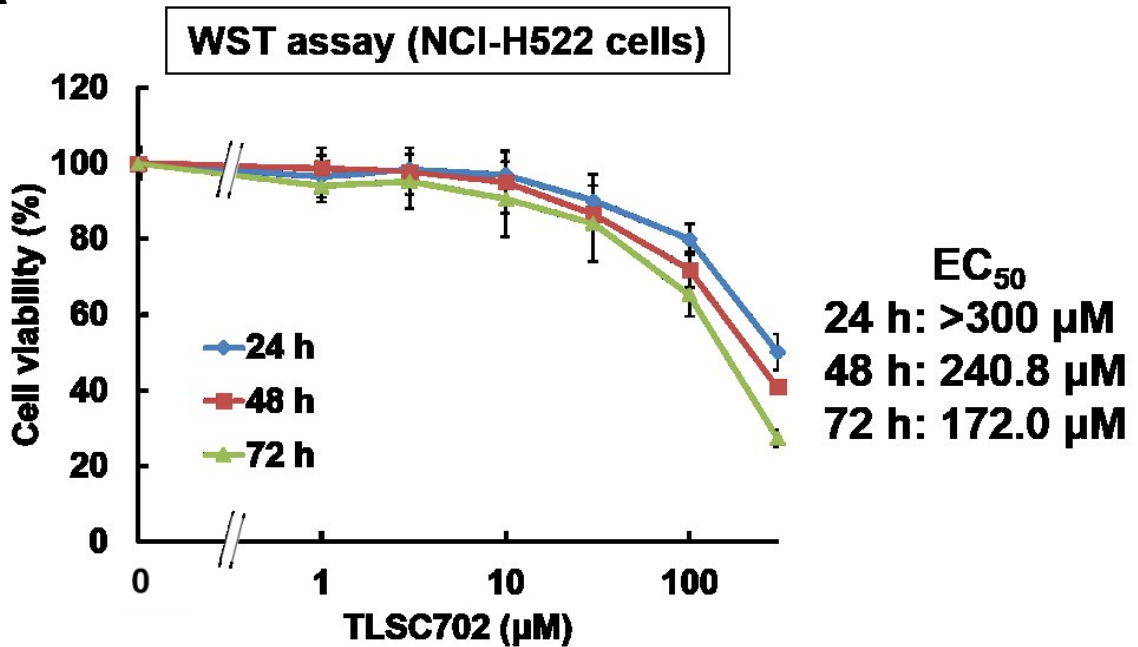
PDP1 の mRNA 発現量及びタンパク質発現量の解析

マイクロアレイ解析により、NCI-H522 細胞の GLO1 を発現抑制した際に PDP1 遺伝子発現量が上昇していることが分かったため、さらに PDP1 の mRNA 発現量及びタンパク質発現量を解析することとした。NCI-H522 細胞に siRNA 導入を行い、GLO1 を発現抑制させた際の mRNA 発現量及びタンパク質発現量を RT-PCR 法及び Western blot 法により解析した。その結果、それぞれ mRNA 発現量が約 2.5 倍、タンパク質発現量が約 3 倍上昇していた (Fig. 3-5, 3-6)。

A



B



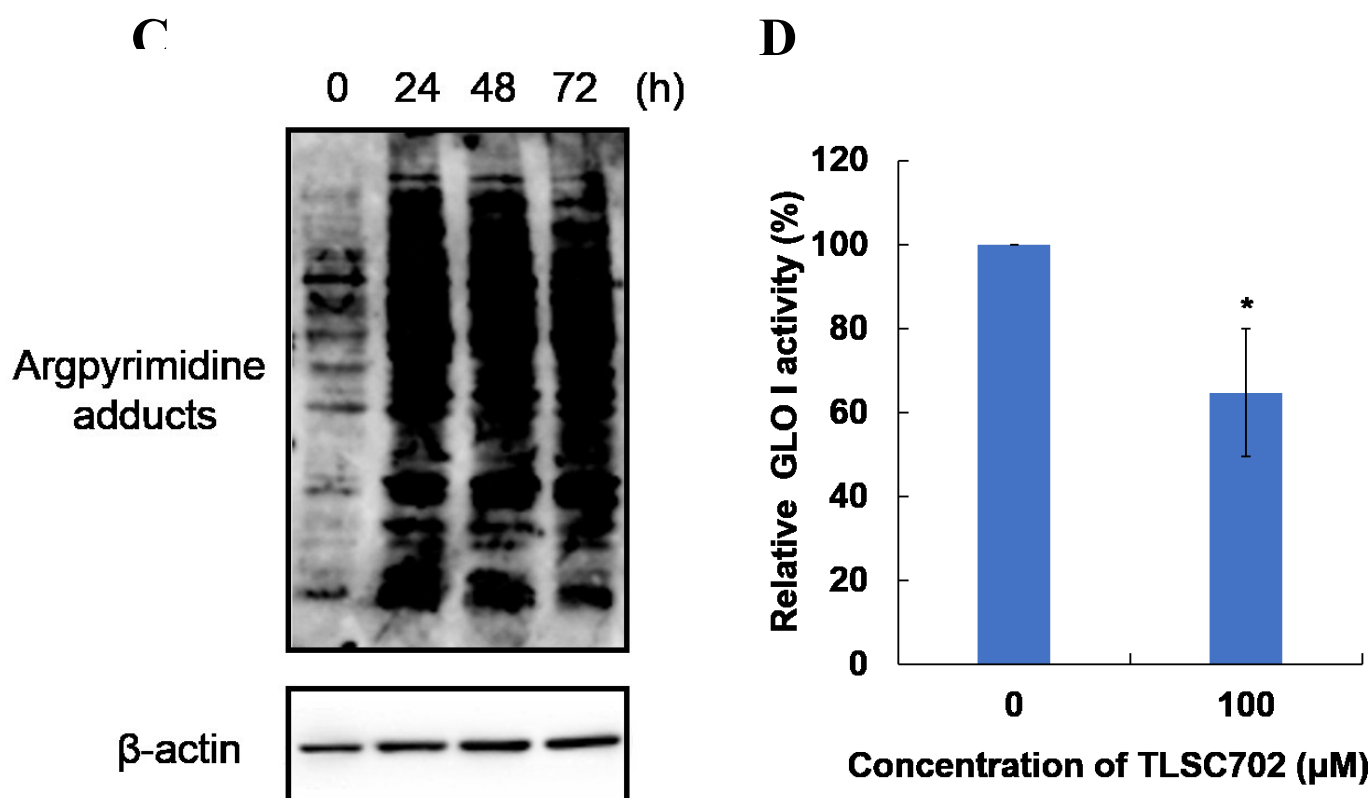


Fig. 3-1 The effect of TLSC702 GLO I inhibitor on cultured cells

(A) The dose-dependent effect of TLSC702 on TIG-1 cells. The cells were treated with various concentrations of TLSC702 for 72 h. Cell viability (% of control) was measured by WST assay. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments. (B) The dose-dependent effect of TLSC702 on NCI-H522 cells. The cells were treated with various concentrations of TLSC702 for 72 h. Cell viability (% of control) was measured by WST assay. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments. (C) Accumulation of argpyrimidine adducts on NCI-H522 cells treated with 300 μ M of TLSC702 for 24, 48 and 72 h was detected by Western blot analysis. (D) The inhibitory effect of TLSC702 on NCI-H522 cells by *in vitro* cell free GLO I assay. The cell extracts were prepared from the cells were treated with TLSC702 (0 and 100 μ M) for 72 h. Relative GLO I activity was measured by *in vitro* cell free GLO I assay. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments (*: $p < 0.05$ vs. 0 μ M of TLSC702). Statistical evaluations were performed using the Student's t test.

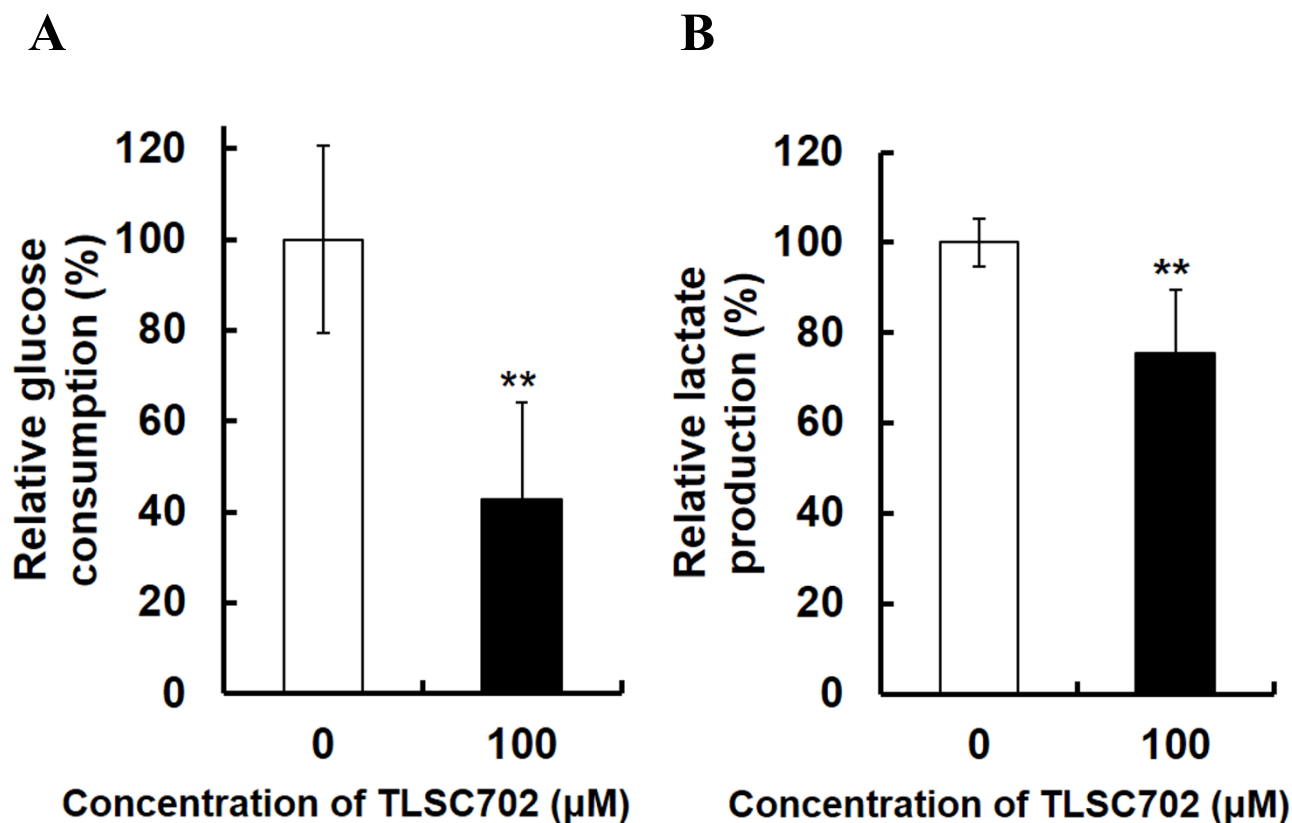
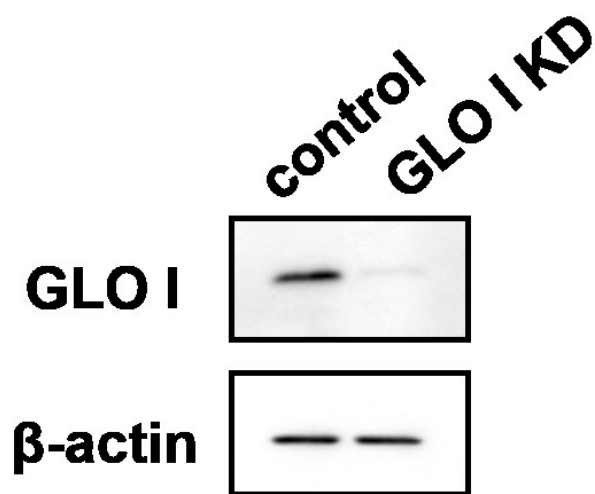


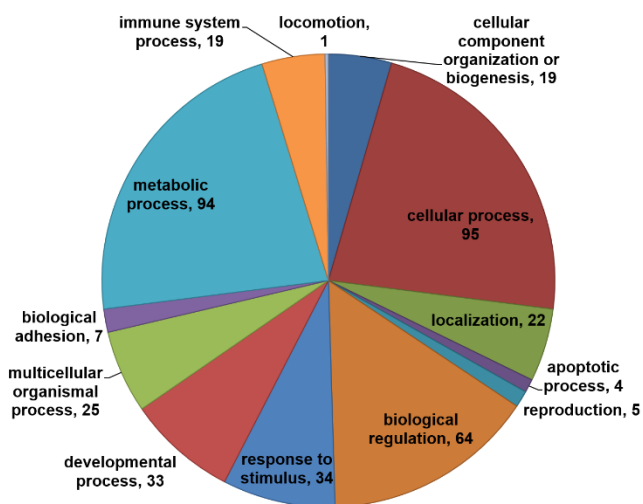
Fig. 3-2 Changes of glucose consumption and lactate production after TLSC702 treatment in NCI-H522 cells

(A) Relative glucose consumption rate in NCI-H522. The cells were treated with TLSC702 (0, 100 μM) for 72 h and analyzed glucose consumption in the cell culture medium by Glucose Assay Kit as described in Materials and Methods. Cell-free medium was used as a control. The data are expressed as the mean ± SD from 3 independent experiments (**: $p < 0.01$ vs. 0 μM of TLSC702).

(B) Relative lactate production rate in NCI-H522. The cells were treated with TLSC702 (0, 100 μM) for 72 h and analyzed lactate production in the cell culture medium by Lactate Assay Kit as described in Materials and Methods. The data are expressed as the mean ± SD from 3 independent experiments (**: $p < 0.01$ vs. 0 μM of TLSC702). Statistical evaluations were performed using the Student's t test.



B



C

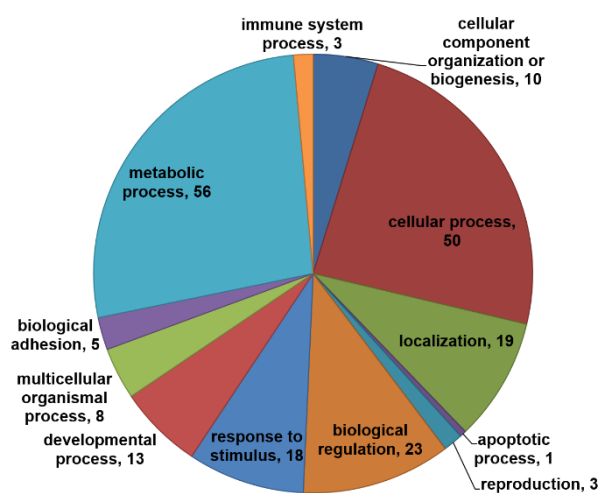


Fig. 3-3 Microarray analysis and change of PDP1 expression

(A) NCI-H522 cells were transfected with siRNA targeting GLO I on NCI-H522 cells for 72 h and protein levels of GLO I was analyzed by Western blot analysis. (B) Pie chart showed the up-regulated genes (>2.0-fold in relative to control) associated with biological processes. (C) Pie chart showed the down-regulated genes (<0.5-fold in relative to control) associated with biological processes.

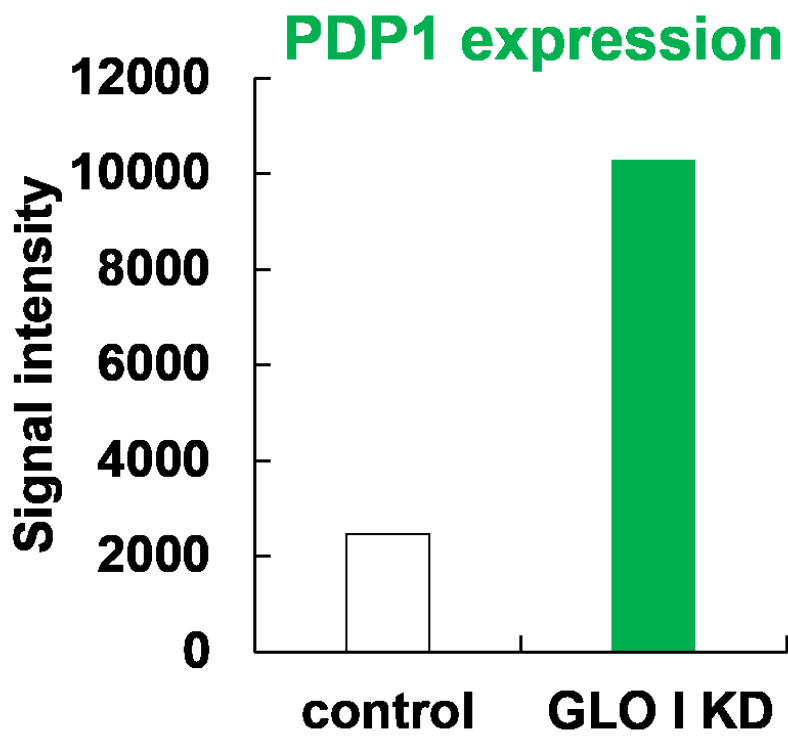


Fig. 3-4 Microarray analysis and change of PDP1 expression

NCI-H522 cells were transfected with siRNA targeting GLO I on NCI-H522 cells for 72 h and upregulation of PDP1 was identified by microarray analysis.

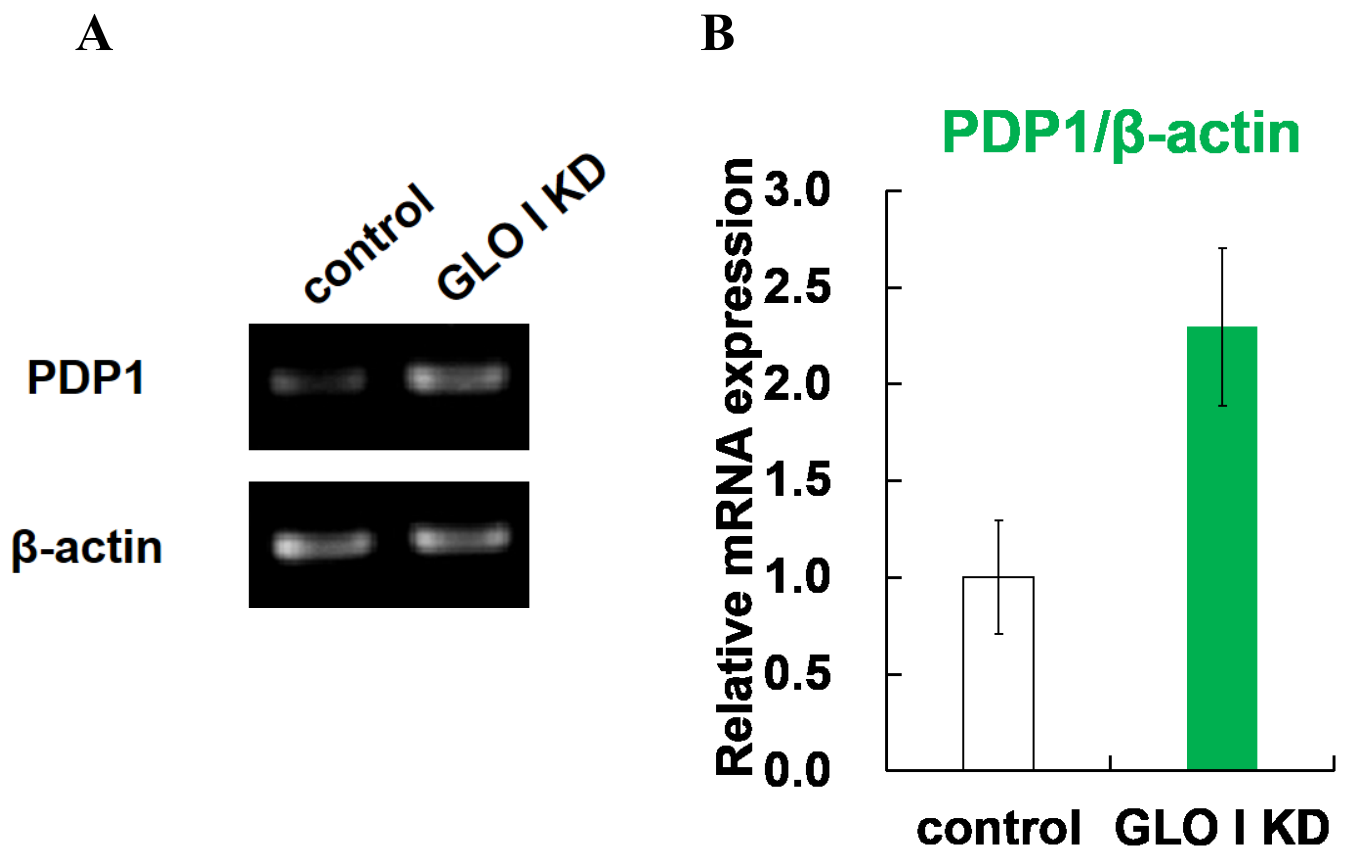


Fig. 3-5 The mRNA expression of PDP1 on NCI-H522 cells transfected with siRNA

(A) NCI-H522 cells were transfected with siRNA targeting GLO I on NCI-H522 cells for 72 h and mRNA levels of PDP1 was analyzed by RT-PCR analysis. (B) Relative PDP1 mRNA expression normalized by β -actin on NCI-H522 cells were calculated by densitometric analysis. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments (**: $p < 0.01$ vs. control). Statistical evaluations were performed using the Student's t test.

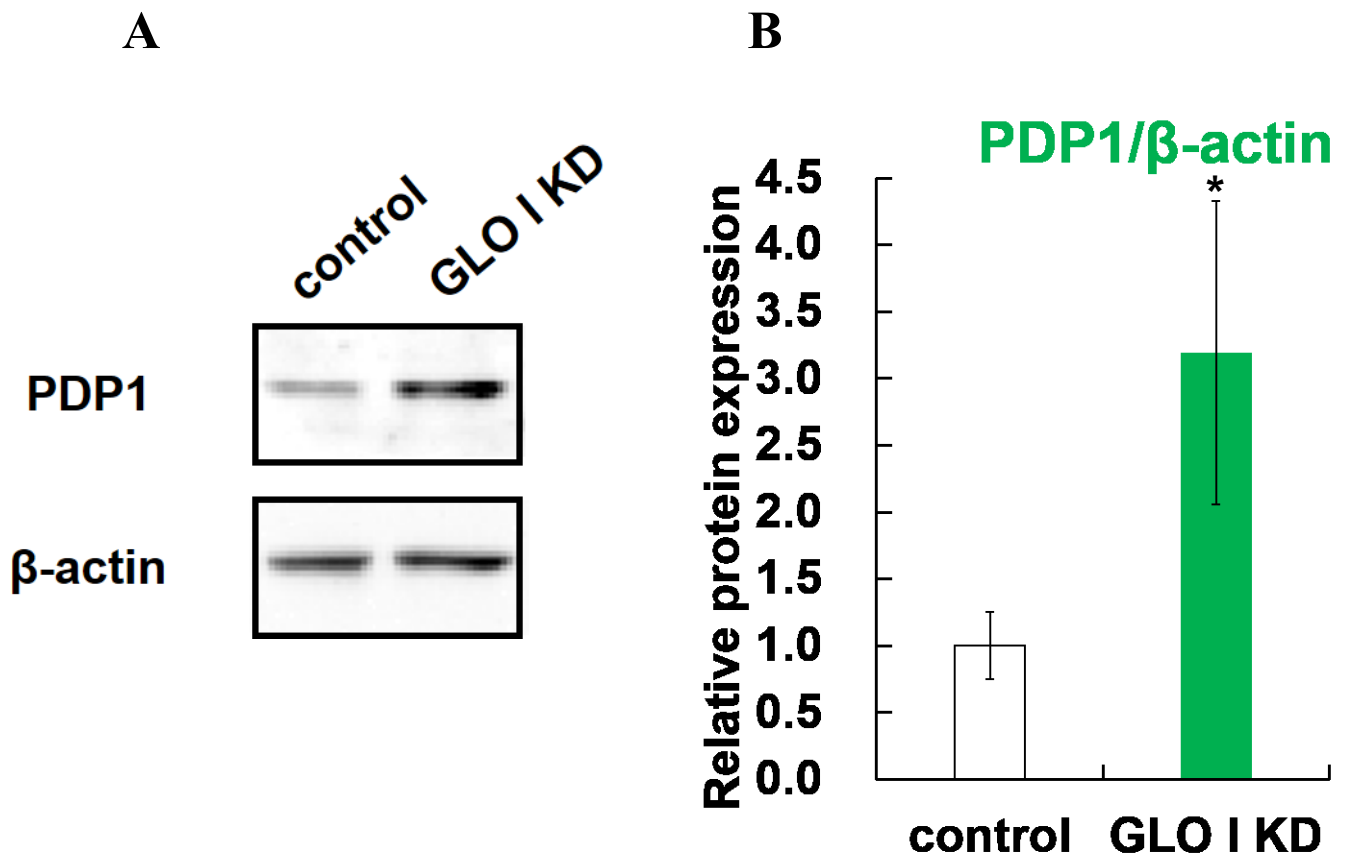


Fig. 3-6 The protein expression of PDP1 on NCI-H522 cells transfected with siRNA

(A) NCI-H522 cells were transfected with siRNA targeting GLO I on NCI-H522 cells for 72 h and protein levels of PDP1 was analyzed by Western blot analysis. (B) Relative PDP1 protein expression normalized by β -actin on NCI-H522 cells were calculated by densitometric analysis. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments (*: $p < 0.05$ vs. control). Statistical evaluations were performed using the Student's t test.

3-4 考察

本章では、GLO I 阻害剤の処理によりがん細胞が代謝シフトを起こすか否かを解析するとともに、代謝シフトを引き起こす「スイッチングキーファクター」の同定を行い、Warburg 効果を標的とした新規がん併用化学療法確立のための基礎的知見を得ることを目的としている。

まず、GLO I 阻害剤 TLSC702 処理による培養細胞株への影響を解析することとした。用いた培養細胞株であるが、正常細胞としてヒト胎児肺由来線維芽細胞である TIG-1 細胞と、GLO I 依存性がん細胞株である NCI-H522 細胞を用いた。TIG-1 細胞は正常細胞であり GLO I も極低発現であることから、予想通り、がん細胞特異的な GLO I 阻害剤である TLSC702 処理による細胞生存率への影響はあまり影響がなかったのではないかと考える ($EC_{50} > 300 \mu\text{M}$) (Fig. 3-1A)。一方、NCI-H522 細胞は GLO I 依存性のヒト非小細胞肺癌細胞株であり、*p53* を欠損している株である [69]。序論でも述べたように、*p53* の変異、欠損は解糖系依存の要因の一つであるとされているため [6-8]、NCI-H522 細胞は解糖系に依存した細胞株であり、GLO I を高発現させていると考えられる。そこで、NCI-H522 細胞に GLO I 阻害剤 TLSC702 処理した際の細胞生存率への影響を WST assay により解析したところ、 EC_{50} が $172 \mu\text{M}$ (72 時間処理)と、効果はあるものの、*in vitro* GLO I assay での $IC_{50} = 2.0 \mu\text{M}$ と比較しても、がん細胞に対する制がん効果には高い濃度を必要とすることが分かった (Fig. 3-1B)。ここで、TLSC702 が真に培養がん細胞株の GLO I を阻害できているのか否かを調べるために、GLO I 阻害剤の作用機序である MG 蓄積を引き起こしているのか、培養がん細胞株内の GLO I 活性は阻害されているのかをそれぞれ Western blot 法及び細胞抽出液を用いた GLO I assay により解析すると、確かに TLSC702 処理により細胞レベルでも MG 蓄積や細胞内 GLO I 活性の阻害が起きていることが分かる (Fig. 3-1C, D)。このことから、私は GLO I 阻害剤 TLSC702 が細胞レベルでのアポトーシス誘導に高い濃度を必要とする理由の一つとして、がん細胞は GLO I を阻害されると MG の蓄積を回避するために、解糖系に依存的なエネルギー代謝から TCA サイクル (ミトコンドリア呼吸) 依存的になるような「代謝シフト」を起こして生き延びてしまう可能性があるという仮説を立てた。実際、NCI-H522 細胞に TLSC702 を処理すると、未処理細胞と比較して培養液中フェノールレッドの色の変化が抑制されていることを目視で観察している。これは、TLSC702 処理による NCI-H522 細胞の乳酸産生量の低下、すなわち解糖系の利用度が低下を示唆しているのではないかと考えた。また、この「代謝シフト」が実際に起きているとすると、このメカニズムを明らかにしていくことにより、今後 GLO I 阻害剤の制がん効果を高め、さらなる有用性をもたらす戦略を構築できると期待される。

そこでまず、GLO I 依存性がん細胞が GLO I 阻害剤 TLSC702 によりエネルギー産生を解糖系優位からミトコンドリア呼吸優位になるような「代謝シフト」を起こすか否か

を調べることとした。がん細胞は細胞増殖を行うために、活発にグルコースを取り込む [70]。そして、解糖系を継続するために必要な補酵素 NAD^+ は、通常電子伝達系において再生されるが、がん細胞は酸化リン酸化が抑制され解糖系が亢進しているため、電子伝達系ではなく解糖系において乳酸を生成する際に NAD^+ を再生している [71]。そのため、解糖系が亢進しているか否かを評価するために、がん細胞のグルコース消費量と乳酸産生量を測定することとした。実際、 $100 \mu\text{M}$ TLSC702 処理により GLO1 を阻害することで NCI-H522 細胞のグルコース消費量、乳酸産生量が減少していることが分かった (グルコース消費量約 60%低下、乳酸産生量約 20%低下) (Fig. 3-2A, B)。また、この時に細胞数補正を行うためにトリパンブルー色素排除法により細胞数を数えているが、 $100 \mu\text{M}$ TLSC702 処理では、細胞数は約 20%低下していた。しかし、死細胞数の増加は認められなかったため、TLSC702 処理により細胞増殖が抑制されていたことが分かった。これは、TLSC702 処理により NCI-H522 細胞が解糖系を抑制し、解糖系から分岐して始まるペントースリン酸経路や、3-ホスホグリセリン酸からアミノ酸を合成する経路が抑制されることにより、細胞増殖に必要な同化経路が制限されてしまったためだと考えられる。このことから、がん細胞は GLO1 が阻害されると亢進した解糖系を抑制しミトコンドリア呼吸優位となる「代謝シフト」を起こす可能性があることが示唆された。

さらに、この「代謝シフト」が起こるメカニズムを明らかにするために、代謝シフトをドライブする「スイッチングキーフアクター」の探索を行うこととした。NCI-H522 細胞に siRNA を導入し GLO1 発現抑制時の遺伝子発現差異を解析するためにマイクロアレイ解析を行った。その結果、GLO1 発現抑制時の NCI-H522 細胞において PDP1 の遺伝子発現量が上昇していたことを見出した (Fig. 3-4)。さらに、RT-PCR 法及び Western blot 法によっても、PDP1 の mRNA 発現量及びタンパク質発現量が上昇していることが分かった (Fig. 3-5, 3-6)。PDP1 は、pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) とともに pyruvate dehydrogenase (PDH) の活性調節を行う酵素であり、PDH はリン酸化によって不活性化され、脱リン酸化によって活性化する [72-74]。また、PDH は dihydrolipoyl transacetylase と dihydrolipoamide dehydrogenase と pyruvate dehydrogenase complex を形成し、ピルビン酸からアセチル CoA への変換を触媒することから、解糖系と TCA サイクルをつなぐ役割を果たしている [72-74]。したがって、GLO1 発現抑制時には、PDP1 が PDH を活性化させることによって、TCA サイクル優位となる代謝シフトを引き起こしていることが示唆される (Fig. 3-7)。

以上のことから、がん細胞は GLO1 を制限されると MG 蓄積を回避するために PDP1 の発現量を上昇させてピルビン酸からアセチル CoA への変換を促進させ、TCA サイクル優位なエネルギー産生に切り替えるような「代謝シフト」を起こして生き延びてしまうことが示唆された。したがって、この「代謝シフト」を抑制するような薬剤と併用することで、GLO1 阻害によるアポトーシス誘発機序としての制がん効果を高めることができ、Warburg 効果を標的とした新規がん併用化学療法確立につながることを期待され

る。

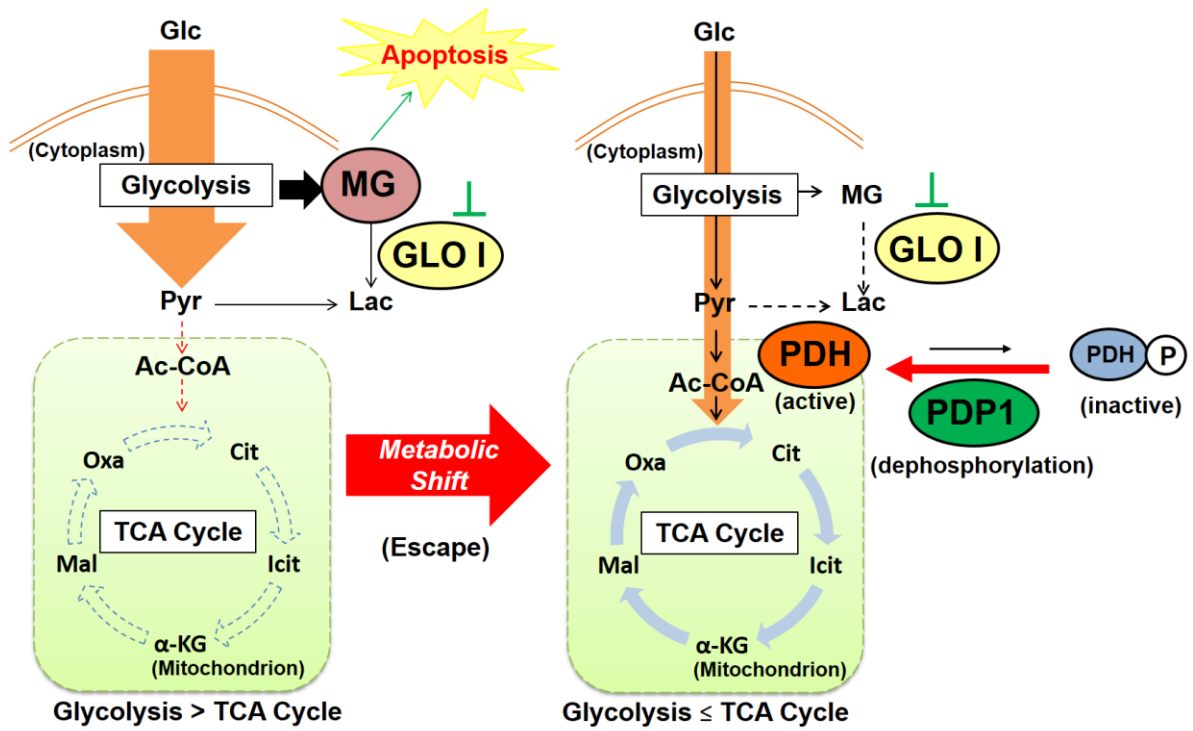


Fig. 3-7 Metabolic shift by TLSC702 GLO I inhibitor treatment via upregulation of PDP1

After GLO I inhibition, cancer cells undergo the *Metabolic shift*, which makes cells are more dependent on mitochondrial respiration (TCA cycle) than glycolysis to repress MG accumulation and to escape from apoptosis.

第4章

Warburg 効果/グルタミノリシスを標的とした

新規がん併用化学療法の開発

4-1 緒言

第3章では、GLO1 依存性培養がん細胞株が GLO1 阻害剤 TLSC702 処理により解糖系への依存度を低下させ TCA サイクル優位になるような「代謝シフト」を起こし、MG の蓄積を回避してアポトーシスを回避してしまうことが分かった。さらに、この現象が PDP1 遺伝子発現量上昇を介した PDH 複合体形成促進による TCA サイクル促進によって引き起こされる可能性を示した。これは、GLO1 阻害剤を単独で用いても解糖系優位なエネルギー代謝から TCA サイクル (ミトコンドリア呼吸)優位になるような代謝シフトを起こして MG の蓄積を回避できるメカニズムをがん細胞はもっていることを意味している。このことから、この代謝シフトを抑制するような薬剤と併用することで、GLO1 阻害によるアポトーシス誘発機序としての制がん効果を高めることができることが予測される。そこで、GLO1 阻害剤との併用化学療法確立を目指して、この代謝シフトを抑制すると予想される TCA サイクルのドライブに関与する二つのがん細胞特異的な標的分子に着目した。すなわち、解糖系においてピルビン酸を生成する酵素である pyruvate kinase M2 (PKM2) と、TCA サイクルの補充反応であるグルタミノリシスの律速酵素 glutaminase 1 (GLS1) に着目した。

解糖系の律速酵素の一つであるピルビン酸キナーゼは、その最終段階であるホスホエノールピルビン酸からピルビン酸への反応を触媒し、ピルビン酸を TCA サイクルに供給する重要な役割を果たしている酵素である。この酵素には4種のアイソザイム (L, R, M1, M2) が知られているが [75]、肝細胞や赤血球などを除くほとんどの細胞・組織では、PKM1 および PKM2 が発現している。興味深いことに、正常細胞では PKM1 が主に発現している一方で、がん細胞では PKM2 の発現が主となる [76]。これら PKM の2つのアイソフォームは単一遺伝子から選択的スプライシングによりつくりだされる [77]。このことから、PKM2 はがん細胞選択的な標的分子となり得ると考えられる。PKM2 は通常、活性の低い単量体、二量体で存在している [78]。PKM2 が活性型となるためには四量体を形成する必要があるとあり、フルクトース 1,6 ビスリン酸 (FBP) を要することが知られている [79, 80]。不活性体の PKM2 はピルビン酸への変換反応速度が低く、これが解糖系上流のペントースリン酸経路への移行を促進することになり、がん細胞は同化反応を亢進させることができると考えられている。また、がん細胞の PKM2 を PKM1 に変換することで細胞増殖が顕著に抑制されることから、PKM2 はがん細胞の Warburg 効果に重要な役割を果たしていると考えられている [76]。

さらに、がん細胞は解糖系の他に、グルタミンを用いた TCA サイクルの補充反応である「グルタミノリシス」も利用している。そのため、がん細胞の GLO1 と PKM2 を阻害し、解糖系優位に留めたとしても、グルタミノリシスが新たなエネルギー産生経路となり、グルタミノリシスを利用してエネルギー産生を行うことで MG の蓄積を回避して生き延びるといふ、更なる代謝シフトを起こす可能性があると考えられる。

GLS1 は、細胞質から取り込まれたグルタミンをグルタミン酸に変換する、グルタミノリシスを担う律速酵素である [81]。このグルタミン酸がさらに α -ケトグルタル酸 (α -KG) に変換され TCA サイクルをドライブしている。がん細胞ではグルコースの他にもグルタミンの取り込みが上昇することが知られており、いくつかの培養がん細胞株をグルタミンフリーの培養液で培養すると、細胞増殖が減少するという報告もある [81]。GLS1 には2つのスプライズバリエント、KGA form と GAC form が存在し、GAC form はがん細胞において高発現がみられるため、がん細胞特異的な標的分子になり得ると考えられており、これまでに GLS 阻害剤が数種類報告されている [41-43, 82]。

本章では、GLO1 を主標的として、さらに Warburg 効果、グルタミノリシスのがん細胞特性を標的とした新規がん併用化学療法の開発を目指し、解糖系と TCA サイクルをつなぐピルビン酸を生成する酵素であり、がん細胞特異的に発現している PKM2 と、TCA サイクルの補充反応であるグルタミノリシスの律速酵素 GLS1 に着目し、それらの阻害剤と GLO1 特異的阻害剤 TLSC702 との併用制がん効果を評価することを目的とした。

4-2 実験材料及び実験方法

材料

薬剤 ; 3-(1, 3-benzothiazol-2-yl)-4-(4-methoxyphenyl)but-3-enoic acid (TLSC702)
(ナミキ商事)

Shikonin (SIGMA-ALDRICH)

CB-839 (Focus Biomolecules)

抗体 ; mouse anti-GLO I (Novus Biologicals)
mouse anti- β -actin (Sigma-Aldrich)
rabbit anti-PKM2 (Cell Signaling Technology)
rabbit anti-GLS1 (Abcam)
rabbit anti-PARP (Cell Signaling Technology)
horseradish peroxidase (HRP)標識 anti-mouse 二次抗体
(Jackson ImmunoResearch Laboratories)
horseradish peroxidase (HRP)標識 anti-rabbit 二次抗体
(Jackson ImmunoResearch Laboratories)

細胞培養

使用した細胞株 ; ヒト非小細胞肺癌細胞 NCI-H522 細胞
ヒト前骨髄球性白血病細胞 HL-60 細胞

使用した培地 ; RPMI-1640 (Wako) supplemented 10% fetal bovine serum
細胞株を 37°C、5%CO₂ インキュベーター中で培養した。

Western blotting

2.0×10⁵ cells の NCI-H522 細胞を 3.5 cm dish に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。回収した細胞に 1×SDS Sample Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% (w/v), 8% (v/v) glycerol, 50 mM DTT, 0.02% (w/v) BPB)を加えてソニケーションを行い、100°Cで 5 分間加熱処理したものを SDS-PAGE 用サンプルとした。

各サンプルを SDS-PAGE によって分離した後、ニトロセルロースメンブレンに転写した。その後、メンブレンをブロッキング溶液に浸し、室温で 1 時間ブロッキングした。メンブレンを TBST (20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 400 mM NaCl, 0.05% (w/v) Triton X-100)で 10 分間×1 回洗浄し、検出対象に対する一次抗体反応液を用いて室温で 1 時間、または 4°Cで一晩抗原抗体反応を行った。一次抗体反応後のメンブレンを TBST で 10 分間×3 回洗浄し、二次抗体反応溶液を用いて室温で 1 時間抗原抗体反応を行った。二次抗体反応後のメンブレンを TBST で 10 分間×3 回洗浄し、ImmunoStar[®] LD (Wako)を用いた化学

発光システム及び Light Capture System (ATTO)によって可視化した。抗体はウサギモノクローナル抗 PKM1 抗体 (#7067; Cell Signaling Technology)、ウサギモノクローナル抗 PKM2 抗体 (#4053; Cell Signaling Technology)、マウスモノクローナル抗 β -actin 抗体 (A5441; SIGMA-ALDRICH)、HRP 標識抗ウサギ二次抗体 (111-036-045; Jackson ImmunoResearch)HRP 標識抗マウス二次抗体 (115-036-062; Jackson ImmunoResearch)を用いた。

WST assay

1) 750 cells の NCI-H522 細胞を 96 well plate に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。shikonin (0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ M in 0.01% DMSO)あるいは CB-839 (0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM in 0.001% DMSO)処理を行い 37°C、5%CO₂ の条件で 72 時間培養した。そこに Cell Counting Kit-8 (DOJINDO)溶液を 10 μ L/100 μ L 加え、37°C、5%CO₂ の条件で反応させた。マイクロプレートリーダー (Molecular Devices)を用いて 450 nm の吸光度を測定した。

コロニー形成法

1) 200 cells の NCI-H522 細胞を 6 well plate に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。これを、shikonin (0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.2, 0.3 μ M in 0.1% DMSO)処理を行い 37°C、5%CO₂ の条件で 10 日間培養した。また、TLSC702 (0, 30, 100 μ M in 0.1% DMSO)単独処理あるいは TLSC702(0, 30, 100 μ M in 0.1% DMSO)と Shikonin(0.2 μ M in 0.1% DMSO)併用処理し 37°C、5%CO₂ の条件で 10 日間培養した。そこに、PBS (-)で二回洗浄した後、methanol で 10 分間固定を行った。その後、0.5% クリスタルバイオレット染色液 (SIGMA-ALDRICH)用いて 10 分間染色した。染色した 6 well plate を精製水で洗浄した後風乾させ、Gel Doc™ XR+ Imager (BIO-RAD)により撮影し、形成されたコロニーの数をカウントした。

2) 200 cells の NCI-H522 細胞を 6 well plate に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。TLSC702 (0, 30, 100 μ M)単独処理あるいは TLSC702(0, 30, 100 μ M in 0.1% DMSO)と Shikonin(0.2 μ M in 0.1% DMSO)併用処理し 37°C、5%CO₂ の条件で 10 日間培養した。そこに、PBS (-)で二回洗浄した後、methanol で 10 分間固定を行った。その後、0.5% クリスタルバイオレット染色液 (SIGMA-ALDRICH)用いて 10 分間染色した。染色した 6 well plate を精製水で洗浄した後風乾させ、Gel Doc™ XR+ Imager (BIO-RAD)により撮影し、形成されたコロニーの数をカウントした。

3) 200 cells の NCI-H522 細胞を 6 well plate に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。これを、CB-839 (0, 1, 3, 10, 30, 100 nM in 0.1% DMSO)処理を行い 37°C、5%CO₂ の条件で 10 日間培養した。そこに、PBS (-)で二回洗浄した後、methanol で 10 分間固定を行った。その後、0.5% クリスタルバイオレット染色液 (SIGMA-ALDRICH)用いて 10

分間染色した。染色した 6 well plate を精製水で洗浄した後風乾させ、Gel Doc™ XR+ Imager (BIO-RAD)により撮影し、形成されたコロニーの数をカウントした。

4) 200 cells の NCI-H522 細胞を 6 well plate に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。100 μM TLSC702, 0.2 μM shikonin, 10 nM CB-839 単独処理あるいは 100 μM TLSC702 と 0.2 μM shikonin との二剤併用処理、100 μM TLSC702 と 10 nM CB-839 との二剤併用処理、0.2 μM shikonin と 10 nM CB-839 との二剤併用処理、100 μM TLSC702 と 0.2 μM shikonin と 10 nM CB-839 との三剤併用処理し、37°C、5%CO₂ の条件で 10 日間培養した (溶媒は全て 0.1% DMSO)。そこに、PBS (-)で二回洗浄した後、methanol で 10 分間固定を行った。その後、0.5% クリスタルバイオレット染色液 (SIGMA-ALDRICH)用いて 10 分間染色した。染色した 6 well plate を精製水で洗浄した後風乾させ、Gel Doc™ XR+ Imager (BIO-RAD)により撮影し、形成されたコロニーの数をカウントした。

トリパンブルー色素排除法

1) 3750 cells の NCI-H522 細胞を 24 well plate に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。これを、TLSC702 (0, 30, 100 μM in 0.1% DMSO)単独処理あるいは TLSC702(0, 30, 100 μM in 0.1% DMSO)と Shikonin (0.3 μM in 0.1% DMSO)併用処理を行い 37°C、5%CO₂ の条件で 72 時間培養した。その後、0.1% トリプシンを用いて細胞を剥離させ、回収を行った。細胞懸濁液と 0.4%トリパンブルー染色液 (Gibco)と 1:1 の比率で混合させ、血球計算盤に注入し、トリパンブルー陽性細胞数をカウントした。

2) 3750 cells の NCI-H522 細胞を 24 well plate に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。これを、100 μM TLSC702, 0.3 μM shikonin, 50 nM CB-839 単独処理あるいは 100 μM TLSC702 と 0.3 μM shikonin との二剤併用処理、100 μM TLSC702 と 50 nM CB-839 との二剤併用処理、0.3 μM shikonin と 50 nM CB-839 との二剤併用処理、100 μM TLSC702 と 0.3 μM shikonin と 50 nM CB-839 との三剤併用処理し 37°C、5%CO₂ の条件で 72 時間培養した(溶媒は全て 0.1% DMSO)。その後、0.1% トリプシンを用いて細胞を剥離させ、回収を行った。細胞懸濁液と 0.4%トリパンブルー染色液 (Gibco)と 1:1 の比率で混合させ、血球計算盤に注入し、トリパンブルー陽性細胞数をカウントした。

HPLC による培養液中 MG の定量

4.0×10⁵ cells の HL-60 細胞を 6 cm dish に播種し、37°C、5%CO₂ の条件で 24 時間培養した。これを、100 μM TLSC702, 0.3 μM shikonin, 50 nM CB-839 単独処理あるいは 100 μM TLSC702 と 0.3 μM shikonin との二剤併用処理、100 μM TLSC702 と 50 nM CB-839 との二剤併用処理、0.3 μM shikonin と 50 nM CB-839 との二剤併用処理、100 μM TLSC702 と 0.3 μM shikonin と 50 nM CB-839 との三剤併用処理し、37°C、5%CO₂ の条件で 72 時間培養した(溶媒は全て 0.1% DMSO)。その培養上清を回収し、終濃度 0.5 M となるように過塩素酸を加え、氷上に 10 分間静置し、4,000×g、室温で 10 分間遠心分離を行った。

遠心後、その上清をアセトニトリル、10 mM KH₂PO₄ (pH 2.5)にて前処理した C-18 SPE cartridge (Waters)に通した。この試料に 5-methylquinoxaline (終濃度 2.5 μM), *o*-phenylenediamine (終濃度 25 μM)を加え、室温で4時間静置させ誘導体化を行った。その後、再びアセトニトリル、10 mM KH₂PO₄ (pH 2.5)にて前処理した C-18 SPE cartridge (Waters)に通し、固相抽出を行った。これを HPLC サンプルとし、以下の条件で測定を行った。

Column: Adsorbosphere 25 cm C-18 column (TSKgel ODS-80Ts 4.6*250)

Mobile phase: 68 vol% of 10 mM KH₂PO₄ (pH 2.5) and 32 vol% of HPLC grade acetonitrile

Detector wavelength: 315 nm (UV)

Mobile phase flow rate: 1.0 ml/min

Typical sample size: 100 μl

Column temperature: 20°C

Pump: JASCO PU-4180

UV: JASCO UV-4075

Column Oven: CO-4060

Inter Face: LC-NETII/ADC

Auto sampler: AS-4050

Software: ChromNAV

4-3 結果

培養がん細胞株の PKM1/2 発現量の解析

第3章において、がん細胞は、GLO1を阻害されると、エネルギー代謝を解糖系からTCA サイクル依存的へと変化させる代謝シフトを起こすことが判明した。この代謝シフトを抑制すれば、GLO1阻害によるアポトーシス誘発機構としての制がん効果を高めることができると予測される。そこで着目した、TCA サイクルドライブに関与する二つのがん細胞特異的な PKM2 と GLS1 について、最初に PKM2 の阻害剤を用いて制がん効果を評価することとした。まず、NCI-H522 細胞の PKM1/2 発現量を Western blot 法により解析したところ、正常細胞で主に発現している PKM1 に比べ、PKM2 の発現量が約 10 倍高いことが判明した (Fig. 4-1A)。さらに、TLSC702 (0, 30, 100 μM in 0.1% DMSO) 処理によって、高い PKM2 発現量は維持されたままだった (Fig. 4-1B)。よって、GLO1 阻害剤と併用する薬剤の標的分子の一つとして、がん細胞特異的な PKM2 を決定した。

PKM2 阻害剤 shikonin の培養がん細胞株への影響

次に、PKM2 の阻害剤として、PKM2 を特異的に阻害することが報告されている shikonin を用いることにした [39]。Shikonin を併用処理する際の濃度を決定するために、NCI-H522 細胞に shikonin (0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10 μM in 0.01% DMSO) を 72 時間単独処理し、細胞生存率への影響を WST assay 法により解析した。その結果、0.3 μM まで高い細胞生存率を維持した (Fig. 4-2A)。このことより、72 時間処理における TLSC702 との併用処理に用いる shikonin 濃度は 0.3 μM とした。また、NCI-H522 細胞に shikonin (0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.2, 0.3 μM in 0.1% DMSO) を 10 日間単独処理し、コロニー形成能への影響を colony formation assay により解析した。その結果、0.2 μM まで高い細胞生存率維持した (Fig. 4-2B)。このことより、10 日間処理における TLSC702 との併用処理に用いる shikonin 濃度は 0.2 μM とした。

TLSC702 と shikonin との二剤併用処理による制がん効果の解析

Shikonin を併用処理する際の濃度を決定したので、次に TLSC702 と shikonin との併用処理による細胞増殖能への影響として、NCI-H522 細胞に TLSC702 (0, 30, 100 μM in 0.1% DMSO) と shikonin (0, 0.2 μM in 0.1% DMSO) とを 10 日間併用処理し、コロニー形成能を colony formation assay により解析した。TLSC702 100 μM 単剤処理群と 0.2 μM shikonin との併用処理群でコロニー形成能を比較したところ、TLSC702 単剤処理群ではコロニー形成能の阻害がみられなかったが、併用処理群においてコロニー形成が強く阻害された (Fig. 4-3A, B)。

また、NCI-H522 細胞に TLSC702 (0, 30, 100 μM in 0.1% DMSO) と shikonin (0, 0.3 μM in 0.1% DMSO) とを 72 時間併用処理した際の細胞死への影響をトリパンプルー色素排除

法により解析した。TLSC702 単剤処理群と shikonin との併用処理群で死細胞数の割合を比較したところ、TLSC702 単剤処理群では細胞死の誘導がみられなかったが、併用処理により TLSC702 の濃度依存的に細胞死が誘導されることが判明した (Fig. 4-3C)。

さらに、100 μM TLSC702 単剤処理、0.3 μM shikonin 単剤処理及び 100 μM TLSC702 と 0.3 μM shikonin との併用処理した際にアポトーシスの指標となる PARP の限定分解産物を Western blot 法により検出したところ、未処理群や単剤処理群と比較して併用処理により PARP 限定分解産物量の増加がみられた (Fig. 4-3D)。

TLSC702 と shikonin との併用処理による培養がん細胞株の GLS1 発現量の変動

TLSC702 と shikonin との併用処理によって制がん効果の増強がみられたが、がん細胞はさらなる回避経路を利用して生き延びてしまう可能性が考えられる。そこで、着目しているもう一つのがん細胞特異的な標的分子 GLS1 について、NCI-H522 細胞に 100 μM TLSC702 単剤処理、0.3 μM shikonin 単剤処理及び 100 μM TLSC702 と 0.3 μM shikonin との併用処理(溶媒は全て 0.1% DMSO)した際のタンパク質発現量を Western blot 法により解析した。その結果、未処理細胞と比較して 0.3 μM shikonin 単剤処理及び 100 μM TLSC702 と 0.3 μM shikonin との併用処理では GLS1 発現量 (GAC form)の顕著な増加がみられた (shikonin 単剤処理: 約 9 倍、TLSC702 と shikonin との併用処理: 約 10 倍) (Fig. 4-4)。

GLS1 阻害剤 CB-839 の培養がん細胞株への影響

0.3 μM shikonin 単剤処理及び 100 μM TLSC702 と 0.3 μM shikonin との併用処理において、GLS1 発現量が増加しており、NCI-H522 細胞に 100 μM TLSC702 と 0.3 μM shikonin とを併用処理しても GLS1 発現量上昇を介してグルタミノリシスを利用したエネルギー産生を行い生き延びてしまう可能性がある。そこで、さらなる併用処理による制がん効果の増強を目指して、GLS1 の阻害剤として既に報告されている CB-839 を用いることにした [43]。CB-839 を併用処理する際の濃度を決定するために、NCI-H522 細胞に CB-839 (0, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000 nM in 0.001% DMSO)を 72 時間単剤処理し、細胞生存率への影響を WST assay 法により解析した。その結果、50 nM まで高い細胞生存率を維持した (Fig. 4-5A)。このことより、72 時間処理における TLSC702 と shikonin との併用処理に用いる CB-839 濃度は 50 nM とした。また、NCI-H522 細胞に CB-839 (0, 1, 3, 10, 30, 100 nM in 0.1% DMSO)を 10 日間単剤処理し、コロニー形成能への影響を colony formation assay により解析した。その結果、10 nM まで高い細胞生存率維持した (Fig. 4-5B)。このことより、10 日間処理における TLSC702 と shikonin との併用処理に用いる CB-839 濃度は 10 nM とした。

TLSC702 と shikonin と CB-839 との三剤併用処理による制がん効果の解析

CB-839 を併用処理する際の濃度を決定したので、TLSC702 と shikonin と CB-839 との三剤併用処理による培養がん細胞株への影響を解析することとした。まず、細胞増殖能への影響として、NCI-H522 細胞に 100 μ M TLSC702, 0.2 μ M shikonin, 10 nM CB-839 単独処理あるいは 100 μ M TLSC702 と 0.2 μ M shikonin との二剤併用処理、100 μ M TLSC702 と 10 nM CB-839 との二剤併用処理、0.2 μ M shikonin と 10 nM CB-839 との二剤併用処理、100 μ M TLSC702 と 0.2 μ M shikonin と 10 nM CB-839 との三剤併用処理(溶媒は全て 0.1% DMSO)を行い、10 日間培養後にコロニー形成能を colony formation assay により解析した。その結果、100 μ M TLSC702 と 0.2 μ M shikonin との二剤併用処理、100 μ M TLSC702 と 10 nM CB-839 との二剤併用処理においてコロニー形成が阻害され、特に 100 μ M TLSC702 と 0.2 μ M shikonin と 10 nM CB-839 との三剤併用処理ではコロニー形成が阻害されていた (Fig. 4-6A, B)。

また、NCI-H522 細胞に 100 μ M TLSC702, 0.2 μ M shikonin, 50 nM CB-839 単独処理あるいは 100 μ M TLSC702 と 0.3 μ M shikonin との二剤併用処理、100 μ M TLSC702 と 50 nM CB-839 との二剤併用処理、0.3 μ M shikonin と 50 nM CB-839 との二剤併用処理、100 μ M TLSC702 と 0.3 μ M shikonin と 50 nM CB-839 との三剤併用処理(溶媒は全て 0.1% DMSO)を行い、72 時間併用処理した際の細胞死への影響をトリパンブルー色素排除法により解析した。その結果、100 μ M TLSC702 と 0.3 μ M shikonin と 50 nM CB-839 との三剤併用処理において最も強い細胞死誘導能がみられた (Fig. 4-6C)。

さらに、同様の処理を行い、アポトーシスの指標となる PARP の限定分解産物を Western blot 法により PARP の限定分解を検出したところ、未処理群や単独処理群と比較して、100 μ M TLSC702 と 0.3 μ M shikonin との二剤併用処理、100 μ M TLSC702 と 0.3 μ M shikonin と 50 nM CB-839 との三剤併用処理(溶媒は全て 0.1% DMSO)により PARP 限定分解産物量の増加がみられた (Fig. 4-6D)。

TLSC702 と shikonin と CB-839 との三剤併用処理による培養がん細胞株の MG 蓄積の解析

上記の結果でみられたような併用処理によるアポトーシス誘導効果の亢進が、GLO I 阻害剤による MG 蓄積を介したものであるか否かを、HPLC を用いて解析することとした。HL-60 細胞に 100 μ M TLSC702, 0.2 μ M shikonin, 1 nM CB-839 単独処理あるいは 100 μ M TLSC702 と 0.2 μ M shikonin との二剤併用処理、100 μ M TLSC702 と 1 nM CB-839 との二剤併用処理、0.2 μ M shikonin と 1 nM CB-839 との二剤併用処理、100 μ M TLSC702 と 0.2 μ M shikonin と 1 nM CB-839 との三剤併用処理(溶媒は全て 0.1% DMSO)を行い、72 時間併用処理した際の培養液中 MG 量を HPLC により解析した。その結果、未処理群や単独処理群と比較して、100 μ M TLSC702 と 0.2 μ M shikonin との二剤併用処理及び 100 μ M TLSC702 と 0.2 μ M shikonin と 1 nM CB-839 との三剤併用処理で

は培養液中 MG 量がそれぞれ約 2 倍、約 3 倍増加していることがわかった (Fig. 4-7)。

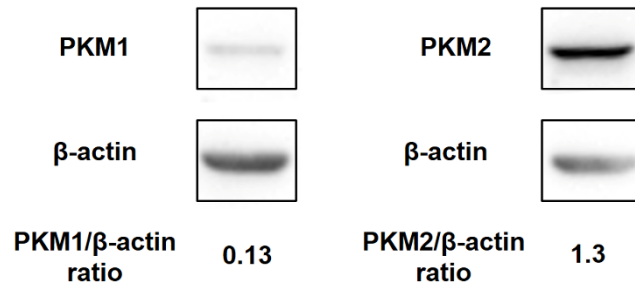
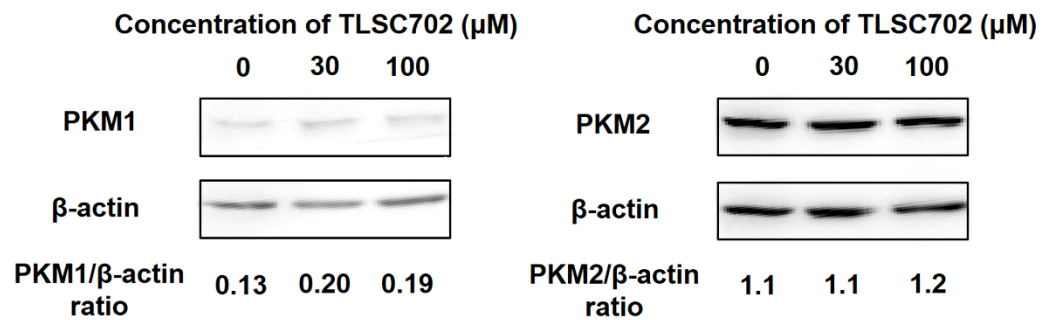
A**B**

Fig. 4-1 The expression of PKM1 and 2 in NCI-H522 cells

The expression levels of PKM1 and 2 in NCI-H522 cells (control) (A) and TLSC702 treated (0, 30, and 100 μM for 24 h) NCI-H522 cells (B) were analyzed by Western blot analysis. The values are the ratios of each PKM to β-actin band intensities calculated by densitometric analysis. The experiments were performed three times

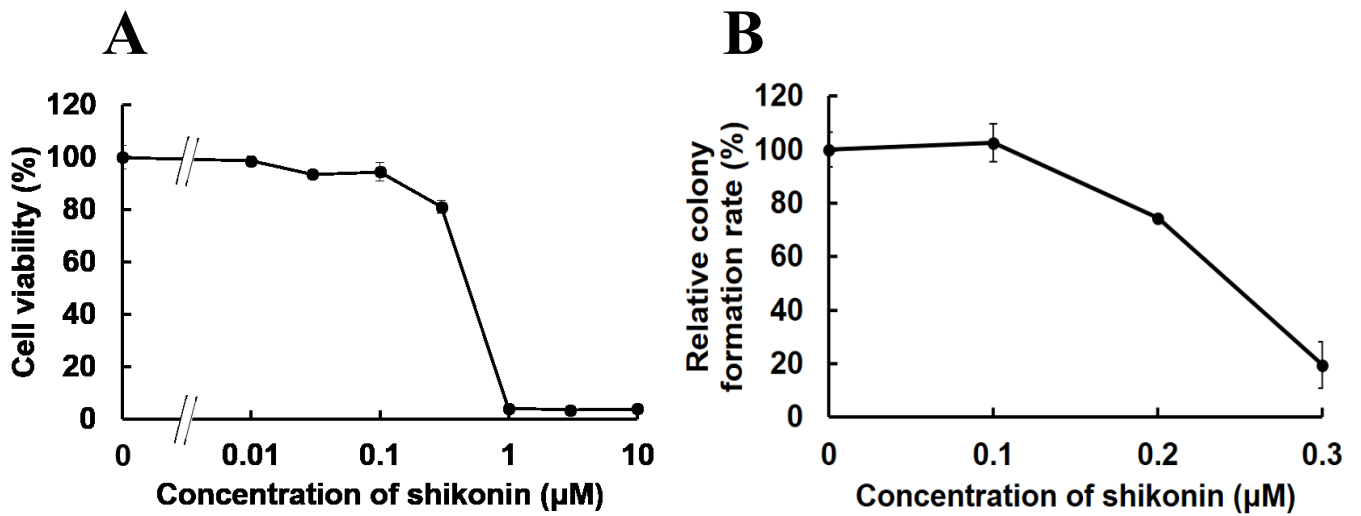


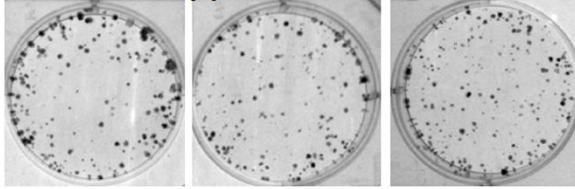
Fig. 4-2 The anti-proliferative effect of shikonin on NCI-H522 cells

(A) NCI-H522 cells were treated with various concentrations of shikonin for 72 h. Cell viability (% of control) was measured by a WST assay. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments. (B) The effect of shikonin on the colony formation ability of NCI-H522 cells. The cells were treated with various concentrations of shikonin for 10 days, and then colony formation rate (%) was calculated by a colony formation assay. The data represent the mean \pm SD from 3 independent experiments.

AConcentration of TLSC702 (μM)

0 30 100

Shikonin (-)



Shikonin (+)

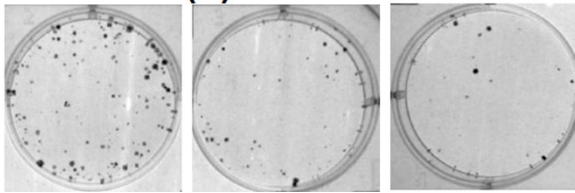
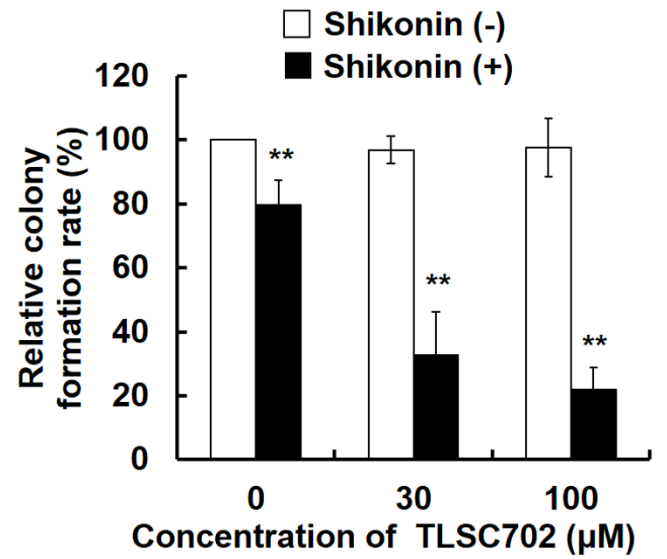
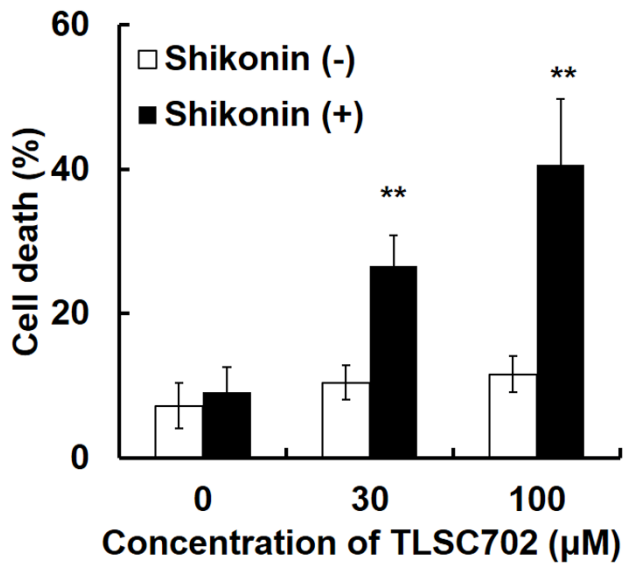
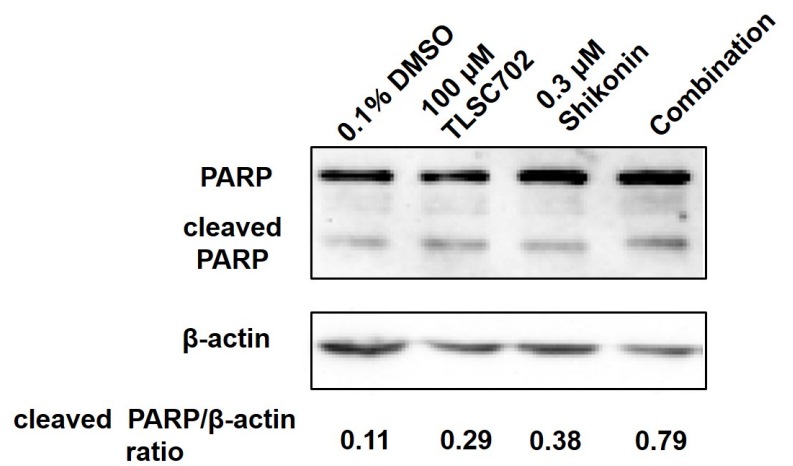
**B****C****D**

Fig. 4-3 The enhancement of anti-proliferative effect of TLSC702 on NCI-H522 cells by the combination treatment with shikonin

(A) The effect of TLSC702 in the presence or absence of shikonin on colony formation of NCI-H522 cells. The cells were treated with TLSC702 (0, 30, and 100 μM) and shikonin (0 and 0.2 μM) for 10 days. The colony forming abilities were then assessed by a colony formation assay.

(B) Analyses of the colony formation abilities in NCI-H522 cells. The number of colonies was calculated. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments (**: $p < 0.01$ vs. TLSC702 alone treatment). Statistical evaluations were performed using the Student's *t* test.

(C) The effect of TLSC702 in combination with shikonin on the cell death of NCI-H522 cells. The cells were treated with TLSC702 (0, 30, and 100 μM) and shikonin (0 and 0.3 μM) for 72 h, and then the number of apoptotic dead cells was measured by trypan blue exclusion assay. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments (**: $p < 0.01$ vs. 30 and 100 μM of TLSC702 alone treatments). Statistical evaluations were performed using the Student's *t* test.

(D) The effect of the combination treatment on PARP restriction cleavage in NCI-H522 cells. The cells were treated with 100 μM TLSC702, 0.3 μM shikonin and the combination of 100 μM TLSC702 and 0.3 μM shikonin for 72 h. The levels of full-length PARP and cleaved PARP were then detected by Western blotting as described in Materials and Methods. The values are expressed as the ratio of cleaved PARP to the β -actin band intensity calculated by a densitometric analysis. The experiments were performed three times

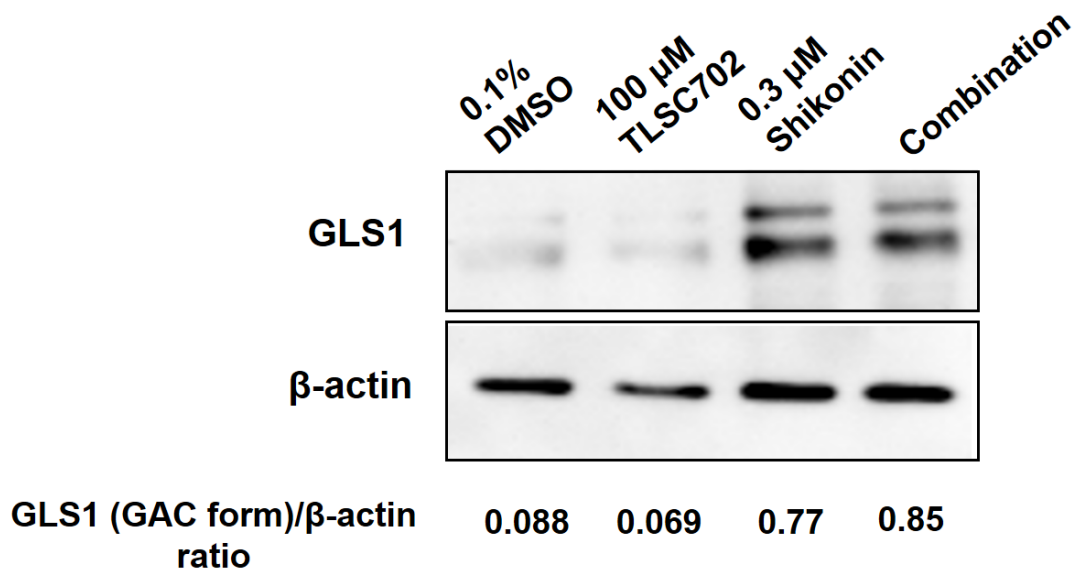


Fig.4-4 The expression of GLS1 on NCI-H522 cells treated with TLSC702 and shikonin

NCI-H522 cells were treated with various concentrations of TLSC702 and shikonin for 72 h, and then expression levels of GLS1, including two GLS allozymes, KGA form (upper band) and GAC form (lower band) were analyzed by Western blot analysis. The experiments were performed three times

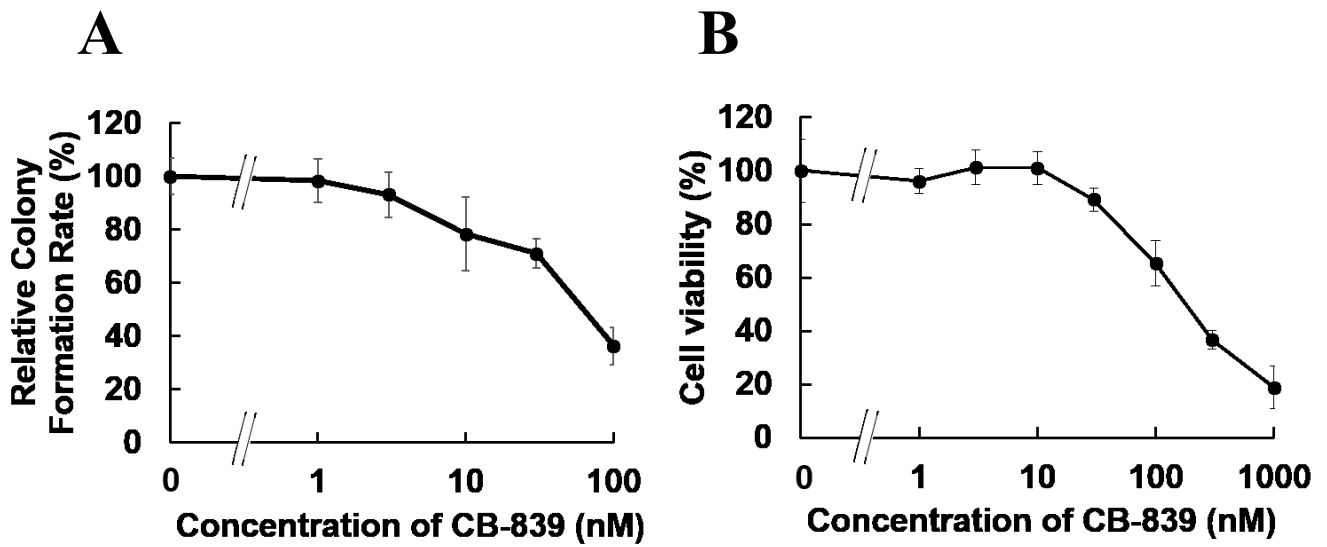
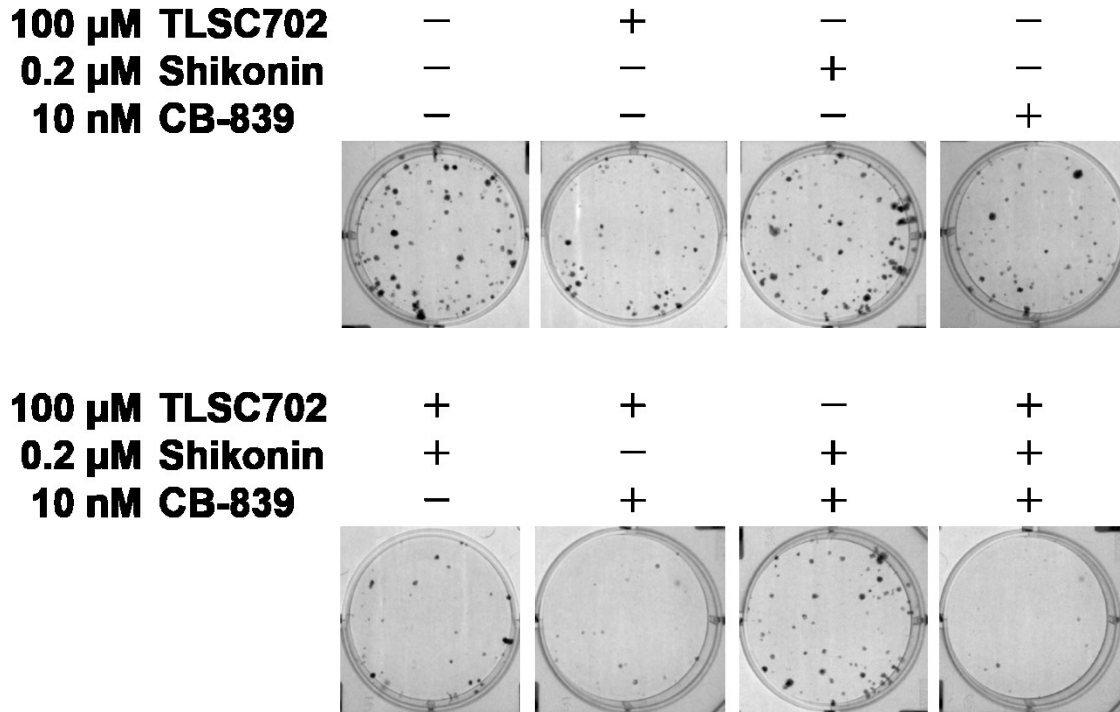


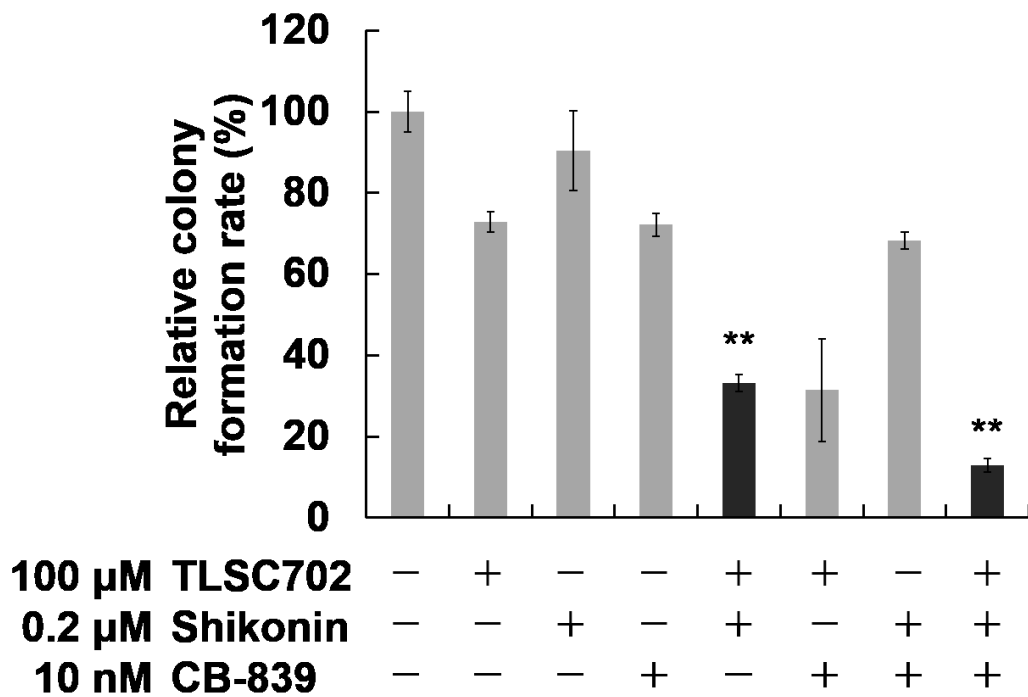
Fig. 4-5 The anti-proliferative effect of shikonin on NCI-H522 cells

(A) NCI-H522 cells were treated with various concentrations of shikonin for 72 h. Cell viability (% of control) was measured by WST assay. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments. (B) The cells were treated with various concentrations of shikonin for 10 days, and then colony formation rate (%) was calculated by colony formation assay. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments.

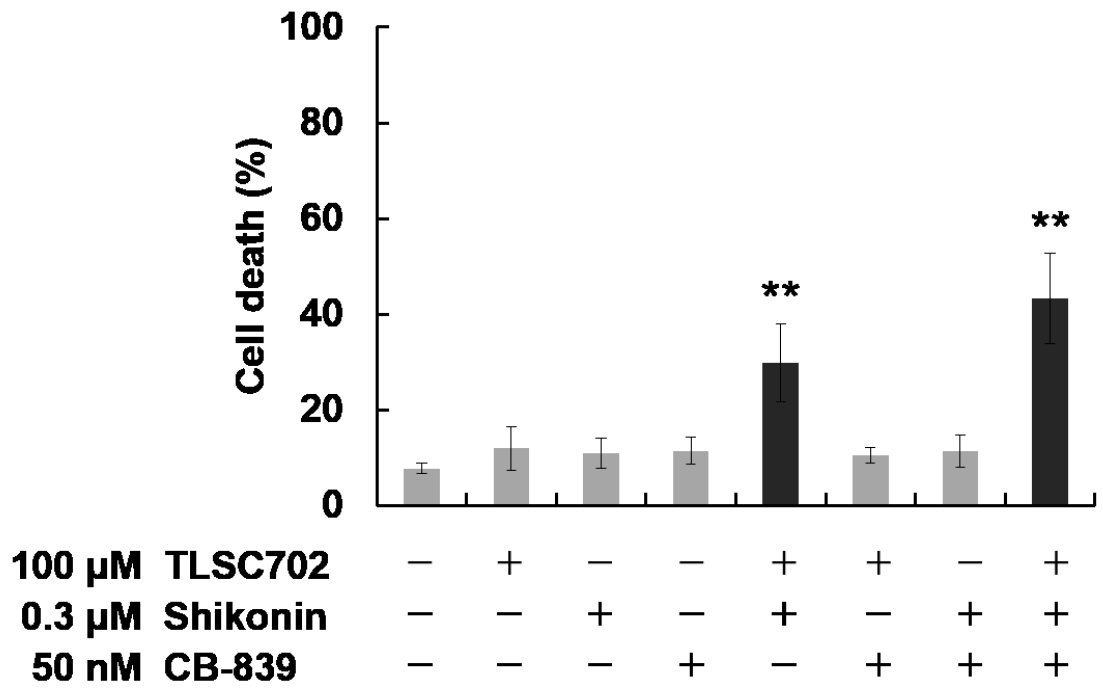
A



B



C



D

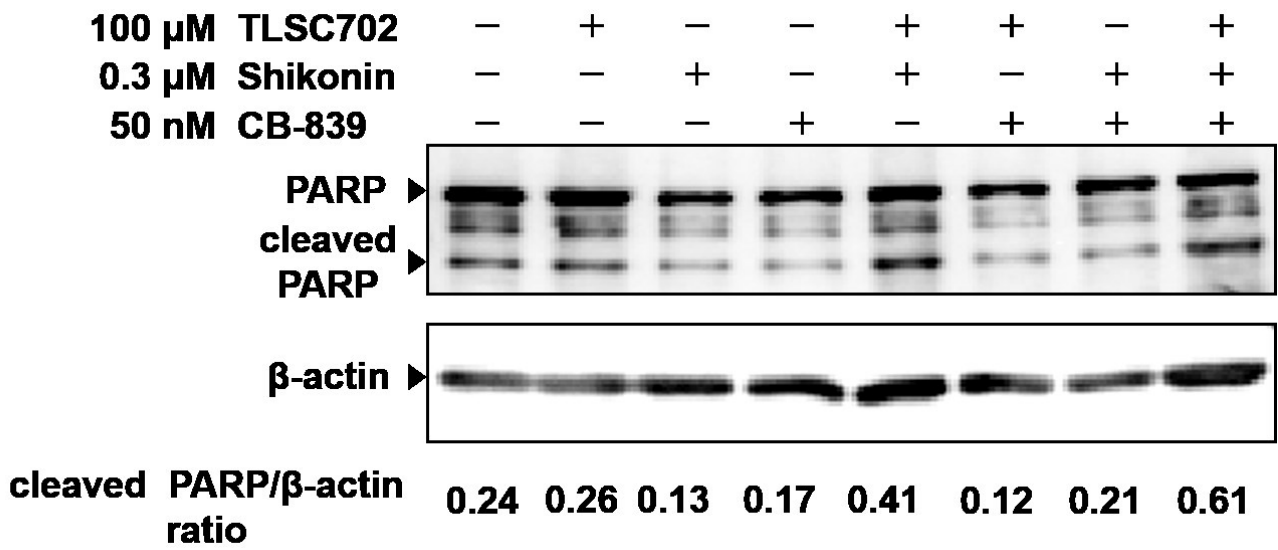


Fig. 4-6 The enhancement of anti-proliferative effect of TLSC702 on NCI-H522 cells by the combination treatment with shikonin and CB-839

(A) The effect of TLSC702 on colony formation in the presence or absence of shikonin and CB-839 in NCI-H522 cells. The cells were treated with DMSO (control), 100 μ M TLSC702, 0.2 μ M shikonin, 10 nM CB-839 and those of combinations which are indicated in the figure for 10 days, and then the colony forming abilities were assessed by colony formation assay. (B) Analyses of colony formation abilities in NCI-H522 cells. The number of colonies (A) were calculated. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments (**: $p < 0.01$ vs. TLSC702 alone treatment). Statistical evaluations were performed using the Student's t test. (C) The effect of TLSC702 on cell death (apoptosis) by the combination with shikonin and CB-839 on NCI-H522 cells. The cells were treated with DMSO (control), 100 μ M TLSC702, 0.3 μ M shikonin, 50 nM CB-839 and those of combinations which are indicated in the figure for 72 h, and then the number of apoptotic dead cells was measured by trypan blue exclusion assay. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments (**: $p < 0.01$ vs. TLSC702 alone treatment). Statistical evaluations were performed using the Student's t test. (D) The effect of TLSC702 on PARP restriction cleavage by the combination with shikonin and CB-839 on NCI-H522 cells. The cells were treated with DMSO (control), 100 μ M TLSC702, 0.3 μ M shikonin, 50 nM CB-839 and those of combination which is indicated in the figure for 72 h, and then the levels of full length PARP and cleaved PARP were detected by Western blot analysis. The experiments were performed three times

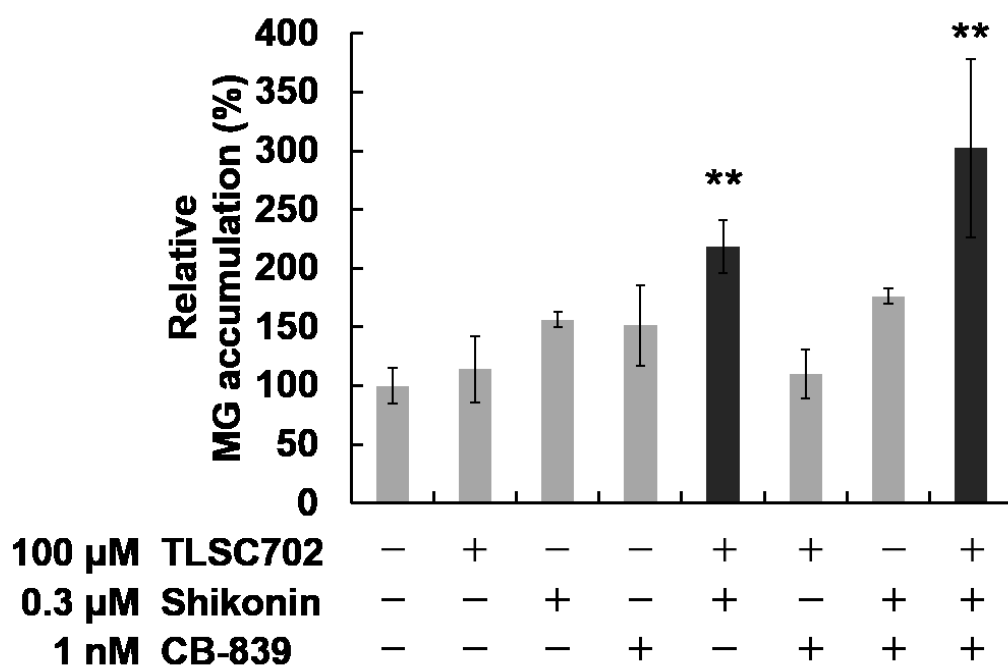


Fig. 4-7 The enhancement of MG accumulation effect of TLSC702 on HL-60 cells by the combination treatment with shikonin and CB-839

NCI-H522 cells were treated with DMSO (control), 100 μ M TLSC702, 0.2 μ M shikonin, 1 nM CB-839 and those of combinations which are indicated in the figure for 72 h. MG concentrations in the culture medium were measured using HPLC/UV. The data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent experiments (**: $p < 0.01$ vs. TLSC702 alone treatment). Statistical evaluations were performed using the Student's t test.

4-4 考察

本章では、GLO1 を主標的として、Warburg 効果、グルタミノリシスを標的とした新規がん併用化学療法の開発を目指して、解糖系と TCA サイクルをつなぐピルビン酸を生成する酵素であり、がん細胞特異的に発現している PKM2 と、TCA サイクルの補充反応であるグルタミノリシスの律速酵素 GLS1 に着目し、それらの阻害剤と TLSC702 との併用制がん効果を評価することを目的としている。

前章において、GLO1 依存性培養がん細胞株が GLO1 阻害剤 TLSC702 処理により解糖系への依存度を低下させ TCA サイクル優位になるような「代謝シフト」を起こし、MG 蓄積を回避してアポトーシスを回避してしまうことが分かった。このことからこの代謝シフトを抑制するような薬剤を併用することで、GLO1 阻害によるアポトーシス誘発機序としての制がん効果を高めることができることが予測される。そこで私は、この代謝シフトを抑制すると予想される、TCA サイクルドライブに関与する二つのがん細胞特異的な標的分子に着目した。すなわち、解糖系においてピルビン酸を生成する酵素である PKM2 と TCA サイクルの補充反応であるグルタミノリシスの律速酵素 GLS1 に着目し、TLSC702 との併用制がん効果を検討することとした。

前章より、「代謝シフト」が PDP1 の発現上昇を介した PDH 複合体形成促進によるピルビン酸からアセチル CoA への変換促進により引き起こされている可能性があることから、その上流に位置する解糖系酵素群の中にこの「代謝シフト」を抑制するポイントがあるのではないかと考えた。そこでまず、解糖系においてピルビン酸を生成する酵素でかつがん細胞に特異的に発現している PKM2 に着目した。正常細胞では PKM1 を主に発現している一方で、がん細胞では PKM2 を主に発現していることが知られている。実際、NCI-H522 細胞の PKM1/M2 発現量を解析すると、PKM2 の方が約 10 倍、発現量が高かった (Fig. 4-1A)。また、NCI-H522 に TLSC702 (0, 30, 100 μ M) を処理した際、この高い PKM2 発現量は維持されたままだった (Fig. 4-1B)。そこで、GLO1 阻害とともに PKM2 も阻害することで TCA サイクルの利用率を抑止し、エネルギー産生を解糖系優位に留めることでより効率的に制がん効果得られるのではないかと考えた。実際、PKM2 の特異的阻害剤である shikonin を TLSC702 と併用したところ、細胞増殖が強く抑制され、細胞死 (アポトーシス) も誘発することができた (Fig. 4-3A, 3B, 3C and 3D)。このことは、PKM2 阻害剤がピルビン酸生成を阻害し、TCA サイクルの利用を抑止させ、エネルギー産生を解糖系優位に留めることで、GLO1 阻害剤による MG 蓄積□アポトーシス誘導メカニズムによる制がん作用がより効果的に発揮されることを示唆する。

ここで私は、GLO1 阻害剤と PKM2 阻害剤との併用処理により、がん細胞がさらなる「代謝シフト」を引き起こして生き延びてしまう可能性を考えた。それは、初めに「代謝シフト」を抑制する標的分子としてもう一つ着目していた GLS1 によるものである。がん細胞は解糖系の他に、グルタミンを用いた TCA サイクルの補充反応である

グルタミノリシスも利用している。そのため、がん細胞の GLO I と PKM2 を阻害し、解糖系優位に留めたとしても、グルタミノリシスが新たなエネルギー産生経路となり、グルタミノリシスを利用してエネルギー産生を行うことで MG の蓄積を回避して生き延びてしまう可能性があると考えられる。実際、NCI-H522 細胞に shikonin 単独処理、TLSC702 と shikonin との併用処理をした際に、未処理、TLSC702 単独処理と比較して GLS1 発現量が顕著に増加していた (Fig. 4-4)。このことは、NCI-H522 細胞は本来グルタミノリシスの利用度が低いが、PKM2 を阻害されピルビン酸の供給ができなくなった際に、エネルギー産生を行うためにグルタミノリシスの利用に切り替えている可能性を示唆している。また、TLSC702 と shikonin との併用処理においても GLS1 の高発現がみられたことから、この時もグルタミノリシスを利用してエネルギー産生を行い、解糖系の利用を回避することで GLO I 阻害剤による MG 蓄積も回避し、生き延びてしまう可能性も示唆している。このことから、GLO I 阻害剤と PKM2 阻害剤の二剤併用だけでなく、GLS1 阻害剤を加えた三剤併用処理により、より強い制がん効果が期待できると考えた。実際、TLSC702 と shikonin と CB-839 とを併用処理し、その制がん効果をコロニー形成法、トリパンブルー色素排除法、Western blot 法により解析したところ、単剤処理と比較して強い細胞増殖抑制作用、細胞死 (アポトーシス) 誘導能をもつことが明らかとなった (Fig. 4-6)。また、これらの制がん効果が、GLO I 阻害剤による MG 蓄積を介したものであるか否かを解析するために、HPLC により細胞培養液中の MG 量を測定した。その結果、未処理群や単独処理群と比較して、TLSC702 と shikonin との二剤併用処理及び TLSC702 と shikonin と CB-839 との三剤併用処理において、培養液中 MG 量が増加していることが分かった (Fig. 4-7)。このことから、TLSC702 と shikonin との二剤併用処理、TLSC702 と shikonin と CB-839 との三剤併用処理における細胞増殖抑制作用、細胞死誘導作用は、PKM2 と GLS1 の阻害により解糖系への依存度が高まり、そこに GLO I 阻害による MG 蓄積が促進されたためではないかと考えられる。重要なことに、MG の蓄積は、TLSC702 と shikonin と CB-839 との三剤併用処理において最も増加していた。これは、PKM2 阻害、GLS1 阻害により、GLO I 阻害による MG 蓄積回避のための「代謝シフト」が抑制されたため、より効果的に GLO I 阻害剤の MG 蓄積作用が発揮されたと考えられる。

以上をまとめる。本章では、GLO I 阻害剤 TLSC702 とともにがん細胞特異的な代謝酵素 PKM2 の阻害剤 shikonin とを併用することで GLO I 阻害剤の制がん作用がより効果的に惹起されることを示した。また、この際にグルタミノリシスの律速酵素である GLS1 の発現が上昇していたため、グルタミノリシスを利用したさらなる代謝シフトを起こす可能性を考え、GLO I 阻害剤、PKM2 阻害剤とともに GLS1 阻害剤も併用処理することで、さらに効果的な制がん効果が得られることを示した (Fig. 4-8)。Warburg 効果をはじめ、がん細胞は細胞内外のさまざまな変化に応じてその代謝経路を切り替えることができると考えられており、一つの代謝経路を阻害しただけでは他の代謝経路を利用

して生存してしまう可能性が高い。よって、変化するがん細胞の回避代謝経路を明らかにし、その代謝シフトを担う重要な分子群を標的とする分子標的薬を組み合わせた新たな併用療法の確立が有効ながん化学療法の開発につながると考えられる。また、GLO1、PKM2、GLS1 は全てがん細胞特異的に高発現していることから、これらの阻害剤を用いることは副作用の少ないがん併用化学療法の確立につながることが期待される。

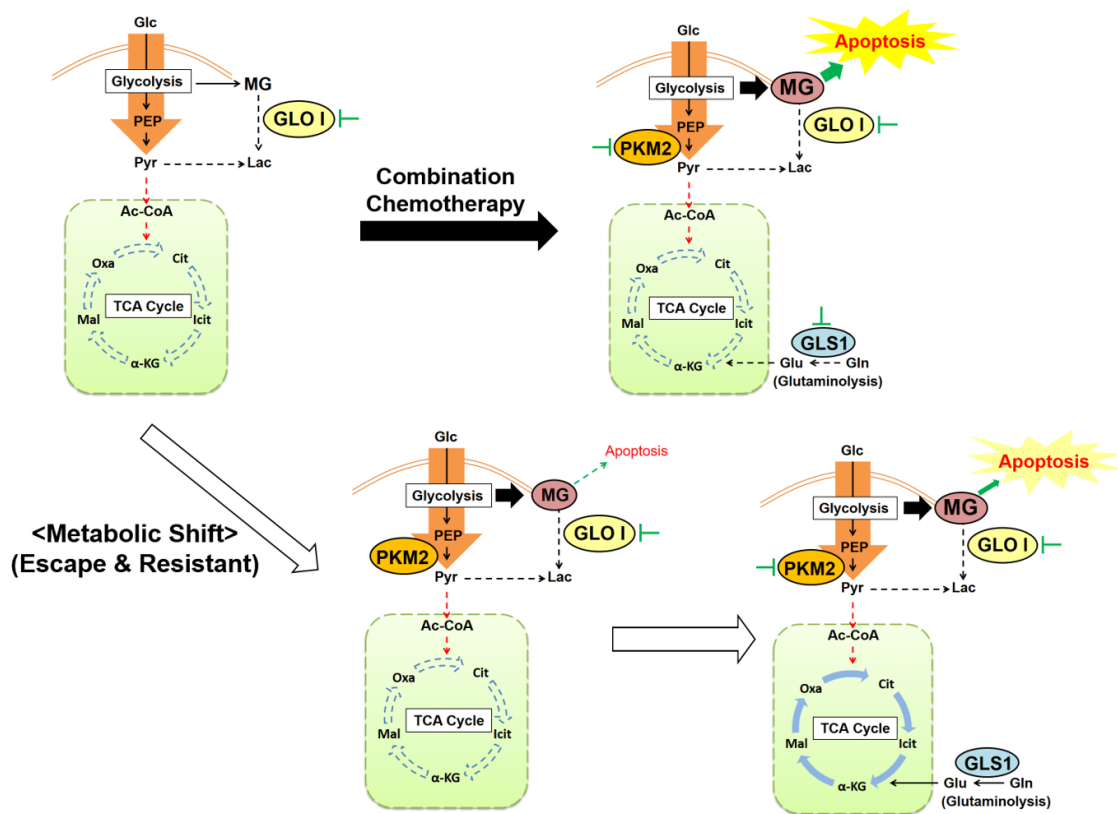


Fig.4-8 An effective combination of anticancer chemotherapy targeting the Warburg effect

Possible anticancer mechanisms by the combination chemotherapy using GLO I, PKM2, and GLS1 inhibitors were illustrated.

第 5 章

総括

総括

第1章では、我が国の死因の第一位であり、有効な薬剤・治療法の開発が望まれる疾患であるがんについて、その特徴的なエネルギー代謝、Warburg 効果についてまとめ、多くのがん細胞で高発現している GLO I の阻害剤の有用性を論じた。また、Warburg 効果を標的とした最近の制がん剤研究についてまとめた。

第2章では、新規 GLO I 阻害剤の候補化合物として、スチルベン骨格を有する天然物 piceatannol を見出した。また、制がん剤として使用する上で重要となる GLO I の SNP による活性の差異や阻害剤感受性に対する影響を解析したところ、アミノ酸置換をもたらす唯一の多型である GLO I Ala111Glu 多型は GLO I 比活性に影響を与えないこと、また当研究室で見出した合成低分子化合物 TLSC702 は、SNP の影響を受けず、強い阻害能をもつ GLO I 阻害剤であることを明らかにした。

第3章では、GLO I 依存性培養がん細胞株が GLO I 阻害剤 TLSC702 処理により解糖系への依存度を低下させ TCA サイクル依存性になるような代謝シフトを起こし、MG 蓄積を回避してアポトーシスを回避してしまうことを明らかにした。さらに、この現象を引き起こすスイッチングキーファクターとして PDP1 を同定した。

第4章では、前章で得られた結果から、代謝シフトを抑制するような薬剤と併用することで、GLO I 阻害によるアポトーシス誘発機序としての制がん効果を高めることができることが予測し、この代謝シフトを抑制すると予想される TCA サイクルドライブに関与する二つのがん細胞特異的な標的分子である PKM2 と GLS1 の阻害剤を GLO I 阻害剤と併用処理することで制がん効果より効果的に惹起されることを明らかにした。

本研究において、私は、がん細胞特異的な Warburg 効果を標的として、GLO I 阻害剤を中心とした新たな制がん戦略を構築するために、新たな GLO I の阻害剤候補化合物を見出し、また臨床使用を指向して GLO I の SNP による活性の差異や阻害剤感受性に対する影響を解析し、GLO I の活性中心を標的とした GLO I 阻害剤は臨床使用において SNP の差異を考慮せず、全ての GLO I に適応できる可能性を示した。また、培養がん細胞株への GLO I 阻害剤単独使用において、アポトーシスを回避するためにエネルギー産生経路を TCA サイクル依存的に変化させる「代謝シフト」が起きてしまうことを見出し、その原因であるスイッチングキーファクターとして PDP1 を同定した。そして、GLO I 阻害剤単独使用におけるアポトーシス回避経路「代謝シフト」の問題を解決するために「代謝シフト」を抑制する標的分子としてがん細胞特異的かつ TCA サイクルドライブに関わる PKM2 と GLS1 に着目し、GLO I 阻害剤とこれらの阻害剤とを併用することで制がん効果がより効果的に惹起されることを明らかにした。

また、今回の結果から、Warburg 効果のような代謝リプログラミングを起こしたがん細胞は、細胞内外のさまざまな変化が起こると、それに応じてエネルギー代謝経路をシフトすることが明らかとなり、一つの代謝経路を阻害しただけでは他の代謝経路を利用

して生存してしまう可能性が高いことが示唆された。よって、変化するがん細胞の回避代謝経路を明らかにし、その代謝シフトを担う重要な分子群を標的とする分子標的薬とを組み合わせた新たな併用療法の確立が有効ながんの治療法に成り得ると結論される。

本研究は今後、Warburg 効果を標的とした新しい制がん戦略として、特に、がん細胞選択性を有する GLO I を主標的として、関連するエネルギー代謝酵素の特異的阻害剤とを組み合わせた効果的な新しいがん併用化学療法の開発に貢献できるものと期待される (図 5-1)。

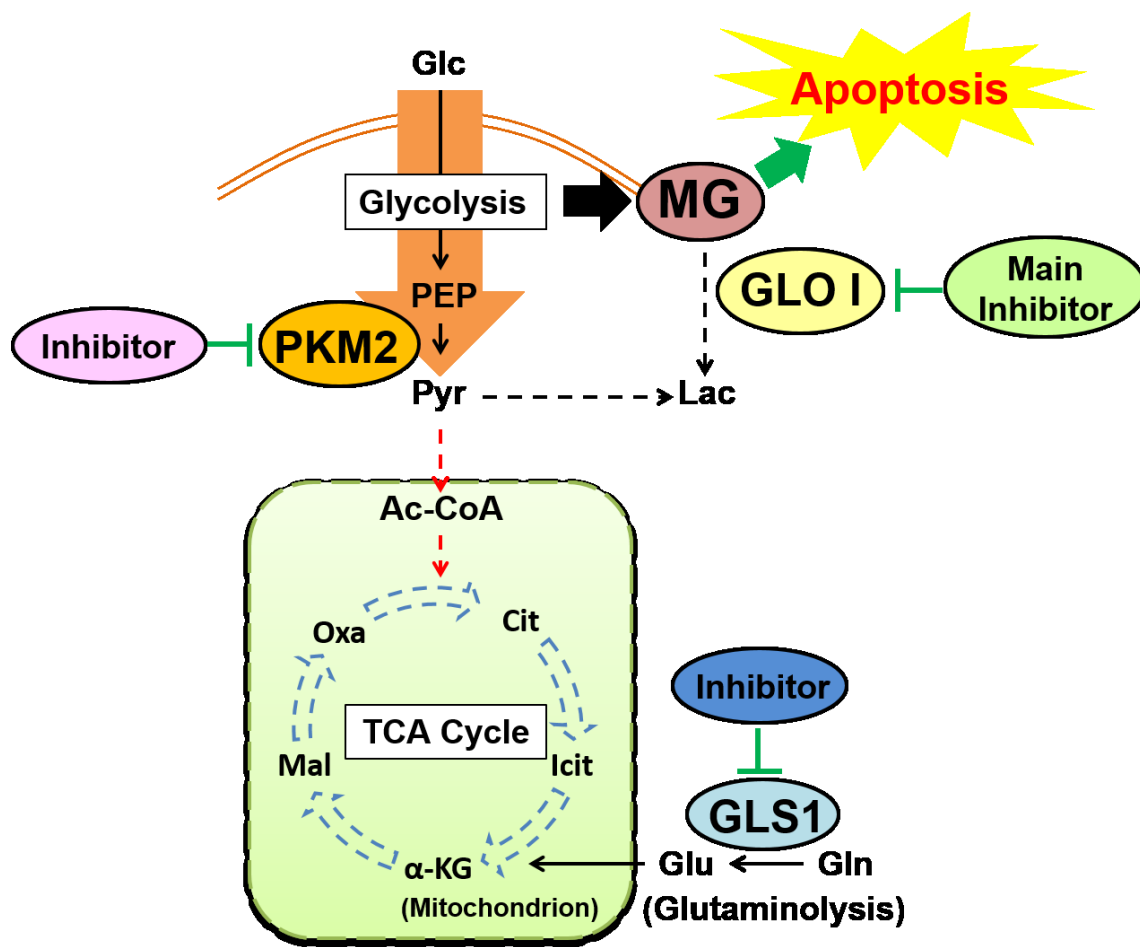


図 5-1 がん細胞特異的な Warburg 効果を標的とした新たな制がん戦略

参考文献

- [1] Hanahan D, Weinberg RA, The hallmarks of cancer, *Cell* 2000; **100**: 57-70.
- [2] 実験医学増刊 Vol.30 No.15 がんと代謝 曾我朋義, 江角浩安／編 (羊土社、2012)
- [3] Warburg O, On the origin of cancer cells, *Science* 1956; **123**: 309-314.
- [4] Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB, Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation, *Science* 2009; **324**: 1029-1033.
- [5] Denko NC, Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour, *Nat. Rev. Cancer* 2008; **8**: 705-713.
- [6] Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N, p53 regulates glucose metabolism through an IKK-NF-kappaB pathway and inhibits cell transformation, *Nat. Cell Biol.* 2008; **10**: 611-618.
- [7] Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, Vidal MN, Nakano K, Bartrons R, Gottlieb E, Vousden KH, TIGAR, a p53-inducible regulator of glycolysis and apoptosis, *Cell* 2006; **126**: 107-120.
- [8] Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavrilova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM, p53 regulates mitochondrial respiration, *Science* 2006; **312**:1650-1653.
- [9] Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K, c-Myc and cancer metabolism, *Clin. Cancer Res.* 2012; **18**: 5546-5553.
- [10] Kim JW, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang CV, HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia, *Cell Metab.* 2006; **3**: 177-185.
- [11] Hanahan D, Weinberg RA, Hallmarks of cancer: the next generation, *Cell* 2011; **144**: 646-674.
- [12] Phelps ME, Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000; **97**: 9226-9233.
- [13] Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T, Saito N, Ochiai A, Tomita M, Esumi H, Soga T, Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis time-of-flight mass spectrometry, *Cancer Res.* 2009; **69**: 4918-4925.
- [14] H. D. Dakin and H. W. Dudley, ON GLYOXALASE, *J. Biol. Chem.* 1913; **14**: 423-431.
- [15] Cliffe EE, Waley SG, The mechanism of the glyoxalase I reaction, and the effect of ophthalmic acid as an inhibitor, *Biochem. J.* 1961; **79**: 475-482.
- [16] Racker E. The mechanism of action of glyoxalase. *J. Biol. Chem.* 1951; **190**: 685-96.
- [17] Phillips SA, Thornalley PJ, The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal, *Eur J Biochem.* 1993; **212**: 101-105.
- [18] Vander Jagt DL, Daub E, Krohn JA, Han LP, Effects of pH and thiols on the kinetics of yeast

glyoxalase I. An evaluation of the random pathway mechanism, *Biochemistry* 1975; **14**: 3669-3675.

[19] Selwood T, Thornalley PJ, Binding of methylglyoxal to albumin and formation of fluorescent adducts. Inhibition by arginine, N-alpha-acetylarginine and aminoguanidine, *Biochem. Soc. Trans.* 1993; **21**: 170S.

[20] Thornalley PJ, Waris S, Fleming T, Santarius T, Larkin SJ, Winklhofer-Roob BM, Stratton MR, Rabbani N, Imidazopurinones are markers of physiological genomic damage linked to DNA instability and glyoxalase 1-associated tumour multidrug resistance, *Nucleic Acids Res.* 2010; **38**: 5432-5442.

[21] Ranganathan S, Tew KD, Analysis of glyoxalase-I from normal and tumor tissue, *Biochim. Biophys. Acta* 1993; **1182**: 311–316.

[22] Wang Y, Kuramitsu Y, Ueno T, Suzuki N, Yoshino S, Iizuka N, Akada J, Kitagawa T, Oka M, Nakamura K, Glyoxalase I (GLO1) is up-regulated in pancreatic cancerous tissues compared with related non-cancerous tissues, *Anticancer Res.* 2012; **32**: 3219–3222.

[23] Bair WB 3rd, Cabello CM, Uchida K, Bause AS, Wondrak GT, GLO1 overexpression in human malignant melanoma, *Melanoma Res.* 2010; **20**: 85–96.

[24] Davidson SD, Cherry JP, Choudhury MS, Tazaki H, Mallouh C, Konno S, Glyoxalase I activity in human prostate cancer: a potential marker and importance in chemotherapy, *J. Urol.*, 1999; **161**: 690–691.

[25] Romanuik TL, Ueda T, Le N, Haile S, Yong TM, Thomson T, Vessella RL, Sadar MD, Novel biomarkers for prostate cancer including noncoding transcripts, *Am. J. Pathol.* 2009; **175**: 2264–2276.

[26] Rulli A, Carli L, Romani R, Baroni T, Giovannini E, Rosi G, Talesa V, Expression of glyoxalases I and II in normal and breast cancer tissues, *Breast Cancer Res. Treat.* 2001; **66**: 67–72.

[27] Chiavarina B, Nokin M-J, Durieux F, Bianchi E, Turtoi A, Peulen O, Peixoto P, Irigaray P, Uchida K, Belpomme D, Delvenne P, Castronovo V, Bellahcène A, Triple negative tumors accumulate significantly less methylglyoxal specific adducts than other human breast cancer subtypes, *Oncotarget* 2014; **5**: 5472–5482.

[28] Sakamoto H, Mashima T, Sato S, Hashimoto Y, Yamori T, Tsuruo T, Selective activation of apoptosis program by S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in glyoxalase I-overexpressing human lung cancer cells, *Clin. Cancer Res.* 2001; **7**: 2513–2518.

[29] Sakamoto H, Mashima T, Kizaki A, Dan S, Hashimoto Y, Naito M, Tsuruo T, Glyoxalase I is involved in resistance of human leukemia cells to antitumor agent-induced apoptosis, *Blood* 2000; **95**: 3214–3218.

[30] Burdelski C, Shihada R, Hinsch A, Angerer A, Göbel C, Friedrich E, Hube-Magg C, Burdak-

- Rothkamm S, Kluth M, Simon R, Möller-Koop C, Sauter G, Büscheck F, Wittmer C, Clauditz TS, Krech T, Tsourlakis MC, Minner S, Graefen M, Schlomm T, Wilczak W, Jacobsen F, High-Level Glyoxalase 1 (GLO1) expression is linked to poor prognosis in prostate cancer, *Prostate* 2017; **77**: 1528-1538.
- [31] Kreycey N, Gotzian C, Fleming T, Flechtenmacher C, Grabe N, Plinkert P, Hess J, Zaoui K, Glyoxalase 1 expression is associated with an unfavorable prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma, *BMC Cancer* 2017; **17**: 382.
- [32] Cheng WL, Tsai MM, Tsai CY, Huang YH, Chen CY, Chi HC, Tseng YH, Chao IW, Lin WC, Wu SM, Liang Y, Liao CJ, Lin YH, Chung IH, Chen WJ, Lin PY, Wang CS, Lin KH, Glyoxalase-I is a novel prognosis factor associated with gastric cancer progression, *PLoS One* 2012; **7**: e34352.
- [33] Vince R and Wadd WB, Glyoxalase inhibitors as potential anticancer agents, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1969; **35**: 593-598.
- [34] Vince R, Daluge S, Glyoxalase inhibitors. A possible approach to anticancer agents, *J. Med. Chem.* 1971; **14**: 35-37.
- [35] Takasawa R, Akahane H, Tanaka H, Shimada N, Yamamoto T, Uchida-Maruki H, Sai M, Yoshimori A, Tanuma S, Piceatannol, a natural trans-stilbene compound, inhibits human glyoxalase I, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2017; **27**: 1169-1174.
- [36] Thornalley PJ, Ladan MJ, Ridgway SJ, Kang Y, Antitumor activity of S-(p-bromobenzyl)glutathione diesters in vitro: a structure-activity study, *J. Med. Chem.* 1996; **39**: 3409-3411.
- [37] Murthy NS, Bakeris T, Kavarana MJ, Hamilton DS, Lan Y, Creighton DJ, S-(N-aryl-N-hydroxycarbamoyl)glutathione derivatives are tight-binding inhibitors of glyoxalase I and slow substrates for glyoxalase II, *J. Med. Chem.* 1994; **37**: 2161-2166.
- [38] Takasawa R, Tao A, Saeki K, Shionozaki N, Tanaka R, Uchiro H, Takahashi S, Yoshimori A, Tanuma S, Discovery of a new type inhibitor of human glyoxalase I by myricetin-based 4-point pharmacophore, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011; **21**: 4337-4342.
- [39] Chen J, Xie J, Jiang Z, Wang B, Wang Y, Hu X, Shikonin and its analogs inhibit cancer cell glycolysis by targeting tumor pyruvate kinase-M2, *Oncogene* 2011; **30**: 4297-4306.
- [40] van den Heuvel AP, Jing J, Wooster RF, Bachman KE, Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth, *Cancer Biol. Ther.* 2012; **13**: 1185-1194.
- [41] Shukla K, Ferraris DV, Thomas AG, Stathis M, Duvall B, Delahanty G, Alt J, Rais R, Rojas C, Gao P, Xiang Y, Dang CV, Slusher BS, Tsukamoto T, Design, synthesis, and pharmacological evaluation of bis-2-(5-phenylacetamido-1,2,4-thiadiazol-2-yl)ethyl sulfide 3 (BPTES) analogs as glutaminase inhibitors, *J. Med. Chem.* 2012; **55**: 10551-10563.
- [42] Katt WP, Ramachandran S, Erickson JW, Cerione RA, Dibenzophenanthridines as inhibitors

- of glutaminase C and cancer cell proliferation, *Mol. Cancer Ther.* 2012; **11**: 1269-1278.
- [43] Gross MI, Demo SD, Dennison JB, Chen L, Chernov-Rogan T, Goyal B, Janes JR, Laidig GJ, Lewis ER, Li J, Mackinnon AL, Parlati F, Rodriguez ML, Shwonek PJ, Sjogren EB, Stanton TF, Wang T, Yang J, Zhao F, Bennett MK, Antitumor activity of the glutaminase inhibitor CB-839 in triple-negative breast cancer, *Mol. Cancer Ther.* 2014; **13**: 890-901.
- [44] Leinonen HM, Kansanen E, Pölönen P, Heinäniemi M, Levonen AL, Role of the Keap1-Nrf2 pathway in cancer, *Adv Cancer Res.* 2014; **122**: 281-320
- [45] Singh A, Venkannagari S, Oh KH, Zhang YQ, Rohde JM, Liu L, Nimmagadda S, Sudini K, Brimacombe KR, Gajghate S, Ma J, Wang A, Xu X, Shahane SA, Xia M, Woo J, Mensah GA, Wang Z, Ferrer M, Gabrielson E, Li Z, Rastinejad F, Shen M, Boxer MB, Biswal S, Small Molecule Inhibitor of NRF2 Selectively Intervenes Therapeutic Resistance in KEAP1-Deficient NSCLC Tumors, *ACS Chem Biol.* 2016; **11**: 3214-3225.
- [46] Kömpf J, Bissbort S, Gussmann S, Ritter H, Polymorphism of red cell glyoxalase I (E1: 4.4.1.5); a new genetic marker in man. Investigation of 169 mother-child combinations, *Humangenetik.* 1975; **27**: 141-143.
- [47] Gale CP, Grant PJ, The characterisation and functional analysis of the human glyoxalase-1 gene using methods of bioinformatics, *Gene* 2004; **340**: 251-260.
- [48] Kim NS, Sekine S, Kiuchi N, Kato S, cDNA cloning and characterization of human glyoxalase I isoforms from HT-1080 cells, *J Biochem.* 1995; **117**: 359-361.
- [49] Junaid MA, Kowal D, Barua M, Pullarkat PS, Sklower Brooks S, Pullarkat RK, Proteomic studies identified a single nucleotide polymorphism in glyoxalase I as autism susceptibility factor, *Am. J. Med. Genet. A.* 2004; **131**: 11-17.
- [50] Antognelli C, Del Buono C, Ludovini V, Gori S, Talesa VN, Crinò L, Barberini F, Rulli A, CYP17, GSTP1, PON1 and GLO1 gene polymorphisms as risk factors for breast cancer: an Italian case-control study, *BMC Cancer* 2009; **9**: 115.
- [51] Antognelli C, Mezzasoma L, Mearini E, Talesa VN, Glyoxalase 1-419C>A variant is associated with oxidative stress: implications in prostate cancer progression, *PLoS One* 2013; **8**: e74014.
- [52] Krechler T, Jáchymová M, Mestek O, Zák A, Zima T, Kalousová M, Soluble receptor for advanced glycation end-products (sRAGE) and polymorphisms of RAGE and glyoxalase I genes in patients with pancreas cancer, *Clin Biochem.* 2010; **10-11**: 882-886.
- [53] Kalousová M, Germanová A, Jáchymová M, Mestek O, Tesar V, Zima T, A419C (E111A) polymorphism of the glyoxalase I gene and vascular complications in chronic hemodialysis patients, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008; **1126**: 268-271.
- [54] Politi P, Minoretti P, Falcone C, Martinelli V, Emanuele E, Association analysis of the functional Ala111Glu polymorphism of the glyoxalase I gene in panic disorder, *Neurosci Lett.*

2006; **396**: 163-166.

[55] SNPedia [<https://www.snpedia.com/index.php/Rs2736654>] (最終アクセス日: 2018 年 2 月 21 日)

[56] Cameron AD, Ridderström M, Olin B, Kavarana MJ, Creighton DJ, Mannervik B, Reaction mechanism of glyoxalase I explored by an X-ray crystallographic analysis of the human enzyme in complex with a transition state analogue, *Biochemistry* 1999; **38**: 13480-13490.

[57] Guex N, Swiss-PdbViewer: A new fast and easy to use PDB viewer for the Macintosh, *Experientia* 1996; **52**: A26.

[58] David A Case, TA Darden, Thomas E Cheatham III, CL Simmerling, Junmei Wang, Robert E Duke, Ray Luo, Kenneth M Merz, David A Pearlman, Mike Crowley, RC Walker, Wei Zhang, Bing Wang, Seth Hayik, Adrian Roitberg, Gustavo Seabra, KF Wong, Francesco Paesani, X Wu, S Brozell, V Tsui, H Gohlke, L Yang, C Tan, J Mongan, V Hornak, G Cui, P Beroza, DH Mathews, CEAF Schafmeister, WS Ross, PA Kollman, AMBER 9, *University of California, San Francisco* 2006.

[59] William L. Jorgensen, Jayaraman Chandrasekhar, Jeffrey D. Madura, Roger W, Impey and Michael L. Klein. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water, *J. Chem. Phys.* 1983; **79**: 926-935.

[60] Jean-Paul Ryckaert, Giovanni Ciccotti, Herman J.C Berendsen, Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes, *J. Comput. Phys.* 1977; **23**: 327-341.

[61] Gohlke H, Case DA, Converging free energy estimates: MM-PB(GB)SA studies on the protein-protein complex Ras-Raf, *J. Comput. Chem.* 2004; **25**: 238-250.

[62] Junmei Wang, Tingjun Hou, Xiaojie Xu, Recent advances in free energy calculations with a combination of molecular mechanics and continuum models, *Curr. Comput.-Aided Drug Des.* 2006; **2**: 287-306.

[63] Onufriev A, Bashford D, Case DA, Exploring protein native states and large-scale conformational changes with a modified generalized born model, *Proteins* 2004; **55**: 383-394.

[64] Gohlke H, Kiel C, Case DA, Insights into protein-protein binding by binding free energy calculation and free energy decomposition for the Ras-Raf and Ras-RalGDS complexes, *J. Mol. Biol.* 2003; **330**: 891-913.

[65] Oray B, Norton SJ, Glyoxalase I from mouse liver, *Methods Enzymol.* 1982; **90**: 542-546.

[66] Cameron AD, Olin B, Ridderström M, Mannervik B, Jones TA, Crystal structure of human glyoxalase I--evidence for gene duplication and 3D domain swapping, *EMBO J.* 1997; **16**: 3386-3395.

[67] Hall SS, Doweyko AM, Jordan F, Glyoxalase I enzyme studies. 4. General base catalyzed enediol proton transfer rearrangement of methyl- and phenylglyoxalglutathionylhemithiol acetal

to S-lactoyl- and S-mandeloylglutathione followed by hydrolysis. A model for the glyoxalase enzyme system, *J. Am. Chem. Soc.* 1978; **100**: 5934-5939.

[68] Tanuma S, Development of novel anti-cancer combination chemotherapy targeting warburg effect, ILSI Japan 121 (2015) 8-15.

[69] O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Friend S, Fornace AJ Jr, Kohn KW, Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents, *Cancer Res.* 1997; **57**: 4285-4300.

[70] Annibaldi A, Widmann C, Glucose metabolism in cancer cells, *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2010; **13**: 466-470.

[71] Hirschhaeuser F, Sattler UG, Mueller-Klieser W, Lactate: a metabolic key player in cancer, *Cancer Res.* 2011; **71**: 6921-6925.

[72] Roche TE, Hiromasa Y, Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer, *Cell Mol Life Sci.* 2007; **64**: 830-849.

[73] McFate T, Mohyeldin A, Lu H, Thakar J, Henriques J, Halim ND, Wu H, Schell MJ, Tsang TM, Teahan O, Zhou S, Califano JA, Jeoung NH, Harris RA, Verma A, Pyruvate dehydrogenase complex activity controls metabolic and malignant phenotype in cancer cells, *J Biol Chem.* 2008; **283**: 22700-22708.

[74] Saunier E, Benelli C, Bortoli S, The pyruvate dehydrogenase complex in cancer: An old metabolic gatekeeper regulated by new pathways and pharmacological agents, *Int J Cancer.* 2016; **138**: 809-817.

[75] Imamura K, Tanaka T, Pyruvate kinase isozymes from rat, *Methods Enzymol.* 1982; **90**: 150-165.

[76] Christofk HR, Vander Heiden MG, Harris MH, Ramanathan A, Gerszten RE, Wei R, Fleming MD, Schreiber SL, Cantley LC, The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth, *Nature* 2008; **452**: 230-233.

[77] Noguchi T, Inoue H, Tanaka T, The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing, *J. Biol. Chem.* 1986; **261**: 13807-13812.

[78] Ugurel S, Bell N, Sucker A, Zimpfer A, Rittgen W, Schadendorf D, Tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) as a novel plasma tumor marker in melanoma, *Int. J. Cancer* 2005; **117**: 825-830.

[79] Ashizawa K, Willingham MC, Liang CM, Cheng SY, *In vivo* regulation of monomer-tetramer conversion of pyruvate kinase subtype M2 by glucose is mediated via fructose 1,6-bisphosphate, *J. Biol. Chem.* 1991; **266**: 16842-16846.

- [80] Jurica MS, Mesecar A, Heath PJ, Shi W, Nowak T, Stoddard BL, The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate, *Structure* 1998; **6**: 195-210.
- [81] van den Heuvel AP, Jing J, Wooster RF, Bachman KE, Analysis of glutamine dependency in non-small cell lung cancer: GLS1 splice variant GAC is essential for cancer cell growth, *Cancer Biol. Ther.* 2012; **13**: 1185-1194.
- [82] Szeliga M, Matyja E, Obara M, Grajkowska W, Czernicki T, Albrecht J, Relative expression of mRNAs coding for glutaminase isoforms in CNS tissues and CNS tumors, *Neurochem. Res.* 2008; **33**: 808-813.

謝辞

本研究を遂行するにあたり、熱心なご指導、ご鞭撻を賜りました東京理科大学薬学部 生化学研究室教授 田沼 靖一 博士に厚く御礼申し上げます。田沼先生は私のサイエンスの力を高めてくださいました。また田沼先生のご指導なくしては本論文の完成はありえませんでした。深く感謝いたします。

直接のご指導を賜りました、東京理科大学薬学部 医療分子生物学研究室講師 高澤 涼子 博士に深く感謝いたします。

また、様々なご指導、ご助言を賜りました東京理科大学薬学部 生化学研究室講師 佐藤 聡 博士、東京理科大学薬学部 生化学研究室客員教授 阿部 英明 博士、東京理科大学薬学部 遺伝子制御学研究室教授 内海 文彰 博士、東京理科大学薬学部 分子医科学研究室准教授 秋本 和憲 博士、株式会社 理論創薬研究所 吉森 篤史 博士に心から感謝いたします。

本論文の審査をしていただき、大変有意義なご助言をいただきました、東京理科大学薬学部教授 深井 文雄 博士、岡 淳一郎 博士、宮崎 智 博士、内海 文彰 博士に厚く御礼申し上げます。

また、これまでの研究生活において、さまざまなご指導を賜りました先輩方、共に試行錯誤してきた後輩達に感謝申し上げます。

最後に、私の研究生活をいつも応援し、6年間支え続けてくださいました家族に深く感謝申し上げます。