

126. マイトファジーによるがん代謝リプログラミングの制御

青木 重樹

千葉大学 大学院薬学研究院 分子薬物治療学講座 生物薬剤学研究室

Key words : ミトコンドリア, 解糖系, 代謝リプログラミング, マイトファジー, PINK1

緒 言

がん細胞は一般に解糖系に強く依存して生存しているが、解糖系の抑制時にも生存可能であり、細胞内代謝システムをリプログラミングしていることが推察される [1]。本研究では、主として膵がん細胞を用いて、糖代謝のリプログラミング機構を評価するため、ATP 産生オルガネラであるミトコンドリアに着目した検討を行った。その結果、解糖系を抑制することでミトコンドリアに強く依存して生存できるように細胞内代謝がリプログラミングされることが認められた。また、ミトコンドリア特異的オートファジー機構であるマイトファジーについても評価を行ったところ、解糖系の抑制時にマイトファジーが亢進することが示され、それがミトコンドリアの機能維持に働いている可能性が想定された。がん治療の成功確率を向上させるためには、解糖系の抑制に伴うマイトファジーも関連したミトコンドリア機能の賦活化を効率的に抑制することが求められると考えている。

方 法

1. 解糖系抑制時のミトコンドリア機能評価

ヒト膵がん細胞株として PANC-1 細胞を用い、培養液である RPMI1640 中の糖源を通常の 2 g/L のグルコース (Glc) から 2 g/L のガラクトース (Gala) や 0.2 g/L の低濃度グルコース (Low-glc) に置換することで解糖系の抑制を図った。また、解糖系抑制時のミトコンドリア機能を、ミトコンドリア染色試薬である JC-1 を用いて評価した。ミトコンドリアの膜電位が上昇すると、ミトコンドリア内に取り込まれた JC-1 はモノマーからポリマーとなり、励起波長および蛍光波長の組み合わせが 490 および 530 nm から 525 および 590 nm へと変化する。データは共焦点顕微鏡 LSM700 を用いて取得した。さらに、解糖系の抑制に伴うミトコンドリア呼吸の亢進を、PreSens Sensor Dish Reader を用いて培地中の酸素濃度の減少を指標に測定した。加えて、解糖系抑制時の PANC-1 細胞のミトコンドリア代謝への依存度を、ミトコンドリア ATP 合成酵素 (ミトコンドリア複合体 V) の阻害薬である Oligomycin (20 ng/mL) の曝露後に CellTiter-Glo を用いて細胞内 ATP 量を測定することで評価した。

2. 解糖系抑制時の細胞内代謝変動の評価

解糖系の抑制に伴う PANC-1 細胞内代謝環境の変化をキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析装置 CE-TOFMS (Agilent Technologies) を用いたメタボローム解析によって評価した。具体的には、PANC-1 細胞を 5% マンニトール溶液で洗浄し、メタノールにて溶解した後に水/クロロホルム溶液を加えて除タンパクを行い、水相に含まれる中心炭素代謝を中心とした 110 の代謝物の濃度を CE-TOFMS を用いて検量した。

3. オートファジーとマイトファジーの評価

解糖系抑制時のオートファジー活性については、オートファゴソームマーカー LC3 のフラックスアッセイによって評価した。具体的には、それぞれの糖源を含む培地中で培養した PANC-1 細胞を 10 μ M の Chloroquine 存在下で 48 時間さらに培養し、その後に細胞を固定して細胞内に蓄積した LC-3 を免疫染色によって確認した。

解糖系抑制時のマイトファジー活性については、ミトコンドリアへのターゲティング配列を付加した Keima-Red (mtKeima) ベクターを細胞に導入し、励起波長の変化を共焦点顕微鏡 LSM700 で捉えることによって評価した。

マイトファジーが亢進した場合には、ミトコンドリアが酸性環境下に置かれるため、ミトコンドリアに局在した mtKeima の励起波長が中性環境下の 440 nm から 586 nm へと変化する（実際には 488 および 555 nm の励起光を当てた）。

4. PTEN-induced kinase 1 (PINK1) 依存的なミトコンドリア機能の評価

PINK1 はセリン/スレオニンキナーゼであり、正常細胞ではマイトファジーによるミトコンドリアの新陳代謝を促進させる働きを有する [2]。解糖系抑制時の PINK1 の mRNA 発現量を定量的リアルタイム PCR 法によって定量した。また、siRNA を用いて PINK1 の発現をノックダウンした際のミトコンドリア膜電位の低下を、JC-1 による染色像の共焦点顕微鏡 LSM700 を用いた観察から確認した。

結 果

1. 解糖系抑制に伴うミトコンドリアの賦活化

本研究では、モデルとなるがん細胞として PANC-1 細胞を用いた。その培養液中の糖源を Glc から Gala や Low-glc に置換することで、培養液中への乳酸の放出量が顕著に減少したことから、解糖系の抑制が示唆された。解糖系の抑制によって細胞増殖速度の低下も観察されたが、細胞の生存率はほぼ変化しなかったため、解糖系の抑制時に PANC-1 細胞は細胞内代謝システム・ATP 獲得経路をリプログラミングすることで生存を維持していることが示唆された。そこで、解糖系抑制時のミトコンドリア活性を評価したところ、JC-1 ポリマーの蓄積量の増加が認められ（図 1a）、ミトコンドリア膜電位の上昇が観察された。また、解糖系の抑制時に培地中の酸素消費速度が増加したことから（図 1b）、解糖系の抑制によってミトコンドリア呼吸が亢進し、ミトコンドリアの賦活化が起きていたと考えられる。そこで、解糖系を抑制した PANC-1 細胞がミトコンドリアの酸化的リン酸化による ATP 供給に依存して生存しているのか検討したところ、Oligomycin に対する感受性の顕著な増大が認められ（図 1c）、ミトコンドリアへの強い依存が示唆された。

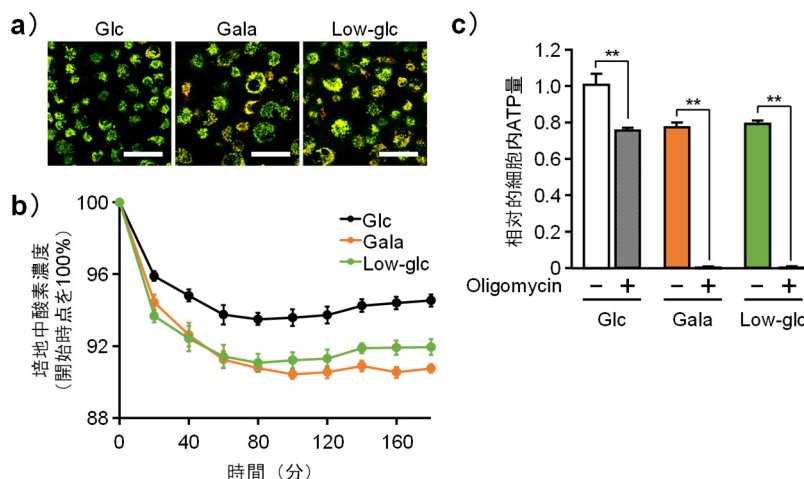


図 1. PANC-1 細胞における解糖系抑制時のミトコンドリア活性の上昇

- それぞれの糖源で培養した PANC-1 細胞を JC-1 で染色し、488 nm または 555 nm で励起した際の JC-1 の蛍光強度を観察した。（スケールバー：50 μ m）。
- それぞれの糖源で培養した PANC-1 細胞の培地中酸素濃度を測定した。（N=3、平均値 $\pm$ SD）
- それぞれの糖源で培養した PANC-1 細胞の Oligomycin に対する感受性を評価した。ANOVA の後に Bonferroni 解析を行った。（N=3、平均値 $\pm$ SD、** P<0.01）

2. 解糖系抑制に伴う細胞内代謝のダイナミックな変動

解糖系を抑制された PANC-1 細胞は、ミトコンドリアが賦活化されてその機能が亢進しており、特に酸化的リン酸化を介した ATP 供給に強く依存して生存していることが示唆された。よって、解糖系やミトコンドリアにおける TCA 回路など、細胞内代謝環境も大きく変化していることが想定された。そこで、CE-TOFMS を用いたメタボローム解析によって、中心炭素代謝に関係する解糖系や TCA 回路、アミノ酸などの 110 の代謝物量を測定したところ、確かに Gala や Low-glc といった解糖系の抑制環境下において、TCA 回路の中間産物の減少や多くのアミノ酸の増加が観察された (図 2)。また、Gala や Low-glc の条件で認められた代謝物量の変化は、Oligomycin (0.8 ng/mL) の処理によって抑制されることも明らかとなった (図 2)。これらの結果から、解糖系の抑制に伴う糖代謝を中心とした細胞内代謝のリプログラミングは、ミトコンドリア機能依存的であることが示唆された。

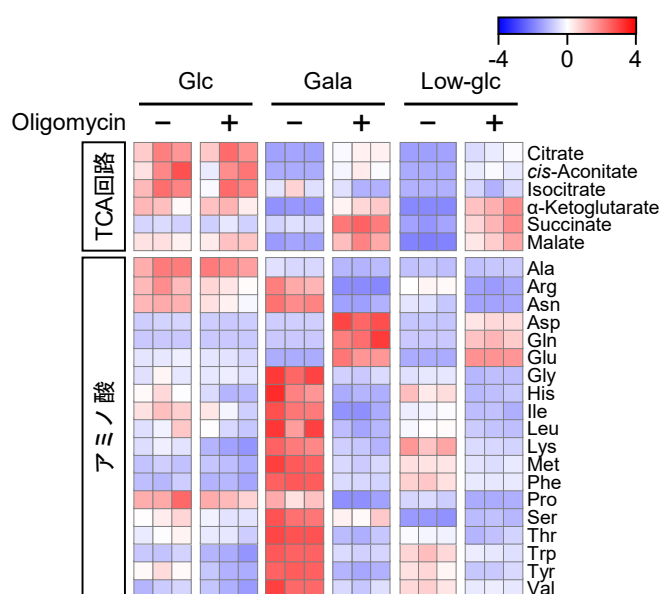


図 2. PANC-1 細胞における解糖系抑制に伴う細胞内代謝物の変動

Oligomycin 存在下 (+) または非存在下 (-) において、それぞれの糖源で培養した PANC-1 細胞より代謝物を抽出し、CE-TOFMS を用いてその量を測定した。細胞内タンパク質量で補正後、Z スコアによるヒートマップとして表した (青から赤になるにつれて量的に多いことを示している) (N=2)。

3. 解糖系抑制に伴うオートファジー・マイトファジーの亢進

CE-TOFMS を用いたメタボローム解析の結果から、解糖系の抑制された PANC-1 細胞では、大半のアミノ酸量が顕著に増加していることが明らかとなった。細胞内のアミノ酸の代表的な供給経路の一つとして、タンパク質分解系であるオートファジーが挙げられる。そこで、解糖系の抑制された PANC-1 細胞ではオートファジーが亢進しているのか、その活性をフラックスアッセイによって評価した。その結果、確かにフラックスを止める Chloroquine の存在下でオートファゴソームマーカー LC3 の顕著な蓄積が認められ (図 3a)、オートファジーの亢進が示唆された。

また、これまでの検討から、解糖系の抑制された PANC-1 細胞ではミトコンドリア機能が亢進していることが見出されている。よって、ミトコンドリア選択的オートファジーであるマイトファジーが亢進することでミトコンドリアの機能維持が行われている可能性を想定した。そこで、解糖系の抑制時のマイトファジーについて評価したところ、ミトコンドリアに局在する mtKeima が酸性環境下に置かれやすいことが分かり (図 3b)、ミトコンドリアとリソソームとが融合して起こるマイトファジーが亢進していることが示唆された。ゆえに、解糖系の抑制時の代謝リプログラミングにオートファジーやマイトファジーが関与する可能性が考えられた。

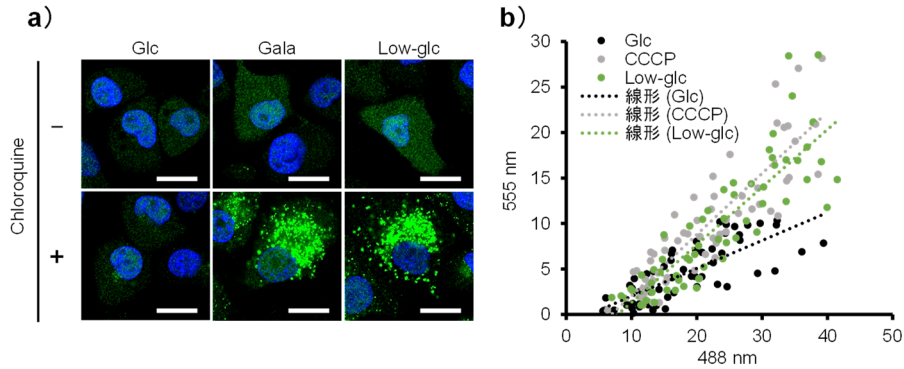


図 3. 解糖系が抑制された PANC-1 細胞のオートファジー・ミトファジーの上昇

- a) それぞれの糖源で培養した PANC-1 細胞を Chloroquine の存在下・非存在下でさらに培養し、細胞の固定後、内因性の LC3 を染色した。ドット状の LC3 がオートファゴソームの形成を表している。(スケールバー：20 μ m、緑：LC3、青：核)
- b) それぞれの糖源で培養した PANC-1 細胞中のミトファジー活性を、導入した mtKeima の励起波長の変化から評価した。それぞれの波長で励起した際の蛍光強度を示しており、励起波長 555 nm における蛍光強度が強いほど、ミトファジーが亢進していることを表している。CCCP (ミトコンドリアの脱共役剤) は陽性対照である。

4. 解糖系抑制時の PINK1 依存的なミトコンドリア機能の調節

正常細胞におけるミトファジーは PINK1 によって制御されることがよく知られている [2]。そこで、解糖系抑制時のがん細胞においても同様に PINK1 による制御がある可能性を考え、PANC-1 細胞における PINK1 発現を確認したところ、その mRNA の有意な上昇が認められた (図 4a)。また、PINK1 の発現を、siRNA を用いて抑制したところ、解糖系の抑制に伴う JC-1 ポリマーの蓄積が抑制された (図 4b)。ゆえに、PINK1 依存的ミトファジーが解糖系抑制時の PANC-1 細胞におけるミトコンドリア機能調節や代謝リプログラミングに関与していることが示唆された。

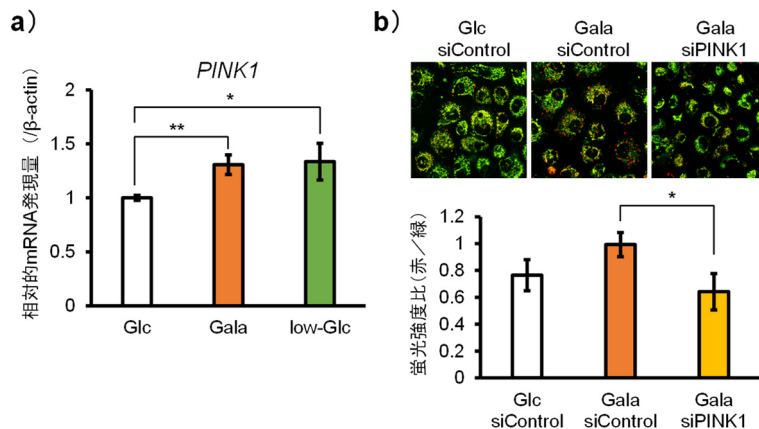


図 4. PANC-1 細胞における PINK1 依存的なミトコンドリア膜電位の上昇

- a) それぞれの糖源で培養した PANC-1 細胞における PINK1 の mRNA 発現を定量した。 β -actin の mRNA 発現量で補正を行った。ANOVA の後に Bonferroni 解析を行った。(N=3、平均値 $\pm$ SD、* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$)
- b) Glc または Gala で培養した PANC-1 細胞を JC-1 で染色し、488 nm または 555 nm で励起した際の JC-1 の蛍光強度を観察した。グラフは 5 視野の平均値を示している。ANOVA の後に Bonferroni 解析を行った (N=3、平均値 $\pm$ SD、* $P < 0.05$)。

考 察

がん細胞は主として解糖系から生存するためのエネルギーATP を獲得するが、解糖系の抑制時には酸化的リン酸化を中心としたミトコンドリア代謝系へとリプログラミングするポテンシャルを有しており、特にそのミトコンドリア機能の維持にマイトファジーが重要であることが示唆された。ここでは膵がん細胞株 PANC-1 細胞を用いた結果について述べたが、肺がん細胞株 A549 や子宮頸がん細胞株 HeLa でも同様に、解糖系の抑制時にミトコンドリア代謝系へとリプログラミングすることが明らかとなっている。よって、糖代謝をミトコンドリア系へシフトすることができるがん細胞においては、マイトファジーによるミトコンドリアの賦活化によって効率的に代償的 ATP を獲得できるようになっていると考えられる。マイトファジーを抑制することによってミトコンドリアの賦活化の抑制も可能であることから、マイトファジーの制御による代謝リプログラミングの阻害効果が期待される。

ここで、がん細胞における解糖系抑制時のマイトファジーの亢進に PINK1 が関与している可能性が見出された。がん細胞におけるマイトファジーの制御機構については未だ不明な点が多く、がん細胞内のミトコンドリア機能がどのように制御されているのかは明らかとなっていない。正常細胞では一般に、PINK1 は E3 ユビキチンリガーゼである Parkin と共役してマイトファジーを誘導している [2]。しかし、がん細胞においては一般に Parkin の発現は低く、PINK1 がどのような機序でマイトファジーを誘導しているのかは謎に包まれている。今後、他の E3 ユビキチンリガーゼなども含めて PINK1 がどのようにがん細胞のマイトファジーを制御しているのか解明される必要がある。

メタボローム解析から、大半のアミノ酸量は解糖系の抑制によって増加することが示されたが、グルタミン酸やグルタミン、アスパラギン酸といった特定のアミノ酸は逆の挙動を取ることが明らかとなった。また、解糖系抑制時に Oligomycin を曝露することでこれら 3 つのアミノ酸量が増加したことから、糖代謝のリプログラミングにこれらのアミノ酸が使われていることが想定される。特に、これらはすべて TCA 回路の中間体に変換されるアミノ酸であるため、ATP を産生するための原料として利用されている可能性が高い。マイトファジーによるミトコンドリア機能の調節と併せて、これらのアミノ酸の挙動についても詳細な検討が望まれる。

主として膵がん細胞を用いた検討から、がん細胞における糖代謝のリプログラミングにマイトファジーが関与し、特にミトコンドリアの賦活化を正に制御していることが明らかとなった。また、がん細胞におけるマイトファジーを PINK1 が制御していることが新たに見出され、その抑制によって解糖系抑制時のミトコンドリアの賦活化の抑制が可能となることが示唆された。今後、がん細胞特異的なマイトファジー制御機構について詳細に検討することで、代謝リプログラミングを標的としたがん治療が画期的に進展すると確信している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、千葉大学大学院薬学研究院生物薬剤学研究室の伊藤晃成教授である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深謝いたします。

文 献

- 1) Kawaguchi M, Aoki S, Hirao T, Morita M, Ito K. Autophagy is an important metabolic pathway to determine leukemia cell survival following suppression of the glycolytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 May 20;474(1):188-192. Epub 2016 Apr 20. PMID: 27107693 DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.04.098
- 2) Narendra DP, Youle RJ. Targeting mitochondrial dysfunction: role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control. *Antioxid Redox Signal*. 2011 May 15;14(10):1929-38. Epub 2011 Mar 3. PMID: 21194381 DOI: 10.1089/ars.2010.3799