

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07194

研究課題名(和文) 膠芽腫に対する代謝リプログラミングおよびmTORを標的とした効果的薬物療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of drug therapy targeting metabolic reprogramming for glioblastoma

研究代表者

江田 岳誉 (Eda, Takeyoshi)

新潟大学・医歯学総合病院・薬剤師

研究者番号：90772038

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫に対する新たな薬物療法提示のため、細胞の飢餓による腫瘍制御の可能性について検討した。既存のSGLT2阻害剤canagliflozin投与により膠芽腫細胞の生存は低下した。この細胞上において、SGLT2は過剰に発現が認められることや、canagliflozinを用いた放射標識グルコースの取り込み実験から、細胞内グルコースの流入がcanagliflozinにより抑制されることから、細胞増殖抑制に栄養飢餓が関与することが判明した。また、canagliflozinの影響はmTORシグナル、タンパク合成活性において認められ、抗腫瘍作用はSGLT2を介した栄養飢餓シグナルによる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は未だ予後の改善されない膠芽腫に対する新規薬物療法の提示を目指して実施した。がんでは増殖維持のため栄養要求が高く、嫌氣的解糖という代謝的特徴を有することが知られる。本研究ではがん細胞への特殊な栄養供給を絶つことを主眼におき新規治療について探求した。canagliflozinは悪性脳腫瘍細胞の増殖生存を抑制する。背景として飢餓シグナルの活性化や、増殖シグナルが抑制されることがわかった。この知見による増殖抑制の試みは他の癌種においても有効であると予測できる。また、既存の抗がん剤治療への相乗効果も期待できる。canagliflozinはまた承認済みであるので迅速に臨床応用が可能となる。

研究成果の概要(英文)：The possibility of tumor control by cell starvation was investigated for the presentation of a new drug therapy for glioblastoma. Approved SGLT2 inhibitor canagliflozin reduced glioblastoma cell survival. SGLT2 was overexpressed on these cells, and canagliflozin-assisted uptake of isotope-labeled glucose showed that canagliflozin suppressed intracellular glucose influx, indicating that nutrient starvation is involved in the inhibition of cell proliferation. In addition, canagliflozin was found to affect mTOR signaling and protein synthesis activity, suggesting that its anti-tumor effects may be due to nutrient starvation signaling via SGLT2.

研究分野：神経薬理学

キーワード：がん代謝 膠芽腫 AMPK mTOR タンパク質合成

## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫(GBM)は壮年期から老年期にかけて大脳半球に好発し、急速に脳組織を破壊しつつ、脳内を浸潤性に発育・進展する腫瘍である。手術による完全摘出は困難で、後療法は必須である。現在の標準治療は手術による腫瘍の摘出およびテモゾロミド併用した放射線療法である。しかし、このような集学的治療が施行されるにも関わらず、国内治療成績は再発までの期間中央値で約 10 カ月とされ、予後は不良である。GBM の本態に迫り、新たな治療法の確立が急務とされる。

がんの本質は無秩序無制限の増殖である。異常増殖を維持するため、がんではグルコース要求が高い。大量に取り込んだグルコースを細胞ではミトコンドリア好気呼吸よりも乳酸へと多く代謝する (Warburg effect)。しかし、このような現象はどのようにして起こるのかということについて最終的な理解は得られていない。エネルギー収支としても非効率ながんの代謝様式について、ミトコンドリア障害説や低酸素適応説などこれまでに数多くの説が提唱されている。

飢餓時にはタンパク質分解 (異化) が亢進することが知られる。オートファジー誘導が背景にあり、飢餓時においてもなお必要なタンパク質合成の材料としてアミノ酸が供給されるものと考えられる。こうした状況より GBM は初期治療の間も再発の準備を整えている段階にあると推測される。我々の GBM 細胞を用いたこれまでの検討において mTOR 阻害剤 clindamycin がタンパク質合成の抑止に関わり、細胞の増殖抑制に効果的に寄与することが判明している。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は GBM に対する新たな薬物治療の基盤を確立することである。本研究ではヒト由来膠芽腫培養細胞株に対し、薬剤を用いて飢餓を誘導し、細胞増殖に与える影響について解析する。続いて飢餓に誘発される mTOR シグナルの影響について検討する。さらにはヌードマウスを用いた GBM 皮下腫瘍モデルにおいて飢餓の生理学的意義を検証、腫瘍サイズほか浸潤範囲、増大速度など GBM 細胞の実態について理解することを目指す。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞培養、飢餓条件

本研究には複数のヒト由来 GBM 培養細胞株を用いた。細胞は、増殖および維持において 10% 牛胎児血清と抗生物質を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)にて 5% CO<sub>2</sub> 環境下 37 °C で培養した。細胞内飢餓誘導についてはこれまでの我々の検討から既存薬である SGLT2 阻害剤 canagliflozin を用いた。canagliflozin は細胞膜上 SGLT2 に作用し、細胞内へのグルコース取り込みを抑制する。Canagliflozin との 72 時間共培養による飢餓誘導について対照群との比較検証を行った。

### (2)GBM 細胞上 SGLT2 発現とグルコースの細胞内へ取り込みについて

上記の GBM 培養細胞株 NGT41 に由来する抽出物をサンプルとして抗 SGLT2 抗体を用いたウエスタンブロットにより GBM 細胞膜上 SGLT2 の発現量について評価した。次にエネルギー代謝基質であるグルコースの細胞内への取り込みに対し、canagliflozin が実際に影響 (取り込み量変化) を与えるのか判定した。細胞は canagliflozin を濃度別に振り分け、薬効を与えた。その後、放射標識グルコースを含む培養液に切り替え、一定時間において細胞を回収した。この細胞破碎液における放射活性測定より、細胞内に取り込まれた放射標識グルコースの割合を算出、対照群と比較した。

### (3)飢餓誘導、腫瘍制御に影響する因子の検討

canagliflozin による細胞増殖への影響は、細胞生存率を測定し評価した。96 ウェルプレートに NGT41 細胞を播種し、canagliflozin 処理を行い、72 時間共培養した。ここで WST 試薬による比色定量を行い、生存細胞数を定量した。飢餓に関わるシグナル伝達変化を検出するため、AMPK や ACC 活性化などの細胞内代謝センサーに関連する抗体を用いてイムノブロッティングを行った。同様に、mTOR 下流シグナルである p70S6K および S6K などに対する特異的抗体を用いて腫瘍内タンパクの合成活性について評価した。

### (4)タンパク質合成活性

新規合成されるタンパク質量は SUnSET 法により測定した。アミノアシル tRNA と構造が類似するピューロマイシンは新規合成中ポリペプチド鎖に取り込まれる。その後タンパク合成は停止、ペプチド断片として解離するので、これを抗ピューロマイシン抗体によるイムノブロットで検出する。Canagliflozin 処理後の細胞よりタンパク質合成活性を評価した。

### (5)in vivo 解析

上記 canagliflozin 投与実験の結果を in vivo で再現、検証することが目的である。我々はこれまでの研究から疾患脳由来 NGT41 培養細胞を樹立している。この細胞をマウスへ皮下投与することで異種移植モデルを作成する。このモデルに対し、canagliflozin を経口投与し、腫瘍体積の変化を指標として、抗腫瘍効果を判定する。薬剤投与終了後、皮下腫瘍を摘出し、ウエスタンブロットまたは免疫染色にて細胞増殖能やタンパク合成への影響などの各種実験を行った。

#### 4. 研究成果

GBM 細胞に対し、canagliflozin を投与することで生じたシグナル伝達の変化が腫瘍増殖にどのような影響を与えるのか調べた。以下の課題を設けて実験を行った。

ヒト由来各種悪性脳腫瘍の培養細胞株を用い、ウエスタンブロッティングによって細胞上 SGLT2 の発現を調べた。その結果、全ての脳腫瘍細胞株において SGLT2 の発現を認めた (図 1)。

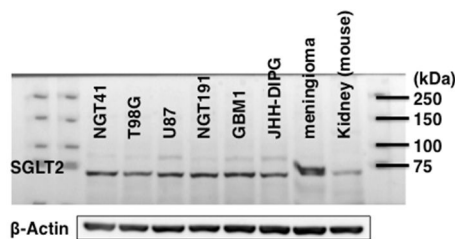
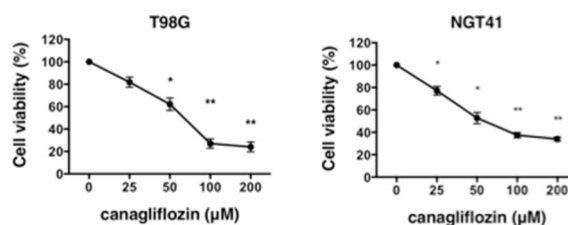


図 1. 各種悪性脳腫瘍細胞株上の SGLT2 発現

次に SGLT2 阻害剤 canagliflozin による GBM 細胞増殖への影響について調べるため WST アッセイを実施した。canagliflozin による 72 時間の処理を行ったところ、GBM 細胞の生存能は薬剤濃度に依存するようにして低下した (図 2、結果は一部のみ提示)。



これらの結果から細胞生存率の低下は canagliflozin による SGLT2 を介した作用によるものと推測できる。

図 2. canagliflozin による細胞増殖への影響

実際、canagliflozin は細胞内へのグルコース取り込みを阻害するのか、放射標識グルコースを用いて検証実験を行った。想定した通り、グルコースの取り込みは薬剤濃度に依存するように低下していた (図 3)。膠芽腫細胞に対する canagliflozin 投与によりグルコース取り込み阻害は阻害され、細胞増殖は低下する。

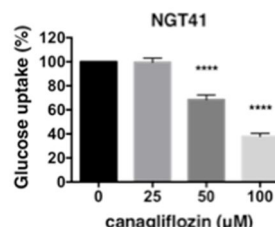


図 3. canagliflozin によるグルコース取り込み阻害

そこで canagliflozin による細胞内グルコース欠乏で変化する飢餓シグナルの挙動をウエスタンブロッティングによって調べた。AMPK は細胞内 AMP 濃度の上昇によって活性化 (リン酸化) し、糖や脂質、タンパク質の代謝さらにはオートファジーを制御することから代謝センサーとして知られる。さらに AMP による活性化の機構とは別にグルコースの欠乏を感知して活性化する機構も明らかになっている。Canagliflozin 投与下では ACC や AMPK の活性化が確認された (図 4)。さらに mTOR 活性との関連を調べるために mTOR 下流の p70S6K, S6K のリン酸化について同様の方法で調べた。canagliflozin は薬剤暴露による細胞生存率の低下に沿うように p70S6K, S6K の脱リン酸化を誘導した。

実際のタンパク合成率への影響は SUnSET 法によって評価した。その結果、canagliflozin 投与下にはピューロマイシンの取り込みが低下していた (図 5)。これらの結果から canagliflozin はタンパク合成能を低下することが示唆された。

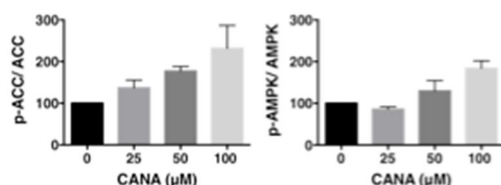


図 4. ACC, AMPK の活性化

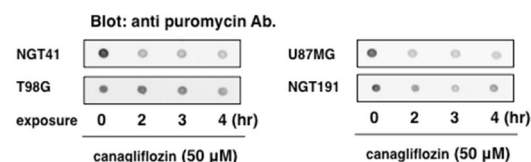


図 5. タンパク合成能の評価

上記、canagliflozin の作用は in vivo 投与実験にて検証した。NGT41 細胞を用いたマウス皮下腫瘍モデルを作成し、それぞれの試験薬を 10 日間連続経口投与した。効果判定は腫瘍の大きさ Tumor volume を指標とした。canagliflozin 投与により腫瘍の増殖は抑制された (図 6)。

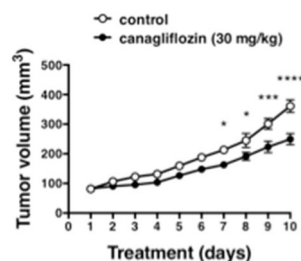


図 6. canagliflozin による腫瘍体積の変化

試験終了後、免疫組織染色によって細胞増殖能について検討した。すると canagliflozin 投与群ではや MIB1 染色が著しく低下していた。さらに摘出腫瘍からのタンパク抽出物より S6 発現の低下についても確認した。

このことから canagliflozin による膠芽腫細胞内へのグルコースの取り込み阻害から始まる飢餓条件により AMPK は活性化される。AMPK は細胞周期抑制的に働くことやオートファジーの活性化にも関与することが知られる。mTOR シグナルの抑制に関わる研究結果は AMPK のがん抑制機能を支持するものである。しかし、AMPK についてはミトコンドリアの呼吸鎖複合体への直接作用や AMPK 非依存的な mTOR 抑制などの知見もあり議論は尽きないが、本研究で膠芽腫の増殖、維持に関わる細胞内情報伝達の一部を理解することができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Eda Takeyoshi, Okada Masayasu, Ogura Ryosuke, Tsukamoto Yoshihiro, Kanemaru Yu, Watanabe Jun, On Jotaro, Aoki Hiroshi, Oishi Makoto, Takei Nobuyuki, Fujii Yukihiko, Natsumeda Manabu	4. 巻 14
2. 論文標題 Novel Repositioning Therapy for Drug-Resistant Glioblastoma: In Vivo Validation Study of Clindamycin Treatment Targeting the mTOR Pathway and Combination Therapy with Temozolomide	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 770 ~ 770
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14030770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江田岳誉、棗田学、大石誠、藤井幸彦、武井延之
2. 発表標題 Canagliflozin, a sodium-glucose transporter 2 (SGLT2) inhibitor, suppresses the growth of glioblastoma through the AMPK-mTOR signaling
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 江田岳誉、岡田正康、棗田学、大石誠、藤井幸彦、武井延之
2. 発表標題 Investigation of anti-tumor effects by inhibiting glucose uptake via sodium-glucose transporter 2 (SGLT2) expressed in glioblastoma cell lines
3. 学会等名 第12回国際放射線神経生物学会大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	棗田 学 (Natsumeda Manabu)  (00515728)	新潟大学・脳研究所・特任准教授  (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------