

平成 28 年 4 月 18 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670635

研究課題名(和文) がん幹細胞運命決定の糖代謝レオスタット仮説実証を通じて膠芽腫根治モデル創出に挑む

研究課題名(英文) An attempt to create an animal model for glioblastoma cure via proving the hypothesis that glucose metabolism serves as a rheostat to determine the cell fate of cancer 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

研究成果の概要(和文)：がんでしばしば認められる糖代謝亢進ががん細胞にとってどのような意義があるかについてはいまだ不明な点が多い。本研究課題では糖代謝ががん幹細胞状態の調節器としてグリオブラストーマ幹細胞の維持に重要な役割を果たしているという作業仮説の検証を試みた。グリオブラストーマ幹細胞の糖代謝を調節する目的でグルコーストランスポーターの一つGLUT1の機能を抑制したところ、糖代謝抑制とともに細胞内活性酸素レベルの上昇が観察され、同時に幹細胞性の喪失が認められた。これらの結果は糖代謝が細胞内活性酸素レベルの調節を通じてグリオブラストーマ幹細胞のがん幹細胞状態維持に寄与している可能性を示唆しているものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Glucose metabolism is often increased in human cancers, the significance of which for cancer cells remains mostly unclear. In this project, we conducted experiments to test the working hypothesis that glucose metabolism serves as a rheostat to determine the cell fate of glioblastoma stem cells. Inhibition of glucose metabolism through the inhibition of GLUT1, a facilitative glucose transporter, resulted in increased intracellular reactive oxygen species (ROS) level as well as in the loss of the stem cell properties of glioblastoma stem cells, which suggested the possibility that glucose metabolism could contribute to the maintenance of glioblastoma stem cells through the modulation of intracellular ROS level.

研究分野：脳神経外科学、脳腫瘍学

キーワード：glioma-initiating cell

## 1. 研究開始当初の背景

近年、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ている。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。従ってヒトがんの中でも難治を極めるグリオブラストーマの「根治」を実現するうえで、この少数細胞集団であるグリオブラストーマ幹細胞の制御が必須不可欠のプロセスであることが認識されるようになってきた。

これまでに我々はグリオブラストーマ幹細胞維持に関わる分子機構の解明に取り組み、2型糖尿病治療薬である metformin が細胞内代謝調節のマスター制御分子である AMPK の活性化を通じてグリオブラストーマ幹細胞の分化を誘導し、腫瘍形成能を抑制することを明らかにした。極めて重要なことに、AMPK はグルコース代謝のみならず脂肪酸やコレステロールといった脂質代謝等にも関わっているが、今回我々は細胞外グルコース濃度が AMPK 活性化への影響を通じてグリオブラストーマ幹細胞の維持に直接関与していることを見出した。これはグリオブラストーマに限らず、他のがん種を含めてもがん幹細胞に関する世界に先駆けた発見である。

一方我々は、全く別のアプローチから JNK の活性がグリオブラストーマ幹細胞の維持に必須の役割を果たしていることを発見し、JNK 阻害薬が in vivo においてグリオブラストーマ幹細胞の腫瘍形成を抑制し優れた治療効果をもつことを世界に先駆けて報告した。興味深いことに、JNK は糖尿病発症への関与が指摘されており、JNK 阻害薬は糖尿病治療薬候補としても注目を集めている (Bennett BL: JNK: a new therapeutic target for diabetes. *Curr Opin Pharmacol* 3:420, 2003)。全くの偶然ではあるが、これらの我々独自の先駆的な発見は「糖代謝ががん幹細胞 (グリオブラストーマ幹細胞) 制御に中心的な役割を果たしている」という新たなコンセプトを生み出すとともに、糖代謝を直接の標的としたグリオブラストーマ幹細胞治療に初めて理論的根拠を与えるものとなった。

以上のような世界に先駆けた我々独自の実験的事実は、グルコース代謝そのものががん幹細胞制御に深く関わっている可能性を示唆するものであると同時に、グルコース代謝を標的とする治療ががん幹細胞 (本研究ではグリオブラストーマ幹細胞) 制御を通じてがん根治療法に寄与しようという考えに世界で初めて実験的根拠を与えるものとなった。これまでもグルコース代謝を標的としたがん治療は多く検討されてきたが、未だ著しい成功はおさめていない。このような状況は我々の仮説により容易に説明される。すなわちグルコース代謝ががん幹細胞特異的に寄

与しているならば、「非」がん幹細胞が大部分を占める腫瘍全体を治療標的としたグルコース代謝標的治療はむしろ不首尾に終わるはずである。このように同じ糖代謝標的治療でも我々の提唱するがん幹細胞標的治療は従来の単純なグルコース代謝標的がん治療と本質的に異なるものである。

以上のようなことから、本課題では以下の「研究の目的」の項に記す仮説検証を行うため、課題申請を行った。

## 2. 研究の目的

本研究では「糖代謝がレオスタット (幹細胞状態維持の調節器) としてがん幹細胞制御に重要な役割を果たしており、がん幹細胞治療の有効な標的となる」という、我々が確立しつつある新規概念・仮説をより強固なものとするための実験的根拠をさらに積み重ねるべく、糖代謝がどのような機序でがん幹細胞維持に寄与しているかを明らかにするとともに、糖代謝を標的としたがん幹細胞標的治療が可能かを in vivo 動物モデルを用いて検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

グリオブラストーマ幹細胞維持における糖代謝の役割について検討を行うため、グルコーストランスポーターの一つである GLUT1 に対する阻害薬や siRNA を用いることで糖代謝を抑制した。糖代謝抑制 (細胞内 ATP の減少、ADP/AMP の増加) の程度はリン酸化 AMPK の発現を検討することにより行った。幹細胞マーカーや分化マーカー等の発現については、ウエスタンブロット法、フローサイトメトリー等の方法により調べた。自己複製能を評価するためスフィア形成アッセイを行った。細胞内活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) レベルは細胞を dichlorofluorescein acetate (DCFDA) で染色後フローサイトメトリーにより測定した。がん幹細胞の腫瘍形成能はヌードマウス皮下に細胞を移植し、腫瘍の有無、形成された腫瘍の体積を経時的にモニターすることにより評価を行った。

## 4. 研究成果

種々の糖代謝関連分子のうち、グルコースの細胞内輸送に関わる GLUT1 に対する薬理的阻害薬および siRNA を用いて当該分子の機能抑制を試みたところ、AMPK の活性化 (リン酸化 AMPK の発現亢進) が観察され、この分子の抑制が効率よくがん幹細胞内 ATP を枯渇させ、ADP/AMP を増加させていることが明らかになった。このような条件下で種々のがん幹細胞パラメータにつき検討を行ったところ、薬理的阻害薬、siRNA のいずれによっても当該分子の抑制により幹細胞状態

が抑制されている所見が得られた。これらの結果から GLUT1 を介したグルコース取り込みがグリオブラストーマがん幹細胞の維持に重要な役割を果たしていることが確認された。また、in vivo での GLUT1 阻害ががん幹細胞の腫瘍創始能を抑制し治療効果を発揮するか検討したところ、GLUT1 阻害薬の全身投与によりがん幹細胞による腫瘍創始が抑制されることが確認された。さらにこのような GLUT1 阻害により幹細胞性が失われる機序について検討を行ったところ、GLUT1 阻害により細胞内グルコース取り込みを抑制すると細胞内 ROS レベルの上昇が誘導されることがわかった。我々はすでにグリオブラストーマ幹細胞内の ROS レベルの上昇が幹細胞性の喪失を引き起こすことを明らかにしており (Sato A et al. *Stem Cell Res* 12:119-131, 2014)、糖代謝抑制による細胞内 ROS レベルの上昇が GLUT1 抑制によるがん幹細胞性喪失のメカニズムである可能性が考えられた。以上より糖代謝活性は細胞内 ROS レベルの調節を通じてがん幹細胞状態を規定するレオスタットとして機能していることが示唆された。

#### 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)

[雑誌論文](計 12 件)

- 1) Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Sakaki H, Seino S, Seino M, Suzuki S, Kitanaka C: The novel JNK inhibitor AS602801 inhibits cancer stem cells in vitro and in vivo. *Oncotarget* in press, 2016  
doi:10.18632/oncotarget.8395. (査読有)
- 2) Seino M, Okada M, Sakaki H, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Kuramoto K, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C: Time-staggered inhibition of JNK effectively sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin and paclitaxel. *Oncol Rep* 2016;35(1):593-601  
doi:10.3892/or.2015.4377. (査読有)
- 3) Sakaki H, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Suzuki S, Seino S, Seino M, Ohta T, Nagase S, Kurachi H, Kitanaka C: GSKJ4, A Selective Jumonji H3K27 Demethylase Inhibitor, Effectively Targets Ovarian Cancer Stem Cells. *Anticancer Research* 2015;35(12):6607-6614 (査読有)
- 4) Seino M, Okada M, Shibuya K, Seino S, Suzuki S, Takeda H, Ohta T, Kurachi H, Kitanaka C: Differential contribution of ROS to resveratrol-induced cell death and loss of self-renewal capacity of ovarian cancer stem cells. *Anticancer Research* 2015;35(1):85-96 (査読有)
- 5) Shibuya K, Okada M, Suzuki S, Seino M, Seino S, Takeda H, Kitanaka C: Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells. *Oncotarget* 2015;6(2):651-661 (査読有)
- 6) Suzuki S, Okada M, Shibuya K, Seino M, Sato A, Takeda H, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C: JNK suppression of chemotherapeutic agents-induced ROS confers chemoresistance on pancreatic cancer stem cells. *Oncotarget* 2015;6(1):458-470 (査読有)
- 7) Uzuka T, Asano K, Sasajima T, Sakurada K, Kumabe T, Beppu T, Ichikawa M, Kitanaka C, Aoki H, Saito K, Ogasawara K, Tominaga T, Mizoi K, Ohkuma H, Fujii Y, Kayama T; Tohoku Brain Tumor Study Group: Treatment outcomes in glioblastoma patients aged 76 years

- or older: a multicenter retrospective cohort study. J Neurooncol 2014;116:299-306 (査読有)
- 8) Tomiyama A, Uekita T, Kamata R, Sasaki K, Takita J, Ohira M, Nakagawara A, Kitanaka C, Mori K, Yamaguchi H, Sakai R : Flotillin-1 regulates oncogenic signaling in neuroblastoma cells by regulating ALK membrane association. Cancer Res 2014;74:3790-3801 (査読有)
- 9) Okada M, Shibuya K, Sato A, Seino S, Suzuki S, Seino M, Kitanaka C: Targeting the K-Ras - JNK axis eliminates cancer stem-like cells and prevents pancreatic tumor formation. Oncotarget 2014;5:5100-5112 (査読有)
- 10) Seino M, Okada M, Shibuya K, Seino S, Suzuki S, Ohta T, Kurachi H, Kitanaka C: Requirement of JNK signaling for self-renewal and tumor-initiating capacity of ovarian cancer stem cells. Anticancer Res 2014;34:4723-4731 (査読有)
- 11) Okada M, Sato A, Shibuya K, Watanabe E, Seino S, Suzuki S, Seino M, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: JNK contributes to temozolomide resistance of stem-like glioblastoma cells via regulation of MGMT expression. Int J Oncol 2014;44:591-599 (査読有)
- 12) Sato A, Okada M, Shibuya K, Watanabe E, Seino S, Narita Y, Shibui S, Kayama T, Kitanaka C: Pivotal role for ROS activation of p38 MAPK in the control of differentiation and tumor-initiating capacity of glioma-initiating cells. Stem Cell Res 2014;12:119-131 (査読有)
- [学会発表](計9件)
- 1) 北中千史: グリオーマ、固形がん幹細胞を標的とする治療法開発を目指したがん幹細胞研究. 第74回日本癌学会学術総会, 名古屋(名古屋国際会議場); 2015年10月8日
- 2) 北中千史: 臨床応用を目指したグリオーマ幹細胞研究. 第5回栃木ニューロオンコロジー研究会 特別講演, 宇都宮(宇都宮グランドホテル); 2015年7月30日
- 3) 北中千史: 臨床応用を目指したがん幹細胞研究. 第1回北里大学悪性脳腫瘍研究会 特別講演, 相模原(北里大学); 2015年5月15日
- 4) 北中千史: 臨床応用を目指したがん幹細胞研究. 第50回大分脳腫瘍研究会 特別講演, 大分(アルメイダ病院研修会館); 2015年3月14日
- 5) 北中千史: 臨床応用を目指したがん幹細胞研究. 第15回日本分子脳神経外科学会ランチョンセミナー, 山形(大手門パルズ); 2014年9月25日
- 6) 北中千史: 糖尿病薬メトホルミンのグリオーマ幹細胞抑制作用. 第2回がん代謝研究会指定講演, 東京(東京理科大学葛飾キャンパス図書館大ホール); 2014年7月11日
- 7) 北中千史: グリオーマ幹細胞 第32回日本脳腫瘍病理学会ランチョンセミナー, 徳島(徳島県郷土文化会館); 2014年5月24日
- 8) 北中千史: グリオーマ幹細胞. 第34回日本脳神経外科コンgres総会, 大阪(大阪国際会議場); 2014年5月17日
- 9) 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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 連携研究者

岡田 雅司 (OKADA MASASHI)  
山形大学・医学部・講師  
研究者番号: 70512614