

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462181

研究課題名(和文) mTORシグナルを介したグルタミン代謝機構の解析とグリオーマ新規治療法の開発

研究課題名(英文) Integrated analyses of GBM cell lines, in vivo xenograft models, and clinical samples to examine the glutamine metabolism in response to mTOR-targeted treatments

研究代表者

田中 一寛 (TANAKA, KAZUHIRO)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：70467661

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：悪性グリオーマに対してmTOR阻害薬が細胞内代謝に及ぼす影響とその耐性機構について、質量分析計によるメタボローム解析やreal-time PCRによる特定の代謝関連遺伝子の解析を行った。mTOR阻害薬を投与後にはグルタミン酸、 α -ケトグルタル酸、コハク酸、リンゴ酸の有意な上昇を認め、代謝遺伝子グルタミナーゼ(GLS)のmRNA発現亢進を認めた。GLS阻害薬の投与によってグリオーマ細胞あるいはマウス皮下移植モデルのmTOR阻害薬に対する感受性が増強し、抗腫瘍効果が増強した。グルタミン代謝経路がmTORシグナルと共に悪性グリオーマの新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The impact of mTOR inhibition on metabolic reprogramming in malignant glioma is incompletely understood. Here, by integrating metabolic and functional studies in glioblastoma multiforme (GBM) cell lines, in vivo models and clinical samples, we demonstrate that the compensatory upregulation of glutamine metabolism promotes resistance to mTOR kinase inhibitors. Metabolomic studies reveal elevated glutaminase (GLS) and glutamate levels following mTOR kinase inhibitor treatment, which is confirmed in a xenograft model. GLS is shown to promote GBM survival following mTOR inhibitor treatment. Genetic and pharmacologic studies demonstrate that combined inhibition of mTOR kinase and GLS cause massive synergistic tumor cell death and growth inhibition in vivo. These results highlight a critical role for compensatory glutamine metabolism in promoting mTOR inhibitor resistance, and suggest a rational combination therapy to suppress it.

研究分野：医歯薬学

キーワード：グルタミン代謝 グルタミナーゼ mTOR グリオーマ

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫(グリオーマ)は脳に発生する悪性腫瘍で、集学的治療を施しても生存期間中央値ははまだ1年半と極めて予後不良の疾患である。多くの癌(腫瘍)細胞のエネルギー代謝がグルコースに依存していることは Warburg 効果として既に明らかであるが、同時に非必須アミノ酸であるグルタミンが ATP 産生、高分子生合成の炭素骨格に“必須”であることも知られている (Locasale and Cantley, *Cell Metab.* 2011)。これは癌細胞内の代謝リモデリングを反映しており、グルコース代謝とグルタミン代謝は互いに密接な連携を保ちながら細胞増殖・分裂に必要なエネルギー産生・生合成に関与し、細胞代謝の多様性を担保していると考えられる。一方、悪性グリオーマでは上皮成長因子受容体(EGFR)の増幅・変異(EGFR variant-III, EGFRvIII)などにより PI3 キナーゼ(PI3K)シグナルが亢進しており、そのシグナルの下流にある The mammalian target of rapamycin (mTOR)は強く活性化されて細胞増殖・生存に深く関与している (Tanaka et al. *Cancer Discov.* 2011)。グルコース代謝にはこの PI3K/mTOR シグナルが強く関与していることが報告されている (Laplante et al. *Cell* 2012) が、グルタミン代謝に及ぼす影響については未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では質量分析計によるメタボローム解析によって PI3K/mTOR シグナルが悪性グリオーマの細胞内代謝に与える影響を解析する。特に、mTOR がグルタミン代謝に与える影響を探求するため、mTOR 阻害薬を用いてグルタミン代謝活性やミトコンドリア機能の変化を解析する。また、mTOR 阻害剤に対する耐性機序を解明し、グルタミン代謝阻害剤との併用による新たな治療法の開発を目標とした基礎的な実験を行う。

3. 研究の方法

変異型 EGFR 遺伝子発現ヒト悪性グリオーマ細胞に mTOR 阻害薬を投与し、ガスクロマトグラフィー/質量分析計(GC/MS)によるメタボローム解析を用いて細胞内代謝産物の変化を解析した。また、細胞内のグルコースおよびグルタミン代謝について特定の代謝関連遺伝子に着目して real-time PCR などで解析を行った。得られた結果から悪性グリオーマ細胞および動物移植モデルを使用して mTOR 阻害薬と共に効果的な代謝ターゲットについて解析・評価した。

mTOR 阻害による細胞内代謝物の変化を解析する。

特に、グルコースおよびグルタミン代謝関連酵素の発現・機能変化を明らかにする。

mTOR 阻害剤と共にグルタミン代謝酵素阻害剤を併用して、相乗的・相加的な抗腫瘍効果が得られるかを明らかにす

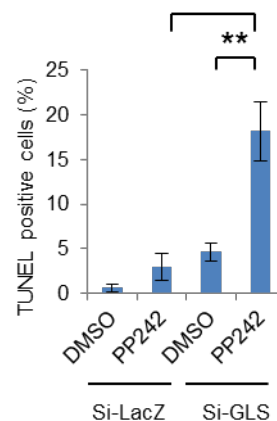
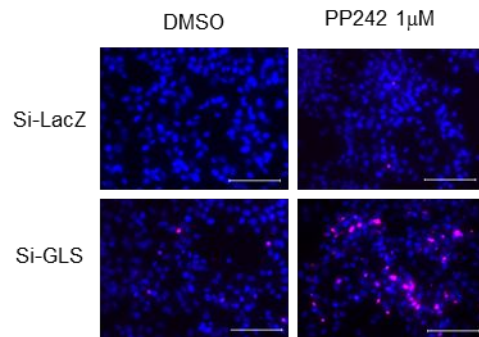
る。

4. 研究成果

(1) 悪性グリオーマ細胞に mTOR 阻害剤(ラパマイシンまたは PP242)を投与後のガスクロマトグラフィー/質量分析計(GC/MS)によるメタボローム解析では細胞内のグルタミン酸の有意な上昇を認め、TCA 回路内の代謝物では、 α -ケトグルタル酸、クエン酸(イソクエン酸)、コハク酸、の有意な上昇を認めた。その他、アミノ酸の中ではアスパラギン酸の上昇を認めた。

(2) グルタミン代謝に注目して real-time PCR での代謝酵素の mRNA 量の解析を行い、グルタミンからグルタミン酸産生を調節する代謝遺伝子グルタミナーゼ (GLS)の発現亢進を認めた。

(3) siRNA 法による GLS ノックダウンや GLS 阻害薬の投与によってグリオーマ細胞の mTOR 阻害薬に対する感受性(細胞死誘導)が増強し、この効果は α -ケトグルタル酸に依存した。



(4) グリオーマ細胞のマウス移植モデルを作成し、GLS 阻害薬の投与によって mTOR 阻害薬の抗腫瘍効果が増強することを確認した。

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)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Takata K, Nagashima H, Satoh N, Kyotani K, Mizowaki T, Imahori T, Ejima Y, Masui K, Gini B, Yang H, Hosoda K, Sasaki R, Mischel PS, Kohmura E. Compensatory glutamine metabolism promotes glioblastoma resistance to mTOR inhibitor treatment. **J Clin Invest**. 査読あり 2015 Apr;125(4):1591-602. doi: 10.1172/JCI78239. Epub 2015 Mar 23. PubMed PMID: 25798620; PubMed Central PMCID: PMC4396477.
2. Masui K, Tanaka K, Ikegami S, Villa GR, Yang H, Yong WH, Cloughesy TF, Yamagata K, Arai N, Cavenee WK, Mischel PS. Glucose-dependent acetylation of Rictor promotes targeted cancer therapy resistance. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 査読あり 2015 Jul 28;112(30):9406-11. doi: 10.1073/pnas.1511759112. Epub 2015 Jul 13. PubMed PMID: 26170313.
3. Tanaka K, Sasayama T, Mizukawa K, Takata K, Sulaiman NS, Nishihara M, Kohta M, Sasaki R, Hirose T, Itoh T, Kohmura E. Combined IDH1 mutation and MGMT methylation status on long-term survival of patients with cerebral low-grade glioma. **Clin Neurol Neurosurg**. 査読あり 2015 Jul 31;138:37-44. doi: 10.1016/j.clineuro.2015.07.019. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 26276726.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 田中一寛、篠山隆司、入野康宏、高田孔美、長嶋宏明、甲村英二: mTOR シグナル阻害による悪性グリオーマ細胞内グルタミン代謝機構の変化 第2回がんと代謝研究会、東京、2014年7月10-11日
2. Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Takata K, Nagashima H, Masui K, Gini B, Yang H,

Mischel PS, Kohmura E:

Glutaminase-mediated metabolic pathway involves glioblastoma resistance to mTOR-targeted therapies. The 11th Annual Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO), Istanbul, Turkey, September 11-14, 2014

3. Tanaka K, Sasayama T, Irino Y, Takata K, Nagashima H, Masui K, Gini B, Yang H, Mischel PS, Kohmura E: Glutaminase-mediated metabolic pathway involves glioblastoma resistance to mTOR-targeted therapies. 19th World Congress on Advances in Oncology & 17th International Symposium on Molecular Medicine, Athens, Greece, 9-11 October, 2014
4. Tanaka K (**invited**), Sasayama T, Irino Y, Takata K, Nagashima H, Masui K, Gini B, Yang H, Mischel PS, Kohmura E: Glutaminase-mediated metabolic pathway involves glioblastoma resistance to mTOR-targeted therapies. 19th Annual Scientific Meeting and Education Day of the society for Neuro-Oncology (SNO), Miami, Florida, 13-16 November, 2014
5. 田中一寛、篠山隆司、入野康宏、佐藤直子、長嶋宏明、甲村英二: 悪性グリオーマのグルタミン代謝による代償的 mTOR 阻害薬耐性機構 第3回がんと代謝研究会、金沢、2015年7月16-17日
6. 田中一寛、篠山隆司、入野康宏、佐藤直子、長嶋宏明、甲村英二: 悪性グリオーマの mTOR シグナル阻害薬に対する代償的グルタミン代謝機構、第74回日本脳神経外科学会学術総会、札幌、2015年10月14日
7. 田中一寛、篠山隆司、入野康宏、佐藤直子、長嶋宏明、甲村英二: 悪性グリオーマの mTOR シグナル阻害薬に対する代償

的グルタミン代謝機構、第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会、京都、2015 年 12 月 6-8 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/neuro/TOP2.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 一寛 (TANAKA, Kazuhiro)
神戸大学・医学研究科・助教
研究者番号：70467661

(2) 研究分担者

篠山 隆司 (SASAYAMA, Takashi)
神戸大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10379399

入野 康宏 (IRINO, Yasuhiro)
神戸大学・医学研究科・特命助教
研究者番号：10415565

(3) 連携研究者

()

研究者番号：