

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25670615

研究課題名(和文)糖代謝を新規標的としたがん幹細胞制御によるグリオブラストーマ根治への挑戦

研究課題名(英文) A daring attempt to cure glioblastoma by targeting glucose metabolism as a novel target to control glioma stem cells

研究代表者

北中 千史 (Kitanaka, Chifumi)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70260320

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：がんではしばしば糖代謝の亢進が認められるが、亢進した糖代謝ががん細胞にとってどのような意義があるかについてはまだ不明な点が多い。本研究課題では糖代謝がグリオーマ幹細胞の維持に重要な役割を果たしているという作業仮説の検証を試みた。グリオーマ幹細胞において糖代謝に関与していると考えられている細胞内分子の機能を抑制したところ、グリオーマ幹細胞の幹細胞としての性質が影響を受けている可能性を示唆する所見が得られ、糖代謝がグリオーマ幹細胞の維持に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Increased glucose metabolism often occurs in human cancers, the significance of which for cancer cells remains mostly unclear. In this project, we conducted experiments to test the working hypothesis that glucose metabolism has an essential role in the maintenance of glioma stem cells. The results suggested that inhibition of an intracellular molecule presumed to be involved in glucose metabolism might affect the stemness of glioma stem cells, in support of the idea that glucose metabolism is involved in the maintenance of glioma stem cells.

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：glioma-initiating cell

1. 研究開始当初の背景

近年、がん治療の重要なターゲットとしてがん幹細胞が注目を集めている。がん幹細胞は腫瘍細胞の「ごく一部に相当する小集団」であるが、治療抵抗性と腫瘍形成能を併せ持っているため治療後再発の原因となっており、「がんの治療を阻む最大要因」と考えられる。従ってヒトがんの中でも難治を極めるグリオブラストーマの「根治」を実現するうえで、この少数細胞集団であるグリオブラストーマ幹細胞の制御が必須不可欠のプロセスであることが認識されるようになってきた。

これまでに我々はグリオブラストーマ幹細胞維持に関わる分子機構の解明に取り組み、ごく最近、2型糖尿病治療薬である metformin が細胞内代謝調節のマスター制御分子である AMPK の活性化を通じてグリオブラストーマ幹細胞の分化を誘導し、腫瘍形成能を抑制することを明らかにした。極めて重要なことに、AMPK はグルコース代謝のみならず脂肪酸やコレステロールといった脂質代謝等にも関わっているが、今回我々は細胞外グルコース濃度が AMPK 活性化への影響を通じてグリオブラストーマ幹細胞の維持に直接関与していることを見出した。これはグリオブラストーマに限らず、他のがん種を含めてもがん幹細胞に関する世界に先駆けた発見である。

一方我々は、全く別のアプローチから JNK の活性がグリオブラストーマ幹細胞の維持に必須の役割を果たしていることを発見し、JNK 阻害薬が in vivo においてグリオブラストーマ幹細胞の腫瘍形成を抑制し優れた治療効果をもつことを世界に先駆けて報告した(詳細は後述)。興味深いことに、JNK は糖尿病発症への関与が指摘されており、JNK 阻害薬は糖尿病治療薬候補としても注目を集めている(Bennett BL: JNK: a new therapeutic target for diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 3:420, 2003)。全くの偶然ではあるが、これらの我々独自の先駆的な発見は「糖代謝ががん幹細胞(グリオブラストーマ幹細胞)制御に中心的な役割を果たしている」という新たなコンセプトを生み出すとともに、糖代謝を直接的としたグリオブラストーマ幹細胞治療に初めて理論的根拠を与えるものとなった。

ところで我々はこれまで幹細胞制御を通じたグリオブラストーマの根治を目標に研究を進めてきた。その結果これまでに幹細胞マーカー CD133 の発現がグリオブラストーマの播種リスクの予測に有用であること(*Neurosurg Rev* 33:175, 2010)、従来直列的にシグナルを伝達すると考えられてきた PI3K と mTOR が予想外なことに神経幹細胞では並列かつ redundant な様式で幹細胞維持に寄与していること(*Neurosci Lett* 470:115, 2010)、グリオブラストーマ幹細胞でも同様な機序で PI3K と mTOR が幹細胞維持に働いており、PI3K と mTOR の同時阻害により初めて効率

よく幹細胞形質/造腫瘍能が抑制されること(*Neuro-Oncol* 12:1205, 2010)、MAPK 経路も PI3K/mTOR 経路と redundant な様式でグリオブラストーマ幹細胞維持に関わっているが、両経路間に存在する相互抑制的なフィードバックメカニズムにより一方の阻害のみでは他方の活性化が生じるため、両経路の同時阻害にてより効率的に幹細胞形質/造腫瘍能が抑制されること(*Stem Cells* 28:1930, 2010)、MAPK および PI3K 経路からのシグナルを受けて幹細胞を制御している転写因子が FoxO3a であること(*Stem Cells* 29:1327, 2011)、MAPK 経路がグリオブラストーマ幹細胞の MGMT 発現制御を介してテモゾロミド抵抗性を賦与していること(*Stem Cells* 29:1942, 2011)などを相次いで見出した。さらにごく最近、グリオブラストーマ幹細胞分化のカギを握る転写因子 FoxO3a の活性化薬として2型糖尿病治療薬 metformin を見出し、metformin が AMPK 依存的な FoxO3a 活性化を通じてグリオブラストーマ幹細胞の分化を誘導し、効果的に腫瘍形成能を抑制することを明らかにした。Metformin は血液脳関門を効率よく通過することが以前から知られているが、実際我々はマウス脳腫瘍モデルを用いた in vivo 実験において metformin がグリオブラストーマ幹細胞を制御することにより顕著な生存期間延長効果をもたらすことを確認した(*Stem Cells Transl Med* 1:811, 2012)。重要なことに我々は、細胞外グルコース濃度の低下が metformin による AMPK 活性化を促進し、metformin によるグリオブラストーマ幹細胞抑制効果を増強することも同時に明らかにしている。これまでも metformin が(他のがん種の)がん幹細胞に対して抑制的に作用するとの報告があるが、その分子機構や細胞内代謝との関わりは全く未解明であった。これに対して我々は metformin の効果が AMPK-FOXO3a 経路を介するものであること、そしてグルコース代謝ががん幹細胞制御に直接的影響を及ぼしている可能性があることを世界に先駆けて示したことになる。

一方我々は上記一連のプロジェクトとは別個にグリオブラストーマの幹細胞と分化細胞の間で発現や活性のレベルが異なる分子の探索を行い、そのような分子の一つとして JNK を見出した。JNK はグリオブラストーマ幹細胞で共通に活性化しており、JNK 阻害薬は in vitro のみならず脳実質内を含む in vivo においてもグリオブラストーマ幹細胞の腫瘍形成能を抑制し、マウス脳腫瘍モデルで優れた生存期間延長効果を示した(*Sci Rep* 2:516, 2012)。全くの偶然ではあるが、前頁に記載のごとく、JNK は糖尿病発症との関連が指摘されており、JNK 阻害薬は新たな糖尿病治療薬候補として注目されている。

以上のような世界に先駆けた我々独自の実験的事実は、グルコース代謝そのものががん幹細胞制御に深く関わっている可能性を示唆するものであると同時に、グルコース代

謝を標的とする治療ががん幹細胞（本研究ではグリオブラストーマ幹細胞）制御を通じてがん根治療法に寄与するという考えに世界で初めて実験的根拠を与えるものとなった。これまでもグルコース代謝を標的としたがん治療は多く検討されてきたが、未だ著しい成功はおさめていない。このような状況は我々の仮説により容易に説明される。すなわちグルコース代謝ががん幹細胞特異的に寄与しているならば、腫瘍全体を治療標的としたグルコース代謝標的治療はむしろ不首尾に終わるはずである。このように同じ糖代謝標的治療でも我々の提唱するがん幹細胞標的治療は従来の単純なグルコース代謝標的がん治療と本質的に異なるものである。

以上のようなことから、本課題では続く研究目的の項に記す仮説検証を行うため、課題申請を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では「糖代謝ががん幹細胞制御に重要な役割を果たしており、がん幹細胞治療の有力な標的となる」という新規概念に実験的根拠を与えることを目的とする。

## 3. 研究の方法

グリオブラストーマ幹細胞維持における糖代謝の役割について検討を行うため、まず糖代謝に関わる細胞内分子の阻害薬や siRNA を用いて糖代謝を抑制し、幹細胞マーカーや分化マーカーの発現等について調べた。糖代謝抑制（細胞内 ATP の減少、ADP/AMP の増加）の程度はリン酸化 AMPK の発現を検討することにより行った。また、ヌードマウスへの移植実験により、糖代謝抑制がグリオブラストーマ幹細胞の腫瘍形成能に与える影響についても検討を行った。

## 4. 研究成果

糖代謝に関わると考えられているある種の細胞内分子に対する薬理的阻害薬を用いて当該分子の機能抑制を試みたところ、AMPK の活性化（リン酸化 AMPK の発現亢進）が観察され、この分子の抑制が効率よくグリオブラストーマ幹細胞内の ATP を枯渇させ、ADP/AMP を増加させていることが推察された。このような条件下で種々のパラメータにつき検討を行ったところ、当該分子の抑制により幹細胞状態が影響を受けている可能性を示唆する所見が得られた。そこでこのような変化が薬理的阻害剤の off-target 効果によるものではなく、実際に当該分子の機能変化により生じているものかを確認するため、当該分子をコードする遺伝子に対する siRNA を用いてノックダウン実験を開始した。すでに当該分子のノックダウンが確認できる siRNA 導入条件を確立している。

## 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）\* 研究課題に関連して研究期間中に発表した主な論文、学会発表を列記

〔雑誌論文〕(計 5 件)

- 1) JNK contributes to temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via regulation of MGMT expression. Okada M, Sato A, Shibuya K, Watanabe E, Seino S, Suzuki S, Seino M, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C. *Int J Oncol* 2014;44:591-599 (査読有)
- 2) Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. Sato A, Okada M, Shibuya K, Watanabe E, Seino S, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C. *Stem Cell Res* 2014;12:119-131 (査読有)
- 3) Specific role of JNK in the maintenance of the tumor-initiating capacity of A549 human non-small cell lung cancer cells. Okada M, Shibuya K, Sato A, Seino S, Watanabe E, Suzuki S, Seino M, Kitanaka C. *Oncol Rep* 2013;30:1957-1964 (査読有)
- 4) Resveratrol promotes proteasome-dependent degradation of Nanog via p53 activation and induces differentiation of glioma stem cells. Sato A, Okada M, Shibuya K, Watanabe E, Seino S, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C. *Stem Cell Res*. 2013;11:601-610 (査読有)
- 5) Kitanaka C, Sato A, Okada M: JNK signaling in the control of the tumor-initiating capacity associated with cancer stem cells.

Genes Cancer 2013;4:388-396 (査読有)

[学会発表](計 9件)

- 1) 北中千史: 臨床応用を目指したがん幹細胞研究 ～グリオーマ幹細胞を題材として～. 第23回泌尿器科分子・細胞研究会特別セミナー, 山形(霞城セントラル); 2014年3月15日
- 2) 北中千史: 臨床応用を見据えた悪性脳腫瘍がん幹細胞研究～がん根治療法開発を目指して～. 第6回秋田脳腫瘍セミナー特別講演, 秋田(イヤタカ); 2013年11月15日
- 3) 佐藤篤, 岡田雅司, 渋谷慶太, 清野静香, 成田善孝, 渋井壮一郎, 北中千史, 嘉山孝正: レスベラトロールによる Nanog-p53 経路を介したグリオーマ幹細胞の制御. 第14回日本分子脳神経外科学会, 横浜(パシフィコ横浜); 2013年10月19日
- 4) 佐藤篤, 岡田雅司, 成田善孝, 渋井壮一郎, 北中千史, 嘉山孝正: メトホルミンによる AMPK-FOXO3 経路を介したグリオーマ幹細胞の制御. 日本脳神経外科学会第72回学術総会, 横浜(パシフィコ横浜); 2013年10月17日
- 5) 岡田雅司, 渋谷慶太, 佐藤篤, 鈴木修平, 清野学, 北中千史: A549 非小細胞肺癌細胞の腫瘍形成能維持における JNK の特異的な役割. 第72回日本癌学会学術総会, 横浜(パシフィコ横浜); 2013年10月3日
- 6) 北中千史: がん予防の今とこれから、そして未来のがん治療～がん幹細胞を標的とする新たながん治療の開発を目指して～. 日本体力医学会東北地方会第22回大会, 山形(山形県立保健医療大学); 2013年6月8日
- 7) 北中千史: 治療への応用を目指したグリオーマ幹細胞研究 --アップデート--.

第46回東北脳腫瘍研究会研究会特別講演, 仙台(江陽グランドホテル); 2013年4月6日

- 8) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第8回脳腫瘍の基礎シンポジウム特別講演, 東京(大手町サンケイプラザ); 2013年3月2日
- 9) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第2回 Multidisciplinary Meeting on Atherosclerosis 特別講演, 仙台(仙台トラストシティ); 2013年1月5日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北中 千史 (KITANAKA CHIFUMI)  
山形大学・医学部・教授  
研究者番号: 70260320