

令和 3 年 6 月 24 日現在

機関番号：32645

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17685

研究課題名（和文）ミトコンドリア脱共役によりエネルギー代謝効率を低下させる新しい肺癌治療法の開発

研究課題名（英文）Anti-cancer strategy targeting the energy metabolism of tumor cells surviving a low-nutrient acidic microenvironment

研究代表者

岩井 悠希（Iwai, Yuki）

東京医科大学・医学部・助教

研究者番号：90743302

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：アシドーシスに曝露された肺癌細胞はグルコースとATPの消費を抑制し、つまり腫瘍細胞を冬眠状態にし、環境ストレスに対応していた。私たちは、その治療候補として、cAMP（EPAC）阻害剤によって活性化される既知のタンパク質であるESI-09が、古典的な脱共役剤よりも安全にミトコンドリア電子伝達系の脱共役をもたらし、ATP産生を減少、ATP消費の増加し、細胞内ATPを枯渇させることにより酸性環境下における栄養欠乏抵抗性を改善することを見いだした。これは、一般的な抗癌剤であるシスプラチンと反対の効果を示した。さらにESI-09は、肺癌細胞生着マウスの腫瘍増殖も抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍微小環境におけるアシドーシス、栄養欠乏時の腫瘍細胞の生存促進作用を見出し、ESI-09がアシドーシス、低栄養下での代謝のリプログラミングをすることにより、癌細胞のミトコンドリア脱共役剤であることを示した。通常よりも低いグルコース濃度でより高い細胞毒性を発揮し、ESI-09は従来の化学療法よりも安全であり、腫瘍細胞の微小環境下である、低栄養、アシドーシス下の代謝を標的としており、多くの癌細胞にも適応できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Acidosis limited the cellular consumption of glucose and ATP, causing tumor cells to enter a metabolically dormant but energetically economic state, which promoted tumor cell survival during glucose deficiency. We identified ESI-09, as an anti-cancer compound that inhibited cancer cells under low-glucose conditions even when associated with acidosis. Bioenergetic studies showed that independent of EPAC inhibition, ESI-09 was a safer mitochondrial uncoupler than a classical uncoupler and created a futile cycle of mitochondrial respiration, leading to decreased ATP production, increased ATP dissipation, and fuel scavenging. Accordingly, ESI-09 exhibited more cytotoxic effects under low-glucose conditions than under normal glucose conditions. ESI-09 was also more effective than actively proliferating cells on quiescent glucose-restricted cells. Cisplatin showed opposite effects. ESI-09 inhibited tumor growth in lung cancer engraft mice.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：腫瘍微小環境 アシドーシス 低栄養 ESI-09 脱共役

## 1．研究開始当初の背景

腫瘍微小環境では低酸素、栄養欠乏およびアシドーシスが生じ、癌細胞は代謝をリプログラムしてこれらの環境ストレスに対応している。アシドーシスに曝露された肺癌細胞は解糖系の抑制、蛋白 RNA 合成の抑制の 2 つのエネルギー節約機序を介して栄養欠乏抵抗性を獲得することが明らかになった。その治療薬候補として、EPAC 阻害薬がミトコンドリア電子伝達系の脱共役をもたらし、エネルギー代謝を空転させ、細胞内 ATP を枯渇させることにより酸性環境下における栄養欠乏抵抗性を改善することが見いだされた。本研究では、肺癌の異種性異所移植マウスモデルを用いて EPAC 阻害薬単独及び抗 VEGF 抗体との併用による抗癌効果を検討する。

## 2．研究の目的

腫瘍微小環境では、低酸素、栄養欠乏およびアシドーシスが生じているが、癌細胞は代謝をリプログラムしてこれらの環境ストレスに対応している。これまでの研究で、アシドーシスに曝露された肺癌細胞は解糖系の抑制(グルコース消費の減少)と蛋白・RNA 合成の抑制(ATP 消費の減少) という 2 つのエネルギー節約機序を介して栄養欠乏抵抗性を獲得することが明らかになった。さらにその治療薬候補として、EPAC 阻害薬がミトコンドリア電子伝達系の脱共役をもたらしエネルギー代謝を空転させ、細胞内 ATP を枯渇させることにより酸性環境下における栄養欠乏抵抗性を改善することが見いだされた。そこで本研究では、肺癌の異種性異所移植マウスモデルを用いて EPAC 阻害薬単独及び抗 VEGF 抗体との併用による抗癌効果を検討する。本研究により、癌細胞のエネルギー代謝を空転させて ATP を枯渇させるという新しい機序の抗癌剤の開発が期待できる。

## 3．研究の方法

まず、細胞実験にて、私たちが発見した ESI-09 と HJC-0197 によるミトコンドリア脱共役作用が EPAC 阻害作用によるものかについて確認する。すなわちコンフルエンまで増殖した A549 及び H1299 肺癌細胞を、グルコース存在または非存在下 (0-10 mM) の酸性 (pH 6.8) または中性 (pH 7.4) 培養液中で培養し、ESI-09 と HJC-0197 以外の EPAC 阻害薬 (CE3F4、EPAC1 阻害薬; ESI-05、EPAC2 阻害薬; GGTI 281、Rap-1 阻害薬) を添加して細胞内 ATP 濃度、グルコース消費量、乳酸産生量、extracellular acidification rate (ECAR)、oxygen consumption rate (OCR)、mitochondrial ATP production、proton leak、coupling efficiency、細胞生存率を測定する。CE3F4 および ESI-09 を用いても ESI-09 と HJC-0197 と同様な成績が得られた場合には、siRNA を用いた EPAC1、EPAC2 遺伝子のノックダウン実験を行い、脱共役作用が EPAC の阻害効果を介していることを確認する。

次に 動物実験にて、肺癌細胞の異種異所性移植マウスモデルを作製し、ESI-09 単独および抗癌薬として使用されている抗 VEGF 抗体 (Bevacizumab; Bev) との 併用効果について検討する。すなわち A549 細胞を免疫不全マウス (NOD-scid) の腋窩皮下に移植して 6 群に分け、1) 生食

( 腹腔内投与 ) 2) Bev ( マウス VEGF との交差性あり、10 mg/kg、1 回/週、腹腔内投与 ) 3) ESI-09 (2 mg/kg、1 回/日、腹腔内投与)、4) ESI-09 (10 mg/kg)、5) Bev + ESI-09 (2mg/kg)、6) Bev + ESI-09 (10mg/kg) を投与し、腫瘍サイズを連日モニターする。以上の細胞・動物実験から予想される結果として、ESI-09 を投与された肺癌移植マウスでは、癌細胞がエネルギーを節約している酸性環境下においてもミトコンドリア脱共役作用により ATP が枯渇し、ESI-09 の濃度依存性に栄養欠乏性細胞死に陥ることが考えられる。さらに Bevacizumab との併用モデルでは、腫瘍内の栄養がさらに減少するため、腫瘍の縮小効果の増強が期待される。以上のような成果より、EPAC 阻害薬が新規 肺癌治療薬および抗 VEGF 抗体の併用治療薬としての有力な開発候補になるものと確信する。

#### 4 . 研究成果

アシドーシスに曝露された肺癌細胞はグルコースと ATP の消費を抑制し、つまり腫瘍細胞を冬眠状態にし、環境ストレスに対応していた。私たちは、その治療薬候補として、cAMP (EPAC) 阻害剤によって活性化される既知のタンパク質である ESI-09 が、古典的な脱共役剤よりも安全にミトコンドリア電子伝達系の脱共役をもたらし、ATP 産生を減少、ATP 消費の増加し、細胞内 ATP を枯渇させることにより酸性環境下における栄養欠乏抵抗性を改善することが見いだした。これは、一般的な抗癌剤であるシスプラチンと反対の効果を示した。さらに ESI-09 は、肺癌細胞生着マウスの腫瘍増殖も抑制した。

腫瘍微小環境におけるアシドーシス、栄養欠乏時の腫瘍細胞の生存促進作用を見出し、ESI-09 がアシドーシス、低栄養下での代謝のリプログラミングをすることにより、癌細胞のミトコンドリア脱共役剤であることを示した。通常よりも低いグルコース濃度でより高い細胞毒性を発揮し、ESI-09 は従来の化学療法よりも安全であり、腫瘍細胞の微小環境下である、低栄養、アシドーシス下の代謝を標的としており、多くの癌細胞にも適応できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 岩井 悠希
2. 発表標題 エネルギー代謝を空転させ癌細胞を餓死させる治療法の開発
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩井 悠希
2. 発表標題 肺癌細胞のエネルギー代謝を浪費させる新規治療薬の開発
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuki Iwai
2. 発表標題 Mitochondrial Function and Metabolism in Cancer
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2019 in Atlanta, Georgia (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------