

200400459A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江角 浩安

平成17(2005)年 4月

目 次

I. 総括研究報告		
新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究	-----	1
江角浩安		
II. 分担研究報告		
1. 微生物代謝産物からの抗がん剤の探索	-----	7
國本節子		
2. 嫌氣的代謝を利用した抗がん剤の開発	-----	11
北 潔		
3. がんにおけるミトコンドリアの構造と機能変異と治療への応用	---	15
田中雅嗣		
4. 腫瘍特異的微小環境適応シグナル伝達を利用した抗がん剤の開発	---	19
上野隆		
5. 臨床的ゲノム情報に基づいた抗がん剤の開発	-----	22
門田守人		
6. 腫瘍脈管構築に基づくがん化学療法の開発	-----	31
松村保広		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	34

厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

総括研究報告書

新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究

主任研究者 江角 浩安 国立がんセンター研究所支所 支所長

研究要旨 がん組織の特徴と、それに対するがん細胞の適応反応に注目して見出したキガマイシンは、膵がん細胞に対するゲムシタビンの感受性を約1000倍に増強するが、マウスでの副作用は増強せず、有望な増感剤と考えられた。膵臓がん細胞では、飢餓状態に対する反応としてのオートファジーが盛んであり特徴的性質といえる。哺乳動物細胞で、嫌氣的呼吸が起こりうることを示した。これはがん特異的標的となると考えられた。シスプラチンをミセル体に封入すると有効性は落ちず副作用が著明に減少した。臨床導入可能と考えられた。

A. 研究目的

本研究は、画期的がん治療法の開発を目指し、多くのがんで共通に見いだされる、がん組織の構造と機能の異常を明らかにし、これを標的とした治療薬を生み出そうとするものである。がん組織の構造的・機能的特徴は、発がんに関わる遺伝子の多様性に比較すると、多様性が少ないことも期待されている。最近の研究では、特に悪性度の高いがん組織では組織の低酸素の程度が高いという、共通した特徴が報告されてきた。我々の研究は、がん組織の低酸素を中心とした、正常組織にはない特徴を標的とするものであり、がんに対する特異性のみならず、汎用性も期待される。さらに、従来の低酸素の研究ではあまり重要視されなかった、低酸素下でのエネルギー産生機構に注目する研究であり、新しい標的に対する治

療薬が生み出されれば、現在開発が進められている分子標的治療薬と車の両輪となり、より有効で患者への身体的精神的負担の少ない根治を目指しうる治療法が可能となる。

B. 研究方法、C. 研究結果

平成16年度の研究方法と結果を簡潔に述べる。

1) がん克服事業で発見したキガマイシンによりヒト膵臓がん細胞、PANC-1、CAPAN-1、AsPc-1、Miapaca-2の4株、ヒト大腸がん細胞株SW480では、ゲムシタビンの細胞毒性が約1000倍に増強された。同様の増強効果は、タキソール、ヴィンクリスチン、カンプトテシンでも認められた。このような増強効果が認められない細胞、認められない薬剤もあった。C57BL/6マウスに

に対するゲムシタピンの、骨髄毒性、腎毒性、肝臓毒性を3週間にわたりキガマイシンと共に投与し検討した。ゲムシタピンの毒性はキガマイシンにより増強されなかった。このように、副作用の増強なく抗がん効果の増強があるのはきわめて不思議なことである。キガマイシンとゲムシタピンの併用によりPANC-1細胞のヌードマウスでの腫瘍に対しては有意の増強効果があった。実用的には抗がん剤感受性増強薬としての開発も進めるが、どのようなメカニズムでこのようなことが起こるのかは、抗がん剤の本当の抗がん効果を知る上でも、キガマイシンの効果を知る上でも大切な情報である。

- 2) キガマイシンは、膵臓がん細胞に対する栄養飢餓状態での選択的毒性を指標として発見された薬剤である。同様の効果を示すものとして、ピルヴィニューウムパモエートやP13キナーゼ阻害剤LY294002を同定しているが、これらの物質ではゲムシタピンの細胞毒性増強は認められなかった。3化合物共にPI3キナーゼ阻害活性があるが、ゲムシタピンに対する増強効果は、この阻害活性とは異なるものと考えられた。今後の解明が待たれる。
- 3) キガマイシンの絶対立体構造を決定した。更に誘導体合成のため構造活性相関を調べ、キガマイシン類の糖鎖に関しては活性に不要であること、オキザゾリジン環が開環すると活性が無くな

ることがわかった。キガマイシンDは分子量が約1000であり、通常の意味では経口薬としての分子量の限界に近い。糖鎖がなければ約500となり腸管吸収は向上するはずであるが、実際には水への溶解性が極端に悪くなり、生体内でこの形で効果があるか否かは不明である。水溶性を増す意味でもエステル化などの構造修飾を試す必要がある。

- 4) イムノブロットによりPANC-1、Capan-1、Paca-2では、オートファゴソーム膜マーカーであるAtg8の哺乳動物ホモログLC3、GABARAP、GATE-16が多く発現していることが明らかになった。LC3は、脂質化された(lipidated)II型が多く、GABARAPやGATE-16は可溶性のI型が多かった。また、E64dおよびpepstatin存在下にLC3-IIとGABARAP-IIの蓄積が促進されたことから、少なくともLC3とGABARAPはオートファゴソームに動員され、リソソームでターンオーバーを受けていることが判明した。さらに、膵がん由来細胞では、Kigamicin処理によってLC3とGABARAPのレベルが有意に増加し、Kigamicinはオートファゴソーム形成を促進する働きを持つことが示唆された。一方、大腸がん細胞SW480やメラノーマ細胞では、LC3やGABARAPの脂質化(lipidation)促進は見られなかった。
- 5) がん細胞におけるミトコンドリアエネ

ルギー産生系の機能の相違が腫瘍の増殖性・浸潤性・薬剤感受性に影響を与えている可能性がある。そこでミトコンドリア DNA 変異を有する 2 種のサイブリッドの遺伝子発現をミトコンドリア機能が正常な骨肉腫細胞と比較し、ミトコンドリア機能異常に伴って、どのような細胞内過程に関わる遺伝子の発現が上昇するかについて検討した。その結果、ミトコンドリア機能異常によって、DNA 損傷とそれに対する修復系、細胞の増殖刺激に対する応答、蛋白質合成系などに関わる遺伝子の発現が上昇することが明らかになった。これらによって、腫瘍細胞の抗ガン剤に対する感受性が変化すると推定された。

- 6) 哺乳類ミトコンドリアにおける嫌氣的エネルギー代謝の実体を明確にする目的で、以下の方法によって研究を行った。哺乳類ミトコンドリアにおける NADH-フマル酸還元系 (NADH-FR) やフマル酸還元酵素など嫌氣的呼吸鎖の活性を調べ、回虫成虫の酵素活性と比較した。特に複合体 II の嫌氣的条件下での活性であるフマル酸還元酵素活性としては、回虫成虫ミトコンドリアのキノンの主成分である酸化還元電位の低いロドキノンの還元型を基質としたロドキノール-フマル酸還元酵素活性 (RQFR) を測定した。ロドキノールはその電位が低いために非酵素的に反応溶液中の酸素への電子伝達が起こるため、嫌気キュベットを用いて活性測定

を行った。その結果、哺乳類ミトコンドリアにおいても嫌氣的呼吸鎖が機能しうる事が明らかになった。また駆虫剤ピルビニウムパモエートがこれらの嫌氣的呼吸活性に対して、好氣的活性より高い阻害効果を示す事が判った。この結果はピルビニウムパモエートが嫌氣的環境下のがん細胞におけるエネルギー代謝を特異的に阻害する可能性を示している。

- 7) 大腸癌肝転移巣の血管構築とそのメカニズムを解析するため各種の臨床的および分子的解析を行った。Perfusion CT では肝転移巣の血流は外縁で豊富であるが中心に向かうにつれ減少した。低酸素誘導遺伝子マーカーとして HIF-1, VEGF, CA9 (carbonic anhydrase), Glut-1 の染色を行い、血管分布 (CD34 染色) との関連を検討した (肝転移巣パラフィン切片、N=14)。VFGF と CA9 が乏血管領域の癌細胞で発現が亢進していた。特に CA-9 は乏血管領域の中に血管がわずかでもあると近傍の腫瘍細胞は発現を失い、低酸素の鋭敏なマーカーと考えられた。
- 8) 種々のがん種にその効果が知られているシスプラチン (CDDP) をミセルに内包させることにより、正常組織特に神経系への集積を抑えつつ、がん組織に選択的に CDDP を集積させることが可能か否かを検討した。ミセル体の CDDP/m は著明に血中半減期がのびて血漿中 AUC は CDDP に比べ 65 倍以上高く

なった。抗腫瘍効果は同等であった。
抗腫瘍効果は容量依存性であった。また
CDDP/mはCDDPによる末梢神経障害
を著明に抑制しうることも判明した。
以上の基礎研究の結果から早急に
CDDP/mの臨床試験を行うべきと考え

(倫理面への配慮)

本研究は、ヒトの試料を用いた研究に関
しては、大学の倫理審査委員会に諮り許可
を得他の血、患者の同意を得た試料を用い
て行った。また、動物実験に関しては、各
施設の実験動物倫理審査委員会の審査を受
け、その後に行った。

D. 考察

本年度は、研究の一年目であり必ずしも
すべての班員の研究が有機的には動かなか
った。しかし、長年懸案であった、哺乳動
物細胞での嫌氣的呼吸の存在を証明し、更
に我々が見出した栄養飢餓、低酸素での特
異的細胞毒性を示す化合物がこれを阻害す
ることを確認できた。また、栄養飢餓状態
にさらされて進展したことが推定される腺
がん細胞が、オートファジーに偏っている
こと、など次の段階で共同でメカニズムを
解析する手がかりを得ることが出来た。更
に、抗がん剤としては既存の物質であるが、
これをミセル体に内包し腫瘍と正常組織の
血管構築の違いを利用しうる剤型が正常組
織への傷害が著明に減弱することを確認で
きた。我々が見出した、新規の薬物と共に
臨床導入の数年のうちに目指す必要がある。

E. 結論

本年度の研究で、がん組織の特徴である
血管構築が不十分でその機能が異常である
ため、がん組織が低酸素と同時に栄養飢餓
にもさらされていることを利用した癌治療
法の開発の現実性が証明できた。今後は、
この実用化に向けた、メカニズムの解析、
特異性の詳細な検討、及び具体的に得られ
た薬剤の臨床導入のための準備が必要であ
る。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kusakai G, Suzuki A., Ogura T., Miyamoto S., Ochiai A., Kaminishi M. and Esumi H. ARK5 Expression in Colorectal Cancer and Its Implications for Tumor Progression. Am J Pathol 164(3): 987-995, 2004
- Suzuki A., Lu J., Kusakai G, Kishimoto A., Ogrua A. and Esumi H. ARK5 is a Tumor Invasion-Associated Factor Downstream of Akt Signaling. Mol Cell Biol 24(8): 3526-3535, 2004
- Nomura S., Kaminishi M., Takagi N. and Esumi H. Analysis of Promotor Region of X-Linked pgk-1 Gene Polymorphisms: Evidence for Polyclonality of Adult

- Mouse Gastric Glands. *Dig Dis Sci* 49(2):218-223, 2004
- Lu J., Kunimoto S., Yamazaki Y., Kaminishi M. and Esumi H. Kigamicin D, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity strategy targeting cancer cells' tolerance to nutrient starvation. *Cancer Science* 95(6):547-552, 2004
 - Kusakai G., Suzuki A., Ogura T., Kaminishi M. and Esumi H. Strong Association of ARK5 with Tumor Invasion and Metastasis. *J Exp Clin Cancer Res* 23(2):263-268, 2004
 - Yoshitake J., Akaike T., Akuta T., Tamura F., Ogura T., Esumi H. and Maeda H. Nitric Oxide as an Endogenous Mutagen for Sendai Virus without Antiviral Activity. *J. Virol* 78(16):8709-8719, 2004
 - Esumi H., Lu J., Kurashima Y. and Hanaoka, T. Antitumor Activity of Pyrvinium Pamoate, 6-(Dimethylamino)-2-[2-(2,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrrol-3-yl)ethenyl]-1-methyl-quinolinium Pamoate Salt, Showing Preferential Cytotoxicity during Glucose Starvation. *Cancer Sci* 95(8):685-690, 2004
 - Suzuki A., Kusakai G., Kishimoto A., Shimojo Y., Miyamoto S., Ogura T., Ochiai A. and Esumi H. Regulation of Caspase-6 and FLIP by The AMPK Family Member ARK5. *Oncogene* 23:7067-7075, 2004
 - Suzuki A., Kusakai G., Kishimoto A., Shimojo Y., Ogura T., Lavin MF. and Esumi H. IGF-1 phosphorylates AMPK-alpha subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 324:986-992, 2004
 - Takamochi K., Ogura T., Yokose T., Ochiai A., Nagai K., Nishiwaki Y., Suzuki K. and Esumi H. Molecular analysis of the TSC1 gene in adenocarcinoma of the lung. *Lung Cancer* 46:271-281, 2004
 - Minchenko O., Opentanova I., Minchenko D., Ogura T, Esumi H. Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation. *FEBS Lett.* 576(1-2):14-20, 2004
 - Lu J., Imamura K., Nomura S., Mafune K., Nakajima A., Kadowaki T., Kubota N., Terauchi Y., Ishii G., Ochiai A., Esumi H. and Kaminishi M. Chemopreventive effect of peroxisome proliferators activated receptor gamma on gastric carcinogenesis in mice. *Cancer Res.* (in press)

2. 学会発表

第3回国際消化器発癌会議

(第15回日本消化器癌発生学会)

Molecular bases of ischemia-accelerated tumor invasion and metastasis

第63回日本癌学会学術総会

がん特異的組織機能を標的とした治療戦略の提案 (Novel strategy for cancer therapy targeting cancer specific tissue function)

第42回日本癌治療学会総会

がんの微小環境に対する適応反応を標的とした新しい治療法の開発

高松宮妃癌研究基金第35回国際シンポジウム

Anti-Austerity: A new strategy of anti-cancer therapy based on cancer cells' response to their microenvironment

Keystone Symposia

(The Role of Microenvironment in Tumor Induction and Progression)

Austerity is a novel pathophysiological response of cancer cells to their microenvironments

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

微生物代謝産物からの抗がん剤の探索

分担研究者 國元 節子 (財)微生物化学研究センター・沼津創薬医科学研究所副所長

研究要旨 ヌードマウスに移植したヒト膵臓がん細胞に効果を示したキガマイシンDの開発に必要な下記基礎的研究を行った。
1. 絶対立体構造の決定 2. 細胞レベルでの効果発現の条件と特徴
3. 予想される代謝物とその生物活性

A. 研究目的

我々は「栄養飢餓状態でより強い殺細胞作用を示す」という新しい戦略で微生物代謝産物を探索し、新規構造を有するキガマイシンDを得た。キガマイシンDの平面構造は既に明らかにしていたが、機器分析だけでは決定できず未解決であったキガマイシンDの絶対立体構造を明らかにすることを目的にした。また、キガマイシンDの制がん活性を示す根拠を探ることを目的とし、細胞レベルでの解析によりキガマイシンDの効果発現に至る必須条件を追求し、さらに経口投与で予想される代謝物の構造を明らかにして、それらの生物活性を追求することを行った。

B. 研究方法

キガマイシンDの絶対立体構造の決定は、酸分解により得られる5種類の

分解物をそれぞれ有機溶媒抽出とシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、結晶化、X線結晶解析、旋光度の測定を行い、絶対立体構造を決定した。これらの絶対立体構造を論理的に構築することによりキガマイシンDの絶対立体構造を決定した。キガマイシンDおよび分解物の *in vitro* での生物活性はPANC-1ヒト膵臓癌細胞を用いて、栄養飢餓状態での選択的殺細胞作用の評価によった。*In vivo* での制がん活性は、Capan-1ヒト膵臓癌細胞をヌードマウスに移植し、薬剤は経口投与し、腫瘍の大きさを測定することで行った。細胞内レベルは、細胞を破碎し、有機溶媒で薬剤を抽出しHPLCで測定した。経口投与で予想される代謝物については、キガマイシンDを胃酸の酸度で処理し、分解物をHPLCで追求した。出来てくる2種類の分解物をそれぞれ精製し、NMR解析で、その構造を

決定し、*in vitro*、*in vivo*での生物活性を評価した。

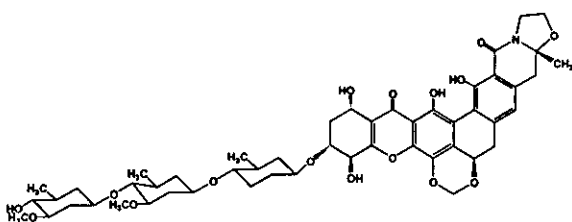
(倫理面への配慮)

有機溶剤の使用や化学実験に関してまた実験動物に対する配慮として

(財)微生物化学研究センターの環境安全委員会規定および動物実験指針に従った。

C. 研究結果

キガマイシンDについて、クロモホア部分に存在する5個の不斉炭素の立体配置および糖鎖を構成する3個のデオキシ糖の立体配置と結合様式を決定した。すなわち、キガマイシンDの絶対立体構造は、12*S*, 14*R*, 15*S*, 20*R*, 26*R*の絶対配位を持つアグリコンの14位に β -D-oleandrosyl- β -D-oleandrosyl- β -D-amicetose が結合していることを明らかにした。



キガマイシンDの細胞膜透過は、栄養飢餓培地でも通常の培地でもかなり速やかであり、細胞との接触は1時間で十分であった。しかし、殺細胞作用の発現には、細胞が数時間栄養飢餓状態で曝されることが必要であることを見いだした。

キガマイシンDを経口投与した場合に胃酸で分解または代謝されることが推定される。そこで胃酸の酸度であるpH1およびpH2で生成される分解物をHPLCで追求した。経口投与でも、キガマイシンDはかなり分解を免れ、5時間後でも40%はそのままの形であった。また、主たる代謝物は2種類であると予想される知見を得た。これらを精製し構造を決定したところ、糖を全て失ったアグリコン(キガマイシノンと命名)とさらに末端のオキサゾリジン環の開いた物質であった。キガマイシノンはキガマイシンDと同等の活性を有するが、オキサゾリジン環の開いた物質は活性を失っていることを見いだした。今後の誘導体の合成のための素材となるキガマイシノンを大量に純粋に得る条件を決定できた。

D. 考察

正常な栄養状態と比べて栄養飢餓状態でより強い殺細胞作用を示すキガマイシンDを経口投与すると、キガマイシンDまたは胃酸で分解して出来るアグリコンであるキガマイシノンが活性分子として腸管から吸収されると考えられる。膜透過には培地による選択性は認められなかったので、いろいろな細胞に透過されると考えられるが、殺細胞効果は、腫瘍の増大に伴い低栄養状態になっている細胞で

のみ発揮されると考えられる。キガマイシンDを取り込んだ低栄養状態の腫瘍細胞は約4時間後に死に至る。

キガマイシノンに活性が存在することを明らかにし、これを大量に純粋に得る方法を確立できたので、今後の誘導体の合成が可能になった。

E. 結論

「栄養飢餓状態でより強い殺細胞作用を示す」という新しい戦略で探索して得たキガマイシンDは、特徴ある新規構造を有し、その細胞内標的はPI3 kinase-AKT pathway であるというユニークなものである。さらに経口投与で有効であるという特徴を持つ。本物質を制がん剤として開発できるかどうかを見極めるために、さらなる研究を進めるべきである。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Lu J, Kunimoto S, Yamazaki Y, Kaminishi M, Esumi H.

Kigamicin D, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity strategy targeting cancer cells' tolerance to nutrient starvation.
Cancer Sci. 95, 547-52, 2004.

2) Someno T., Kunimoto S., Nakamura H., Naganawa H., Ikeda D. Absolute configuration of Kigamicins A, C, and D. J. Antibiotics, 58, 56-60, 2005

2. 学会発表

- 1) 第63回日本癌学会学術総会シンポジウム：癌特異的組織機能を標的とした治療戦略の提案：江角浩安、呂杰、倉島由紀子、國元節子
- 2) 第63回日本癌学会学術総会新規抗がん剤Kigamicin Dと通常抗がん剤の協同作用：呂杰、國元節子、山崎洋子、上西紀夫、江角浩安
- 3) 第63回日本癌学会学術総会新規抗がん剤Kigamicin Dと血管新生抑制剤TNP-470の併用による、腫瘍増殖抑制効果の検討：倉島由紀子、呂杰、國元節子、山崎洋子、江角浩安
- 4) 第63回日本癌学会学術総会新規抗癌抗生物質キガマイシンの絶対立体構造と生物活性：國元節子、増田徹、池田大四郎、呂杰、江角浩安
- 5) 第41回日本癌治療学会癌の微小環境に対する適応反応を標的とした新しい治療法の開発：江角浩安、呂杰、倉島由紀子、國元節子

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

新規抗生物質キガマイシン類とその用途（平成14.10.16）

キガマイシノン類及びその製造方
法、並びに、該キガマイシノン類を
含む薬用組成物（平成 16. 9. 21）

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

嫌氣的代謝を利用した抗がん剤の開発

分担研究者 北 潔 東京大学大学院医学系研究科

研究要旨 哺乳類ミトコンドリアにおいても嫌氣的呼吸鎖が機能しうる事が明らかになった。また駆虫剤ピルビニウムパモエートがこれらの嫌氣的呼吸活性に対して、好氣的活性より高い阻害効果を示す事が判った。この結果はピルビニウムパモエートが嫌氣的環境下のがん細胞におけるエネルギー代謝を特異的に阻害する可能性を示している。

A. 研究目的

研究分担者がこれまでに行ってきた寄生虫ミトコンドリアや細菌などの嫌氣的エネルギー代謝に関する経験を活かし、がん組織の嫌氣条件下でのエネルギー代謝の全体像を明らかにし、その中からがん特異的代謝を利用した生化学的標的を開発する。

B. 研究方法

本年度は哺乳類ミトコンドリアにおける嫌氣的エネルギー代謝の実体を明確にする目的で、以下の方法によって研究を行った。

寄生虫に特異的なエネルギー代謝のモデル系として、宿主小腸内と言う嫌氣的環境に生息している回虫成虫の筋肉ミトコンドリアを選び、また好氣的エネルギー代謝を行っている哺乳類としてはこれまでも生化学的な研究が進んでいるウシ心筋ミトコンド

リア（ α ミトコンドリア粒子：SMP）を用いた。

実際には、哺乳類ミトコンドリアにおける NADH- フマル酸還元系（NADH-FR）やフマル酸還元酵素など嫌氣的呼吸鎖の活性を調べ、回虫成虫の酵素活性と比較した。同時に、これらの活性の呼吸阻害剤に対する感受性を調べた。

特に複合体 II の嫌氣的条件下での活性であるフマル酸還元酵素活性としては、回虫成虫ミトコンドリアのキノンの主成分である酸化還元電位の低いロドキノンの還元型を基質としたロドキノール-フマル酸還元酵素活性（RQFR）を測定した。ロドキノールはその電位が低いために非酵素的に反応溶液中の酸素への電子伝達が起こるため、嫌氣キュベットを用いて活性測定を行った。また、ロドキノンは市販されていないため、京都大学大学

院農学系研究科の三芳秀人博士に合成を依頼した。

(倫理面への配慮)

本実験ではすべて回虫およびウシ心筋を材料として用いており、倫理上の問題はないと考えられる。

C. 研究結果

複合体 II の好氣的な酵素活性であるコハク酸脱水素酵素 (SDH) およびコハク酸-ユビキノン還元酵素 (SQR) は回虫ではそれぞれ 131 ± 33.4 nmol/min/mg タンパク質、 122 ± 3.7 nmol/min/mg protein (SQR)、ウシでは 248.9 ± 31.3 nmol/min/mg および 562 ± 86.4 nmol/min/mg タンパク質であった。一方、SQR の逆反応で、複合体 II の生理的に嫌氣的条件下での活性である RQFR は、回虫では 67.3 ± 9.7 nmol/min/mg タンパク質、ウシでは 8.86 ± 3.0 nmol/min/mg と回虫の約 13% の活性を示した。また、複合体 I および II の両酵素活性から構成される嫌氣的呼吸鎖 NADH-FR 活性は回虫では 70.3 ± 1.7 nmol/min/mg タンパク質であるのに対し、ウシでは 14.5 ± 0.5 nmol/min/mg タンパク質と回虫の約 1/5 の活性を示した。

次に複合体 II 特異的阻害剤であるアトペニン A5 を用いて嫌氣的な複合体 II 活性に対する IC_{50} を調べたところ、ウシにおける RQFR の IC_{50} は 5.9

nM と、回虫に対する IC_{50} (12 nM, Miyadera, H. *et. al.*, PNAS, 2003) に比べ低い値となった。一方、駆虫薬ピルビニウムパモエートの複合体 II の嫌氣的活性における IC_{50} を調べたところ、ウシにおける RQFR の IC_{50} は 19 μ M と、回虫に対する IC_{50} 4.7 μ M と比較して高い値となった。また NADH-FR の IC_{50} はウシでは 3 μ M、回虫では 0.5 μ M であった。さらに複合体 II の好氣的な活性における IC_{50} を調べたところ、ウシにおける SDH の IC_{50} は 92 μ M、回虫に対する IC_{50} 115 μ M と両者とも RQFR や NADH-FR に対する値に比較して高値を示した。

D. 考察

以上の結果から、哺乳類において回虫に比較して低いものの、RQFR は 8.86 ± 3.0 nmol/min/mg タンパク質、NADH-FR は 14.5 ± 0.5 nmol/min/mg タンパク質と呼吸鎖複合体 II が実際に嫌氣的な酵素活性を有し、嫌氣的環境下で機能しうる事が明らかになった。さらに駆虫剤であるピルビニウムパモエートは RQFR や NADH-FR などの嫌氣的活性に対して SDH など好氣的活性より高い阻害効果を示す事が判った。

以上の結果はピルビニウムパモエートが嫌氣的環境下のがん細胞におけるエネルギー代謝を特異的に阻害

する可能性を示している。

E. 結論

哺乳類ミトコンドリアにおいても RQFR および NADH-FR 活性が検出され、実際に複合体 II の嫌氣的条件下で機能しうる事が明らかになった。さらに駆虫剤ピルビニウムパモエートがこれらの嫌氣的呼吸活性に対して好氣的活性より高い阻害効果を示す事が判った。

この結果は、ピルビニウムパモエートが嫌氣的環境下のがん細胞におけるエネルギー代謝を特異的に阻害する可能性を示している。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamashita, T., Ino, T., Miyoshi, H., Sakamoto, K., Osanai, A., Nakamaru-Ogiso, E. and Kita, K. Rhodoquinone reaction site of mitochondrial complex I, in parasitic helminth, *Ascaris suum*. *Biochim Biophys. Acta (Bioenergetics)*, 1608, 97-103 (2004)
- 2) Suzuki, T., Hashimoto, T., Yabu, Y., Kido, Y., Sakamoto, K., Nihei, C., Hato, M., Suzuki, S., Amano, Y., Nagai, K., Hosokawa, T., Minagawa, N., Ohta, N., and Kita, K. Direct evidence for cyanide insensitive

quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: Phylogenetic and therapeutic implication. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 313, 1044-1052 (2004)

- 3) Suzuki, T., Nihei, C., Yabu, Y., Hashimoto, T., Suzuki, M., Yoshida, A., Nagai, K., Hosokawa, T., Minagawa, N., Suzuki, S., Kita, K., and Ohta, N. Molecular cloning and characterization of *Trypanosoma vivax* alternative oxidase (AOX) gene, a target of the trypanocide ascofuranone. *Parasitol. Int.* 53, 235-245 (2004)
- 4) Yano, K., Komaki-Yasuda, K., Kobayashi, T., Takemae, H., Kita, K., Kano, S. and Kawazu, S. Expression of mRNAs and proteins for peroxiredoxins of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum* in the blood stage. *Parasitol. Int.* in press
- 5) Mi-ichi, F., Miyadera, H., Kobayashi, T., Takamiya, S., Waki, S., Iwata, S., Shibata, S. and Kita, K. Parasite mitochondria as a target of chemotherapy: The inhibitory effect of licochalcone A on the *Plasmodium falciparum* respiratory chain. *Ann. New York Acad. Sci.* in press

2. 学会発表
- 1) Kiyoshi Kita
Parasite mitochondria as a target of chemotherapy.
IX EUROPEAN MULTICOLLOQUIUM OF PARASITOLOGY, Valencia, Spain, July 2004
- 2) Kiyoshi Kita
Diversity of Parasite mitochondria.
3rd International Eijkman Symposium, Indonesia, Sept. 2004.
- 3) Kiyoshi Kita, Tamaki Kobayashi, Shigeharu Sato, Fumika Mi-ichi, Takeshi Tanaka, Kanako Komaki-Yasuda, Kazuhiko Yano, Shinzaburo Takamiya, Shin-ichiro Kawazu, Shigeyuki Kano, Ayami Hirata, Izumi Onitsuka, Atsushi Miyajima
Plasmodium mitochondria as target of chemotherapy.
Joint International Symposium of Tropical medicine, Bangkok, Thailand,

Dec. 2004

- 4) 城戸康年、齋本博之、坂元君年、鈴木高史、藪義貞、重政好弘、北潔
アスコフラノン誘導体の Trypanosome Alternative Oxidase (TAO) 阻害能に関する構造活性相関
第 77 回日本生化学会大会、2004、10
- 5) 冨塚江利子、後藤雄一、北 潔
ヒト複合体 II (コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素) Fp サブユニット変異を用いたアイソフォームの解析
第 27 回日本分子生物学会年会、2004、12
- H. 知的財産権の出願・登録状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

厚生科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

分担研究報告書

がんにおけるミトコンドリアの構造と機能変異と治療への応用

分担研究者 田中 雅嗣 東京都老人総合研究所 健康長寿ゲノム探索

研究要旨 ミトコンドリア DNA 変異を有する 2 種のサイブリッドの遺伝子発現をミトコンドリア機能が正常な骨肉腫細胞と比較した。その結果、ミトコンドリア機能異常によって、DNA 損傷とそれに対する修復系、細胞の増殖刺激に対する応答、蛋白質合成系などに関わる遺伝子の発現が上昇することが明らかになった。これらによって、腫瘍細胞の抗ガン剤に対する感受性が変化すると推定された。

A. 研究目的

がん細胞におけるミトコンドリアエネルギー産生系の機能の相違が腫瘍の増殖性・浸潤性・薬剤感受性に影響を与えている可能性がある。そこでミトコンドリア DNA 変異を有する 2 種のサイブリッドの遺伝子発現をミトコンドリア機能が正常な骨肉腫細胞と比較し、ミトコンドリア機能異常に伴って、どのような細胞内過程に関わる遺伝子の発現が上昇するかについて検討した。

B. 研究方法

正常なミトコンドリア機能を有する骨肉腫細胞株 143B を低濃度の臭化エチジウム存在下で培養しミトコンドリア DNA を完全に枯渇させた ρ^0 細胞を用いて transmitochondrial cybrid を作成した。MELAS 患者由来の

筋芽細胞を脱核し ρ^0 細胞と融合し、3243A>G [tRNA-Leu(UUR)] 変異を有するサイブリッド 2SD を確立した。NARP 患者由来の線維芽細胞を脱核し ρ^0 細胞と融合し、8993T>G (MTATP6: Leu156Arg) 変異を有するサイブリッド NARP3-1 を確立した。143B, 2SD, NARP3-1 の 3 種の細胞をピルビン酸あるいは乳酸存在下で培養し、DNA アレイを用いて遺伝子発現パターンの相違を検討した。

(倫理面への配慮)

患者からの筋芽細胞あるいは線維芽細胞の採取はそれぞれの研究施設における倫理委員会の承認に基づき、インフォームドコンセントを得て実施した。

C. 研究結果

サイブリッド細胞 2SD は MELAS

(mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode)の病因変異である 3243A>G を約 98%有しており、ミトコンドリア内でのタンパク合成が低下している。一方、サイブリッド細胞 NARP3-1 は NARP (neurogenic myopathy, cerebellar ataxia, retinitis pigmentosa)の病因変異である 8993T>G を約 97%有しており、ATP 合成酵素のプロトン輸送に伴った ATP 合成能が低下しているが、電子伝達系の機能は保たれている。ミトコンドリア内でのタンパク合成が低下している。

2SD においては 143B と比較して、DNA 損傷に関連する 3 遺伝子、細胞周期に関わる 1 遺伝子、TGF- β のシグナル伝達に関わる 3 遺伝子、DNA 修復に関わっていると推定される 3 遺伝子の発現量が 1.5 倍以上高かった。また、アミノ酸の生合成に関連する 3 遺伝子、アミノ酸輸送に関わる 1 遺伝子、翻訳開始に関わる 2 遺伝子、翻訳の鎖延長に関わっていると推定される 1 遺伝子、3 種のアミノアシル-tRNA 合成酵素遺伝子の発現量が 1.5 倍以上高かった。

一方、NARP3-1 においては 143B と比較して、細胞増殖に関与していると推定される 3 遺伝子、1 種の解糖系酵素の遺伝子、5 種の電子伝達系酵素の遺伝子、3 種のリボゾーム蛋白質の遺

伝子の発現量が 1.5 倍以上高かった。

電子伝達系および酸化リン酸化系の欠損が著しい 2SD 細胞において、ATP 合成酵素の機能異常のみを示す NARP3-1 細胞よりも遺伝子発現量の 143B との相違が全般的に著しかった。また、乳酸とピルビン酸の存在下での遺伝子発現量の差は、サイブリッド間の遺伝子発現量の差よりも小さかった。

D. 考察

分担研究者らは、MELASの病因変異を有する 2SD 細胞を高濃度酸素に暴露すると、ミトコンドリア機能が正常な 143B 細胞と比較して、過酸化物の産生量が高くアポトーシスが生じやすいことを報告した。(Zhang et al. *Biochem Mol Biol Int* 46: 71-79, 1998) 今回、2SD 細胞において DNA 損傷に関連する遺伝子の発現が上昇していたことは、活性酸素種の増大による DNA 損傷に対して、防御的機構が働いているものと推定される。

TGFB1 遺伝子は多くの腫瘍細胞において転写が上昇しており、TGFB が腫瘍形成において重要な役割を演じていると推定されている (Derynck et al. *Nat Genet* 29: 117-129, 2001)。2SD 細胞において TGF- β のシグナル伝達に関わる複数の遺伝子の発現上昇が見られたことは、ミトコンドリア機能低

下がTGFBを介した骨肉腫細胞の増殖に対して促進的に作用していることを示唆している。

2SD細胞においてアミノ酸の生合成・輸送ならびに翻訳開始と鎖延長に関わる複数の遺伝子の発現上昇が見られたことは、ミトコンドリア機能低下に伴う代謝的变化が骨肉腫細胞におけるタンパク合成に影響を与えていることを示唆している。

一方、ATP合成酵素の変異を有するNARP3-1細胞において解糖系および電子伝達系酵素の複数の遺伝子の発現上昇が観察されたことは、ミトコンドリアにおけるATP合成低下に対する代償機構が働いているものと推定される。

乳酸とピルビン酸の存在下での遺伝子発現量の差がサイブリッド間の遺伝子発現量の差よりも小さいという結果は、細胞内のNADH/NAD⁺比の変化によってこれらの遺伝子発現が大きな影響を受けないためと考えられた。

E. 結論

ミトコンドリアDNA変異を有する2種のサイブリッドの遺伝子発現をミトコンドリア機能が正常な細胞と比較することにより、ミトコンドリア機能の変化によって、DNA損傷とそれに対する修復系、細胞増殖刺激に対する

応答、蛋白質合成系などに関わる遺伝子の発現が影響を受けていることが明らかになった。これらの細胞内過程の変化によって、腫瘍細胞の抗ガン剤に対する感受性に影響が及ぶものと推定された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Guo L.-J., Oshida Y., Fuku N., Takeyasu T., Fujita Y., Kurata M., Sato Y., Ito M., and Tanaka M. Mitochondrial genome polymorphisms associated with type-2 diabetes or obesity. *Mitochondrion*, in press: 2005
2. Matsui T., Hogetsu K., Akao Y., Tanaka M., Sato T., Kumasaka T., and Tanaka N. Crystallization and X-ray analysis of the N-terminal core domain of a tumor-associated human DEAD-box RNA helicase, rck/p54. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60: 156-9, 2004
3. Munakata K., Tanaka M., Mori K., Washizuka S., Yoneda M., Tajima O., Akiyama T., Nanko S., Kunugi H., Tadokoro K., Ozaki N., Inada T., Sakamoto K., Fukunaga T., Iijima Y., Iwata N., Tatsumi M., Yamada K., Yoshikawa T., and Kato T. Mitochondrial DNA 3644T-->C mutation

associated with bipolar disorder.

Genomics, 84: 1041-50, 2004

4. Niemi A. K., Moilanen J. S., Tanaka M., Hervonen A., Hurme M., Lehtimäki T., Arai Y., Hirose N., and Majamaa K.

A combination of three common inherited mitochondrial DNA

polymorphisms promotes longevity in

Finnish and Japanese subjects. Eur J Hum Genet, 13: 166-70, 2005

5. Takagi K., Yamada Y., Gong J. S., Sone T., Yokota M., and Tanaka M.

Association of a 5178C-->A

(Leu237Met) polymorphism in the

mitochondrial DNA with a low

prevalence of myocardial infarction in Japanese individuals. Atherosclerosis,

175: 281-6, 2004

6. Tanaka M., Cabrera V. M.,

Gonzalez A. M., Larruga J. M., Takeyasu T., Fuku N., Guo L. J., Hirose R., Fujita

Y., Kurata M., Shinoda K., Umetsu K.,

Yamada Y., Oshida Y., Sato Y., Hattori

N., Mizuno Y., Arai Y., Hirose N., Ohta

S., Ogawa O., Tanaka Y., Kawamori R.,

Shamoto-Nagai M., Maruyama W.,

Shimokata H., Suzuki R., and Shimodaira

H. Mitochondrial genome variation in

eastern Asia and the peopling of Japan.

Genome Res, 14: 1832-50, 2004

7. Umetsu K., Tanaka M., Yuasa I.,

Adachi N., Miyoshi A., Kashimura S.,

Park K. S., Wei Y. H., Watanabe G., and

Osawa M. Multiplex amplified

product-length polymorphism analysis of

36 mitochondrial single-nucleotide

polymorphisms for haplogrouping of East

Asian populations. Electrophoresis, 26:

91-98, 2004

2. 学会発表

1. Tanaka M. Mitochondrial genome

polymorphisms associated with longevity,

Alzheimer's disease or Parkinson's

disease. In 29th FEBS Congress

Federation of European Biochemical

Societies, Warsaw, Poland, June 26 - July

1, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他