

## クレアチンシャトルの大腸癌における役割

奈良県立医科大学分子病理学講座

谷 里 奈, 喜 多 真 由, 國 安 弘 基

### Roles of the creatine shuttle in colorectal cancer

RINA FUJIWARA-TANI, MAYU KITA and HIROKI KUNIYASU

*Department of Molecular Pathology, Nara Medical University*

Received December 6, 2023

#### *Abstract*

The creatine shuttle is a system that transfers energy generated by oxidative phosphorylation to the cytoplasm by phosphorylating creatine with mitochondrial creatine kinase (MTCK) and dephosphorylating phosphocreatine with creatine kinase B (CKB) in the cytoplasm. The relevance of this system to cancer has not been clear. The creatine shuttle not only transports ATP generated in the mitochondria to the cytoplasm as phosphocreatine, but also provides ATP that causes phosphorylation in multiple phosphorylation signal systems. By inhibiting these two functions of the creatine shuttle, it is possible to suppress the progression of cancer and the development of cancer stem cells.

**Key words** : creatine kinase B, mitochondrial creatine kinase, phosphorylation signal, phosphocreatine, energy metabolism

大腸癌においては、前癌病変である腺腫の段階からミトコンドリアに形態的・機能的障害が発生し、酸化リン酸化から解糖系へのエネルギー代謝プログラミングが起きる<sup>1)</sup>。これに対して、がん幹細胞においては、酸化的リン酸化によりエネルギー代謝がもたらされていることも明らかになっている<sup>2,3)</sup>。クレアチンシャトルは、酸化的リン酸化、解糖系に次ぐ第3のエネルギー供給システムとされる。正常組織においては、①速やかに利用可能な時間的エネルギーバッファー、②ATP産生部位（解糖およびミトコンドリア酸化的リン酸化）と細胞内のATP利用部位（ATPase）をつなぐ空間的エネルギーバッファー、③細胞内エネルギー輸送システム、そして、代謝調節

因子としての機能を有することが明らかになってきた<sup>4)</sup>。これに対して、癌においてもクレアチンシャトルは、旺盛な増殖を示す癌のエネルギー供給源として重視され、クレアチン・キナーゼ（CK）レベルの異常が様々な癌や分裂制御と関連していること知られている<sup>5)</sup>。乳癌においては、HER2によるミトコンドリア・クレアチン・キナーゼ-1（MtCK）の安定化がエネルギー供給を増加し細胞増殖を促進する<sup>6)</sup>。これに対して、肉腫ではクレアチンシャトルは正常筋組織に比較し低下している<sup>7)</sup>。

大腸癌においても、クレアチンシャトルが癌の進展に重要な役割を果たしていることが知られ、肝転移とクレアチン・キナーゼB（CKB）発現増加に相関が

見られる<sup>8)</sup>。しかし、一方で大腸癌ではCKの各アイソザイムの発現が低下しており<sup>9)</sup>、発現低下が上皮間葉移行と関連するとの報告も見られる<sup>10)</sup>。このように、癌におけるクレアチンシャトルの役割はいまだ確定的ではないが、エネルギー伝達系のリプログラミングとする解釈も見られる<sup>11)</sup>。エネルギー代謝を新たながん治療の標的とする試みに近年研究者の興味が集まっているが<sup>12)</sup>、その実現のためにはクレアチンシャトルのより詳細な解明が必要である。

われわれは、大腸癌(CRC)におけるCKBとMTCKの発現と機能を解析し、クレアチンシャトルのCRCにおける役割を検討した。184例のCRCにおいてCKBとMTCKは正常粘膜よりも過剰発現しており、発現は組織分化度の低下、癌浸潤、遠隔転移と相関していた。CKの阻害剤であるジニトロフルオロベンゼン(DNFB)でCRC細胞株のHT29とCT26を処理すると、増殖抑制と幹細胞性の低下が見られた。この時、ミトコンドリア量と膜電位は低下し、酸化ストレス(ROS)産生は亢進し、ミトコンドリア呼吸は抑制された。CT26細胞と同系のBALB/cマウスを用いた腹膜播種モデルではDNFB処理により、播種は抑制された。このとき、EGFR、AKT、ERK1/2のいずれのリン酸化も抑制されていた。HT29細胞では、DNFB処理、CKBまたはMTCKのノックダウン、クレアチンの不活性体であるシクロクレアチン処理のいずれにおいてもEGFRのリン酸化は抑制され、高濃度のATPによりレスキューされた。CKBとEGFRは結合していないがEGF刺激により近接した。これらの結果から、クレアチンシャトルの抑制は、酸化的リン酸化を抑制しエネルギー供給を低下させると共に、リン酸化シグナルへのATP供給を抑制しシグナル伝達を阻害すると考えられた。

このように、CKBとMTCKの活性を阻害することにより、癌の増殖、幹細胞性、転移を抑制することが明らかになった。その原因として、ミトコンドリアエネルギー代謝の障害とともにリン酸化シグナル系への抑制性の作用が関与することが示唆された。

われわれの検討では、CKBとMTCKを介するクレアチンシャトルがリン酸化シグナルにATPを供給している可能性が示唆される<sup>13)</sup>。リン酸化シグナルは細胞の活動において不可欠であるが、リン酸化プロセスへのATPの供給源は特異的ではなく、細胞質内

ATPの受動的拡散によると考えられてきた<sup>14)</sup>。その細胞内の不均衡により、分子やオルガネラの分布にもクラスター化が生じると考えられてきた<sup>15)</sup>。しかし、NLRP3インフラマソームにホスホクレアチンを介してミトコンドリアで産生されたATPが供給されることが示され<sup>16)</sup>、能動的なATP供給が示唆された。われわれのデータでは、NLRP3インフラマソームと同様に、ミトコンドリアの酸化的リン酸化により生成されたATPがクレアチンシャトルにより細胞質に移行し、CKBにより取り出されたATPがEGFRリン酸化に用いられることが示された。これは、クレアチンシャトルがATPの拡散限界を克服するシステムであることを示している<sup>4)</sup>。

われわれは、ATPドナーであるCKBとレシピエントであるEGFRの空間的な配置の制御は明らかに出来なかった<sup>13)</sup>。両タンパクの直接結合の報告はなく、われわれも確認できなかった。しかし、リガンド刺激により両タンパクが近接するようになることがわかった。なんらかのシャペロンや細胞骨格の関与が考えられるが<sup>17)</sup>、今後の検討が必要である。

CK活性の阻害により、ミトコンドリア呼吸が抑制され、ミトコンドリア膜電位の低下とミトコンドリアROSの亢進が認められる<sup>13)</sup>。この所見は、クレアチンシャトルがミトコンドリアで産生されたエネルギーを搬出するだけの経路ではないことを示している。クレアチンシャトルのもう一つの意義は、エネルギーの搬出に際してミトコンドリア内のADPを減じないことである。ミトコンドリア内には厳密なADP勾配が存在し、ATP産生に必要な条件となっている<sup>18)</sup>。ミトコンドリアで産生されたエネルギーの搬出のもう一つの経路は、adenine nucleotide translocator (ANT)によるATPの汲み出しである。この場合、ミトコンドリア内のATPとADPの減少が生じ、ATP産生を低下させるリスクがある。これに対し、クレアチンシャトルはATP分子はMTCKによるホスホクレアチン生成の際にADPとなりミトコンドリアに保持され、ATP産生に利用される。このため、CK活性阻害によるクレアチンシャトルの抑制は、ADPの枯渇によりミトコンドリア呼吸の低下をもたらすことが示唆される。クレアチンシャトルの不安定化とミトコンドリアDNA障害がリンクするとの報告もあり、クレアチンシャトルはミトコンドリア安定化に関与する可能性

も示唆される<sup>19)</sup>.

クレアチンシャトル阻害によるミトコンドリア呼吸の低下は、癌細胞においては Warburg 効果として知られる解糖系と乳酸発酵により代償可能である。しかし、クレアチンシャトル阻害による解糖系の亢進は認められてはいない<sup>13)</sup>。シクロクレアチン処理した場合でも細胞内 ATP は保てないことが報告されている<sup>20)</sup>。また、解糖系、酸化的リン酸化とクレアチンシャトルにおける ATP ターンオーバーは 3 者がパラレルな動態を示す可能性が示唆されており<sup>21)</sup>、どれかいずれかのエネルギー代謝の障害は、他の系で代替されない可能性がある。

さらに重要な点として、クレアチンシャトルががん幹細胞性と密接に相関する点である。これまで、クレアチンシャトルはエネルギー代謝における重要性に注目されてきたが、幹細胞性との関連は明らかではなかった。最近、幹細胞が酸化的リン酸化によりエネルギー産生を行うことが示され、幹細胞性と酸化的リン酸化の関連性が明らかとなった<sup>2)</sup>。また、iPS 細胞の幹細胞維持に、低レベルの ROS が必要であることも示されている<sup>22)</sup>。これに対し、クレアチンシャトルの阻害は、酸化的リン酸化を阻害するとともに、ミトコンドリアの ROS 産生を亢進させており、ミトコンドリアの持つ幹細胞維持機能を障害している。

クレアチンシャトルを治療標的とするうえで、DNFB は候補と考えられる。しかし、CK 阻害作用を有する DNFB はアミノ基と速やかに反応し、2,4-ジニトロフェニルアミンを生成するため、血漿中のアルブミンおよび  $\alpha$  1-酸性糖タンパク質に結合しフェニル化をもたらす、標的組織にデリバリーされない<sup>23)</sup>。このため、DNFB は生体への適応が困難である。シクロクレアチンは CK によりリン酸化されるもののリン酸供与体として作用しない。クレアチンとの競争阻害によりホスホクレアチン生成を阻害するが、その作用は DNFB に比較し緩やかである。このため、インビトロではシクロクレアチンによっては強い増殖抑制は示さない<sup>24)</sup>。ミトコンドリアエネルギー産生の抑制と ATP 供給阻害による複数のリン酸化シグナルの阻害が CK 活性阻害による抗腫瘍効果をもたらすと考えられる<sup>13)</sup>。この両効果を vivo においてもたすには、新たな CK 阻害剤の開発が必要と考えられる。

## 利益相反

論文内容に関連し、開示すべき COI 関係にある企業などはない。

## 文 献

- 1) Satoh, K., Yachida, S., Sugimoto, M., Oshima, M., Nakagawa, T., Akamoto, S., Tabata, S., Saitoh, K., Kato, K., Sato, S., Igarashi, K., Aizawa, Y., Kajino-Sakamoto, R., Kojima, Y., Fujishita, T., Enomoto, A., Hirayama, A., Ishikawa, T., Taketo, M. M., Kushida, Y., Haba, R., Okano, K., Tomita, M., Suzuki, Y., Fukuda, S., Aoki, M. and Soga, T.: Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: E7697-e7706, 2017.
- 2) Sancho, P., Burgos-Ramos, E., Tavera, A., Bou Kheir, T., Jagust, P., Schoenhals, M., Barneda, D., Sellers, K., Campos-Olivas, R., Graña, O., Viera, C. R., Yuneva, M., Sainz, B., Jr. and Heeschen, C.: MYC/PGC-1  $\alpha$  Balance Determines the Metabolic Phenotype and Plasticity of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cell Metab* 22: 590-605, 2015.
- 3) Sancho, P., Barneda, D. and Heeschen, C.: Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br J Cancer* 114: 1305-1312, 2016.
- 4) Wallimann, T., Tokarska-Schlattner, M. and Schlattner, U.: The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. *Amino Acids* 40: 1271-1296, 2011.
- 5) Yan, Y. B.: Creatine kinase in cell cycle regulation and cancer. *Amino Acids* 48: 1775-1784, 2016.
- 6) Kurmi, K., Hitosugi, S., Yu, J., Boakye-Agyeman, F., Wiese, E. K., Larson, T. R., Dai, Q., Machida, Y. J., Lou, Z., Wang, L., Boughey, J. C., Kaufmann, S. H., Goetz, M. P., Karnitz, L. M. and Hitosugi, T.: Tyrosine Phosphorylation of Mitochondrial Creatine Kinase 1 Enhances a Druggable Tumor Energy Shuttle Pathway. *Cell Metab* 28: 833-847. e838, 2018.
- 7) Patra, S., Ghosh, A., Roy, S. S., Bera, S., Das,

- M., Talukdar, D., Ray, S., Wallimann, T. and Ray, M.: A short review on creatine-creatine kinase system in relation to cancer and some experimental results on creatine as adjuvant in cancer therapy. *Amino Acids* **42**: 2319-2330, 2012.
- 8) Loo, J. M., Scherl, A., Nguyen, A., Man, F. Y., Weinberg, E., Zeng, Z., Saltz, L., Paty, P. B. and Tavazoie, S. F.: Extracellular metabolic energetics can promote cancer progression. *Cell* **160**: 393-406, 2015.
  - 9) Joseph, J., Cardesa, A. and Carreras, J.: Creatine kinase activity and isoenzymes in lung, colon and liver carcinomas. *Br J Cancer* **76**: 600-605, 1997.
  - 10) Mooney, S. M., Rajagopalan, K., Williams, B. H., Zeng, Y., Christudass, C. S., Li, Y., Yin, B., Kulkarni, P. and Getzenberg, R. H.: Creatine kinase brain overexpression protects colorectal cells from various metabolic and non-metabolic stresses. *J Cell Biochem* **112**: 1066-1075, 2011.
  - 11) Reinsalu, L., Puurand, M., Chekulayev, V., Miller, S., Shevchuk, I., Tepp, K., Rebane-Klemm, E., Timohhina, N., Terasmaa, A. and Kaambre, T.: Energy Metabolic Plasticity of Colorectal Cancer Cells as a Determinant of Tumor Growth and Metastasis. *Front Oncol* **11**: 698951, 2021.
  - 12) Hon, K. W., Zainal Abidin, S. A., Othman, I. and Naidu, R.: The Crosstalk Between Signaling Pathways and Cancer Metabolism in Colorectal Cancer. *Front Pharmacol* **12**: 768861, 2021.
  - 13) Kita, M., Fujiwara-Tani, R., Kishi, S., Mori, S., Ohmori, H., Nakashima, C., Goto, K., Sasaki, T., Fujii, K., Kawahara, I., Bhawal, U. K., Luo, Y. and Kuniyasu, H.: Role of creatine shuttle in colorectal cancer cells. *Oncotarget* **14**: 485-501, 2023.
  - 14) Jones, D. P.: Intracellular diffusion gradients of O<sub>2</sub> and ATP. *Am J Physiol* **250**: C663-675, 1986.
  - 15) Aw, T. Y.: Intracellular compartmentation of organelles and gradients of low molecular weight species. *Int Rev Cytol* **192**: 223-253, 2000.
  - 16) Billingham, L. K., Stoolman, J. S., Vasan, K., Rodriguez, A. E., Poor, T. A., Szibor, M., Jacobs, H. T., Reczek, C. R., Rashidi, A., Zhang, P., Miska, J. and Chandel, N. S.: Mitochondrial electron transport chain is necessary for NLRP3 inflammasome activation. *Nat Immunol* **23**: 692-704, 2022.
  - 17) Cox, D., Raeburn, C., Sui, X. and Hatters, D. M.: Protein aggregation in cell biology: An aggregomics perspective of health and disease. *Semin Cell Dev Biol* **99**: 40-54, 2020.
  - 18) Joubert, F., Mateo, P., Gillet, B., Beloeil, J. C., Mazet, J. L. and Hoerter, J. A.: CK flux or direct ATP transfer: versatility of energy transfer pathways evidenced by NMR in the perfused heart. *Mol Cell Biochem* **256-257**: 43-58, 2004.
  - 19) Warren, E. B., Aicher, A. E., Fessel, J. P. and Konradi, C.: Mitochondrial DNA depletion by ethidium bromide decreases neuronal mitochondrial creatine kinase: Implications for striatal energy metabolism. *PLoS One* **12**: e0190456, 2017.
  - 20) Ara, G. and Teicher, B.: Relationship of cellular energy parameters to cytotoxicity for AG-17, lonidamine and cyclocreatine in four human tumor cell lines. *Int J Oncol* **8**: 865-873, 1996.
  - 21) Klepinin, A., Miller, S., Reile, I., Puurand, M., Rebane-Klemm, E., Klepinina, L., Vija, H., Zhang, S., Terzic, A., Dzeja, P. and Kaambre, T.: Stable Isotope Tracing Uncovers Reduced  $\gamma / \beta$ -ATP Turnover and Metabolic Flux Through Mitochondrial-Linked Phosphotransfer Circuits in Aggressive Breast Cancer Cells. *Front Oncol* **12**: 892195, 2022.
  - 22) Crespo, F. L., Sobrado, V. R., Gomez, L., Cervera, A. M. and McCreath, K. J.: Mitochondrial reactive oxygen species mediate cardiomyocyte formation from embryonic stem cells in high glucose. *Stem Cells* **28**: 1132-1142, 2010.
  - 23) Kitteringham, N. R., Kenna, J. G., McLean, C., Clarke, J. B. and Park, B. K.: Conjugation of dinitrofluorobenzene to plasma proteins in vivo in the rat. *Drug Metab Dispos* **20**: 625-631, 1992.
  - 24) Teicher, B. A., Menon, K., Northey, D., Liu, J., Kufe, D. W. and Kaddurah-Daouk, R.: Cyclocreatine in cancer chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* **35**: 411-416, 1995.