

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013087

研究課題名（和文） がん細胞の低酸素低栄養適応反応の分子機構の研究

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of adaptive response of cancer cells to deprivation of both oxygen and nutrient

研究代表者

江角 浩安 (ESUMI HIROYASU)

国立がんセンター（研究所及び東病院臨床開発センター）・東病院、臨床開発センター・  
院長

研究者番号：70160364

研究成果の概要（和文）：

がん細胞は、過剰な増殖への内在的圧力に血管新生を含めた組織の再構築が伴わず、恒常的な低酸素・低栄養状態に曝されている。これが血管新生能をがん悪性化の決定要因と考える根拠である。しかし実際のヒトの腫瘍は、多くのものが依然として血流が少なく極めて強い低酸素にさらされている。我々は、特に臨床的に hypovascular として知られる血流の少ないがんでは、がん細胞自身が酸素や栄養の飢餓に耐性になっていることを見出した。本研究は、この低酸素・低栄養状態でがんが獲得した栄養飢餓耐性のメカニズムを解明することである。この研究で、1) 正常細胞も低酸素状態にするとグルコース欠乏による細胞死に抵抗性になること、2) AKT, AMPK などのタンパクキナーゼが関与すること、3) 新規 AMPK 関連キナーゼとして ARK5 を見出し、これが栄養飢餓耐性と、がんの浸潤転移の双方に関与する、4) 低酸素・低グルコース条件ではオートファジーが生存に寄与する事、5) この条件下では嫌氣的呼吸としてのフマル酸呼吸が起こる事を生化学的・分子生物学的に証明した。6) またヒトのがん組織のメタボロミクス解析で、これらの特殊な呼吸が起こっている可能性を検証できた。正常組織では持続する血流不足は起こらない。従って、本研究で明らかにした反応は、がん組織に特異性が高くこれを標的とするれば世界に例のない新しい治療法となる。

研究成果の概要（英文）：

Molecular and biochemical mechanisms of adaptive responses of cancer cells to deprivation of both oxygen and nutrient, which mimics tumor microenvironment of hypovascular tumors have been analyzed. In this series of experiments we have found following. 1) Tumor cells especially those from hypovascular tumor show resistance to hypoglycemia and even normal cells can be converted resistant to glucose deprivation by hypoxic condition. 2) AMPK AKT and AMPK-related kinases are involved in the response. 3) These molecules are involved in invasion and metastasis. 4) Under deprivation of nutrient and oxygen, autophagy is involved in cell survival. 5) Anaerobic energy production through fumarate respiration was found to be induced and operated by deprivation of both oxygen and glucose. 6) The metabolomic analysis of human cancer tissues strongly suggested anaerobic energy production through fumarate respiration. The present results opened a way to develop a novel strategy to treat cancer by targeting cancer cells' adaptation to their microenvironment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	8,600,000	0	8,600,000
2006年度	8,600,000	0	8,600,000
2007年度	8,600,000	0	8,600,000
2008年度	8,600,000	0	8,600,000
2009年度	8,600,000	0	8,600,000
総計	43,000,000	0	43,000,000

研究分野：発がん

科研費の分科・細目：染色体動態異常と発がん

キーワード：(1) 低酸素・(2) 腫瘍血流・(3) エネルギー代謝・(4) 栄養欠乏・(5) ARK5

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の低酸素反応とがん進展における役割に関する研究が、世界的に盛んであった。がん組織の低酸素に対する反応の解析は転写因子 HIF-1、血管新生反応を中心に進んでいた。しかし生体が如何にエネルギーを得ているかという問いには、解糖系の亢進以外には説明されていなかった。がん組織の低酸素には多くの場合低栄養が付随するため、解糖系の活性化だけで説明するのは困難である事を我々が問題提起をした。がん細胞は glutaminolysis, serinolysis の活性が強いことが指摘されているがこれらは有酸素反応であり、低酸素でのメカニズムは全く解析されていない。我々の視点の独創性は、腫瘍の血流不足に対する適応反応を低酸素と低栄養双方に対する反応と捉える点にある。また、がんの進展をこのような血流不足を伴う微小環境に対するがん細胞の適応反応と選択の過程と捉える独自の視点にあった。つまり、血流が不足する発がん過程の環境下でのがん細胞の生存への選択圧力と浸潤・転移能の獲得という過程を統一的に把握する考え方を提出した。一方、正常組織では腫瘍組織のごとく慢性的に血流が不足しないように生理反応が起こる。上に述べた血流不足に対する恒常的反応は従って腫瘍に特異性があり治療法の開発に直接つながる意義があると考え創薬への道を探った。実際、上に述べた反応を阻害する物質を発見しこれらが抗腫瘍性があることを見出している。

2. 研究の目的

がん細胞が最初の遺伝子・形質変化を遂げて以降長いがん化の過程で、過剰な増殖への内在的圧力に血管新生を含めた組織の再構築が伴わず、恒常的な低酸素低栄養状態に曝さ

れている。これが血管新生能をがん悪性化の決定要因と考える根拠である。しかし実際のヒトの腫瘍は膵臓がんを典型に、多くのものが依然として血流が少なく極めて強い低酸素にさらされている。我々は、特に臨床的に hypovascular として知られる血流の少ないがんでは、がん細胞自身が酸素や栄養の飢餓に耐性になっていることを見出した。この性質は1) 正常細胞を低酸素状態にするとグルコース欠乏による細胞死に抵抗性になること、2) AKT, AMPK などのタンパクキナーゼに依存することなどから生理的な反応ががん化の過程で固定化したものらしいことを見出した。正常組織では血流不足による飢餓耐性反応は通常必要ではない。本研究では、このがんの特異性の強い性質の生化学的機構及びそれを支える遺伝子群及びその働きを明らかにすることにより、これを標的とした治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

栄養飢餓を細胞が認識するメカニズムに関する研究は、PI3 キナーゼが関与することは解明し得たが、どのような受容体あるいはセンサーが存在あるいは関与するのかという点に関しては未だ解明し得ていない。低栄養に対する耐性を解除する薬剤を既に見出しており、これらの一部は、PI3 K系を阻害する事が分かっている。これらの作用点を解明する事で PI3K より上位のセンサーに近い分子が同定できる可能性が高い。栄養飢餓に対する耐性を指標として各種の分子のシグナル伝達への関与を解明する。一方、低酸素低栄養でがん細胞が如何にエネルギーを獲得するのかという点に関しては、培養がん細胞のモデル実験、及びヒトの手術材料を用いたメタボローム解析と、生化学的

解析を用いる。

#### 4. 研究成果

これまで5年間の研究で、1) 正常細胞も低酸素状態ではグルコース欠乏に抵抗性になること、2) この反応には AKT, AMPK、AMPK-related kinases などが関与すること、3) がん細胞が栄養飢餓状態におかれたとき、オートファゴソームが盛んに形成され、その形成阻害或いは最終段階のタンパク質の分解抑制をすると細胞が栄養飢餓に感受性が増すこと、4) 間質を分解すると MMP が多分子種誘導される事を明らかにした。飢餓状態でのがん細胞の生存という観点からの研究だが、このプロセスで活性化される分子は浸潤・転移能の獲得というがんの悪性化と多くが重なる。がんの微小環境が悪性化の原動力・選択圧である事の証明ともいえる。さらに、微小環境下でがん細胞がどのようにしてエネルギーを獲得するのかに関し生化学的・メタボロミクスの検討を行った。ヒト膵臓がん細胞株を低酸素低グルコース環境下で培養すると、1) ミトコンドリア画分では電子伝達系複合体 II であるコハク酸脱水素酵素活性が徐々に減少し、その逆反応のフマル酸還元酵素活性が徐々に高くなる事を見出した、2) この事を裏づける事実は細胞や培養液をメタボロミクス解析した場合にも観察され、低グルコース低酸素下ではコハク酸が顕著に増加した。がん細胞が超低酸素下でフマル酸呼吸をする事を示唆する。3) ヒトの手術材料をメタボロミクス解析すると顕著な特徴があった。まず、嫌氣的解糖の基質であるグルコースは、大腸がん組織では周囲の非がん組織粘膜と比較し5分の1から10分の1であった。同様の解析を胃がん組織でおこなうと2分の1から5分の1で平均で3分の1程度であった。特に大腸がん組織ではグルコースが枯渇している事が分かった。その原因を推測すると、がん組織の嫌氣的解糖の中間代謝産物が平均で1.2から2倍であったが、嫌氣的解糖の最終段階であるピルビン酸はがん組織で低く期待通り乳酸はがん組織で約2倍であった。興味深いのは、TCA サイクルの中間産物で、クエン酸から $\alpha$ ケトグルタル酸までは大腸がんでは殆ど検出されなかった。しかし、コハク酸、フマル酸、リンゴ酸はがん組織で顕著に高かった。この事は、培養細胞で観察し証明した嫌氣的呼吸であるフマル酸呼吸が働いている事を強く示唆した。4) 補酵素として働くキノンの生合成系に関しては、合成系酵素が好氣的条件と嫌氣的条件でアイソザイム複合体の変換がおきている事を見出した。

本研究でがんの特異性の高い性質の生化学的機構及びそれを支える遺伝子群及びその働きを明らかにすることにより、これを標

的とした治療法の開発が現実的になると考えられ、これは世界に例のない新しい治療法となる。

#### 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 27 件)

- (1) Lu J, Imamura K, Nomura S, Mafune K, Nakajima A, Kadowaki T, Kubota N, Terauchi Y, Ishii G., Ochiai A, Esumi H, and Kaminishi M. Chemopreventive effect of peroxisome proliferators activated receptor gamma on gastric carcinogenesis in mice. *Cancer Res.* 65(11):4769-74, 2005
- (2) Minchenko OH, Ochiai A, Opentanova IL, Ogura T, Minchenko DO, Caro J, Komisarenko SV, Esumi H. Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie.* 87(11):1005-10, 2005.
- (3) Suzuki A, Iida S, Kato-Uranishi M, Tajima E, Zhan F, Hanamura I, Huang Y, Ogura T, Takahashi S, Ueda R, Barlogie B, Shaughnessy J Jr., and Esumi H. ARK5 is transcriptionally regulated by the Large-MAF Family and mediates IGF-1-induced cell invasion in multiple myeloma; ARK5 is a new molecular determinant of malignant multiple myeloma. *Oncogene* 24:6936-44, 2005.
- (4) Minchenko OH, Ogura T, Opentanova IL, Minchenko DO, Esumi H. Splice isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4: expression and hypoxic regulation. *Mol Cell Biochem.* 280(1-2):227-34. 2005.
- (5) Zaidi SF, Awale S, Kalauni SK, Tezuka Y, Esumi H, Kadota S. Diterpenes from "Pini Resina" and their preferential cytotoxic activity under nutrient-deprived condition. *Planta Med* 72(13):1231-4 2006.
- (6) Masuda T, Ohba S, Kawada M, Osono M, Ikeda D, Esumi H, Kunimoto S. Antitumor effect of kigamicin D on mouse tumor models. *J Antibiot (Tokyo)* 59:209-14. 2006.
- (7) Suzuki A, Ogura T, Esumi H. NDR2 acts as the upstream kinase of ARK5 during

- insulin-like growth factor-1 signaling. *J Biol Chem* 281:13915-21. 2006.
- (8) Awale S, Nakashima EM, Kalauni SK, Tezuka Y, Kurashima Y, Lu J, Esumi H, Kadota S. Angelmarin, a novel anti-cancer agent able to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Bioorg Med Chem Lett* 16:581-3. 2006.
- (9) Awale S, Lu J, Kalauni SK, Kurashima Y, Tezuka Y, Kadota S, Esumi H. Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Res* 66:1751-7. 2006.
- (10) Morito N, Yoh K, Fujioka Y, Nakano T, Shimohata H, Hashimoto Y, Yamada A, Maeda A, Matsuno F, Hata H, Suzuki A, Imagawa S, Mitsuya H, Esumi H, Koyama A, Yamamoto M, Mori N, Takahashi S. Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human. *Cancer Res* 66:812-9. 2006.
- (11) Win NN, Awale S, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Bioactive Secondary Metabolites from *Boesenbergia pandurata* of Myanmar and Their Preferential Cytotoxicity against Human Pancreatic Cancer PANC-1 Cell Line in Nutrient-Deprived Medium. *J Nat Prod*. 70(10):1582-7. 2007.
- (12) Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, Sugiyama M, Goya T, Atomi Y, Ueno T, Ochiai A, Esumi H. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res*. 67(20):9677-84. 2007.
- (13) Murakami I Y, Yatabe Y, Sakaguchi T, Sasaki E, Yamashita Y, Morito N, Yoh K, Fujioka Y, Matsuno F, Hata H, Mitsuya H, Imagawa S, Suzuki A, Esumi H, Sakai M, Takahashi S. c-Maf expression in angioimmunoblastic T-cell lymphoma. *Am J Surg Pathol* 31(11):1695-702. 2007.
- (14) Nakamura M, Esumi H, Jin L, Mitsuya H, Hata H. Induction of necrosis in human myeloma cells by kigamisins. *Anticancer Res*. 28(1A):37-43. 2008.
- (15) Awale S, Li F, Onozuka H, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16(1):181-9. 2008.
- (16) Win NN, Awale S, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Novel anticancer agents, kayeassamins A and B from the flower of *Kayea assamica* of Myanmar. *Bioorg Med Chem Lett*. 18(16):4688-91. 2008
- (17) Win NN, Awale S, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Novel anticancer agents, kayeassamins C-I from the flower of *Kayea assamica* of Myanmar. *Bioorg Med Chem*. 16(18):8653-60. 2008.
- (18) Fujii S, Mitsunaga S, Yamazaki M, Hasebe T, Ishii G, Kojima M, Kinoshita T, Ueno T, Esumi H, Ochiai A. Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci*. 99(9):1813-9. 2008.
- (19) Win NN, Awale S, Esumi H, Tezuka Y, Kadota S. Panduratinins D-I, novel secondary metabolites from rhizomes of *Boesenbergia pandurata*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 56(4):491-6. 2008.
- (20) Kuga W, Tsuchihara K, Ogura T, Kanehara S, Saito M, Suzuki A, Esumi H. Nuclear localization of SNARK; its impact on gene expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 377(4):1062-6. 2008.
- (21) Tsuchihara K, Fujii S, Esumi H. Autophagy and cancer: Dynamics of the metabolism of tumor cells and tissues. *Cancer Lett*. 278(2):130-8. 2009.
- (22) Tsuchihara K, Suzuki Y, Wakaguri H, Irie T, Tanimoto K, Hashimoto S, Matsushima K, Mizushima-Sugano J, Yamashita R, Nakai, K, Bentley D, Esumi H, Sugano S. Massive transcriptional start site analysis of human genes in hypoxia cells. *Nucleic Acids Res*. 37(7):2249-63. 2009.
- (23) Hirayama A, Kami K, Sugimoto M, Sugawara M, Toki N, Onozuka H, Kinoshita T, Saito N, Ochiai A, Tomita M, Esumi H, Soga T. Quantitative metabolome profiling of colon and stomach cancer microenvironment by capillary electrophoresis Time-of-Flight mass spectrometry. *Cancer Res* :69(11). 4918-25. 2009.
- (24) Li F, Awale S, Zhang H, Tezuka Y, Esumi H, Kadota S. Chemical constituents of propolis from Myanmar and their preferential cytotoxicity against a human pancreatic cancer cell line. *J Nat Prod*. 72(7):1283-7. 2009.
- (25) Tomitsuka E, Kita K, Esumi H.

Regulation of succinate-ubiquinone reductase and fumarate reductase activities in human complex II by phosphorylation of its flavoprotein subunit. Proc Jpn Acad. 85(7):258-65. 2009.

(26) Awale S, Miyamoto T, Linn TZ, Li F, Win NN, Tezuka Y, Esumi H, Kadota S. Cytotoxic constituents of soyimida febrifuga from myanmar. J Nat Prod. 72(9):1631-6. 2009.

(27) Momose I, Ohba S, Tatsuda D, Kawada M, Masuda T, Tsujiuchi G, Yamori T, Esumi H, Ikeda D. Mitochondrial inhibitors show preferential cytotoxicity to human pancreatic cancer PANC-1 cells under glucose-deprived conditions. Biochem Biophys Res Commun. 392(3)460-6. 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況（計3件）

名称：新規抗腫瘍物質アルキルクマリン類とその用途

発明者：江角浩安・三好千香・門田重利・  
Suresh Awale・手塚康弘

権利者：ヒューマンサイエンス振興財団

種類：特許

番号：2008-138555

出願年月日：2008.5.27

国内外の別：国内

名称：アクチゲニン高含有ゴボウシエキス及びその製造方法

発明者：江角浩安・三好千香・門田重利・  
山本恵一

権利者：国立がんセンター・クラシエ製薬・  
富山大学

種類：特許

番号：2009-079590

出願年月日：2009.3.27

国内外の別：国内

名称：抗腫瘍剤

発明者：江角浩安・倉島由紀子・門田重利・  
Suresh Awale

権利者：国立がんセンター・富山医科薬科大学

種類：特許

番号：2005-221360

出願年月日：2005.9.28

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

江角 浩安 (ESUMI HIROYASU)

国立がんセンター（研究所及び東病院臨床  
開発センター）・東病院、臨床開発セン  
ター・院長

研究者番号：70160364