

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430108

研究課題名(和文) デオキシグルコースとABT-263による細胞死誘導のメカニズム

研究課題名(英文) The molecular mechanism of 2deoxyglucose-ABT-263 induced apoptosis

研究代表者

山口 龍二 (YAMAGUCHI, Ryuji)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：70646538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：デオキシグルコース(2DG)とABT-263(ABT)という二つの薬を体内に投与するとグルコース代謝が進んでいる細胞でストレスがかかり、さらにABTを投与すると相乗的相互作用が働き細胞死に誘導されます。体内でグルコースの代謝が進んでいるのは過剰な運動をしたときの筋肉細胞、脳細胞、そしてがん細胞ですが、ABTは脳・血管関門を通れないため通常細胞死に誘導されるのはがん細胞だけです。しかしこの治療の効率は腎癌で低いのでその理由を解明すると、腎癌ではAKTが異常に活性化し、細胞死を抑制していました。AKTをbeta-cyclodextrinで抑制すると2DG-ABTの効率が上がりました。

研究成果の概要(英文)：2-DG is taken-up by highly glycolytic cells such as muscle cells under heavy exercise, brain cells and cancer cells. Since ABT cannot cross the blood-brain barrier, only cells exposed to both agents under normal treatment conditions are cancer cells, and these are only cells that are induced into apoptosis. However, 2DG-ABT combination was less effective in renal cancer cells. We discovered that highly activated AKT was the reason for the resistance in these cancer cells. When we inhibited AKT by beta-cyclodextrin, 2DG-ABT became more effective.

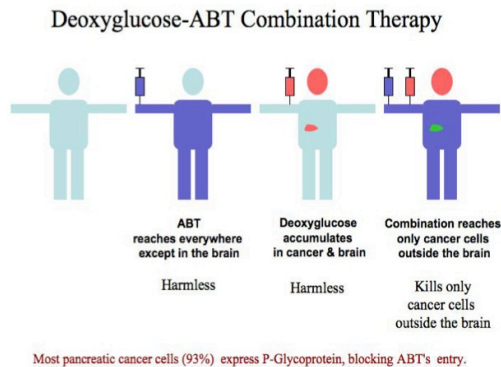
研究分野：腫瘍学

キーワード：腎癌 デオキシグルコース ABT-263 AKT beta-cyclodextrin アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

2-デオキシグルコース・ABT-263 コンビネーション治療の開発

手術または化学療後に残されたがん細胞は、がんの再発を引き起こす可能性がある。よって化学療法の目標は、すべてのがん細胞を排除することだと我々は考える。腫瘍中のがん細胞の異常な不均一性を考えると、特定の遺伝子産物を標的とする1つの薬剤で全てのがん細胞を排除することは困難である。これを克服するために、我々は2-デオキシグルコース(2DG)とABT-263(ABT)でがん細胞を細胞死に誘導する併用療法を開発した。2DG, ABTそれぞれ単一では細胞死誘導効果がみられず現在単一では抗がん剤として使用されていないが、この二剤を併用すると相乗作用により二つの薬を取り込んだ細胞に効率よく細胞死が誘導されることを我々は発見した。ちなみに2DGを取り込むのは解糖系の活性化が進んでいる細胞、つまり体内では過剰な運動をした後の筋肉細胞、炎症を起こしている組織の細胞、がん細胞、そして脳の細胞である。これとは対照的にABTは脳血管関門を超えられない。よって過剰な運動を避け炎症を制御すれば、体内で両方の薬を取り込み細胞死に誘導されるのは脳の外にあるがん細胞に限定できる - (Yamaguchi et al, *PLoS One* (2011); Yamaguchi & Perkins, *Cancer Res* (2012))



2. 研究の目的

2DG-ABT のコンビネーションは腎癌由来の細胞と膵臓がん由来の細胞で低かった為、その理由を研究しました。

3. 研究の方法

腎癌由来の細胞はVHLという遺伝子が欠如しているため常に低酸素で誘導される因子が活性化されています。そのため低酸素チャンバーを使い2DG-ABTの効果を調べました。

4. 研究成果

腎癌においてのシグナル伝達経路の分析 - その1

2DG-ABT の細胞死誘導効果は前立腺がん由来のPPC-1や乳癌由来のMCF-7細胞で一度の薬剤処理で94%を超えるが、腎癌由来のRCC4等の細胞では50%に満たない。その理由の一つにはこれらの細胞ではVHLが遺伝子から欠如しており細胞が通常酸素濃度下でも擬似的に低酸素反応をおこしている為と考えられた。実際にこれらの腎癌由来の細胞や、これらの細胞にVHLを発現させた細胞で2DG-ABTの効果をみるとVHLを発現している細胞では2DG-ABTによって効率よく細胞死が誘導され、VHLが発現されていない細胞では効率が低い事が解った。その一方2DG-ABTの効率はどの細胞でも酸素濃度によって数値が大きくかわる事はなかった。つまりVHLの細胞死へ影響は細胞がおかれた酸素分圧に依存するのではなくVHLの別の機能によるものと推定された。VHL蛋白に酸素反応とは無関係に働く機能があるかデータベースを検索するとVHLが欠如している細胞ではインスリン様増殖因子1受容体(IGF1R)が低酸素下でも通常酸素下でも安定化されるという報告があった。我々もウエスタン・ブロッティングでこの事を確認した。そしてsiRNAでIGF1Rの発現をおさえるとVHLの欠如している細胞でも2DG-ABTが効率よく細胞死を誘導した。さらにIGF1R特異的阻害剤を加えると2DG-ABTの効果が飛躍的に上昇した。これらの結果からVHLが欠損している細胞ではIGF1Rが安定化し2DG-ABTの効果を妨げている事がわかった。

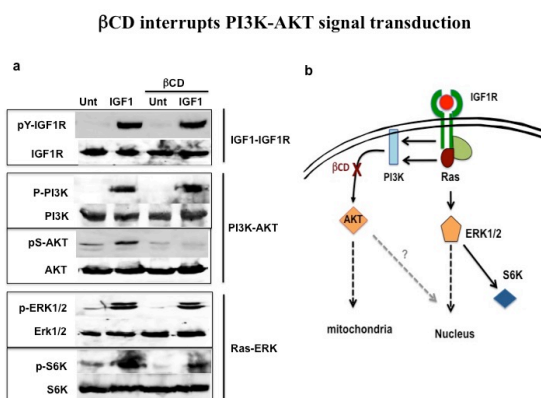
腎癌においてのシグナル伝達経路の分析 - その2

がん腫瘍は細胞株からつくった腫瘍と違い多種多様に変異した細胞の集団である。たとえば腎癌の腫瘍の大多数の細胞でVHLが欠如しIGF1Rの蛋白が安定化している、腫瘍のなかにはEGFRやIGF1Rを発現している細胞もあることが知られている。こうした受容体型チロシン・キナーゼ(RTK)はIGF1Rと同等のシグナルを活性化でき、よってIGF1R阻害剤はこうした細胞には効果がなく、これがPicropodophyllin等のIGF1R阻害剤が臨床試験であまり効果を見せていない理由のひとつと考えられる。よって我々はRTKから発信されるシグナルを解析し、その下流にターゲットを探した。RTKからはRas-ERK増殖シグナルとPI3K-AKTプロサバイバル・シグナルの両方が発信されている。ERK特異的阻害剤もしくはPI3K特異的阻害剤を2DG-ABTに加えるとPI3K阻害剤だけが2DG-ABTの効果を高めた。よってVHLが欠如している細胞で

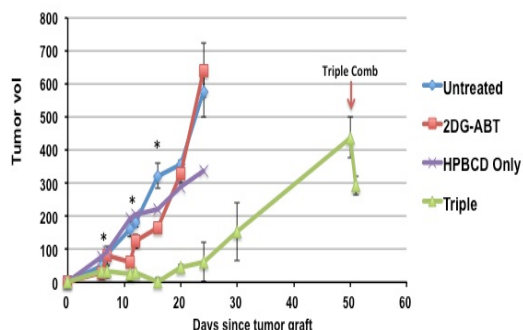
は IGF1R が安定し PI3K-AKT シグナルが発生し、2DG-ABT の効果を抑制していると考えられる - (Yamaguchi et al, Accepted for publication in *Tumor Biology* (2016))。

PI3K-AKT 阻害剤, b-cyclodextrin (bCD) の開発

PI3K-AKT はおおくの健康な細胞でも活性化しているので、その阻害剤の殆どは体内で多大な副作用をもたらす。我々は bCD が細胞外膜からコレステロールを除去することで PI3K と AKT の間のシグナルを遮断し AKT の活性化を阻害できる事を発見した。



しかし動物の体内で bCD の効果が持続するのは我々の開発したプロトコールで測定すると数時間であった。この数時間の間に細胞死を誘導するには 2DG を最初に投与し、その 90 分後に bCD, さらにその 30 分後に ABT を投与すると腎癌由来のがん細胞を細胞死に効率よく治療できることを、マウスを用いた実験で証明した。しかしこのコンビネーションではマウスの腫瘍は縮小されても多数の治療をうけたネズミが Cachexia になった。その理由は現時点では不明である - (Yamaguchi et al, *Febs Lett* (2015))



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 2 件)

- (1) Targeting cholesterol with beta-cyclodextrin sensitized cancer cells for apoptosis, Ryuji Yamaguchi, Guy Perkins, Kiichi Hirota, *Febs Letters* **589** (2015) 4097-4105
査読有り
- (2) VHL deficient renal cancer cells gain resistance to mitochondria-activating apoptosis inducers by activating AKT through the IGF1R-PI3K pathway, Ryuji Yamaguchi, Hiroshi Harada, Kiichi Hirota, Accepted for publication in *Tumor Biology* (2016) (2015 年度)
査読有り

[学会発表] (計 2 件)

- (1) 第 38 回日本分子生物学会年会
神戸ポートアイランド国際会議場
2015/12/03 口頭発表セッション
3T21p15
『コレステロールとシグナル伝達』
- (3) アメリカがん学会総会
American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015
Philadelphia Convention Center, PA, USA
#3808 Targeting cholesterol for increased chemotherapeutic efficacy
- (4) 第 73 回日本癌学会学術総会
パシフィコ横浜
2016/9/26 オラルセッション
E13-1:E-2068
『受容体型チロシンキナーゼを一時的に制御してデオキシグルコース・ABR263 の細胞死誘導作用をたかめる』

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
(準備中。)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 龍二 (YAMAGUCHI, Ryuji)
関西医科大学・医学部・研究員
研究者番号：70646538

(2) 研究分担者

広田 喜一 (HIROTA, Kiichi)
関西医科大学・医学部・准教授
研究者番号：002836