

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 5月31日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650235

研究課題名（和文） がん細胞に特徴的なエネルギー代謝に着目した難治がん治療耐性克服への挑戦

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

研究代表者

清野 静香 (SEINO SHIZUKA)

山形大学・医学部・助手

研究者番号：80571653

研究成果の概要（和文）：

本研究において我々は、がん細胞のミトコンドリア呼吸活性化を通じて難治がんの治療耐性克服を目指した。その過程でグリオーマ細胞のミトコンドリア呼吸を促進する薬物を同定し、その薬物が *in vitro* においてグリオーマ細胞のテモゾロミド耐性を克服することを確認した。さらに皮下腫瘍モデルを用いて *in vivo* におけるこの薬物の効果を検討したところ、テモゾロミド単独投与では抑制されなかった腫瘍の増大がこの薬物の併用により抑制され、腫瘍縮小効果がもたらされた。脳腫瘍モデルにおける両薬物の併用効果についてはまだ確認されていない。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we aimed at overcoming the therapeutic resistance of intractable cancers through activation of mitochondrial respiration. In the course of the study, we identified a chemical agent capable of promoting mitochondrial respiration of glioma cells and also confirmed that the chemical agent overcomes temozolomide resistance of glioma cells *in vitro*. *In vivo*, the chemical agent synergized with temozolomide to inhibit tumor growth in the subcutaneous xenograft model. However, the synergistic anti-tumor effect of these drugs remains to be demonstrated in the intracranial xenograft model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	0	1,400,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	450,000	3,350,000

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：抗がん物質探索・ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

最近我々は Warburg 効果に見られるミトコンドリア呼吸の低下がミトコンドリア依存的細胞自殺のマスター制御分子である Bax, Bak の活性化を抑制することによりがん細胞の細胞死抵抗性に寄与していることを世界に先駆けて示した。さらにこのような知見に基づき、Warburg 効果の解除ががん細胞のもつ治療抵抗性を克服する上で重要な鍵となる可能性 (仮説) を提唱した (*JNCI* 98:1462, 2006; *Nat Rev Cancer* 6:905, 2006)。Warburg 効果はがん PET 検診の原理となるなど種々のがんで認められる普遍的現象として知られており、例えばグリオーマでは過去の詳細な PET study の結果から、ほぼ全ての症例で Warburg 効果 (腫瘍が低酸素代謝率+「低」酸素摂取率を示す=低酸素によらない嫌気代謝を意味する) が生じていることが示されている (Rhodes et al., *Ann Neurol* 14:614-626, 1983; Tyler et al., *J Nuc Med* 28:1123-1133, 1987; Mineura et al., *Cancer* 73:2386-2394, 1994)。このことは治療に対して非常に高い抵抗性を示すことで知られるグリオーマにおいても Warburg 効果の解除 (ミトコンドリア呼吸の回復) によって広く治療感受性を回復できる可能性があることを示すものである。このようなことから我々は、以下のような着想を得るに至った。すなわち、「細胞死誘導効率を指標とした時間・労力を要する従来の薬剤探索に代えて (に加えて)、ミトコンドリア呼吸促進効果そのものを代替指標 (surrogate marker) としたスクリーニングを行うことで遥かに効率よく目的の薬物 (=がん細胞の治療抵抗性克服に有用な薬物) に辿りつけるのではないか？」という発想である。

2. 研究の目的

そこで本研究ではこのような斬新かつ大胆な発想のもと、がん細胞のミトコンドリア呼吸を促進 (回復) する薬物を探索・同定し、そのような薬物の併用によりグリオーマをはじめとする難治がんに対する化学療法薬剤のがん細胞殺傷効果、抗腫瘍効果が増強されることを *in vitro*, *in vivo* において実証することを目指す。

尚、本研究課題は、我々自身が提唱したがん細胞生物学・治療学の根本に関わる仮説の実

証を起点として基本コンセプトの確立を狙うものであり、サイエンスとしても重要な意義を有している。また、本課題で見いだされるであろう薬剤はその作用がミトコンドリア呼吸の回復・促進であると考えられることから、正常細胞に対する有害作用は理論的に極小であるものと予想される。従って安全性が高く実地臨床でも使いやすい「併用薬」となる可能性が高く、臨床的に価値ある研究となることが期待される。

3. 研究の方法

研究の方法としては、以下のように大きく 4 つのステップが考えられる。

- I) ミトコンドリア呼吸を促進できる化合物を探索する
- II) ミトコンドリア呼吸依存的に細胞死を誘導する化学療法薬を探索する
- III) ミトコンドリア呼吸促進化合物とミトコンドリア呼吸依存的化学療法薬による相乗的な細胞死誘導効果のがん細胞株・初代培養がん細胞を用いて確認する
- IV) *in vitro* で相乗効果が認められた組み合わせについては *tumor-bearing mice* を用いて *in vivo* における相乗的抗腫瘍効果を検討する

以上、I) - IV) のステップで段階的に研究を進めることにより、最終的にがん細胞に対して相乗的な治療効果を示す化合物・薬剤の組み合わせを見つけ出すことを目指す。

4. 研究成果

我々は上述のごとく、Warburg 効果のがん細胞に化学療法耐性をもたらしているとする我々自身の仮説に則り、好気呼吸の促進が期待できる薬剤をがん細胞のもつ抗がん剤抵抗性を克服できる薬物の候補としてその探索を行ってきた。その結果我々は、期待される効果を示す薬物の同定に成功した。そのうちの一つはグリオーマ細胞の好気呼吸を促進する作用をもつと同時に、現在悪性グリオーマ治療の第一選択薬剤となっているテモゾロミドによるグリオーマ細胞殺傷効果を増強することが明らかとなった。さらにこの薬物は好気呼吸を抑制した条件下では、テモゾロミドにより

誘導されるグリオーマ細胞の細胞死を増強する効果を失うことが確認された。そこで次のステップとして、グリオーマ細胞をヌードマウス皮下に移植した皮下腫瘍モデルを用いて生体内でのこの薬物の効果を検討した。その結果、テモゾロミドないしこの薬物の単独投与では認められなかった腫瘍縮小効果が、両者の併用にて観察された。ところでこの薬物は脳血液関門を通過することが報告されている薬物であったため、次に脳内腫瘍モデルにおいて同様の治療効果が得られるのではと考え、検討を行った。これまで行った実験条件による検討結果の限りにおいては、併用による生存期間延長の傾向は見られるものの、併用療法が単独治療に比べて統計学的な有意差をもって生存期間を延長するという結果を得るには至っておらず、薬物の投与方法などを含め引き続き実験条件の検討を行っている。

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5件)

- 1) Matsuda K, Sato A, Okada M, Shibuya K, Seino S, Suzuki K, Watanabe E, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: Targeting JNK for therapeutic depletion of stem-like glioblastoma cells. *Sci Rep* 2012;2:516
doi: 10.1038/srep00516. (査読有)
- 2) Sato A, Sunayama J, Okada M, Watanabe E, Seino S, Shibuya K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: Glioma-initiating cell elimination by metformin activation of FOXO3 via AMPK. *Stem Cells Transl Med* 2012;1:811-824 (査読有)
- 3) Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Seino S, Suzuki K, Watanabe E, Tachibana K, Tomiya A, Kayama T, Kitanaka C: MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis. *Stem Cells* 2011;29:1942-1951 (査読有)
- 4) Sunayama J, Sato A, Matsuda KI, Tachibana K, Watanabe E, Seino S, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiya A, Kitanaka C: FoxO3a functions as a key integrator of cellular signals that control glioblastoma stem-like cell differentiation and tumorigenicity. *Stem Cells* 2011;29:1327-1337 (査読有)
- 5) Tomiya A, Tachibana K, Suzuki K, Seino S, Sunayama J, Matsuda KI, Sato A, Matsumoto Y, Nomiya T, Nemoto K, Yamashita H, Kayama T, Ando K, Kitanaka C: MEK-ERK-dependent multiple caspase activation via mitochondrial proapoptotic Bcl-2 family proteins is essential for heavy ion irradiation-induced glioma cell death. *Cell Death Dis* 2010;1:e60
doi: 10.1038/cddis.2010.37. (査読有)

[学会発表] (計4件)

- 1) 佐藤篤, 砂山潤, 松田憲一郎, 立花研, 渡部江梨子, 清野静香, 鈴木香, 成田善孝, 渋井壮一郎, 富山新太, 北中千史, 嘉山孝正: グリオーマ幹細胞における FoxO3a を介した分化と造腫瘍能の制御. 第29回日本脳腫瘍学会学術総会, 下呂(水明館); 2011年11月27日
- 2) 佐藤篤, 松田憲一郎, 砂山潤, 清野静香, 鈴木香, 渡部江梨子, 立花研, 富山新太, 北中千史, 嘉山孝正: グリオーマ幹細胞における MGMT 発現制御の分子機構に関する検討. 第12回日本分子脳神経外科学会, 横浜(パシフィコ横浜); 2011年10月15日
- 3) 佐藤篤, 松田憲一郎, 砂山潤, 清野静香, 鈴木香, 櫻田香, 立花研, 富山新太, 北中千史, 嘉山孝正: MEK 経路阻害による MGMT 発現およびテモゾロミド感受性に関する検討. 第70回日本脳神経外科学会総会, 横浜(パシフィコ横浜); 2011年10月12日
- 4) 佐藤篤, 松田憲一郎, 砂山潤, 清野静香, 鈴木香, 櫻田香, 立花研, 富山新太, 北中千史, 嘉山孝正: グリオーマ幹細胞における MGMT 発現とテモゾロミド感受性に関する検討. 第28回日本脳腫瘍学会, 軽井沢(軽井沢プリンスホテル); 2010年11月28日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清野 静香 (SEINO SHIZUKA)
山形大学・医学部・助手

研究者番号：80571650

(2)連携研究者

北中 千史 (KITANAKA CHIFUMI)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70260320

富山 新太 (TOMIYAMA ARATA)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：40385810