

## チロシンリン酸化による乳がんのクレアチン代謝制御

一杉 太郎

## 1. はじめに

がん細胞が増殖の過程でその代謝機能を変化させることは広く知られている。がんを含む増殖能の高い細胞にみられる代謝現象に、好氣的解糖（Warburg効果）があげられる。Warburg効果は今から100年以上前にドイツ生理学者Otto Warburgが発見した代謝現象で、がん細胞が有酸素下にもかかわらずグルコースを乳酸へと代謝する現象である（図1<sup>1)</sup>。一方、正常な細胞は有酸素下においてグルコースをミトコンドリアの酸化的リン酸化を使って二酸化炭素へと分解する。なぜがん細胞がミトコンドリアに頼らずにWarburg効果を好むのかについては諸説あるが、現在のところ最も有力な説は、がん細胞がグルコースを分解する過程で発生する代謝物質を核酸やアミノ酸の原料として活用し、細胞増殖を促進しているという説である<sup>2)</sup>。近年、解糖系に関わる酵素のほとんどはがん遺伝子によりその発現を制御されており、しかもその活性はがん遺伝子により引き起こされるリン酸化やアセチル化等の翻訳後修飾によって亢進されることがわかってきた<sup>3)</sup>。しかしながら、細胞増殖および生存に必要なエネルギー（ATP）産生という観点からすると、Warburg効果はミトコンドリアにおける酸化的リン酸化に比べ圧倒的に不利である（グルコース1分子につきWarburg効果は2ATP分子を産生するのに対し、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化は36ATP分子を産生できる；図1<sup>4)</sup>。なぜがん細胞がこのエネルギー産生効率の悪いWarburg効果を使いながら、高いエネルギーを保ち生存していられるのかという点について、これまでに合理的な説明はなかった。最近我々は乳がん細胞内のミトコンドリアにおいて、クレアチン代謝経路が乳がん遺伝子HER2/ABLシグナルにより活性化され、ミトコンドリア

で産生したエネルギーが効率的に細胞質へと運ばれていることを見いだした<sup>5)</sup>。本稿ではまずクレアチン代謝経路が乳がん細胞内でどのようにして活性化されているのかを紹介し、次にそのクレアチン代謝経路が乳がん細胞内でのエネルギー活用にいかに関わっているのかを考察し、最後にクレアチン代謝経路の阻害剤であるシクロクレアチンの抗がん作用と臨床治験への展望を議論したい。

## 2. 基礎研究と臨床研究の両方の観点からの目的設定

前述のように生化学的にエネルギー産生という点からがん細胞の代謝を考えた場合、細胞質内で起こるWarburg効果はあまりに非効率的である。正常細胞ではATPは主にミトコンドリアで産生されていることから、我々はがん遺伝子が何らかの形でミトコンドリアでのATP産生メカニズムを増強しているのではないかと仮説を立てた（図1）。この仮説を検証するためにがん遺伝子HER2（ErBB2）を発現した乳がんを対象を絞って研究を行うことにした。HER2は上皮成長因子受容体（EGFR）ファミリーの一つで、チロシンキナーゼである。HER2はその他のEGFRファミリーと違いリガンドを必要とせず、過剰発現した場合自己リン酸化によって活性化し、下流の基質タンパク質のチロシン残基をリン酸化する<sup>6)</sup>。このHER2シグナルによって引き起こされるエネルギー代謝変化およびHER2シグナルの基質代謝酵素を研究することで、Warburg効果とミトコンドリアのがん遺伝子依存的な関係性を明らかにすることを基礎研究の観点からの研究目的とした。

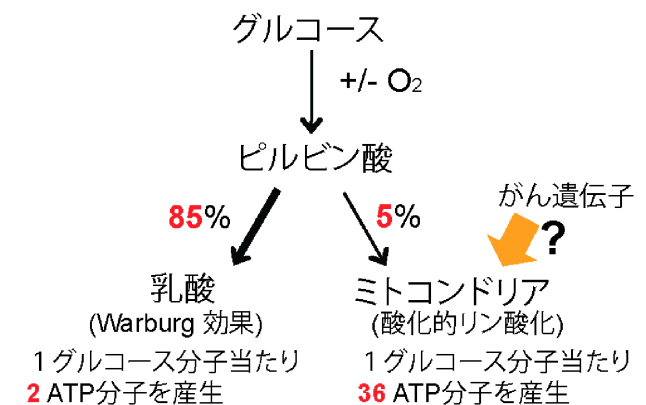


図1 Warburg効果と酸化的リン酸化の模式図

メイヨークリニック腫瘍研究部門（200 First St SW, Rochester, MN55905, USA）

**Tyrosine phosphorylation regulates the creatine shuttle in breast cancer**

Taro Hitosugi (Mayo Clinic, Division of Oncology Research, 200 First St SW, Rochester, MN55905, USA)

本論文の図版はモノクロ（冊子版）およびカラー（電子版）で掲載。

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2019.910236

© 2019 公益社団法人日本生化学会

一方臨床的には、全乳がん患者のうち約25%でHER2の過剰発現が認められており、HER2陽性の患者にはHER2に対するモノクローナル抗体トラスツズマブ (trastuzumab) が有効である。しかしながら、全HER2陽性乳がんのうち20%ほどはトラスツズマブに対して耐性を持っている。さらにトラスツズマブが奏効したがん患者についても約半分は耐性を持つようになるが、現在のところトラスツズマブ耐性を持ったがんに対して有効な治療法は確立されていない<sup>7)</sup>。そこで我々は、HER2そのものを標的にするのではなくHER2シグナルにおいて引き起こされる代謝変化を標的にすることで、トラスツズマブ耐性を持ったがんに対する治療法を確立できるのではないかと考えた。これが臨床研究の観点からの本研究の目的である。

### 3. HER2シグナルによるミトコンドリアクレアチンキナーゼ (MtCK1) のリン酸化

HER2シグナルに依存的なエネルギー代謝変化を検出するため、HER2を過剰発現しているBT474乳がん細胞をHPLCおよびLC-MSによってメタボロミクス解析した。具体的には、HER2阻害剤であるラパチニブ (lapatinib) でBT474細胞を処理した前後において代謝物質を抽出し、どの代謝物質のレベルが上下するのかを調べた。この際、エネルギー代謝に関わる高エネルギーリン酸化合物 (ATP, ADP, GMPなどのリン酸基を有する化合物) を重点的に調べた。またこのメタボロミクス解析と平行して、BT474細胞からミトコンドリア画分を分離し、ミトコンドリア内でのタンパク質がリン酸化されているのかミトコンドリアーリン酸化プロテオミクス解析を行った。その結果、メタボロミクス解析よりラパチニブ処理によってATPとリン酸化クレアチンのレベルが有意に低下することを見だし、また平行して行ったミトコンドリアーリン酸化プロテオミクス解析から、ミトコンドリアクレアチンキナーゼ1 (MtCK1) の153番目のチロシン残基がリン酸化されていることを見いだした。MtCK1は細胞内のエネルギー代謝にとって重要な役割を担っており、図2に示したようにMtCK1はミトコンドリア内でATP合成酵素により産生されたATPとクレアチンを基質とし、ADPとリン酸化クレアチンを産生する。リン酸化クレアチンはATPと比べ、分子量が小さく細胞内で拡散しやすい。そのため、MtCK1により産生されたリン酸化クレアチンはミトコンドリアから細胞質へと効率よく移動する。細胞質へ運ばれたリン酸化クレアチンは細胞質内に存在するクレアチンキナーゼ (CK) によりクレアチンへと変換されると同時に、細胞質内においてATPが再び作られる (図2)。つまりATPの高エネルギーリン酸基を、MtCK1とCKによってミトコンドリアから細胞質まで移動させているのである。

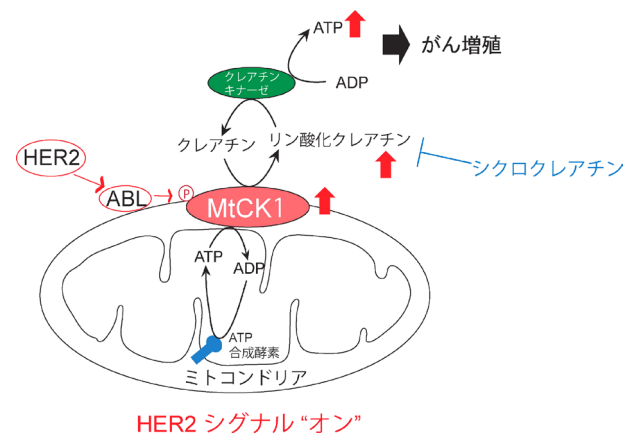


図2 HER2シグナルによるMtCK1活性化を介した効率的な細胞質へのATP移行のメカニズム

このエネルギー移動メカニズムはクレアチンシャトルと呼ばれている<sup>7)</sup>。そこでリン酸化プロテオミクスとメタボロミクス解析の結果から、HER2シグナルがMtCK1を何らかの分子機構により活性化した結果、リン酸化クレアチンの細胞内濃度が上昇し、エネルギー代謝がクレアチンシャトルにより増強され、乳がん細胞がより増殖しているのではないかと仮説を立てた。

この仮説が成り立つのかどうかを調べるため、さまざまな生化学的な実験を行った。その結果、MtCK1の153番目のチロシン残基のリン酸化がMtCK1のタンパク質安定化を促しており、このリン酸化がないとMtCK1はTRAP1というシャペロンタンパク質と結合し、プロテアソームを介して分解されることが明らかになった。また、HER2が活性化した後、別のチロシンキナーゼであるABLが活性化され、ABLがミトコンドリアの外膜においてMtCK1と結合し、MtCK1の153番目のチロシン残基を直接リン酸化することがわかった<sup>5)</sup>。次に、MtCK1の153番目のチロシン残基のリン酸化ががん細胞のエネルギー代謝および細胞増殖にいかにか寄与しているのか、遺伝子工学的手法を用いて調べた。具体的には内在性のMtCK1をshRNAによりノックダウンし、MtCK1の野生型、または153番目のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したMtCK1の変異型を恒常的に発現させたBT474細胞株を樹立した。変異型細胞株は、野生型細胞株に比べ細胞内のリン酸化クレアチンおよびATPの濃度が低く、細胞増殖も遅いことがわかった<sup>5)</sup>。さらに、我々はMtCK1の153番目のチロシン残基のリン酸化を特異的に認識するpY153-MtCK1抗体を作製し、この抗体を使って乳がんのPDX (patient-derived xenograft) のサンプルと正常なヒト乳腺上皮細胞を解析した。PDXはヒト患者由来のがん組織片を免疫不全マウスに移植して樹立した<sup>8)</sup>。この解析より、いくつかの興味深い結果が得られた。まず、正常な乳腺上皮細胞内にはMtCK1が発

現していないことがわかった。次に、いくつかのトリプルネガティブのPDXサンプルにおいてMtCK1の発現が認められたが、153番目のチロシンリン酸化は検出されなかった。しかしながら、HER2陽性のPDXからはすべてのサンプルからMtCK1が検出され、しかもトラスツズマブに耐性を持ったPDXからはより強いMtCK1の153番目のチロシンリン酸化が検出された<sup>5)</sup>。HER2陽性乳がん培養細胞をトラスツズマブとともに長期培養すると、HER2の活性およびMtCK1の153番目のチロシンリン酸化が増強することから<sup>5)</sup>、MtCK1の153番目のチロシンリン酸化の亢進はHER2陽性乳がん細胞がトラスツズマブに耐性となる分子機構に関連していると考えられる。以上のことから上記に示したMtCK1の活性化のメカニズムはHER2陽性の乳がん特異的に起きていることがわかった。

#### 4. MtCK1を標的とすることでHER2陽性の乳がんを狙いうちにできるのか

MtCK1がHER2シグナル特異的にリン酸化されることで活性化され、しかもその活性化が乳がん細胞の増殖に重要な役割を果たすことがわかった。これらの知見を臨床研究の観点から見れば、MtCK1を阻害することでHER2陽性の乳がんの増殖を抑えられるのではないかと仮説が立てられる。この仮説が成り立つのかどうか調べるため、内在性MtCK1をshRNAによりノックダウンしたトラスツズマブに耐性を持つPDX細胞を、免疫不全マウスに移植してがんの成長速度を調べた。その結果、MtCK1をノックダウンしたPDXはほとんど腫瘍として成長しないことがわかった<sup>5)</sup>。正常な乳腺上皮細胞にはMtCK1が元々発現しておらず、過去の研究からMtCK1をマウスの全身でノックアウトしても、特に目立った表現型が確認されない<sup>9)</sup>。さらに、MtCK1を発現しているトリプルネガティブ乳がんPDX（前述のようにこのトリプルネガティブPDXではMtCK1の153番目のチロシンはリン酸化されていない）において、MtCK1をノックダウンしても細胞増殖に

変化は認められなかったことから<sup>5)</sup>、MtCK1はHER2陽性乳がんにとくに効く薬の標的として適切であるといえる。MtCK1が担うクレアチンシャトルを阻害する薬剤として、クレアチンの類似体であるシクロクレアチンが知られている。実はこのシクロクレアチンは、ボディビルダーの人が飲む栄養ドリンクの中によく含まれている物質であり、臨床治験は行われていないものの毒性は低い薬剤であると考えられている。MtCK1はシクロクレアチンを偽基質として認識し、ATPのリン酸基をシクロクレアチンへと付加し、リン酸化シクロクレアチンを産生する（図3）。このリン酸化シクロクレアチンはリン酸化クレアチンに比べ、細胞質内に存在するCKによって脱リン酸化されにくい（つまりリン酸化シクロクレアチンからシクロクレアチンに戻りにくい）ため、結果としてミトコンドリアで産生されたATPの高エネルギーリン酸基がリン酸化シクロクレアチンとして蓄積し、細胞内のエネルギーが欠乏する（図3）<sup>10)</sup>。このシクロクレアチンが抗がん作用を発揮するかどうかを検討するため、さまざまなHER2陽性の乳がん培養細胞およびPDX細胞、さらに正常な乳腺上皮細胞の細胞増殖能がシクロクレアチンにより阻害されるかを調べた。その結果、正常な乳腺上皮細胞の場合は6 mMまでシクロクレアチンを加えても細胞増殖に変化がみられないのに対し、HER2陽性のトラスツズマブに耐性を持つ乳がん培養細胞およびPDX細胞は1~2 mMのシクロクレアチンにより死滅することがわかった。さらに、シクロクレアチンで処理した乳がん培養細胞を、MtCK1の産生物質であるリン酸化クレアチンでさらに処理すると、シクロクレアチンで抑えられていた細胞増殖能が復活することも見いだした。これは、シクロクレアチンが狙いどおり細胞内のクレアチンシャトルをオンターゲットで阻害し、その結果細胞増殖能が低下しているということを示唆している。次にトラスツズマブに耐性を持つPDXを免疫不全マウスに移植した後、マウスの飲み水にシクロクレアチンを0.3%の濃度で溶解して与えたグループと、通常の飲み水を与えたグループとを比較した結果、シクロクレアチンを与えたグ

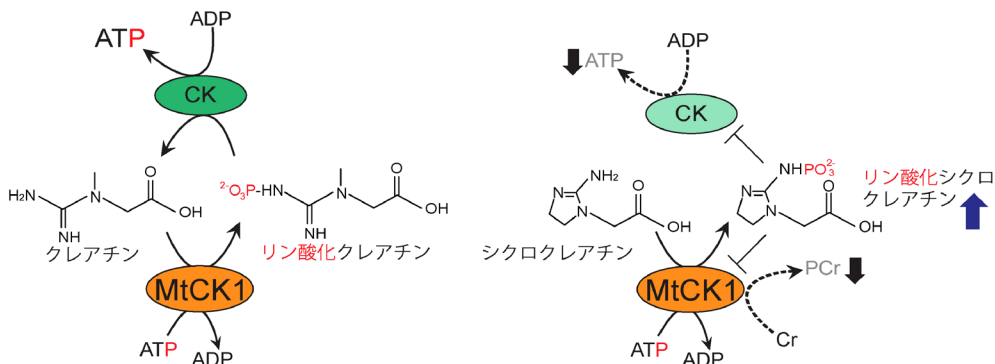


図3 シクロクレアチンによるMtCK1およびクレアチンシャトルの阻害

ループにおいて有意にPDXのがん成長が抑えられた。また既存のHER2に対する分子標的薬であるラパチニブをシクロクレアチンと同時にマウスに投与すると、さらに著しくPDXのがん成長を抑えられた<sup>5)</sup>。そしてシクロクレアチンによるマウスに対する目立った毒性（造血系細胞の変化等）は確認されなかった。以上のことから、シクロクレアチンはトラスツズマブに耐性を持つ乳がんに対して有効な抗がん作用を有するということが示唆された。

## 5. まとめと今後の展開

基礎研究の観点から本研究をまとめると、ミトコンドリアでできたATPがMtCK1によって効率よく細胞質へと運搬されることが、Warburg効果によって起きる非効率なエネルギー産生を助けていると考えられる。MtCK1を阻害する（shRNAによるノックダウンまたはシクロクレアチン処理する）と乳がんの成長が抑えられることから、がん細胞内のミトコンドリアでエネルギーを産生することだけでなく、産生したエネルギーを細胞質まで運搬することもがん細胞増殖にとって重要であると考えられる。また本研究の結果からMtCK1を阻害するとミトコンドリアの呼吸およびほぼすべてのTCA回路の代謝物質レベルが著しく低下することがわかった<sup>5)</sup>。ミトコンドリアの呼吸鎖に直接関わっていないMtCK1が、どのようにTCA回路全体を制御しているのかはいまだに解明されていない。

臨床研究の観点からすると、栄養ドリンクに含まれているダイエットサプリメントの一つであるシクロクレアチンがトラスツズマブに耐性を持つ乳がんに対して有効であることが示唆された。現在、私の研究室ではシクロクレアチンとその他のサプリメントを組み合わせることでシクロクレアチンの有効性を増強できるか検討中である。また、シクロクレアチンの有効性を増強する新規薬剤の開発も検討している。

シクロクレアチンを使ったがんに対する臨床試験は今まで行われてこなかった。なぜなら臨床試験の主なスポンサーである製薬会社は、新規薬剤に対してのみ試験を進めており、特許権の発生しないシクロクレアチンのような既存のサプリメントにはあまり興味がないからである。しかしながら、患者の立場を考えればがんが治るのであればサプリメントであろうが、新しい分子標的薬であろうが違いはないはずである。むしろサプリメントを使った治療の方がいわゆる化学療法に使われる抗がん剤に比べ圧倒的に毒性が少なく、値段も安いので、患者にとっては重要な選択肢の一つになる可能性が高い。私の所属するMayo Clinicでは患者に必要なことを第一に考える“The needs of

patients come first”を組織のモットーとしており、寄付を募り、こうした製薬会社が興味を持たない臨床試験を進める努力をしている。我々の場合、幸運なことにサプリメントに興味を持つ寄付者からの支援によりシクロクレアチンを使った臨床試験が行えることとなった。現在、試験を行うための種々の手続きを進めている段階である。

## 謝辞

本研究で使用した乳がんのPDXはMayo Clinicの乳がん臨床研究チームによって樹立されたものであり、シクロクレアチンの臨床試験もこのチームからの助けなしでは成り立たないものである。ここに心より御礼申し上げたい。また本研究は、私の研究室の初めての大学院生のKiran Kurmi君の博士論文研究として行われたものであり、ここに彼に感謝の意を表したい。

## 文 献

- 1) Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cells. *Science*, **123**, 309-314.
- 2) Deberardinis, R.J., Sayed, N., Ditsworth, D., & Thompson, C.B. (2008) Brick by brick: metabolism and tumor cell growth. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **18**, 54-61.
- 3) Hitosugi, T. & Chen, J. (2014) Post-translational modifications and the Warburg effect. *Oncogene*, **33**, 4279-4285.
- 4) Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., & Thompson, C.B. (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*, **24**, 1029-1033.
- 5) Kurmi, K., Hitosugi, S., Yu, J., Boakye-Agyeman, F., Wiese, E.K., Larson, T.R., Dai, Q., Machida, Y.J., Lou, Z., Wang, L., et al. (2018) Tyrosine Phosphorylation of Mitochondrial Creatine Kinase 1 Enhances a Druggable Tumor Energy Shuttle Pathway. *Cell Metab.*, **28**, 833-847.
- 6) Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*, **244**, 707-712.
- 7) Wilken, J.A. & Maihle, N.J. (2010) Primary trastuzumab resistance: new tricks for an old drug. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1210**, 53-65.
- 8) Yu, J., Qin, B., Moyer, A.M., Sinnwell, J.P., Thompson, K.J., Copland, J.A. 3rd, Marlow, L.A., Miller, J.L., Yin, P., Gao, B., et al. (2017) Establishing and characterizing patient-derived xenografts using pre-chemotherapy percutaneous biopsy and post-chemotherapy surgical samples from a prospective neoadjuvant breast cancer study. *Breast Cancer Res.*, **19**, 130.
- 9) Steeghs, K., Oerlemans, F., & Wieringa, B. (1995) Mice deficient in ubiquitous mitochondrial creatine kinase are viable and fertile. *Biochim. Biophys. Acta*, **1230**, 130-138.
- 10) Boehm, E.A., Radda, G.K., Tomlin, H., & Clark, J.F. (1996) The utilisation of creatine and its analogues by cytosolic and mitochondrial creatine kinase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1274**, 119-128.

## 著者寸描

## ●一杉 太郎 (ひとすぎ たろう)



Mayo Clinic, Division of Oncology Research, Assistant Professor. 博士 (理学).

■略歴 2007年東京大学大学院理学系研究科化学専攻にて学位 (博士) 取得. 07~13年までエモリー大学医学部ウィンシップ癌研究所博士研究員. 13年より Mayo Clinic, Division of Oncology Research, Assistant Professor.

■研究テーマと抱負 代謝物質も化学物質であるという観点から, 代謝研究に取り組んでいる. 化学の知識を生かして癌の代謝機構を明かし, 新しい抗癌治療の開発に役立てたいと思っている.