



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## Warburg効果とTRAIL誘導がん細胞死

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2017-08-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 熊崎, 実南 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/56206">http://hdl.handle.net/20.500.12099/56206</a>

氏名（本籍）	熊崎 実南（岐阜県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位授与番号	甲第 36 号
学位授与日付	平成 29 年 3 月 25 日
専攻	創薬科学専攻
学位論文題目	Warburg 効果と TRAIL 誘導がん細胞死 (Perturbation of the Warburg effect increases the sensitivity of cancer cells to TRAIL-induced cell death)
学位論文審査委員	(主査) 教授 宇野 文二 (副査) 教授 上田 浩 (副査) 教授 田中 香お里 (副査) 教授 赤尾 幸博

#### 論文内容の要旨

Tumor necrosis-factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)は、1995年にWileyらの研究グループによって単離されたTNF(腫瘍壊死因子)ファミリーに属すサイトカインである。活性化T細胞のほか、様々な組織でその発現が認められている。TRAILは、Death receptor (DR)4/5に結合しがん細胞に対して選択的に細胞死を誘導することからがんの治療、予防において極めて重要な役割を担うことが期待されている。1999年には、ヒト組み換え型TRAILを用いた前臨床試験が行われ強力な腫瘍退縮効果を示したことから、TRAIL経路を介する細胞死に注目が高まった。しかしながら、がん細胞はTRAIL耐性を獲得し、細胞死を回避することが分かった。現在、TRAIL受容体を活性化する完全ヒト型モノクローナル抗体が開発され、様々ながんに対して臨床試験が行われたが耐性の出現が大きな障壁となっている。

本研究では、TRAIL耐性を克服する有効な標的分子を探索するため、がん細胞特異的なエネルギー代謝制御機構(Warburg効果)に着目した。Warburg効果とは、がん細胞が酸素の有無に関わらず解糖系に依存したエネルギー代謝を行う現象である。そのキー分子がPTBP1(Polypyrimidine tract-binding protein 1)であり、解糖系の律速酵素であるPKM(Pyruvate kinase muscle) 1/2遺伝子のスプライサーとして機能し、選択的スプライシングによりがん細胞においてはPKM2の発現を優位にさせることで、好氣的条件下においても嫌氣的解糖を積極的に使用している。

これまでに我々は、TRAIL感受性大腸がん細胞株DLD-1に対するTRAIL耐性株(DLD-1/TRAIL)を作製し、TRAIL耐性機構の解明を行ってきた。その結果、TRAIL受容体であるDR5の発現低下と細胞表面上へのリクルートメントの不良がTRAIL耐性機構の要因であることを明らかにした(*Oncotarget* 2015, Kumazaki *et al.*)。

ウェスタンブロット法により定常状態におけるWarburg効果関連遺伝子の発現を検証すると、TRAIL耐性株においてPTBP1の発現亢進が認められた。siRNAを用いてPTBP1の発現をノックダウンするとTRAIL耐性株においてDR5の発現増加、リクルートメントが誘導されTRAIL誘導細胞死が増強されることが明らかとなった。その他のTRAIL耐性株においても、同様にPTBP1の発現をノックダウンすることにより

TRAIL 誘導細胞死が増強されることが分かった。さらに細胞内のエネルギー代謝への影響を検証すると PTBP1 の発現をノックダウンした細胞において、PKM2 から PKM1 へのスイッチングが誘導された。この結果から、がん細胞のエネルギー代謝が一部解糖系から酸化的リン酸化にシフトし、細胞内の活性酸素 (ROS) レベルが上昇する可能性が予測された。細胞内での ROS の発生が TRAIL 耐性解除機構に関与しているのかを抗酸化剤 (NAC) を用いて検証を行った。NAC を処理した細胞において PTBP1 のノックダウンによる DR5 の発現増加が一部キャンセルされることが明らかとなり、Warburg 効果の破綻 (PKM2 から PKM1 へのスイッチング) によるエネルギー代謝の脱制御を介した細胞内 ROS レベルの上昇が DR5 の発現亢進に深く関与している可能性が示唆された。

本研究で得られた知見から、Warburg 効果の成立に必須な遺伝子である PTBP1 が TRAIL 耐性解除に有効な標的分子となる可能性が示唆された。今後、PTBP1 を制御する化合物や siRNA ががんのエネルギー代謝の破綻のみならず TRAIL 誘導細胞死を利用したがんの医薬シーズとして期待される。

#### 論文審査結果の要旨

本論文は、TRAIL 耐性を克服する有効な標的分子としてがん細胞特異的なエネルギー代謝制御機構 (Warburg 効果) を制御する PTBP1 を同定した。Warburg 効果を維持するためのキー分子が PTBP1 (Polypyrimidine tract-binding protein 1) であり、解糖系の律速酵素である PKM (Pyruvate kinase muscle) 1/2 遺伝子のスプライサーとして機能し、PKM2 の発現を優位にすることで、解糖系を積極的に使用させている。TRAIL 感受性大腸がん細胞株 DLD-1 に対する TRAIL 耐性株 (DLD-1/TRAIL) を作製し、TRAIL 耐性機構の解明を行った結果、TRAIL 受容体である DR5 の発現低下と細胞表面上へのリクルートメントの不良が TRAIL 耐性機構の要因であることを明らかにした (*Oncotarget* 2015, Kumazaki *et al.*)。興味あることに TRAIL 耐性株において PTBP1 の発現亢進が認められた。siRNA を用いて PTBP1 をノックダウンすると TRAIL 耐性株において DR5 の発現増加、リクルートメントが誘導され TRAIL 耐性が解除された。さらに PKM2 から PKM1 へのスイッチングが誘導され、一部解糖系から酸化的リン酸化にシフトし、細胞内活性酸素 (ROS) レベルの上昇が示された。以上、がん特異的なエネルギー代謝を制御する PTBP1 と TRAIL 誘導による細胞死が深く関連していること、さらにその機構が明らかになった。今後、TRAIL 誘導細胞死を利用した新規な創薬に繋がるものと考えられることから、博士論文として価値あるものと判定した。

#### 最終試験結果の要旨

熊崎実南さんの学位論文は、これまで行ってきたがん細胞特異的な TRAIL 誘導細胞死に関する一連の研究内容をまとめ、審査付き論文として公表済みの論文に基づいていることから、本論文が学位論文として完成された内容であることを確認した。

また、公聴会において、学位論文の内容に関する事項、すなわち、TRAIL 誘導細胞死の機構、その耐性メカニズム、耐性の解除と Warburg 効果との関連、そのメカニズムなど関して諮問を行った。申請者からは十分な内容の回答が得られたので、博士 (薬科学) の学位に適するものと判断し、最終試験に合格したと判定した。

論文リスト

1. Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Kohei Taniguchi, Tomoaki Takai, Yuki Kuranaga, Nobuhiko Sugito, Yukihiro Akao, “Perturbation of the Warburg effect increases the sensitivity of cancer cells to TRAIL-induced cell death,” *Exp Cell Res*, **347** (1), 133–142 (2016). **【Impact Factor: 3.378】**
2. Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Kohei Taniguchi, Hiroshi Ueda, Mayuko Nishi, Akihide Ryo, Yukihiro Akao, “Understanding of tolerance in TRAIL-induced apoptosis and cancelation of its machinery by  $\alpha$ -mangostin, a xanthone derivative,” *Oncotarget*, **6** (28), 25828–25842 (2015). **【Impact Factor: 5.008】**