

## 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24年 4月25日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791331

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)：

本研究において我々は、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 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	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

本研究の発想の原点は最近我々が腫瘍学領域の top journal である *J Natl Cancer Inst* に発表した論文である。この論文で我々は、ミトコンドリアを介する細胞自殺に必須とされる Bax, Bak の活性化にミトコンドリア呼吸が必要とされるのに対して、同じ ATP 産生メカニズムでありながらサイトゾルで

行われる解糖は Bax, Bak の活性化に関与しないことを示した。この発見は、概要に上述のごとく、ノーベル賞受賞者 Warburg 博士による発見以来約 80 年間続いた「Warburg 効果の謎」に対する一つの明解な解答となり、*Nature Reviews Cancer* の Research Highlight of the Month にも取り上げられた。我々はさらにこの発見に基づき、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を提唱した。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いるが、重要なことに、過去の詳細な PET study の結果から、グリオーマにおいてはほぼ全ての症例で 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。このことは一般に治療に対して高い抵抗性を示す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）により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。

一方、我々はこれまでに temozolomide (TMZ) のグリオーマ細胞殺傷効果を増強できる薬物（ミトコンドリア呼吸促進作用が期待できるものも含め種々の生理活性物質を対象として）の探索を開始し、既にそのような薬物をいくつか同定している。重要なことに、これまでに最も顕著な細胞死増強効果を示した薬物はグリオーマ細胞のミトコンドリア呼吸を活性化する作用を有しており、またミトコンドリア呼吸阻害剤の存在下ではこの薬物による細胞死増強効果が失われた。このことは上述の我々の仮説を裏付ける有力な証拠になると同時に、以下のような provocative で大胆な発想に「現実味」を与えるものである。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（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

本研究ではこのような斬新かつ大胆な発想のもと、グリオーマ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に対する化学療法薬剤（テモゾロミド）の殺傷効果、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した。

## 3. 研究の方法

研究計画は以下のように大きく3つのステップからなる。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促進化合物とテモゾロミドによる相乗的な細胞死誘導効果をグリオーマ細胞株・初代培養細胞を用いて確認する、III) tumor-bearing mice を用いて、*in vitro* で確認された相乗的効果が *in vivo* においても

観察されるか検討する。

## 4. 研究成果

我々は、ワールブルグ効果（がん細胞が酸素存在下でもあえて酸素を利用した好気呼吸を行わず、嫌氣的解糖によりATP=細胞のエネルギーを産生する現象）がグリオーマ細胞に化学療法に対する抵抗性を賦与しているとの我々独自の仮説にのっとり、ミトコンドリア呼吸を促進する作用をもつことが期待される薬物を中心に、テモゾロミドによるグリオーマ細胞殺傷効果を増強できる薬剤の探索を行った。その結果、これまでに期待される効果を示す薬物を同定しているが、中でも最も顕著な細胞死増強効果を示す薬物はグリオーマ細胞のミトコンドリア呼吸を賦活化する作用を有しており、またミトコンドリア呼吸阻害剤の存在により酸化的リン酸化が抑制された条件下では、この薬物による細胞死増強効果が失われることが確認された。そこで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 *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、腫瘍縮小効果をもたらすことが明らかとなった。この薬物は脳血液関門を通過することが知られている薬物であるため、脳内腫瘍モデルにおいてテモゾロミドとこの薬物の併用効果を検討した。パイロット実験の結果併用による生存期間延長の傾向が認められたことから、統計学的に有意な生存期間延長が得られるか検討を行ってみたが、種々の条件検討にもかかわらず、最終的には有意な生存期間延長効果は認められなかった。今後この薬物の生体内動態についての再検討が必要と考えられた。

## 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4件）

- 1) 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)
- 2) 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)

- 3) Sunayama J, Matsuda KI, Sato A, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyaama A, Kitanaka C: Crosstalk between the PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the maintenance of self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. Stem Cells 2010;28:1930-1939 (査読有)
- 4) Sunayama J, Sato A, Matsuda KI, Tachibana K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyaama A, Kitanaka C: Dual blocking of mTor and PI3K elicits a pro-differentiation effect on glioblastoma stem like-cells. Neuro-Oncol 2010;12:1205-1219 (査読有)

[学会発表] (計4件)

- 1) 佐藤篤, 砂山潤, 松田憲一朗, 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) Sato A, Matsuda KI, Sunayama J, Sakurada K, Tachibana K, Tomiyaama A, Kitanaka C, Kayama T: MEK inhibition enhances temozolomide sensitivity of glioma stem-like cells via MGMT down-regulation. 第70回日本癌学会学術総会, 名古屋(名古屋国際会議場); 2011年10月3日
- 3) 佐藤篤, 松田憲一朗, 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
- 4) Sunayama J, Matsuda KI, Sato A, Tachibana K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyaama A, Kitanaka C: Crosstalk between the

PI3K/mTOR and MEK/ERK pathways involved in the regulation of stemness of glioblastoma stem cells. 第69回日本癌学会学術総会, 大阪(大阪国際会議場); 2010年9月24日

## 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