

科学研究費助成事業 研究成果報告書

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：2012～2013

課題番号：24650644

研究課題名(和文)がん幹細胞仮説とミトコンドリア代謝学の融合から新規抗腫瘍薬の創成に挑む

研究課題名(英文)An attempt to develop novel anti-cancer agents through fusion of the cancer stem cell hypothesis and mitochondrial metabolism study

研究代表者

清野 静香 (Seino, Shizuka)

山形大学・医学部・助手

研究者番号：80571653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では「Warburg効果ががん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、悪性脳腫瘍を含む種々の難治がんで検証することを目的とし、一連の実験を行った。その結果ミトコンドリア呼吸促進効果をもつ化合物が悪性脳腫瘍のみならずその他のがん種に由来するがん幹細胞の幹細胞性を抑制することが明らかとなったことから、Warburg効果を標的とする薬剤ががん幹細胞標的治療薬として有用である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project is to test the working hypothesis that Warburg effect plays a critical role in the maintenance of cancer stem cells in various intractable human cancers including malignant brain tumors. The results of a series of experiments revealed that a compound with a mitochondrial respiration-promoting effect inhibits the stemness of cancer stem cells derived from intractable human cancers including malignant brain tumors. The results suggest the possibility that Warburg effect may represent a potential target for cancer stem cell-directed therapy.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：抗がん物質探索

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 効果がん細胞による細胞自殺回避の巧妙な手段であることが明らかになるなど、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)、国内ではいまだ研究者も限られており、萌芽期にとどまっていた。

一方、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るようになっていた。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。従ってがん幹細胞を安全に殺傷する方法ないしがん幹細胞を「非」幹細胞に分化誘導する方法が次世代のがん治療に欠かせない。これまでに我々はヒトの最難治がんの一つであるグリオブラストーマのがん幹細胞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を提唱してきたが、今後グリオブラストーマはもとより他の難治がんのがん幹細胞を標的とする安全で効率的な治療法を開発してゆくためには、あらゆる角度、視点からの研究アプローチが必要とされることは言うまでもない。

このような状況のなか、我々は以前から両研究領域で先駆的な研究を展開する過程で、両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。これまでは「単なる思いつ

き」の域を超えるものではなかったが、課題申請時点には仮説を支持する文献や自身の予備的データが得られていた。

ところで我々の研究室ではこれまでにヒト最難治がんの一つとされるグリオブラストーマを主対象として、がん幹細胞研究を進めていた。その結果申請当時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の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、さらにははまだ当時は未公表であったが、グリオブラストーマ幹細胞制御に関わる FoxO3a (*Stem Cells Transl Med* 1:811, 2012)やその他の新規細胞内シグナル分子 (*Sci Rep* 2:516, 2012)に作用する薬剤を開発し、世界に先駆けて薬剤の全身投与でグリオブラストーマ幹細胞による脳腫瘍形成の抑制と担がん個体の生存期間延長に成功していた。このように我々はグリオブラストーマのがん幹細胞研究において先駆的な仕事を行っていた。

一方我々のグループは 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)。そしてこの可能性を実証するため我々はい

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ブラストーマ細胞株・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った。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がん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ブラスト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 効果がグリオブラスト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、申請時には embryonic stem cell (ES 細胞) ではミトコンドリア呼吸が抑制されエネルギー産生を解糖に依存していること (= Warburg 効果類似の状態) 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った (Rehman J. Empowering self-renewal and differentiation: the role of mitochondria in stem cells. *J Mol Med* 88:981-986, 2010)。

これら我々自身の最新知見と、当時渉猟可能であった文献情報から、さもなくば「単なる思いつき」の域を出なかっ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。また、研究計画遂行に必須不可欠な化合物 X も我々独自に見出したものであった。このように本課題は未発表新知見を含む我々独自の成果に基づいて初めて着想・実行可能(feasible)となった課題であるという点で独創的かつ斬新であると考えられ、挑戦的萌芽研究として課題申請するに至った。

2 . 研究の目的

本研究では「 Warburg 効果のがん幹細胞の維持に重要な役割を果たしている」との作業仮

説を悪性脳腫瘍を含む種々の難治がんで検証することを目的とし、将来的には Warburg 効果を標的としたがん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

がん幹細胞の特徴である自己複製能については幹細胞マーカーや分化マーカーの発現をウエスタンブロット法等により検討した。腫瘍形成能については、ヌードマウスを用いて移植腫瘍の生着の有無や腫瘍体積の評価、あるいは移植を受けたマウスの生存期間により評価した。

4 . 研究成果

ミトコンドリア呼吸促進効果をもつ化合物 X の存在下でがん幹細胞を培養したところ、幹細胞マーカーの発現低下や分化マーカーの発現上昇が認められた。また、同様に処理したがん幹細胞をヌードマウスに移植し腫瘍形成能の評価を行ったところ、化合物 X が腫瘍形成能を抑制していることも確認された。これらの結果はミトコンドリア呼吸の抑制ががん幹細胞維持に重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。また、悪性脳腫瘍幹細胞を用いた実験からは、化合物 X が p53 依存的に幹細胞維持タンパク質の分解を行うことで、がん幹細胞の幹細胞性喪失を促進していることを示す結果を得た。これらの結果は化合物 X ががん幹細胞抑制を通じて腫瘍再発抑制に貢献しうる可能性を示唆している。

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 6 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) 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)
- 6) 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)

[学会発表](計 1件)

- 1) 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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

清野 静香 (SEINO SHIZUKA)

山形大学・医学部・助手

研究者番号 : 80571650

(2)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