

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791002

研究課題名(和文) グリオーマ細胞に特徴的なエネルギー代謝に着目した治療耐性克服へのユニークな試み

研究課題名(英文) Overcoming therapy resistance of glioma cells via modulation of mitochondrial energy metabolism

研究代表者

富山 新太 (TOMIYAMA ARATA)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：40385810

#### 研究成果の概要(和文)：

がん細胞は酸素利用可能な状態でもあえてエネルギー効率の悪い嫌氣的代謝を行う不思議な性質(Warburg 効果)をもっており、がん研究の領域で長年の謎とされてきた。これに対して最近我々は細胞自殺制御の基本メカニズムを明らかにし、そこで得られた知見に基づいて「Warburg 効果はがん細胞が好気呼吸による細胞死のリスクを回避しつつ嫌氣的代謝により安全にエネルギーを確保しようとする巧妙なサバイバル戦略である」との仮説を世界に先駆けて提唱するとともに、「ミトコンドリア呼吸の回復によりがん細胞の細胞死(治療)感受性を回復できる」という新たな可能性を示した。本研究課題はこのような仮説の実証を目的とするものであるが、その過程で正常細胞に対する temozolomide の毒性を増強することなくグリオーマ細胞に対する殺細胞効果を増強することのできる薬物を発見した。重要なことにこの薬物は単独でもミトコンドリア呼吸を促進するが、temozolomide との併用時には temozolomide によるミトコンドリア呼吸促進効果を増強する。さらに、ミトコンドリア呼吸を抑制した状態では、この薬物による temozolomide の効果増強作用は失われた。これらの結果はこの薬物がミトコンドリア呼吸の促進を通じて細胞の temozolomide 感受性を高めていることを示唆するものである。次いで *in vivo* においてこの薬物が temozolomide のもつ抗腫瘍効果を増強するかについても検討を行ったが、グリオーマ細胞をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍を形成したのちこの薬物単独、temozolomide 単独、あるいは両者同時に投与を行ったところ、この薬物単独には抗腫瘍効果は認められなかったが、両者併用で temozolomide 単独より顕著な抗腫瘍効果が得られた。これらの結果は上記仮説を支持するものであると同時に、グリオーマの治療抵抗性克服戦略の一つの新たな方向性を与えるものと考えられる。

#### 研究成果の概要(英文)：

Cancer cells are prone to carry out anaerobic glycolysis even in the presence of ample oxygen. This unique property of cancer cells is widely known as “Warburg effect”, but why cancer cells choose to carry out such an energetically-inefficient, anaerobic metabolism in the place of oxidative metabolism, which is far more efficient in terms of ATP production, has remained a big enigma for decades in the field of cancer research. As a possible explanation, we have recently shown that oxidative phosphorylation, but not anaerobic glycolysis, is required for the activation of Bax and Bak, an essential step in the process of mitochondria-mediated apoptosis. Thus, Warburg effect could be a crafty strategy of cancer cells to evade apoptosis at the expense of energy production efficiency. Conversely, our findings also suggested the possibility that reversal of Warburg effect could render cancer cells

susceptible to mitochondria-mediated apoptosis and hence to anti-cancer therapies. In this project, therefore, we searched for natural and chemical compounds that recover/promote oxidative metabolism in glioma cells and thereby render the cells sensitive to temozolomide, the first-choice chemotherapeutic agent in the management of malignant gliomas. Here we report that we have successfully identified a natural compound having such activities.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：グリオーマ、エネルギー代謝

#### 1. 研究開始当初の背景

細胞の自殺すなわちプログラム細胞死はがん化能を獲得した細胞の排除に重要な役割を果たしており、その制御機構の破綻はがんの発生を招く。またプログラム細胞死は放射線や化学療法などの抗腫瘍療法によるがん細胞殺傷のメカニズムとしても機能している。従ってがん細胞におけるプログラム細胞死制御の実体解明はがん発生の仕組みを理解するにとどまらず、有効な放射線・化学療法を行うために欠くことのできない情報をもたらしてくれる。

原発性脳腫瘍の多くを占める悪性神経膠腫（グリオーマ）は極めて予後不良な悪性腫瘍である。悪性グリオーマは診断時すでに正常脳組織へ深く浸潤しており全摘出はしばしば困難であるため、その治療において放射線・化学療法が果たすべき役割は大きい。しかしながら多くの悪性グリオーマは放射線・化学療法に対しても抵抗性であり、難治性の大きな原因となっている。従ってこの治療抵抗性を克服すべく様々なアプローチが試みられてきたが、がん細胞に特徴的なエネルギー代謝に着目したアプローチはこれまでなかった。

一般に正常細胞は酸素利用可能な状況では好氣的代謝により、酸素が利用できない状況では嫌氣的代謝により、エネルギー（ATP）

を産生する。これに対してがん細胞は、嫌氣的代謝によるエネルギー産生効率が好氣的代謝に比して約20分の1と著しく非効率的であるにもかかわらず、酸素利用が可能な状況でも嫌氣的代謝を行う傾向があり、エネルギー代謝上非常にユニークな性質(Warburg効果)をもっていることが知られている。近年このWarburg効果はp53失活の結果生じるミトコンドリアでの酸化的リン酸化の障害が原因となって引き起こされている可能性が示された。しかしながらエネルギー的に明らかに不利なWarburg効果ががん細胞にとって一体どのような意味をもっているのかは、Warburg効果発見以来約80年の長きにわたり未解明であった。

我々はこのような長年の疑問に答えるべく本研究課題において検討を行ってきたが、その結果、Warburg効果ががん細胞のプログラム細胞死を抑制するうえで重要な役割を果たしていることを明らかにした。ミトコンドリアを介するプログラム細胞死にはミトコンドリアタンパク質 Bax, Bak の活性化が必須であるが、我々は好氣的代謝（酸素呼吸）が Bax, Bak の活性化に重要な役割を果たす一方、嫌氣的代謝は細胞死制御に関与していないことを見出した。がん細胞はその発生や増大の過程で積極的に細胞死を回避して生存し続ける必要がある。従って我々の発見により、がん細胞は Warburg 効果を通じて Bax,

Bak の活性化を阻止する一方で効率は悪いながらも必要なエネルギーを嫌氣的代謝によって賄っている、すなわちエネルギー代謝効率を犠牲にしながらか積極的に自殺を回避しているという理解できるようになった。

ところでこういった成果はがん細胞の基本的特性に関する長年の謎に答えを与えるものであると同時に、がん治療学上も重要な示唆を与えるものである。すなわち、放射線や化学療法はしばしばミトコンドリア依存的細胞死プログラムの活性化によりがん細胞を殺傷することから、Warburg 効果のがん細胞に対してこれら治療法に対する抵抗性を賦与している可能性が新たに考えられるようになった。重要なことに、これまでの悪性グリオーマを対象とした代謝研究の結果からそのほとんどが Warburg 効果を示すことが知られている。従って、なんらかの方法により酸素呼吸を回復させ Warburg 効果を抑制することができれば、悪性グリオーマのもつ治療抵抗性の克服が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究ではグリオーマ細胞の酸素呼吸（ミトコンドリア呼吸）を促進する薬物の探索・同定を行うとともに、そのような薬物が実際に悪性神経膠腫の治療抵抗性を解除する効果を有することを明らかにすることで、Warburg 効果の抑制が悪性グリオーマの治療抵抗性克服につながるという上記仮説を実証することを目的とする。

## 3. 研究の方法

薬物によるミトコンドリア呼吸促進効果の有無は、薬物が細胞内 ATP 濃度に与える影響とその呼吸鎖依存性を調べることにより検討した。また、薬物が temozolomide によるミトコンドリア・アポトーシス経路活性化や細胞死誘導に与える影響についても検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 結果

Warburg 効果の本質はミトコンドリアにおける酸素呼吸(酸化リン酸化)の抑制である。そこで我々はこれまでにミトコンドリア呼吸を促進することが報告されている種々の物質や薬剤あるいは既知の分子機序から考えてミトコンドリア呼吸を促進することが期待される薬剤を用いて、それらの物質や薬剤がグリオーマ細胞のミトコンドリア呼吸ならびに抗腫瘍薬による細胞殺傷効果に及ぼす影響につきスクリーニングを行った。抗腫瘍薬としては近年悪性グリオーマ治療における第一選択薬剤となりつつある

temozolomide を用いて検討を行った。まず最初にグリオーマ細胞株を用いてスクリーニングを行ったところ、植物由来の天然物質の中に temozolomide の殺細胞効果を増強するものが見出された。この物質は単独でも弱い殺細胞効果を示すが、temozolomide と併用することで相乗的殺細胞効果が観察された。またこのような効果は非腫瘍性細胞に対しては認められないことから、腫瘍特異的効果と考えられた。次にこの物質がミトコンドリア呼吸や Bax 活性化に及ぼす影響についても調べたところ、temozolomide によるミトコンドリア呼吸促進効果ならびに Bax 活性化を増強することが明らかになった。さらに呼吸鎖阻害薬を用いてミトコンドリア呼吸を抑制しておく、両薬剤併用による Bax 活性化および細胞死が抑制された。これらの結果はこの物質がミトコンドリア呼吸の促進を介して temozolomide の殺細胞効果を増強している可能性を示唆するものである。

### (2) 考察

これまでの研究成果に基づけば、Warburg 効果を抑制することができれば悪性グリオーマ細胞のもつ放射線・化学療法耐性の克服が期待できる。そこで本研究課題では Warburg 効果を抑制する、すなわちミトコンドリアでの酸素呼吸を回復させることができる薬物を探索し、そのような薬物が実際に化学療法に対する治療感受性を高めることができるかにつき検討を行った。その結果、上記のごとく temozolomide と協調してミトコンドリア呼吸ならびに細胞死を促進する薬物を同定することができた。今後さらなる検討は要するものの、本課題で得られた成果は「Warburg 効果(酸素呼吸の抑制)ががん細胞に治療抵抗性を賦与しており Warburg 効果を標的とする新たな治療法が放射線化学療法耐性の克服に貢献しうる」という治療学上の新たなコンセプトに対する「proof of principle」となっている点でも重要である。今後他のがんや他の化学療法薬剤あるいは放射線についても、同様の検討を試みる価値があるものと考えられる。

## 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2件)

- 1) Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Tachibana K, Sakurada K, Tomiya A, Kayama T, Kitanaka C. Regulation of neural stem/progenitor cell maintenance by PI3K and mTOR. *Neurosci Lett* 470:115-120,

2010. 査読有

- 2) Mouri W, Tachibana K, Tomiyama A, Sunayama J, Sato A, Sakurada K, Kayama T, Kitanaka C. Downregulation of Ras C-terminal processing by JNK inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* 371:273-277, 2008. 査読有

[学会発表](計6件)

- 1) Sunayama J, Sato A, Matsuda K, Tachibana K, Tomiyama A, Sakurada K, Kayama T, Kitanaka C: Effect of rapamycin (mTOR inhibitor) and LY294002 (PI3K inhibitor) on glioblastoma stem-like cells. 第68回日本癌学会総会. 2009年10月3日, 横浜.
- 2) Tomiyama A, Sunayama J, Tachibana K, Matsuda K, Ando K, Kayama T, Kitanaka C: Mechanism of heavy ion radiation-induced glioma cell death. 第68回日本癌学会総会. 2009年10月3日, 横浜.
- 3) 佐藤篤, 砂山潤, 松田憲一郎, 立花研, 富山新太, 櫻田香, 北中千史, 嘉山孝正: ヒトグリオーマ細胞株 A172 における腫瘍幹細胞の単離・同定の試み. 第26回日本脳腫瘍学会. 2008年11月30日, 松山.
- 4) Sato A, Sunayama J, Sakurada K, Matsuda K, Tachibana K, Tomiyama A, Kitanaka C, Kayama T: Isolation and characterization of cancer stem-like cells from a human glioblastoma cell line A172. 第67回日本癌学会総会. 2008年10月28-30日, 名古屋.
- 5) Mouri W, Tachibana K, Tomiyama A, Sunayama J, Sato A, Sakurada K, Kayama T, Kitanaka C: Downregulation of Ras C-terminal Processing by JNK Inhibition. 第67回日本癌学会総会. 2008年10月28-30日, 名古屋.
- 6) Tomiyama A, Nomiya T, Kitanaka C, Nemoto K, Yamashita H, Ando K, Kayama T: Mechanism of heavy ion radiation-induced cancer cell death. HIMAC 共同利用研究成果発表会. 2008年4月15日, 千葉.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

富山 新太 (TOMIYAMA ARATA)

山形大学・医学部・助教

研究者番号: 40385810