

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290061

研究課題名(和文)がん細胞のエネルギー代謝とストレス適応の協調機構の解明と治療標的化

研究課題名(英文)Elucidation of cooperative mechanisms between energy metabolism and stress response of cancer cells for drug discovery

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：グルコースの供給が十分ではない腫瘍内組織において、グルコース要求性の高いがん細胞が生存し増殖するためには、エネルギー代謝と協調して起こるストレス適応機構が重要な役割を果たす。本研究では、ミトコンドリアに依存したストレス適応機構とミトコンドリアに依存しないストレス適応機構に分け、栄養飢餓条件下におけるがん細胞のストレス応答制御分子の探索を行い複数の分子の同定に成功した。さらに、それら制御分子の治療標的としての妥当性検証や薬剤候補の探索・評価の研究を推進した。

研究成果の概要(英文)：As cancer cells generally require a lot of glucose for proliferation, stress adaptation mechanisms coupled with energy metabolism play an essential role in cancer cell survival under tumor microenvironment where supply of glucose is not enough. In this study, we analyzed mitochondria-dependent and -independent mechanisms of cellular stress response under nutrient deprivation conditions, and found several regulatory proteins for each mechanism. We further evaluated the identified proteins as novel targets for drug discovery.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：癌 分子標的治療 微小環境 グルコース ストレス応答

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。近年、腫瘍内環境を標的とする治療研究が活発化し、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きた。その結果、一部は臨床現場で使用されるに至った。こうした事実は、腫瘍内の微小環境を利用した治療法が有効であることを示している。しかしながら、腫瘍内環境における、がん細胞自身の適応応答を制御し死滅させる治療法の研究は未だ少ない。

上述のように、腫瘍内組織ではグルコースの供給が十分ではないにもかかわらず、がん細胞は大量のグルコースを消費しつつ増殖することが知られている。これには、酸素の有無に関係なく、主に解糖系でエネルギーを産生するという、がん細胞の特性が関係している。この解糖に依存した形質は、Warburg 効果と呼ばれ、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異の結果として起こる。したがって、腫瘍内組織においては、グルコースの供給と需要のバランスが悪く、がん細胞はしばしばグルコース飢餓に曝される。そのため、エネルギー代謝と協調して起こるストレス適応機構を発動し、がん細胞自身の恒常性を維持する必要がある。

我々は、グルコース飢餓に対する細胞の恒常性維持機構を新しい標的として捉え、ストレス応答 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 の誘導を特徴とし、主として小胞体機能を強化するストレス応答として知られている。研究開始当時まで、グルコース飢餓選択的に UPR を抑制し抗腫瘍効果を示す化合物として、versipelostatatin (VST, J Natl Cancer Inst, 2004) や、メトホルミンなどのピグアナイド系糖尿病薬 (Cancer Res, 2009) さらに、アルクテゲニン (J Cell Physiol, 2010) などを見出し、これらの化合物の UPR 阻害にはミトコンドリア機能阻害が重要であることを明らかにしてきた。なお、メトホルミンやアルクテゲニンについては、現在抗がん剤としての臨床開発が進められており、臨床における抗がん作用と UPR 抑制作用との関係に興味の持たれるところである。

一方で、我々は、グルコース飢餓に対する細胞の恒常性維持機構には、ミトコンドリアに依存した、UPR の活性化に導く適応機構に加え、UPR の関与しないミトコンドリアに依存しない適応機構が存在することに気が付いた。本研究では、UPR だけではなく、エネルギー代謝と協調して起こるストレス適応機構に広く注目し、腫瘍内環境依存的にがん細胞を死滅させる治療法の開発のための基

盤を築くことを目的に計画された。

2. 研究の目的

がん細胞は一般にグルコース要求性が高いが、腫瘍内組織ではグルコースの供給が十分ではない。そのため、がん細胞が生存し増殖するためには、エネルギー代謝と協調して起こるストレス適応機構が重要な役割を果たす。本研究では、こうしたストレス適応機構の中で、がん細胞の生存に結びつく応答に注目する。具体的には、ミトコンドリアに依存した UPR の活性化に導く適応機構と、UPR の関与しないミトコンドリアに依存しない適応機構に分け研究を進める。そして、細胞生存に重要な制御分子を同定し、その機能解析を通じ、分子標的としての妥当性を検証することによって、腫瘍内環境依存的にがん細胞を死滅させる治療法開発のための基盤を築くことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、ストレス適応機構を制御する治療法開発の基盤を築くため、1) UPR 活性化に導く適応制御因子の探索と機能検証、2) UPR の関与しない適応制御因子の探索と機能検証 の研究を行い有望な分子標的候補を見つけ、3) 標的としての妥当性の検証と既知化合物を中心とした薬剤候補の探索の研究を推進する。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 活性化に導く適応制御因子の探索と機能検証： これまでに見出してきた UPR 阻害剤を活用し、UPR 阻害剤に対する耐性細胞を樹立することにより、未同定の真の標的分子や UPR 制御因子の探索を試みる。この際、ヒト遺伝子に対する網羅的な shRNA レンチウイルスライブラリーを用いるなどにより、効率化を図る。また、近年明らかにされつつある、ミトコンドリア 小胞体クロストークを制御する因子に注目し、siRNA を用いたノックダウンにより、UPR 制御に関与する因子の探索を行う。

2) UPR の関与しない適応制御因子の探索と機能検証： これまで樹立してきた、ミトコンドリア DNA を欠損した⁰細胞株や、グルコース飢餓に耐性を示す⁰変異株を活用し、ミトコンドリア非依存的な適応機構の制御因子の探索を行う。

3) 標的としての妥当性の検証と既知化合物を中心とした薬剤候補の探索： 上記の研究で探索、検証された個々の適応制御因子について、治療標的としての妥当性を検証するための機能評価を行う。具体的には、同定した適応応答の制御因子について、遺伝子発現情報等を活用して、適用がん種の選定を試みる。また、発現量の異なる複数の細胞株を用い、siRNA によるノックダウンの効果を検討し、

標的としての妥当性を検証する。同定した制御因子が酵素活性を有する場合は、酵素活性と機能との関係を検討するとともに、既存の阻害剤を用いた検討を行う。

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 活性化に導く適応制御因子の探索と機能検証： これまでに見出してきた UPR 阻害剤に対する耐性細胞を樹立することにより、未同定の真の標的分子や UPR 制御因子の探索を試みた。最初に、通常条件下でも UPR 阻害剤 VST に感受性を示す肺がん細胞株 DMS114 と DMS273 の 2 種を用い、耐性細胞株を樹立した。これらの耐性細胞について、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、2 種の細胞株で共通に発現の変化している遺伝子の抽出を行った。その結果、両細胞において共通して、薬剤輸送タンパク質が過剰発現していることを見出した。しかしながら、VST については、細胞外フラックスアナライザーを用いた解析から、ロテンノンなどの典型的なミトコンドリア呼吸鎖阻害剤とは明らかに異なるものの、呼吸に対する阻害的な影響を有することが明らかになっており、こうした活性が UPR 阻害活性につながるものと考えられる。そのため、細胞膜上に過剰発現する薬剤輸送タンパク質は、当該薬剤の細胞内の濃度を低下させることにより耐性に導くものと考えられ、標的と想定することは難しいと判断した。薬剤輸送タンパク質以外には共通に発現変動している遺伝子を見出すことができなかったことから、これらの耐性細胞株を用いた標的分子の探索は一旦中断し、下記の述べるように新たな耐性細胞の樹立へと進めた。

次に、グルコース飢餓環境下において UPR 阻害剤に耐性を示す細胞株の樹立を試みた。この際に、ヒト遺伝子に対する網羅的な shRNA レンチウィルスライブラリーを用いることとし、ヒト結腸がん HT-29 細胞を用いて、耐性細胞樹立のための条件検討を事前に行った。そして、shRNA レンチウィルスライブラリーを感染させた HT-29 細胞株について、UPR 阻害剤存在下でもグルコース飢餓環境下で生き残る細胞の濃縮を継続して行い、耐性化の評価を行った。しかしながら、グルコース飢餓環境下での UPR 阻害剤処理を 4~5 サイクル行ったが、十分に強い耐性を示す細胞を得ることができなかった。今後、さらに継続して耐性細胞の濃縮を行い、上記の耐性細胞と比較する等により、真の標的分子や新規 UPR 制御因子の同定につなげて行きたいと考えている。

耐性細胞樹立のアプローチに加えて、既存のミトコンドリア機能制御やミトコンドリア 小胞体のクロストーク、オートファジーに参与する分子などに注目して、50 以上の分

子に対する siRNA のフォーカスライブラリーを構築し、ヒト線維肉腫 HT1080 細胞を用い、グルコース飢餓等のストレス下で細胞を死滅させる因子の探索を行った。その結果、グルコース飢餓等に感受性化させる siRNA を 3 種類同定することに成功した。

一つ目の siRNA は、オートファジー制御因子 beclin1 や Vps34 を脱ユビキチン化する酵素 USP10 を標的とする siRNA であった。USP10 ならびに USP13 の阻害剤として同定された spautin-1 が入手可能であったので、USP10 siRNA と同様に、グルコース飢餓環境下での細胞毒性効果を有するか否かを検討した。その結果、spautin-1 は、これまでに見出してきた UPR 阻害剤と同様に、グルコース飢餓選択的に HT-29 や HT1080 細胞等の細胞死を誘導することが判明した。そこで、これらの知見に基づき、項目 3) の研究への展開を図った(下記参照)。

二つ目の siRNA は、がん代謝関連酵素の一つであり、ペントースリン酸経路の律速酵素 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) を標的とする siRNA であった。G6PD 阻害剤として報告されている化合物 CB70、CB72 及び CB83(Preuss Jet et al, J Biomol Screen, 2013) が入手可能であったので、G6PD に対する siRNA と阻害剤化合物の活性比較を行った。G6PD siRNA によってグルコース飢餓への感受性が増大するがん細胞株を用いて検討したが、いずれの G6PD 阻害剤もグルコース飢餓選択的な殺細胞効果を示さなかった。用いた G6PD 阻害剤の活性が弱いこともあり、今後、より強力な G6PD 阻害剤を用いた解析が必要であると考えられた。

三つ目の siRNA は、ミトコンドリアに局在し、ミトコンドリアの融合分裂を制御する膜型ユビキチンリガーゼ MARCH5 を標的とする siRNA であった。ヒットした MARCH5 siRNA は、グルコース飢餓条件下のみならず、ツニカマイシン等の他の小胞体ストレス条件下でも殺細胞効果を示すことが明らかになった。こうした作用は、これまでに見出してきた UPR 阻害剤と比べて作用スペクトラムが明らかに広く、大変興味深い siRNA と考えられた。しかしながら、異なる配列の複数の MARCH5 siRNA を用いて検証実験を進めたところ、他の siRNA ではストレス下での殺細胞効果が見られないことが判明した。その後、ストレス下で殺細胞効果を示す MARCH5 siRNA の真の標的を探索し、ある種のがん遺伝子が標的となっていることが明らかになった。これについては、現在、種々の配列の siRNA を用い、さらなる検証実験を進めている。

2) UPR の関与しない適応制御因子の探索と機能検証： 本研究項目では、グルコース飢餓環境や腫瘍内環境における細胞応答のうち、ミトコンドリア DNA を欠損し極度に解糖に依存した形質を示す⁰細胞株を用いた解析に焦点を当て、研究を進めた。また、ミト

コンドリア機能異常細胞の腫瘍内環境への適応機構を検討するため、HT-29 由来 β 細胞を用い、ヌードマウスへの移植実験を繰り返すことにより、in vivo での環境に適応した β /xngft 変異株を単離し、その性状解析や遺伝子発現解析を進めた。 β /xngft 変異株についての基本的な性状として、依然としてミトコンドリア DNA を欠損していること、GRP78 などの UPR マーカータンパク質の検討により、グルコース飢餓環境下での UPR 誘導能を欠損していることを確認した。さらに性状解析を進め、 β /xngft 変異株は、 β 細胞に比べて、グルコース飢餓に対し耐性を獲得していることを見出した。

これらの HT-29 由来 β 細胞、 β /xngft 変異株を用い、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、変異株においては、低酸素応答性遺伝子の一部が恒常的に高発現し、これと合致して、低酸素応答性遺伝子の転写因子 HIF-1 が恒常的に活性化していることを見出した。また、この恒常的な低酸素応答活性化に關与する新たな因子の同定に成功した(項目 3 に詳細を記載)。一方、興味深いことに、 β 細胞株では、低酸素下で転写因子 HIF-1 のタンパク安定化は誘導されるものの、それに見合った HIF-1 の転写活性の増大は認められないことが分かった。こうした低酸素下における HIF-1 転写活性誘導の消失は、 β 細胞、 β /xngft 変異株のいずれの細胞株においても見られた。そこで、種々のミトコンドリア阻害剤を用いて詳細に解析したところ、ミトコンドリア機能を有する親株細胞においても、低酸素状態での HIF-1 転写活性化にミトコンドリア呼吸鎖機能が必須の役割を果たすことが明らかになった。

3) 標的としての妥当性の検証と既知化合物を中心とした薬剤候補の探索: 上記の研究で見出した、グルコース飢餓等に高感受性化させる USP10 siRNA と USP10/USP13 阻害剤 spautin-1 を用いて、39 種のヒトがん細胞で構成される JFCR39 がん細胞パネルを用いた評価を実施し、標的としての妥当性の検証実験を進めた。その結果、siRNA と阻害剤とでは細胞特異性が異なることが明らかになった。これは、siRNA の導入効率の違いでは必ずしも説明できず、実際、spautin-1 による USP-10 阻害は、細胞レベルにおいて確認することは極めて困難であった。したがって、USP10 阻害以外の活性があるものと考えられ、spautin-1 の作用機序の詳細を検討することとした。

spautin-1 の細胞毒性については、グルコース飢餓選択的に HT-29 や HT1080 細胞等の細胞死を誘導することが明らかになった。これと合致し、グルコース飢餓選択的に UPR マーカーである GRP78/GRP94 の発現誘導を抑制した。また、これまでに見出してきた UPR 阻害剤と同様に、4E-BP-1 の脱リン酸化を誘導

することが確認された。次に、JFCR39 に対する spautin-1 の薬剤感受性データを活用し、既存の化合物との Compare 解析を行った結果、spautin-1 は、従来 UPR 阻害剤として見出してきた、ミトコンドリア呼吸鎖を標的とするプロルミン等のピグアナイド系化合物と類似性が高いことが明らかになった。そこで、セルフラックスアナライザーを用いた解析を行ったところ、がん細胞のミトコンドリア機能に対して spautin-1 が阻害活性を示すことが判明した。さらに、単離ミトコンドリアを用いた検証実験を進めた結果、spautin-1 が Complex I の活性を阻害することを見出した。呼吸鎖阻害は UPR 抑制機構の一つであることから、spautin-1 はミトコンドリア呼吸鎖阻害を介して、UPR 抑制作用を発揮しているものと考えられた。一方で、spautin-1 による USP-10 阻害が、グルコース飢餓選択的な細胞毒性や UPR 抑制にどの程度關与しているかについては、今後の課題としてさらなる検討の必要性が考えられた。

UPR の關与しない適応制御に係わる因子については、マイクロアレイによる遺伝子発現解析により β /xngft 変異株の恒常的な低酸素応答活性化に關与する因子として同定した、PMEPA1 (prostate transmembrane protein, androgen induced 1) に焦点を当て、研究を推進した。PMEPA1 は、変異株において恒常的に高発現しており、ノックダウンによって、変異株の HIF 転写活性が顕著に減弱することが明らかになった。興味深いことに、PMEPA1 ノックダウンは、親株である HT-29 細胞でも同様に HIF 転写活性を減弱することが明らかになった。また、PMEPA1 過剰発現によって、HIF 転写活性が増強されることも明らかになった。これらの結果から PMEPA1 は、ミトコンドリア呼吸鎖とは關係なく、HIF 転写活性に影響するものと考えられた。

興味深いことに、PMEPA1 の発現は、低酸素条件下で HIF 依存的に起こることが明らかになった。また PMEPA1 の発現が TGF- β シグナルで制御されることと合致し、低酸素による PMEPA1 の発現誘導は TGF- β シグナルの遮断によって阻害されることが判明した。さらに、TCGA データベースを活用し臨床検体における遺伝子発現についての情報解析を進めたところ、腫瘍での PMEPA1 発現と強く關する遺伝子として、TGF- β シグナルによって制御される遺伝子群とともに低酸素応答遺伝子群が明らかになった。今後、PMEPA1 の制がんの標的としての可能性について検討し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)

Tsukumo Y, Tsukahara S, Furuno A,

Iemura S, Natsume T, Tomida A. TBL2 Associates With ATF4 mRNA Via Its WD40 Domain and Regulates Its Translation During ER Stress. *J Cell Biochem*. 117:500-509, 2016. 査読有
doi: 10.1002/jcb.25301.

Tsukumo Y, Tsukahara S, Furuno A, Iemura S, Natsume T, Tomida A. The endoplasmic reticulum-localized protein TBL2 interacts with the 60S ribosomal subunit. *Biochem Biophys Res Commun*. 462:383-388, 2015. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.144.

Mashima T, Ushijima M, Matsuura M, Tsukahara S, Kunimasa K, Furuno A, Saito S, Kitamura M, Soma-Nagae T, Seimiya H, Dan S, Yamori T, Tomida A. Comprehensive transcriptomic analysis of molecularly targeted drugs in cancer for target pathway evaluation. *Cancer Sci*. 106:909-920, 2015. 査読有
doi: 10.1111/cas.12682.

Tsukumo Y, Tsukahara S, Furuno A, Iemura S, Natsume T, Tomida A. TBL2 is a novel PERK-binding protein that modulates stress-signaling and cell survival during endoplasmic reticulum stress. *PLoS One*. 9:e112761, 2014. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0112761.

Ushijima M*, Mashima T*, Tomida A*, Dan S, Saito S, Furuno A, Tsukahara S, Seimiya H, Yamori T, Matsuura M*. (*equally, +corresponding)
Development of a gene expression database and related analysis programs for evaluation of anticancer compounds. *Cancer Sci*. 104:360-368, 2013. 査読有
doi: 10.1111/cas.12071.

[学会発表](計 18 件)

国政和宏、旦慎吾、矢守隆夫、富田章弘 : USP10/USP13 阻害剤 Spautin-1 のグルコース選択的な殺細胞効果、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 9 日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

土岐珠未、岡本有加、永澤生久子、富田章弘 : 小胞体ストレス下における幹細胞マーカー分子 LGR5 及び CD44 の発現変動、第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2015 年 6 月 11 日、松山全日空ホテル(愛媛県・松山市)

小井土大、芳賀直実、塚原里美、佐藤重

男、富田章弘 : 嫌気的環境下においてミトコンドリアを介して活性化する HIF-1 の新たな転写活性制御機構、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

富田章弘、築茂由則、塚原里美 : がん微小環境標的治療の分子標的としての新規ストレス応答 UPR 制御因子 TBL2、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

富田章弘 : 細胞内ストレス_がん細胞の特徴的代謝とストレス応答、第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2013 年 6 月 14 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

[図書](計 2 件)

富田章弘(日本臨床腫瘍学会編) 南江堂、新臨床腫瘍学改訂第 4 版、1-5 細胞死、2015、p.26-29

富田章弘、日本臨床社、日本臨床増刊号最新がん薬物療法学、ビッグアノイド系薬の抗腫瘍効果、2014、p.673-677

[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