

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15522

研究課題名(和文)がん細胞はなぜ糖を過剰に必要とするのか?の根本疑問にグリオーマ幹細胞研究から挑む

研究課題名(英文)An attempt to answer the cardinal question --- why do cancer cells have such a sweet tooth? --- through glioma stem cell research

研究代表者

北中 千史(KITANAKA, Chifumi)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70260320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の特徴である糖代謝亢進ががん細胞にとってどのような意義があるかについてはいまだ不明な点が多い。我々はこれまでの科研費研究の成果に基づき糖代謝が活性酸素種(ROS)レベルの調節を通じてグリオーマ幹細胞のがん幹細胞状態維持に寄与しているという仮説を提唱した。そこで本課題ではこの仮説検証を行うとともに解糖経路阻害により細胞内ROSレベルが上昇する機序について検討を試みた。その結果、細胞内ROS上昇により幹細胞性喪失がおきることは確認されたが、GLUT1阻害による糖取り込みの抑制が細胞内ROS上昇を引き起こす機序についてはこれまでのところ仮説実証に至っておらず、さらなる検討が必要と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Glucose metabolism is often increased in human cancers, the significance of which for cancer cells remains mostly unclear. In this project, we conducted experiments to test the working hypothesis that glucose metabolism contributes to the maintenance of glioma stem cells through the modulation of intracellular ROS levels as well as to investigate the mechanism underlying the increase in intracellular ROS levels caused by impaired glucose metabolism via GLUT1 inhibition. While the results of this study supported the idea that increase in intracellular ROS levels leads to loss of stem cell properties, the molecular mechanism of ROS increase following GLUT1 inhibition remains to be shown.

研究分野：脳神経外科学、脳腫瘍学

キーワード：glioma-initiating cell

1. 研究開始当初の背景

「糖の過剰取り込み (increased glucose uptake)」は広くがん細胞に認められ、FDG-PETによる腫瘍描出の理論的根拠ともなるなど、がん細胞の基本特性(hallmarks of cancer)の一つと考えられるようになってきた (*Cell* 144:460, 2011; *Cancer Res* 71:6921, 2011)。しかしながらその一方でこのように普遍的に見られる特徴的变化ががん細胞の生物学においてどのような意義をもっているかという点については、「活発に分裂増殖する細胞に必要とされる高分子の生合成を行う際の炭素源供給のため」という説明が広く受け入れられてはいるものの、いまだ謎は多い(*Cell* 144:460, 2011)。

一方、近年、がんの重要な治療標的としてがん幹細胞が注目を集めている。がん幹細胞は腫瘍細胞のごく一部に相当する小集団でありながら治療抵抗性と腫瘍形成能を併せ持っているため治療後再発の要因として注目されており、従ってがん幹細胞維持に関わるメカニズムの解明はがん幹細胞標的治療の開発を通じたがんの長期予後改善のためにも極めて重要な課題である。これに対して我々はこれまでにグリオーマ幹細胞を主なモデルとして用いることで、糖尿病治療薬であるメトホルミンがグリオーマ幹細胞標的治療薬として有用であることを世界に先駆けて示してきた。さらに我々はごく最近その延長線上で、グルコーストランスポーターである GLUT1 に依存した糖の取り込みがグリオーマ幹細胞を含むがん幹細胞の幹細胞性維持に必要とされることを見出した(尚、GLUT1 は古い文献ではグリオーマにおける発現はないとの報告もあるが、近年になってグリオーマ幹細胞での発現が確認されている [*Cancer Cell* 15:501, 2009; *Nat Neurosci* 16:1373, 2013])。また、これとは別個に行った研究から我々はグリオーマ幹細胞では非幹細胞と比較して抗酸化メカニズムが活性化しており、細胞内 ROS レベルを低く保つことで幹細胞としての性質を維持していることをやはり世界に先駆けて示した。

ところで我々が見出したこれら2つの事象、すなわちがん幹細胞維持における「糖取り込みの亢進」および「細胞内 ROS レベル制御」の重要性は一見すると別個の事象のようにも見えるが、これまでの検討結果から、がん幹細胞による糖の取り込みを抑制すると細胞内 ROS レベルが上昇するとともに、細胞の生存や増殖能そのものは影響を受けないものの、幹細胞としての性質が選択的に失われる可能性が示唆されつつある。これらの所見は「がん細胞で亢進した

糖の取り込みは、がん幹細胞においては抗酸化メカニズムの活性化を通じて幹細胞性の維持に関わっており、腫瘍性増殖を担保している」という新たな仮説を生み出すものである。そこで本挑戦的萌芽研究ではこういった仮説の検証を通じて、神経腫瘍学のみならずがん細胞生物学の根幹にも関わりうる、新たなコンセプトの形成に挑む。

2. 研究の目的

本研究課題では、上述のごとく、「がん細胞に特徴的な過剰な糖の取り込みは細胞内 ROS レベルの抑制を通じてがん幹細胞の幹細胞性(stemness)維持に重要な役割を果たしている」との仮説の実証を一つの目的とする。と同時に糖代謝による細胞内 ROS の抑制機序についても検討を行う。

3. 研究の方法

がん幹細胞維持における糖代謝の役割について検討を行うため、グルコーストランスポーターの一つである GLUT1 に対する阻害薬や siRNA を用いることで糖代謝を抑制した。糖代謝抑制(細胞内 ATP の減少、ADP/AMP の増加)の程度はリン酸化 AMPK の発現を検討することにより行った。幹細胞マーカーや分化マーカー等の発現については、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリー等の方法により調べた。自己複製能を評価するためスフィア形成アッセイを行った。細胞内 ROS レベルは細胞を dichlorofluorescein acetate (DCFDA) で染色後フローサイトメトリーにより測定した。

4. 研究成果

上述のごとく我々はこれまでの検討から解糖経路障害により細胞内 ROS レベルの上昇が誘導され、これが原因となって幹細胞性が抑制されている可能性を示唆する結果が得られている。そこで本課題では、解糖経路障害による幹細胞性抑制における細胞内 ROS の役割を確認する実験を行うとともに、解糖経路障害により細胞内 ROS レベルが上昇する機序について新規検討を行ったところ、まず細胞内 ROS 上昇により幹細胞性喪失がおきることが確認された。さらに ROS 上昇による幹細胞性喪失の機序としてグルタチオンを介した制御の可能性が示唆されたためグルタチオン代謝に深く関わるグルタミン代謝の関与を含めて検討を行った。その結果、種々実験条件の検討を行いつつ実験を実施したものの、当初予想に反して、グルタミン枯渇やグルタミン代謝障害による細胞内 ROS の上昇はこれまでのところ再現性をもって確認するまでに至っていない。このような結果は実験手法改善の必要性を示唆する一方、仮説再構築の必要性についても考慮が必要で

あることを示唆している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 10 件)

- 1) Kuramoto K, Suzuki S, Sakaki H, Takeda H, Sanomachi T, Seino S, Narita Y, Kayama T, Kitanaka C, Okada M: Liccochalcone A specifically induces cell death in glioma stem cells via mitochondrial dysfunction. FEBS Open Bio. 印刷中.
(査読有)
- 2) Takeda H, Okada M, Suzuki S, Kuramoto K, Sakaki H, Watarai H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C: Rho-Associated Protein Kinase (ROCK) Inhibitors Inhibit Survivin Expression and Sensitize Pancreatic Cancer Stem Cells to Gemcitabine. Anticancer Res. 2016;36:6311-6318. (査読有)
- 3) Watarai H, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Suzuki S, Seino S, Oizumi H, Sadahiro M, Kitanaka C: Impact of H3K27 Demethylase Inhibitor GSKJ4 on NSCLC Cells Alone and in Combination with Metformin. Anticancer Res. 2016;36:6083-6092.
(査読有)
- 4) Suzuki S, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Watarai H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C: Aripiprazole, an Antipsychotic and Partial Dopamine Agonist, Inhibits Cancer Stem Cells and Reverses Chemoresistance. Anticancer Res. 2016;36:5153-5161. (査読有)
- 5) Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Sakaki H, Seino S, Seino M, Suzuki S, Kitanaka C: The novel JNK inhibitor AS602801 inhibits cancer stem cells in vitro and in vivo. Oncotarget in press, 2016
doi:10.18632/oncotarget.8395. (査読有)
- 6) Seino M, Okada M, Sakaki H, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Kuramoto K, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C: Time-staggered inhibition of JNK effectively sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel. Oncol Rep 2016;35(1):593-601
doi:10.3892/or.2015.4377. (査読有)
- 7) Sakaki H, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Seino M, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C: GSKJ4, A Selective Jumonji H3K27 Demethylase Inhibitor, Effectively Targets Ovarian Cancer Stem Cells. Anticancer Research 2015;35(12):6607-6614 (査読有)
- 8) Seino M, Okada M, Shibuya K, Seino S, Suzuki S, Takeda H, Ohta T, Kurachi H, Kitanaka C: Differential contribution of ROS to resveratrol-induced cell death and loss of self-renewal capacity of ovarian cancer stem cells. Anticancer Research 2015;35(1):85-96 (査読有)
- 9) Shibuya K, Okada M, Suzuki S, Seino M, Seino S, Takeda H, Kitanaka C: Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells.

Oncotarget 2015;6(2):651-661 (査読有)

- 10) Suzuki S, Okada M, Shibuya K, Seino M, Sato A, Takeda H, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C: JNK suppression of chemotherapeutic agents-induced ROS confers chemoresistance on pancreatic cancer stem cells. Oncotarget 2015;6(1):458-470 (査読有)

[学会発表](計6件)

- 1) 岡田雅司, 北中千史: グルコース代謝の抑制はがん幹細胞の幹細胞性維持および腫瘍創始能を抑制する. 第59回放射線影響学会, 広島(JMS アステールプラザ); 2016年10月27日
- 2) 岡田雅司, 鈴木修平, 清野学, 武田弘幸, 北中千史: 促進性グルコース輸送体 GLUT1 阻害は癌幹細胞の自己複製能と腫瘍形成能を抑制する. 第75回日本癌学会学術総会, 横浜(パシフィコ横浜); 2016年10月6日
- 3) 北中千史: グリオーマ、固形がん幹細胞を標的とする治療法開発を目指したがん幹細胞研究. 第74回日本癌学会学術総会, 名古屋(名古屋国際会議場); 2015年10月8日
- 4) 北中千史: 臨床応用を目指したグリオーマ幹細胞研究. 第5回栃木ニューロオンコロジー研究会 特別講演, 宇都宮(宇都宮グランドホテル); 2015年7月30日
- 5) 北中千史: 臨床応用を目指したがん幹細胞研究. 第1回北里大学悪性脳腫瘍研究会 特別講演, 相模原(北里大学); 2015年5月15日
- 6) 北中千史: 臨床応用を目指したがん幹細胞研究. 第50回大分脳腫瘍研究会 特別講演, 大分(アルメイダ病院研修

会館); 2015年3月14日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北中 千史 (KITANAKA CHIFUMI)
山形大学・医学部・教授
研究者番号: 70260320

(2) 連携研究者

岡田 雅司 (OKADA MASASHI)
山形大学・医学部・講師
研究者番号: 70512614