

氏名（本籍） <sup>しま</sup>嶋 <sup>だ</sup>田 <sup>な</sup>奈 <sup>み</sup>実（埼玉県）  
学位の種類 博士（薬科学）  
学位記番号 甲第17号  
学位授与の日付 2018年3月19日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
学位論文題目 **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**

論文審査委員 （主査）嘱託教授 深井 文雄  
教授 内海 文彰 教授 宮崎 智  
教授 岡 淳一郎 嘱託教授 田沼 靖一

## 論文内容の要旨

本論文は、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 効果に着目し、多くのがん細胞で高発現している glyoxalase I (GLO I) の阻害剤等を用いた新たな制がん戦略に関する研究をについて述べる。

まず、がん細胞の大きな特徴の一つである「代謝」について述べる。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的リン酸化によりエネルギー (ATP) を主に産生している。しかし、多くのがん細胞は、グルコースを活発に取り込み、酸素存在下でも TCA サイクルよりも解糖系に依存して ATP を産生するように「代謝リプログラミング」を起こしている。この現象は、Warburg 効果として広く知られている。この様ながん細胞では、解糖系代謝副産物である毒性の強い methylglyoxal (MG) を解毒する glyoxalase system が亢進している。この反応の律速酵素である GLO I が種々のがん細胞で高発現しており、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。これらのことから、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。

本研究は、次に示す三点の検討を行うことで、がん細胞特異的な代謝、Warburg 効果を標的として、GLO I 阻害剤を中心とした新しい制がん戦略の構築を目指すものである。第一に、“新規 GLO I 阻害剤の探索、及び GLO I の SNP (Single nucleotide polymorphism)による酵素活性、阻害剤に対する感受性の解析”、第二に、“GLO I 阻害による代謝シフトを引き起こす「スイッチングキーファクター」の探索”、第三に、“GLO I を標的とした新規がん併用化学療法の検討”について、以下に本研究で得られた知見を示す。

### 1.新規 GLO I 阻害剤の創製、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

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。当研究室ではこれまでに、*in silico* 手法を用いて従来の glutathione 誘導體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。また今回、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。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ことが期待される。

一方、ヒト GLO I には GLO I Ala111Glu の SNP が存在しており、臨床調査論文では、この SNP が GLO I の活性に差異を生じさせ、がん化に関係しているのではないかと推察しているが、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、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も分かっていない。もし、影響がある場合には、それを制がん剤として使用する際には、SNP を考慮して投薬量や薬剤選択を検討する必要がでてくる。こうしたことから、SNP による活性の差異や 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、制がん剤として使用する上で重要である。

そこで私はまず、SNP による GLO I の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* 及び *in silico* 解析において、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明らかにした。さらに、従来の glutathione 誘導體型 GLO I 阻

害剤と、当研究室で見出した新規 GLO I 阻害剤 TLSC702 を用いて、両 GLO I タンパク質の GLO I 阻害剤に対する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明らかにした。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いる。また、TLSC702 は GSH 誘導体型 GLO I 阻害剤よりも効果的に両 GLO I を阻害した。したがって、両 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。

## 2. GLO I 阻害による代謝シフトを引き起こす「スイッチングキーファクター」の探索

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。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。事実、siRNA により GLO I 発現抑制実験を行った結果、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、これまでの解糖系優位なエネルギー代謝から TCA サイクル依存的となる代謝シフトを起こすことが判明した。つまり、この回避機構によって、がん細胞は、GLO I が阻害されると亢進している解糖系を抑制し、MG の産生を抑制してアポトーシス誘発を免れて生き延びてしまうと考えられる。よって、この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。

そこで私は、GLO I 発現抑制時の培養がん細胞株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、GLO I 発現抑制時の NCI-H522 細胞株 (ヒト非小細胞肺癌細胞株、GLO I 高発現) において、pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 (PDP1) の遺伝子発現量が上昇していたことを見出した。さらに、RT-PCR 法及びウェスタンブロット法によっても、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を確認した。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。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。以上のことから、GLO I 発現抑制時には、PDP1が PDHを活性化させることによって、TCA サイクル依存的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。

### 3. 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

上述の 2.の結果は、GLO I 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)依存的になるような「代謝シフト」を起こして MG の蓄積を回避し、生き延びてしまう可能性を示唆している。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、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される。つまり、がん細胞は、この「代謝シフト」によって、TCA サイクル依存性にシフトしていると考えられるので、GLO I 阻害剤との併用化学療法の確立を目指して、この代謝シフトを抑制することが予想される、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 pyruvate kinase M2 (PKM2) と TCA サイクルの補充反応である glutaminolysis の律速酵素 glutaminase 1 (GLS1)に着目し、それらの阻害剤と TLSC702 との併用による制がん効果を評価した。

NCI-H522 細胞に対し、GLO I, PKM2, GLS1 の各阻害剤との三剤併用処理を行い、コロニー形成法、トリパンブルー色素排除法、ウェスタンブロット法により制がん効果を解析した。その結果、単剤、あるいは二剤併用処理と比較して強い細胞増殖抑制効果及び細胞死(アポトーシス)誘導効果をもつことが明らかとなった。また、ヒト白血病細胞株 HL-60 細胞に対し、GLO I, PKM2, GLS1 の各阻害剤との三剤併用処理を行い、HPLC により HL-60 細胞の培養液中の MG を測定したところ、単剤、あるいは二剤併用処理と比較して三剤併用処理において、より MG が蓄積されることが判明した。以上のことから、この効果的な制がん効果は、PKM2と GLS1の二重阻害により TCA サイクルの利用が抑止され、解糖系への依存度を高めたままにしたところへ、GLO I 阻害剤を併用作用させ

ることで、MG の蓄積が促進されたためにアポトーシスが誘発されたと考えられる。

以上より、総括する。今回、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、GLO I Ala111Glu 多型は GLO I 比活性に影響を与えないこと、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 阻害剤であることが判明した。さらに、培養がん細胞株において、GLO I 発現を抑制すると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) 依存性になるような「代謝シフト」が起きること、そのスイッチングキーファクターとして PDP1 を同定し、GLO I 阻害剤と代謝シフトを抑制する薬剤 (PKM2, GLS1 阻害剤) とを併用することで制がん効果を増強することができることを初めて示した。

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を示唆した。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化学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。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、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 効果に着目し、多くのがん細胞で高発現している glyoxalase I (GLO I) の阻害剤等を用いた新たな制がん戦略に関する研究について論じているものである。

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的リン酸化によりエネルギー (ATP) を主に産生している。しかし、多

くのがん細胞は、グルコースを活発に取り込み、酸素存在下でも TCA サイクルよりも解糖系に依存して ATP を産生するように「代謝リプログラミング」を起こしている。この現象は、Warburg 効果として広く知られている。この様ながん細胞では、解糖系代謝副産物である毒性の強い methylglyoxal (MG) を解毒する glyoxalase system が亢進している。興味深いことに、この反応の律速酵素である GLO I が種々のがん細胞で高発現しており、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。これらのことから、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。

申請者は、第一に”新規 GLO I 阻害剤の探索、及び GLO I の SNP (Single nucleotide polymorphism) による酵素活性、阻害剤に対する感受性の解析”、第二に、”GLO I 阻害による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”、第三に、”Warburg 効果/グルタミンオリシスを標的とした新規がん併用化学療法の開発”の検討を行うことで、がん細胞特異的なエネルギー代謝、Warburg 効果を標的として、GLO I 阻害剤を中心とした新しい制がん戦略の構築を目指した。

第 1 章では、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ている。

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 pyruvate dehydrogenase phosphatase 1 (PDP1) を同定した。

第 4 章では、前章の結果から、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を予測し、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参与する二つのがん細胞特異的な標的分子である pyruvate kinase M2 (PKM2)と glutaminase 1 (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。

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と期待されるものであり、本論文が博士（薬科学）の学位論文として十分に価値あるものと認められる。