

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：2011～2013

課題番号：23659682

研究課題名(和文)がん細胞エネルギー代謝研究とグリオーマ幹細胞研究の融合による新たな研究領域の創成

研究課題名(英文)An attempt to pioneer a new research field through fusion of studies on cancer cell energy metabolism and 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) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では悪性グリオーマで高頻度に見られるミトコンドリア呼吸の抑制とそれとともに好氣的解糖の亢進(Warburg効果)がグリオーマ幹細胞の維持に寄与しているという作業仮説を検証するべく、ミトコンドリア呼吸促進薬がグリオーマ幹細胞に及ぼす影響について検討を行った。その結果ミトコンドリア呼吸の回復とともにグリオーマ幹細胞の幹細胞性が失われることが明らかとなった。この結果はグリオーマにおけるWarburg効果が幹細胞維持に重要な役割を果たしており、Warburg効果が幹細胞表的治療のよい治療標的となりうることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this project, we investigated the effect of a mitochondrial respiration-promoting agent on glioma stem cells with the intention to test the working hypothesis that inhibited mitochondrial respiration accompanied by increased aerobic glycolysis (Warburg effect), which has been frequently observed in malignant gliomas, contributes to the maintenance of glioma stem cells. Our results showed that promotion of mitochondrial respiration caused loss of stemness of glioma stem cells, suggesting that Warburg effect plays a significant role in the maintenance of glioma stem cells and that Warburg effect may be a promising target for cancer stem cell-directed therapy.

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

ノーベル賞受賞者 Warburg 博士の発見による Warburg 効果、すなわちがん細胞が酸素利用可能条件下でも好んで嫌気解糖を行う現象、は FDG-PET の原理となるなど現在がんの基本性質として認識されている。しかしながら、何故にがん細胞が酸素を利用するミトコンドリア呼吸よりも遥かに効率の悪いエネルギー代謝を好んで行うかについてはこれまで合理的な説明がなく、がん生物学の長年の謎とされてきた(*Science* 312:1158, 2006)。これに対して 2006 年、我々 (*J Natl Cancer Inst* 98:1462, 2006 → *Nature Reviews Cancer* の Research Highlight of the Month に選ばれる [*Nat Rev Cancer* 6:905, 2006]) や他のグループにより Warburg 効果のがん細胞による細胞自殺回避の巧妙な手段であることを明らかにするなど、Warburg 効果のがん細胞生物学的意義の解明に寄与する研究報告が相次ぎ、以降、数十年間にわたり停滞してきたがん細胞のエネルギー代謝研究が急速に展開するようになった。このような世界的な状況で、がん細胞のミトコンドリアエネルギー代謝は国外ではすでにごん研究のホットエリアとなっていたが(Understanding the Warburg effect. *Science* 324:1029, 2009; Targeting mitochondria for cancer therapy *Nat Rev Drug Discov* 9:447, 2010)、国内では萌芽期にとどまっていた。重要なことに、グリオーマにおいても幅広く Warburg 効果がおきていることが古くから確認されているが (Rhodes et al., *Ann Neurol* 14:614-626, 1983; Tyler et al., *J Nuc Med* 28:1123-1133, 1987; Mineura et al., *Cancer* 73:2386-2394, 1994)、グリオーマにおける Warburg 効果の役割解明は世界的に見てもまだまだ緒に着いたばかりの状況であった。

一方、当時から、グリオーマ治療の重要なターゲットとしてグリオーマ幹細胞が注目を集めつつあった。グリオーマ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り、特にグリオブラストーマではその悲惨な長期予後の主要因と考えられている。従ってグリオーマ幹細胞を安全に殺傷する方法ないしグリオーマ幹細胞を「非」幹細胞に分化誘導する方法が次世代のグリオブラストーマ治療に欠かせない。これまでも我々の研究報告を含めグリオーマ幹細胞の維持機構の解明からそこに関わる分子を標的とする治療法が提唱さ

れ始めてはいたが、グリオーマ幹細胞を標的とする安全で効率的な治療法を開発するためには、さらに多角的な研究アプローチが必要とされることは明らかであった。

このような状況で我々は以前より両研究領域の接点として、以下に述べる研究仮説を着想していた。申請当時このような仮説を支持する文献や自身の予備的データが得られたことから、課題申請を行った。

ところで当時我々の研究室ではグリオーマ/神経幹細胞をメインテーマに据え、研究を進めていた。その結果幹細胞マーカー CD133 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)、グリオーマ幹細胞維持においても PI3K と mTOR が同様のメカニズムで働いており、PI3K と mTOR の同時阻害により初めて効率よくグリオーマ幹細胞の幹細胞形質 / 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)、などを相次いで見出し、さらには当時未公表ではあったがグリオーマ幹細胞維持の鍵をにぎる転写因子(*Stem Cells* 29:1327, 2011)や細胞内シグナル分子(その阻害薬により世界で初めて全身投与でグリオーマ幹細胞による脳腫瘍形成を抑制することに成功していた [*Sci Rep* 2:516, 2012]) を同定していた。これらの成果、特にシグナル解析により初めて浮き彫りになってきたのが、グリオーマ幹細胞は幹細胞状態を「多重的に保障する」メカニズムを有しているという事実である。このことは裏を返すと、幹細胞を消滅させるためには多面的なアプローチとその組み合わせが必要であることを物語っていた。

一方我々は Warburg 効果がミトコンドリア依存的細胞自殺の抑制を通じてがん細胞に生存アドバンテージを与えていること、逆に Warburg 効果の解除によりがん細胞の細胞死(治療)抵抗性を克服できる可能性を世界に先駆けて提唱していた(*JNCI* 98:1462, 2006; *Nat Rev Cancer* 6:905, 2006)。この可能性を実証するため我々はグリオーマ細胞のミトコ

ンドリア呼吸を促進できる薬物を探索し、化合物 X を見出した。その後の検討の結果、化合物 X は in vitro において種々のグリオーマ細胞株・初代培養細胞に対するテモゾロミドの殺細胞効果を増強し、in vivo においてもテモゾロミドの抗腫瘍効果を増強することがわかった。また、化合物 X が示す殺細胞効果増強作用がミトコンドリア呼吸依存的であることも確認していた (unpublished data)。

ところでこの化合物 X を用いた実験は基本的に「非」幹細胞を対象に行ってきたものである。これに対して我々は以前から Warburg 効果や腫瘍低酸素はひょっとするとグリオーマ幹細胞の維持にも一役買っているのではないかと想像していた。そこで試験的にグリオーマ幹細胞を化合物 X で処理してみたところ、低濃度で細胞死が誘導されてしまう幹細胞もあったが、細胞死を起こさない幹細胞では明らかに分化傾向が認められた。この予備的実験の結果は Warburg 効果がグリオーマ幹細胞の生存ならびに幹細胞形質の維持に役割を果たしている可能性を示唆するものである。加えて興味深いことに、近年になって embryonic stem cell (ES 細胞) ではミトコンドリア呼吸が抑制され (= Warburg 効果類似の状態) エネルギー産生を解糖に依存していることや、分化とともにエネルギー代謝がミトコンドリア呼吸優位となり、分化誘導にミトコンドリア呼吸が必要であることを示唆する知見が集積しつつある (Rehman J. Empowering self-renewal and differentiation: the role of mitochondria in stem cells. *J Mol Med*, published on-line, Sept. 2010)。

これら我々自身の最新知見と、当時公表された文献情報から、さもなくば「単なる思いつき」の域を出なかつた冒険的課題が然るべき勝算と実現性を伴った「挑戦的」課題となった。そこで以下に記す目的の研究を課題申請した。

## 2 . 研究の目的

「Warburg 効果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」との作業仮説を検証することを目的とし、将来的には Warburg 効果を標的としたグリオーマ幹細胞治療モデルを創出することを狙いとする。

## 3 . 研究の方法

グリオーマ幹細胞としてはグリオブラストーマの手術摘出組織から直接樹立した patient-derived glioma stem cell を用いた。幹細胞状態の評価は幹細胞マーカー、分化マ

ーカーの発現をウエスタンブロット法により行った。腫瘍形成能はヌードマウス脳内への異種移植を行い、マウスの生存期間を primary end point として評価を行った。

## 4 . 研究成果

ミトコンドリア呼吸促進作用をもつ化合物 X のグリオーマ幹細胞に対する効果を検討するため、化合物 X の存在下で一定期間培養を行ったグリオーマ幹細胞における幹細胞マーカーならびに分化マーカーの発現を調べた。その結果、幹細胞マーカーの発現低下、分化マーカーの発現上昇が確認された。この結果は、化合物 X にはグリオーマ幹細胞抑制効果がある、すなわちミトコンドリア呼吸抑制がグリオーマ幹細胞維持に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。と同時にこのような結果は化合物 X がグリオーマ幹細胞抑制を通じてグリオーマの再発抑制に貢献しうる可能性をも示している。そこでさらに化合物 X がグリオーマ幹細胞のもつ腫瘍形成能に与える影響を調べるため、ex vivo 脳腫瘍モデルを用いて検討を行ったところ、化合物 X がグリオーマ幹細胞の腫瘍形成能を抑制することが確認された。引き続き化合物 X が実際の治療薬として有用かを検討するため、脳腫瘍モデルに対して化合物 X の全身投与を試みその治療効果を検討した。しかしながらこれまでの実験条件下では脳腫瘍マウスの生存延長効果は得られておらず、投与方法等の再検討を含めさらなる実験条件の検討が必要と考えられた。

## 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 9 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)
- 6) Sato A, Sunayama J, Okada M, Watanabe E, Seino S, Shibuya K, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: Glioma-initiating cell elimination by metformin activation of FOXO3 via AMPK. Stem Cells Transl Med 2012;1:811-824 (査読有)
- 7) Matsuda K, Sato A, Okada M, Shibuya K, Seino S, Suzuki K, Watanabe E, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: Targeting JNK for therapeutic depletion of stem-like glioblastoma cells. Sci Rep 2012;2:516 (査読有)
- 8) Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Seino S, Suzuki K, Watanabe E, Tachibana K, Tomiyama A, Kayama T, Kitanaka C: MEK-ERK signaling dictates DNA-repair gene MGMT expression and temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via the MDM2-p53 axis. Stem Cells 2011;29:1942-1951 (査読有)
- 9) Sunayama J, Sato A, Matsuda KI, Tachibana K, Watanabe E, Seino S, Suzuki K, Narita Y, Shibui S, Sakurada K, Kayama T, Tomiyama A, Kitanaka C: FoxO3a functions as a key integrator of cellular signals that control glioblastoma stem-like cell differentiation and tumorigenicity. Stem Cells 2011;29:1327-1337(査読有)
- [学会発表](計26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, 渋谷壮一郎, 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, 渋谷壮一郎, 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
- 10) 北中千史: グリオーマ幹細胞に着目した脳腫瘍研究 ～治療への応用を目指して～. 第 1 回 Neuro-Oncology West 研究会, 大阪 (ヒルトン大阪); 2012 年 12 月 8 日
- 11) 佐藤篤, 松田憲一郎, 岡田雅司, 成田善孝, 渋谷慶太, 北中千史, 嘉山孝正: グリオーマ幹細胞における JNK の役割とその治療標的としての意義. 第 30 回日本脳腫瘍学会学術総会, 広島; 2012 年 11 月 25 日
- 12) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第 7 回鹿児島脳腫瘍セミナー特別講演, 鹿児島 (城山観光ホテル); 2012 年 11 月 16 日
- 13) 佐藤篤, 砂山潤, 岡田雅司, 成田善孝, 渋谷慶太, 北中千史, 嘉山孝正: グリオーマ幹細胞における分化誘導因子 FOXO3 をターゲットとした治療法の開発. 第 71 回日本脳神経外科学会総会, 大阪; 2012 年 10 月 17 日
- 14) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第 5 回玄海脳腫瘍セミナー特別講演, 福岡 (ソラリア西鉄ホテル); 2012 年 7 月 6 日
- 15) 北中千史: グリオーマ幹細胞の維持に関わる分子機構. 第 3 回東京前立腺会議招待講演, 東京 (帝国ホテル); 2012 年 7 月 5 日
- 16) 北中千史: 脳腫瘍の cell biology ～グリオーマ幹細胞～. 第 30 回日本脳腫瘍病理学会生涯教育セミナー, 名古屋 (名古屋国際会議場); 2012 年 5 月 25 日
- 17) 北中千史: グリオーマ幹細胞 ～診断/治療への応用を目指して～. 第 45 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); 2012 年 4 月 7 日
- 18) 北中千史: グリオーマ幹細胞に着目した脳腫瘍研究 ～診断治療への応用を目指して～. 第 66 回山形脳神経外科懇話会特別講演, 山形 (パレスグランドール); 2012 年 1 月 28 日
- 19) 北中千史: グリオブラストーマ克服を夢見て脳神経外科専門医が迷い込んだ道 ～グリオーマ幹細胞研究を中心に～. 第 3 回山梨脳腫瘍研究会, 甲府; 2011 年 10 月 21 日
- 20) 佐藤篤, 砂山潤, 松田憲一郎, 立花研, 渡部江梨子, 清野静香, 鈴木香, 成田善孝, 渋谷慶太, 富山新太, 北中千史, 嘉山孝正: グリオーマ幹細胞における FoxO3a を介した分化と造腫瘍能の制御. 第 29 回日本脳腫瘍学会学術総会, 下呂; 2011 年 11 月 27 日

- 21) Kitanaka C: Glioma stem cell - Dissecting the molecular mechanism involved in the maintenance of stem-like glioblastoma cells for future application to glioblastoma treatment -. The 24<sup>th</sup> International Symposium on Cancer Research, Tokyo; Nov 23 2011
- 22) 佐藤篤, 松田憲一郎, 砂山潤, 清野静香, 鈴木香, 渡部江梨子, 立花研, 富山新太, 北中千史, 嘉山孝正: グリオーマ幹細胞における MGMT 発現制御の分子機構に関する検討. 第 12 回日本分子脳神経外科学会, 横浜; 2011 年 10 月 15 日
- 23) 北中千史: 腫瘍幹細胞仮説はグリオブラストーマに根治をもたらすか?. 第 70 回日本脳神経外科学会総会, 横浜; 2011 年 10 月 13 日
- 24) 佐藤篤, 松田憲一郎, 砂山潤, 清野静香, 鈴木香, 櫻田香, 立花研, 富山新太, 北中千史, 嘉山孝正: MEK 経路阻害による MGMT 発現およびテモゾロミド感受性に関する検討. 第 70 回日本脳神経外科学会総会, 横浜; 2011 年 10 月 12 日
- 25) Sato A, Matsuda KI, Sunayama J, Sakurada K, Tachibana K, Tomiyama A, Kitanaka C, Kayama T: MEK inhibition enhances temozolomide sensitivity of glioma stem-like cells via MGMT down-regulation. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋; 2011 年 10 月 3 日
- 26) Kitanaka C: Molecular pathways involved in the maintenance and differentiation of stem-like glioblastoma cells. 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋; 2011 年 10 月 3 日

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

(2) 連携研究者  
砂山 潤 (SUNAYAMA JUN)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号: 80466606

(3) 連携研究者  
佐藤 篤 (SATO ATSUSHI)  
山形大学・医学部・助教  
研究者番号: 30455901

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者