

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450442

研究課題名(和文) 新たな癌研究アプローチの試み～ミトコンドリア呼吸鎖は新規治療標的となりうるか？

研究課題名(英文) New approach of cancer research; mitochondrial respiratory chain inhibitors as a new therapeutic target.

研究代表者

中川 貴之 (Nakagawa, Takayuki)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40447363

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)：薬剤感受性スクリーニングから犬乳腺腫瘍悪性クローン株CHMp-5bでのミトコンドリア呼吸鎖阻害薬(MRCIs)に対する高感受性が示された。MRCIsであるメトホルミンにより低感受性株CHMp-13aではAMPK依存的な細胞増殖抑制が見られる一方で、5b株ではAMPK非依存的なG0/G1期での細胞周期停止が見られた。これはメトホルミンが細胞内のATP産生量を変えないままニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)量を減少させることによるものであった。本研究から犬悪性乳腺腫瘍に対するMRCIの新規治療薬としての可能性と、メトホルミンのNAD依存的な細胞増殖抑制効果が初めて明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The multi-drug screening showed the high sensitivity of a malignant clone of canine mammary gland tumor (cMGT) cell line, CHMp-5b to mitochondrial respiratory chain inhibitors (MRCIs). While Metformin, one of the MRCIs, exhibited its anti-tumor effect through AMPK pathway on low sensitive clonal cell line, CHMp-13a, it induced G0/G1 cell cycle arrest in AMPK-independent manner on CHMp-5b. Cellular nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) amount was decreased by metformin which exerted anti-proliferative effect, though the ATP amount was not changed. These results highlighted potential of metformin as a novel treatment for cMGT as well as a novel NAD-dependent mechanism.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：犬乳腺癌 ミトコンドリア呼吸鎖 AMPK メトホルミン ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

1. 研究開始当初の背景

癌の研究はこれまで、癌を発生させる特定の因子(癌遺伝子/癌抑制遺伝子)の解明にはじまり、多くのサンプルにおける無数の遺伝子やタンパクなどの発現の差から癌に関連する因子を発見する研究手法(網羅的解析:オミックス)へと進歩をとげた。また近年、こうした手法とは異なるアプローチの癌研究が始まりつつあり、癌細胞に対する無数の分子標的阻害物質による効果をスクリーニングする手法が新たなアプローチとして注目されている。

申請者らも分子標的阻害物質パネルを用い、犬乳癌細胞株(Annual conference of VCS, 2012)、猫乳癌細胞株(日本獣医学会, 2012)、犬肥満細胞腫(Vet Immunol, 2011)などの感受性プロファイルを明らかにしてきた。これらの研究の中で、申請者らは分子標的阻害物質の感受性が腫瘍の悪性度や腫瘍の種類によって一定の傾向があることに着目し、従来とは異なる新たな視点で癌の性状解析を行う試みを始めた。すなわち、より悪性度の高い癌細胞に対してより効果を示す分子標的阻害物質をピックアップし、それらの物質に共通する薬理作用機序から悪性度の高い癌細胞の性状を明らかにする全く新しい取り組みである。

申請者らは自身らが樹立した悪性度の異なる犬乳癌細胞株 CHMp-5b と CHMp-13a (Res Vet Sci, 2012)における分子標的阻害物質の感受性プロファイルを作成し、悪性度の高い CHMp-5b 株に対して非常に高い阻害効果を示す阻害剤を 10 種類ピックアップしたところ、3 物質はミトコンドリア呼吸鎖に関連する阻害剤であった。これらの物質がミトコンドリア呼吸鎖に作用した際に、癌細胞に対して増殖抑制効果を示す機序として Superoxide の産生量の変化が考えられるため、それらを両細胞株で評価したところ悪性度が高く阻害剤に対し感受性を示す CHMp-5b においてのみ、Superoxide 産生能の高い細胞集団が存在することが明らかとなった。この特異的な性状および細胞集団は CHMp-5b の持つ高い悪性度ひいては犬乳癌の悪性化の機序に関連し新規治療標的となりうることを示唆された。

2. 研究の目的

これらの背景から、本研究では悪性度の高い細胞集団(犬乳癌細胞株 CHMp-5b)での高い Superoxide 産生能を、細胞内代謝の変化、ミトコンドリアの機能異常、癌幹細胞性や上皮間葉変換との関連の 3 つの観点から多角的に評価することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は以下の実験からなる。それぞれの実験の方法についての詳細は各実験事の実験成果に併せて記載した。

(1)犬乳癌腫瘍細胞の上皮間葉転換、幹細胞性に関するキャラクタライゼーション及び、これらの細胞に対するミトコンドリア呼吸鎖阻害薬(Mitochondrial respiratory chain inhibitors: MRCIs)の活性酸素種(ROS)産生、AMP-activated kinase (AMPK)を介する抗腫瘍効果に関する検討

(2)臨床応用可能な MRCI としてのメトホルミンの犬乳癌腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果とその作用機序

(3)メトホルミンが細胞内ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD)量に与える影響とその細胞障害性との関連

4. 研究成果

(1) MRCIs に対して感受性の大きな違いを見せた細胞株に関して、microarray によるトランスクリプトーム解析・上皮間葉転換ステータス・幹細胞性について検討を行い、その上で MRCI が細胞増殖抑制を引き起こす機序について ROS 産生及び AMPK 分子の活性化の両面から検討を行った。

その結果 MRCIs に高感受性を示す CHMp-5b 株は、低感受性である CHMp-13a 株と比較して高い幹細胞性や浸潤能を持つことが判明した。また MRCIs 暴露後には両細胞株間で ROS 産生量には違いが見られなかったが、CHMp-13a 株では AMPK の活性化が強く生じていることがわかった。AMPK 阻害薬を用いた場合に、CHMp-13a 株では MRCIs による細胞増殖抑制効果が減弱したが、CHMp-5b 株ではその効果は認められなかった。これらの結果より、この 2 細胞株においては悪性度と MRCI への感受性が大きく異なり、またその作用機序も全く異なる(AMPK 依存的/非依存的)ことが判明した。

Fig. 1. Gene expression analysis. (A) M-A plot. (B) Gene expression heat map. (C-L) RT-PCR validation for the selected genes.

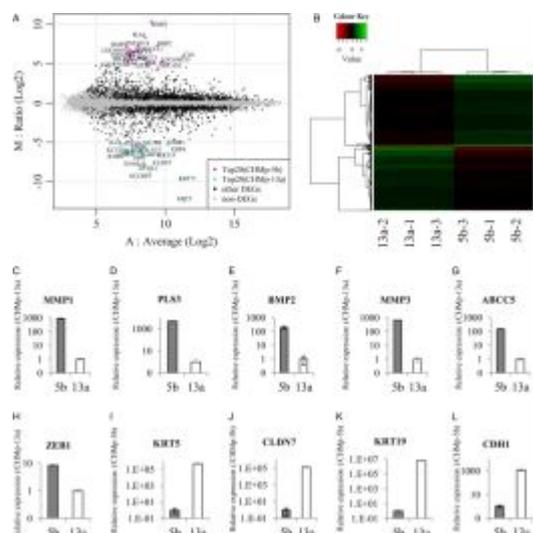


Fig. 2. Matrigel invasion assay. (A) Captured images. (B) Number of matrigel invading cells. (C, D) Aldefluor assay.

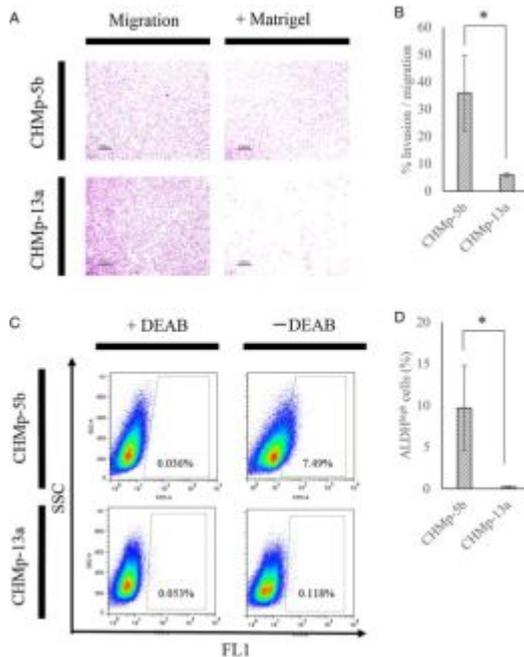


Fig. 3. Overview and result of the inhibitor screen. (A) Diagram of the procedure. (B) Results of the inhibitor screen.

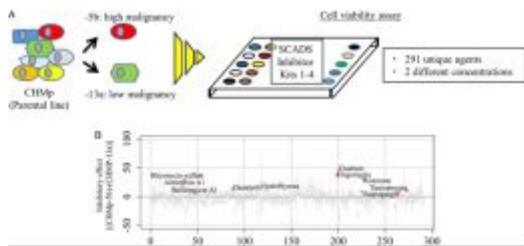


Fig. 4. Cytotoxic effect of MRCIs. (A) Cell morphology. (B-D) Concentration response curves for each MRCIs.

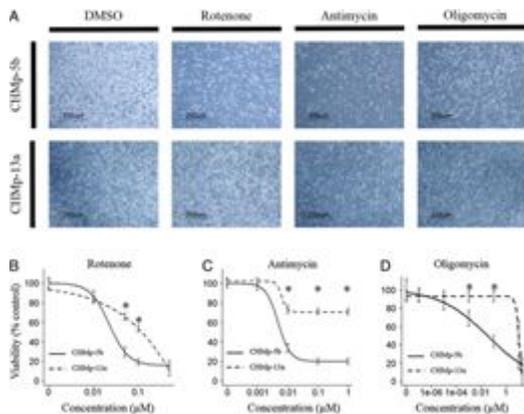


Fig. 5. Effect of MRCIs on cellular ATP production and AMPK activation. (A-C) Cellular ATP

production. (D-F) Western blots.

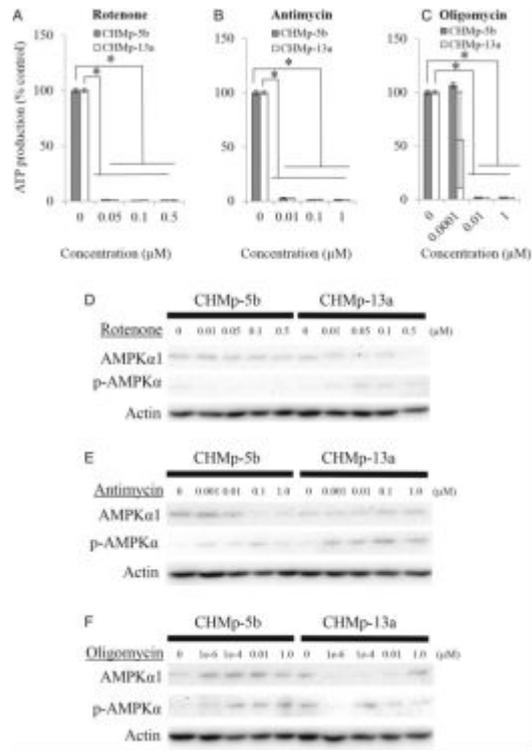
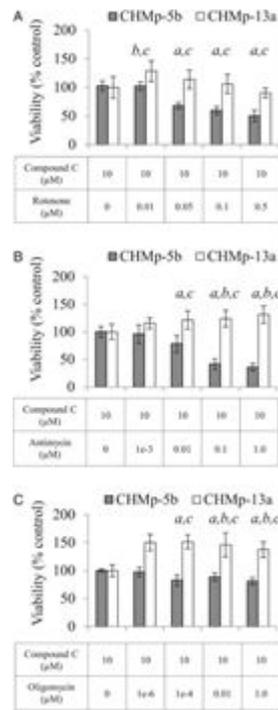


Fig. 6. Cytotoxic effect of MRCIs in the presence of the AMPK inhibitor Compound C.



(2)申請者らは(1)においてMRCIsが悪性度の高い犬乳腺腫瘍に対して高い抗腫瘍効果を示すことを明らかにし、新規治療薬としての可能性が示唆されたが、これらで用いられたMRCIsは臨床応用不可能な薬剤であった。そこで申請者らは同様のミトコンドリア呼吸鎖抑制作用を持つヒトの型糖尿病治

療薬であるメトホルミンに着目した。

メトホルミンは他のMRC1同様 *in vitro* で高悪性株の増殖を強く抑制し、また *in vivo* 移植モデルにおいても抗腫瘍効果を示した。

(1)同様に作用機序を検討したところ、他のMRC1同様低感受性 CHMp-13a 細胞に対しては AMPK-mTOR 経路依存的に、高感受性 CHMp-5b 細胞に対しては AMPK-mTOR 経路非依存的に作用していることが判明した。

そこでこの悪性株に対する作用機序をさらに明らかにするためにトランスクリプトーム解析を行ったところメトホルミンは G0/G1 期での細胞周期停止を介して細胞増殖抑制を起こしていることが判明した。

Fig. 1. *In vitro* and *in vivo* effect of metformin on CMGT cells. (A, B) Cell viability assays. (C) Cell morphology. (D) Concentration response curves. (E) Tumor growth curves in xenograft models. (F) Macroscopic appearance. (G) Tumor weight. (H) Number of metastatic foci.

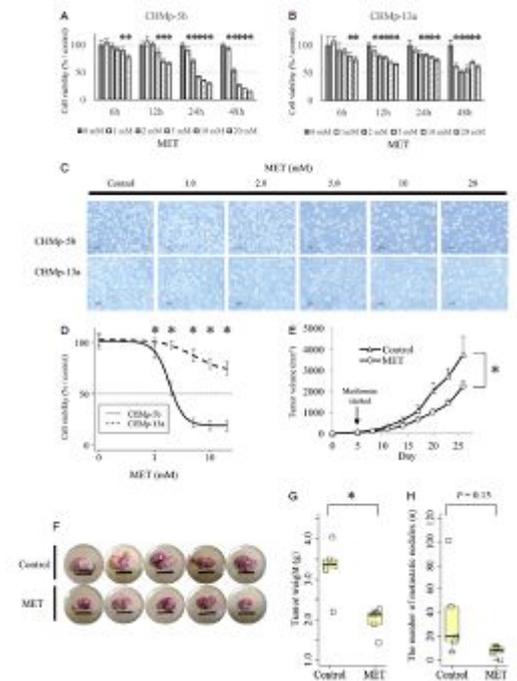


Fig. 2. (A) Changes in cellular ATP. (B) Western blot analysis of AMPK pathway. (C, D) Effect of co-incubation with the AMPK inhibitor, Compound C.

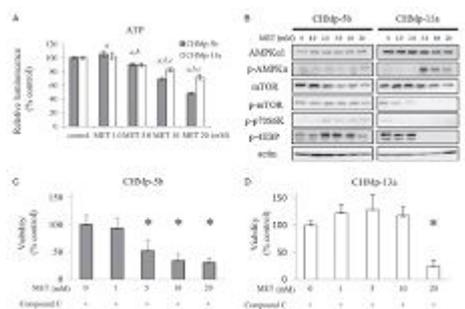


Fig. 3. Effect of a metformin on gene expression profile. (A) M-A plot. (B) Gene ontology term-based enrichment analysis. (C, D) Selected heat maps for DEGs.

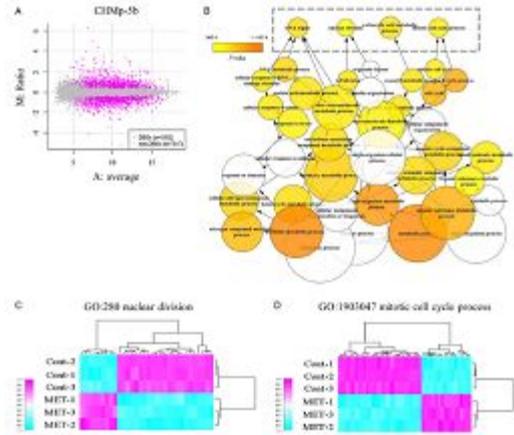
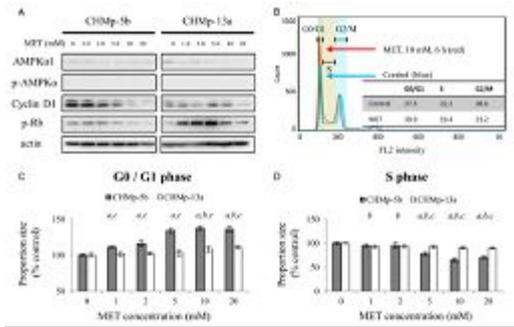


Fig. 4. Effect of a metformin exposure on cell cycle regulation. (A) Western blot analysis. (B) Representative result of flow cytometric cell cycle analysis. (C, D) Summary of the effect of metformin treatment on the cell cycle.



(3)これまでの(1), (2)の実験から、メトホルミンが癌幹細胞性及び浸潤能の高い犬乳腺腫瘍細胞にたいして ROS 及び AMPK 非依存的に細胞周期の抑制を介して細胞増殖の抑制を引き起こすことを明らかにした。

ここで申請者らは、ミトコンドリア呼吸鎖阻害は細胞内 NAD/NADH バランスに影響を与えて細胞増殖を抑制するのではないかと仮説を立てた。

メトホルミンの抗腫瘍増殖抑制効果は NAD の添加により部分的に阻害された。NAD 添加はメトホルミンによる細胞周期停止を部分的に阻害したが、メトホルミン及び NAD 添加は細胞の ATP 産生量には影響を与えなかった。またメトホルミンは細胞内の NAD 量及び NAD/NADH 比を減少させ、それは NAD 添加により部分的に回復した。

これらの結果からメトホルミンの抗腫瘍効果は細胞内 NAD 量の減少によって発揮されている可能性が示唆された。このような作用機序はこれまで報告がなく、メトホルミンに対する感受性は細胞がどれだけ NAD に依存し

ているか等によって異なるのかもしれない。代表的な NAD 依存型酵素には PARP, SIRT などがある。メトホルミン感受性株および非感受性株におけるそれらの発現量や、細胞内 poly(ADP)ribose 化タンパク量およびアセチル化タンパク質にも今のところ差異はみられず、メトホルミンの NAD 依存的細胞増殖抑制効果は SIRT および PARP を介さない作用機序であることが示唆されたが、これらの酵素と細胞の表現形の関係、またメトホルミンとの感受性について今後さらなる検討を行う必要がある。

Fig.1. In vitro effect of metformin or FK866 +/- external NAD. (A, B) Cell viability. (C) Cell morphology. (D) Protective effect of NAD.

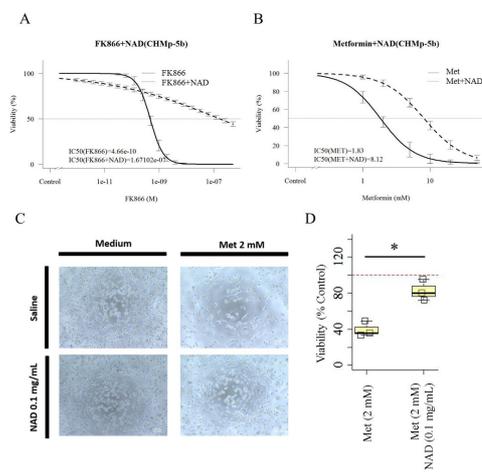


Fig.2. Effect of metformin or FK866 +/- NAD on cell cycle. (A) Cell cycle analysis. (B) Change in dividing cell population.

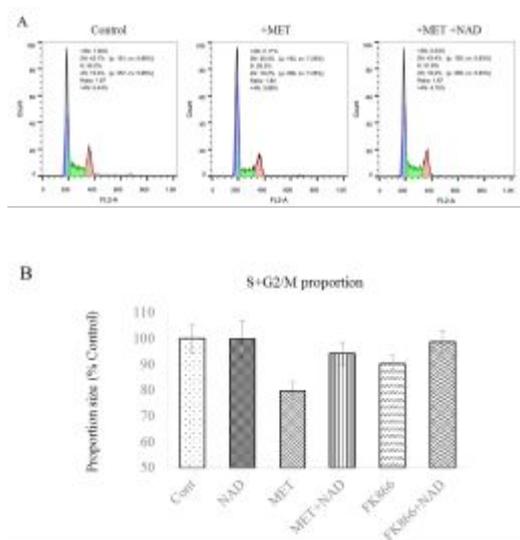


Fig.3. Change in mitochondrial ATP production.

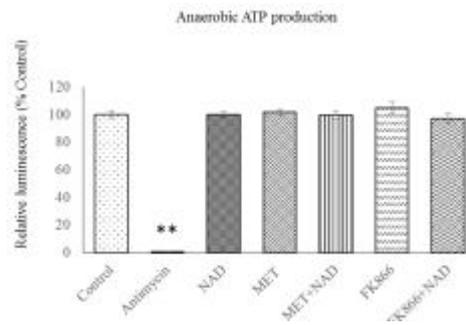
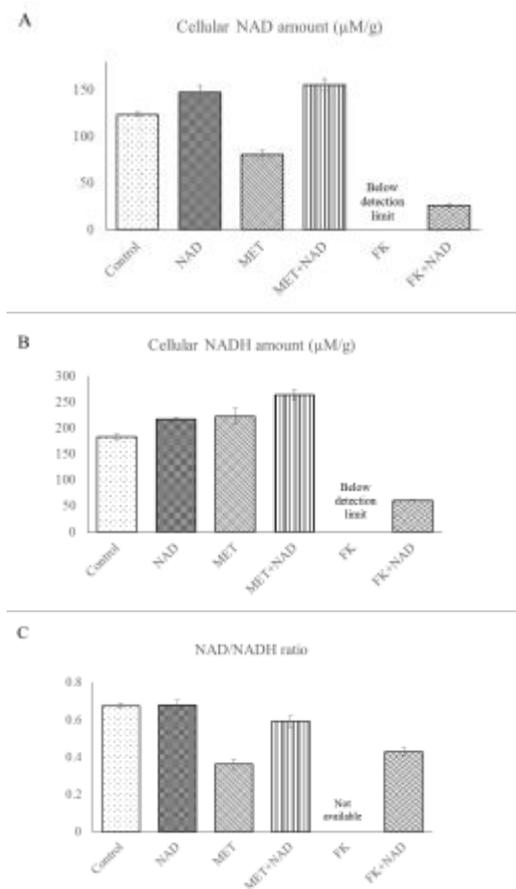


Fig.4. Change in cellular NAD(A) and NADH(B) content by the treatment of NAD, metformin, FK866 or their combination. (C) NAD/NADH ratio.



## 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)

Saeki, K., Watanabe, M., Tsuboi, M., Sugano, S., Yoshitake, R., Tanaka, Y., Ong, S.M., Saito, T., Matsumoto, K., Fujita, N., Nishimura, R., Nakagawa, T. (2015). Anti-tumour effect of metformin in canine mammary gland tumour cells. *Vet. J.* 205, 297-304.

Saeki, K., Watanabe, M., Michishita, M., Tsuboi, M., Sugano, S., Yoshitake, R., Murai, K., Tanaka, Y., Ong, S.M., Saito, T., Fujita, N., Nishimura, R., Nakagawa, T. (2015). Phenotypic screening of a library of compounds against metastatic and non-metastatic clones of a canine mammary gland tumour cell line. *Vet. J.* 205, 288-296. **2015 The Andrew Higgin 's Award (The Veterinary Journal)**

〔学会発表〕(計6件)

Saeki, K., Fujita, N., Nishimura, R., and Nakagawa, T. Metformin-induced growth inhibition of a canine mammary gland tumor cell line was partially attenuated by external compensation of nicotinamide adenine dinucleotide. 第15回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学、2015年6月。

Saeki, K., Fujita, N., Nishimura, R., and Nakagawa, T. External compensation of nicotinamide adenine dinucleotide partly attenuated metformin-induced growth inhibition of canine mammary gland tumor cell line. 4th Conference of Asian Society of Veterinary Surgery (AiSVS), Osaka, December, 2014.

Saeki, K., Watanabe, M., Tanaka, Y., S.M. Ong, Matsumoto, K., Saito, T., Tsuboi, M., Fujita, N., Sugano, S., Nishimura, R., and Nakagawa, T. Metformin exerts anti-proliferative effect through both AMPK-dependent and independent mechanism on canine mammary gland tumor (CMGT) cells. Veterinary Cancer Society annual meeting 2014, Proceedings of the 34th Annual Conference of the Veterinary Cancer Society, St.Louis, October, 2014.

Saeki, K., Watanabe, M., Nishimura, R., and Nakagawa, T. Anti-tumor effect of human diabetic drug metformin on canine breast cancer. 第14回東京大学生命科学シンポジウム、東京大学、2014年4月。**優秀ポスター賞**

Saeki, K., Yamamoto, H., Tanaka, Y., Hanafusa, M., Nishimura, R., and Nakagawa, T. Anti-diabetic drug metformin inhibits proliferation of canine mammary gland tumor (CMGT) cell lines in vitro and in xenograft mouse model. Veterinary Cancer Society annual meeting 2013, Proceedings of the 33th Annual Conference of the Veterinary Cancer Society, Minneapolis, October, 2013.

佐伯 亘平、山本 博紀、田中 由依子、花

房 明生、翁 秀敏、松本 香織、齋藤 友睦、Choisunirachon Nan、西村 亮平、中川 貴之。ミトコンドリア呼吸鎖複合体阻害薬の犬悪性乳腺腫瘍細胞に対する抗腫瘍効果に関する検討。2013年9月、岐阜、日本獣医学会学術集会

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中川 貴之 (NAKAGAWA, Takayuki)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号：40447363

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし