

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300342

研究課題名（和文） がん細胞に特徴的な増殖環境への適応メカニズムと治療標的化

研究課題名（英文） Adaptive mechanisms of cancer cells to unique growth microenvironment and therapeutic targeting

研究代表者

富田 章弘（TOMIDA AKIHIRO）

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センターゲノム研究部・部長

研究者番号：40251483

研究成果の概要（和文）： 腫瘍組織において特徴的に認められる増殖環境として、グルコース欠乏に着目し、主として、グルコース飢餓がん細胞の生存応答 UPR を標的とした治療法開発のための基礎的研究を行った。UPR 標的薬剤の作用機序解析等を通じ、グルコース飢餓環境下での UPR 制御には、ミトコンドリアや翻訳制御機構が重要な役割を果たすことを見出した。また UPR 阻害化合物の動物レベルでの評価を行い、UPR 標的治療法開発に向けた基盤情報を得た。

研究成果の概要（英文）： In this study, we focused on the UPR, a cellular adaptive response to glucose deprivation, that is characteristically observed in tumor microenvironment. Through the mechanistic analyses of UPR-inhibitory compounds, we elucidated that mitochondria and translation control machinery play an important role in the UPR during glucose deprivation. By evaluating the antitumor effects of the compounds, we obtained fundamental information for the therapeutic targeting of the UPR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2012年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野： 総合領域

科研費の分科・細目： 腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード： がん細胞、微小環境、グルコース飢餓、ストレス応答、分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

固形がんには一般に低酸素領域が存在する。腫瘍の低酸素領域では、グルコースなどの栄養物の供給も低下しており、また低 pH となっている。このような固形がん特有の微小環境は、腫瘍内での血管形成不全が原因となっている。こうした微小環境は、抗がん剤耐性の原因となることが知られており治療上大きな問題となるが、一方で正常組織には

みられず選択的な標的となる可能性を秘めている。事実、腫瘍環境を標的とする治療研究も活発化しており、細胞の低酸素応答阻害を基盤とした血管新生阻害剤などの研究が多く進められている。しかしながら、こうした環境でがん細胞が生存し増殖するためには、グルコース欠乏状態などの特殊な増殖環境へ適応することが必要であるが、そのようながん細胞自身の適応応答を制御する治療

法の研究は少ない。

こうした中、我々は、グルコース飢餓や低酸素に対するがん細胞の適応応答として、UPR (unfolded protein response) に着目し研究を展開してきた。UPR は、小胞体分子シャペロン GRP78、GRP94 の誘導を特徴とする細胞のストレス応答で、小胞体に unfolded proteins が蓄積することで起こる。研究開始当時においては、UPR は、がんをはじめ糖尿病、虚血性疾患など様々な疾患に関与することが明らかになり、ATF6、IRE1、PERK といったストレスセンサー分子の同定などその基本的な分子機序も徐々に明らかになってきた。そして、UPR には細胞防御の役割と防御不能の場合はアポトーシスへ導く役割という二面性があることも明らかになってきた。しかしながら、UPR の細胞防御機構を制御しがん治療に結びつけるための標的分子を特定するなど、治療に向けた研究の展開のためには、十分に理解が進んでいるとは言えない状況であった。

我々は、グルコース飢餓環境下で選択的に UPR を抑制し細胞毒性を示す新規化合物 versipelostatatin (VST) を見出し、VST が動物レベルでも抗腫瘍効果を示すことを明らかにしていた (J Natl Cancer Inst 96:1300, 2004)。また、VST と類似の活性を示す化合物として、メトホルミン、ブホルミン、フェンフォルミンといったビグアナイド系糖尿病薬を見出すことに成功していた (Cancer Res 69:4225, 2009)。メトホルミンについては、当時から抗腫瘍活性を有することが認識され、臨床試験が進められている。さらに我々は、標的やメカニズムを推察することの可能な UPR 阻害化合物も見出していた。本研究は、我々独自のこうした継続的な努力を基盤として、がん細胞に特徴的な増殖環境、特にグルコース欠乏に焦点を当て、がん細胞の適応メカニズムを標的とする治療法開発のための基盤を築くことを目的に計画された。

2. 研究の目的

腫瘍組織においては、がん細胞は正常組織とは異なる特徴的な環境で生存し増殖する。この特徴的な増殖環境へのがん細胞の適応メカニズムを解明し、その治療標的化のための基盤研究を行うことにより、これまでにない新しいがん特異的な治療法開発への道を開く。こうした全体構想の中で本研究では、特徴的な増殖環境としてグルコース欠乏に着目し、主として、グルコース飢餓がん細胞の生存応答 UPR (unfolded protein response) を標的とした治療法開発のための基盤を築くことを目的とする。我々の見出してきた一連の UPR 阻害化合物の作用機序解明を要し、グルコース飢餓への適応メカニズムの解明研究とその制御薬剤の探索研究を行い、さら

にそれらの成果に基づき、UPR 標的治療法開発に向けた展開を図る。

3. 研究の方法

本研究では、グルコース飢餓がん細胞の標的化を目指し、1) UPR 標的薬剤の作用機序解析、2) グルコース飢餓における UPR の分子機構解析、3) UPR の制御薬剤探索 の研究を行うとともに、それらの成果の応用展開を促進するため、4) 適応メカニズムの治療標的化に向けた高次解析 の項目に分け推進した。以下に、研究項目ごとに分け、研究の方法を簡潔に述べる。

1) UPR 標的薬剤の作用機序解析

VST の作用を仲介する分子として見出した翻訳開始抑制因子 4E-BP1 について、その UPR 阻害における分子機序の解明や、VST 以外の UPR 阻害剤の作用との関連について研究を進める。また、当該研究で見出した新たな UPR 阻害活性を有する化合物についての作用機序解析を行う。

2) グルコース飢餓における UPR の分子機構解析

グルコース飢餓がん細胞の生存には、ミトコンドリアが必須であること、また、ミトコンドリア阻害剤等を用いた解析から UPR の制御には翻訳制御機構が極めて重要な役割を果たしていることを見出しつつあった。それらがどのようなメカニズムで UPR を制御するかを明らかにするため、UPR における翻訳制御機構を中心に、これまでに樹立してきたミトコンドリア DNA 欠損細胞等も援用し、分子細胞生物学的解析を進める。

3) UPR の制御薬剤探索

これまでに VST 等を用い蓄積してきた遺伝子発現情報を活用した探索や、標的分子の既に明らかにされている阻害剤群を中心とした探索を行う。候補化合物の UPR 阻害活性を確認後、標的分子などの既知情報を活用し、UPR の分子機構研究への展開を図る。

4) 適応メカニズムの治療標的化に向けた高次解析

得られた UPR 阻害剤の動物レベルでの抗腫瘍効果の確認や有効性の期待できるがん腫の検索など、上記で得られた成果を治療研究や薬剤の開発研究へ結びつけるための研究を行う。

4. 研究成果

成果について、研究項目ごとに分け、以下に簡潔に述べる。

1) UPR 標的薬剤の作用機序解析

これまでに UPR を抑制することを見出し、ビグアナイド系化合物のメトホルミン、ブホルミン、フェンホルミンについての作用機序解析を進めた。その結果、グルコース飢餓環境下でこれらの薬剤を処理すると、蛋白合成開始抑制因子 4E-BP1 の異常活性化が認められること、この 4E-BP1 の活性化に伴い UPR の活性化が抑制されることが明らかになった。一方で、グルコース飢餓以外の、糖鎖付加阻害剤のツニカマイシン等を用いて小胞体ストレスを与えた場合には、いずれのビグアナイド系化合物も、4E-BP1 の異常活性化に導かず、UPR も抑制しなかった。

本研究において、UPR 阻害活性を有する化合物として見出した AMPK 阻害剤の compound C について作用機序解析を進めた。その結果、compound C は、ブホルミンなどと異なり、蛋白合成開始抑制因子 4E-BP1 の異常活性化を伴わずに UPR 阻害活性を示し、従来見出してきた UPR 阻害剤とは異なるタイプの化合物であることが明らかになった。実際、ビグアナイド系化合物と compound C を併用すると、グルコース飢餓環境下での UPR 阻害活性ならびに細胞毒性活性ともに相乗的に効果が増強されることが明らかになった。さらに compound C の作用の既知情報を活用して、UPR 阻害のメカニズム解析を進めた。compound C は、エネルギー代謝制御因子 AMPK や細胞のがん化に關与する Smad 経路を阻害することが知られていたが、興味深いことに、compound C の UPR 阻害活性は、AMPK 阻害活性や Smad 阻害活性とは相関せず、新しい生物活性であることが強く示唆された。

2) グルコース飢餓における UPR の分子機構解析

グルコース飢餓環境での細胞生存におけるミトコンドリアの役割を明らかにするため、ミトコンドリア DNA 欠損細胞やミトコンドリア呼吸鎖阻害剤を用い解析を進めた。グルコース飢餓環境下では、解糖系からは十分なエネルギーが得られないため、相対的にミトコンドリア機能が重要な役割を果たすようになるものと考えられる。実際、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤は、グルコース飢餓環境下で細胞毒性が増強されることが知られている。興味深いことに、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤は、グルコース飢餓環境選択的細胞毒性を示すばかりではなく、グルコース飢餓環境下での UPR を抑制することが明らかになった。

同様に、ミトコンドリア DNA を欠損したがん細胞は、グルコース飢餓に対し著しく高感受性を示し死滅することを見出した。このとき、やはり GRP78 の発現誘導などは認められず、UPR が抑制された。重要なことに、PERK 経路などの UPR 活性化経路についての阻害は、

ATP の減少よりも早い時間帯で起こることから、ATP の減少以外のメカニズムも重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方、糖鎖付加阻害剤であるツニカマイシンに対しては、そのような高感受性は認められず、親株と同様に UPR が誘導された。こうした実験事実などから、ミトコンドリアは、グルコース飢餓におけるがん細胞の UPR の制御因子として機能し得ることが明らかになったものと考えている。

こうしたミトコンドリアに依存しておこる UPR の制御機構についてさらに検討を加えた。その結果、グルコース飢餓環境下でミトコンドリアの機能が欠損すると、4E-BP1 の異常活性化が起こること、またタンパク質合成系が強力に抑制されること、これらは、UPR の抑制とよく一致して起こることが明らかになった。こうしたグルコース飢餓環境下でミトコンドリアの機能が欠損した際に見られる現象は、上記のビグアナイドなどの UPR 抑制化合物を作用した際の現象と非常に良く合致しており、UPR 抑制化合物の作用機序の解明に極めて有用な情報であると考えられた。

そこでさらに 4E-BP1 の異常活性化を介した UPR 抑制のメカニズムについて検討を進めた。そして、強力な mTOR 阻害剤の PP242 が、4E-BP1 を強力に活性化し UPR を阻害することを見出し、グルコース飢餓環境下での UPR 制御に mTOR が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。mTOR は、4E-BP1 などの標的分子のリン酸化を介した mRNA の翻訳、オートファジーの抑制、リボソームや脂質の生合成等を通じ、がんの増殖や代謝制御においても重要な役割を果たしているものと考えられており、抗がん剤として mTOR 阻害剤がすでに臨床応用されている。我々の今回の研究成果から、mTOR 阻害を標的とした治療法が、UPR の阻害を介して抗がん活性を発揮するメカニズムも考えられ、今後検討を加えていきたいと考えている。

3) UPR の制御薬剤探索

これまでに、抗腫瘍効果を有する UPR 阻害化合物として VST やビグアナイド系糖尿病薬などを見出してきた。これらの作用機序解析の一環として行ってきた網羅的遺伝子発現解析の情報を活用し、類似の活性を有する化合物の探索を行った。具体的には、薬物と遺伝子発現を結びつける Connectivity Map データベースを利用し、VST などと類似の遺伝子発現変化を誘導する既存薬物を探索した。この探索によって、栄養飢餓耐性解除薬として再発見されたパモ酸ピルビニウムが UPR 抑制活性を有することを見出していたが、GRP78 プロモーターレポーターアッセイを用いて候補化合物について検討を加えたこと

ろ、新たに4種の化合物にUPR抑制活性を有する可能性を見出した。さらに、レポーター抑制活性の強かった rottlerin と valinomycin について確認実験を施行し、VST などと同様に強い UPR 抑制活性を示すこと、グルコース飢餓条件下で選択的な細胞毒性を示すことが明らかになった。PERK 等の UPR シグナル伝達分子への作用や 4E-BP1 に対する影響など UPR 抑制機序について比較解析したところ、遺伝子発現情報をもとに探索された化合物群は非常に似通った性質を有することが明らかになった。

VST、ビグアニド類（メトホルミン、ブホルミン、フェンホルミン）とパモ酸ビルビニウムについて、39種類のヒトがん細胞に対する細胞毒性を比較する COMPARE 解析を行ったところ、非常に似通ったパターンを示すことが明らかになった。すなわち、これらの化合物は類似した作用機序を有することが強く示唆されるとともに、39種類のヒトがん細胞パネルを用いた活性の評価が可能であることが示唆された。次に、データベース内にある薬剤の中から、VST 等と似通ったパターンの細胞毒性を示す薬剤について検索し、実際に UPR 抑制活性を有するか検討したところ、3種類の化合物を同定することができた。現在、これらの化合物については、作用機序の詳細について検討している。

また、このがん細胞パネルを用いた解析から、UPR 阻害化合物に対して、通常条件下でも高感受性を示す細胞群が存在することが明らかになってきた。こうした情報を足掛かりとして、感受性の高い細胞と低い細胞の遺伝子発現パターンを比較検討するなどにより、標的分子やバイオマーカー探索研究への展開を図っていきたいと考えている。

4) 適応メカニズムの治療標的化に向けた高次解析

ビグアニド系化合物のうちブホルミンを選び、胃がん MKN74 細胞をヌードマウスに移植したゼノグラフトモデルを用い、抗腫瘍効果について検討した。その結果、経口投与で MKN74 ゼノグラフトの増殖を抑制できることが明らかになった。次に、UPR 抑制のマーカーとして同定してきた翻訳開始抑制因子 4E-BP1 の活性化を指標に検討した。ブホルミンを MKN74 ゼノグラフト腫瘍内に投与し、ゼノグラフトを回収し組織染色を行った。その結果、薬剤投与により、4E-BP1 の脱リン酸化が観察された。これは、VST やビグアニドが 4E-BP1 の脱リン酸化を促進し異常活性化に導くこと、そして、この 4E-BP1 異常活性化は UPR 抑制に直接関与するという、培養細胞系での知見とよく合致するものであった。

また、グルコース飢餓環境下で UPR の起こらない、ミトコンドリア DNA 欠損細胞株を用

い、in vivo での造腫瘍性に着目した検討を進めた。その結果、ミトコンドリア DNA 欠損細胞株は in vivo での増殖速度が非常に低下することが明らかになった。今後は、この原因を検討するため、ヌードマウスに移植し生着した細胞の網羅的遺伝子発現解析を行うなどの検討を継続して行っていきたいと考えている。

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 8 件)

- ① Saito S, Furuno A, Sakurai J, Park HR, Shin-ya K, Tomida A. Compound C prevents the unfolded protein response during glucose deprivation through a mechanism independent of AMPK and BMP signaling. *PLoS One.* 7:e45845, 2012. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0045845.
- ② Matsuo J, Tsukumo Y, Saito S, Tsukahara S, Sakurai J, Sato S, Kondo H, Ushijima M, Matsuura M, Watanabe T, Tomida A. Hyperactivation of 4E-binding protein 1 as a mediator of biguanide-induced cytotoxicity during glucose deprivation. *Mol Cancer Ther.* 11:1082-1091, 2012. 査読有
DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0871.
- ③ Saito S, Tomida A. Use of chemical genomics in assessment of the UPR. *Methods Enzymol.* 491:327-41, 2011. DOI: 10.1016/B978-0-12-385928-0.00018-3.
- ④ Kim JY, Hwang JH, Cha MR, Yoon MY, Son ES, Tomida A. Ko B, Song SW, Shin-ya K, Hwang YI, Park HR. Arctigenin blocks the unfolded protein response and shows therapeutic antitumor activity. *J Cell Physiol.* 224:33-40, 2010. 査読有
DOI: 10.1002/jcp.22085.
- ⑤ Haga N, Saito S, Tsukumo Y, Sakurai J, Furuno A, Tsuruo T, Tomida A. Mitochondria regulate the unfolded protein response leading to cancer cell survival under glucose deprivation conditions. *Cancer Sci.* 101:1125-32, 2010. 査読有
DOI: 10.1111/j.1349-7006.2010.01525.x.

[学会発表] (計 19 件)

- ① 冨田章弘、小井土大、芳賀直実、塚原里美、佐藤重男、がん微小環境標的治療法の開発を目指したがん細胞のグルコース飢餓への新たな適応機構の解析、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日 (札幌)

- ② Tomida, A. Unfolded protein response as a therapeutic target in tumor microenvironment. The 15th Japan - Korea Cancer Research Workshop 2010, December 21-22, 2010 (Incheon, Korea)
- ③ 富田章弘、がん細胞の環境応答としてのUPRとその治療標的化、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月24日(大阪)

[図書] (計3件)

- ① 富田章弘(宮澤恵二・伊東進編)、化学同人、がん増殖と悪性化の分子機構、19章 がんの化学療法と抗がん剤耐性、2012、230-243
- ② 富田章弘(日本臨床腫瘍学会編集)、南江堂、新臨床腫瘍学、1-5 細胞死、2012、25-28
- ③ 富田章弘(西尾和人、西条長宏編)、羊土社、がんの分子標的と治療薬、6章細胞周期・アポトーシス・ネクローシス、2010、130-133

[産業財産権]

該当なし

[その他]

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/genome/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 章弘 (TOMIDA AKIHIRO)
公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター ゲノム研究部・部長
研究者番号：40251483

(2) 研究分担者：該当なし

(3) 連携研究者：該当なし