

200500471A

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17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江角 浩安

平成18(2006)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
國元節子・百瀬功		
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	---	14
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	---	18
上野隆		
5. 臨床的ゲノム情報に基づいた抗がん剤の開発	-----	21
門田守人		
6. 腫瘍脈管構築に基づくがん化学療法の開発	-----	24
松村保広		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	27

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 国立がんセンター東病院臨床開発センター センター長

**研究要旨** 昨年度の研究で見いだしたキガマイシンによる、膵がん細胞でのゲムシタピンの感受性の約1000倍の増強は、キガマイシンが細胞内のv-ATPase（プロトンポンプ）を阻害することによることを見いだした。そのためリソソームのあまり発達していない正常組織には影響が少なかったと考えられた。有望な増感剤と考えられた。膵臓がんなどの細胞では、オートファジーが盛んでアミノ酸の供給源になっていた。キガマイシンはPI3キナーゼの阻害のほかにv-ATPaseの阻害によるタンパク質再利用の阻害をしめした。また、免疫賦活作用を有しIFN- $\gamma$ の産生を顕著に増強した。栄養飢餓状態でのがん細胞の生存戦略として、哺乳動物細胞の嫌氣的呼吸の生化学を明らかにし、がん特異的標的となることを明らかにした。臨床的低酸素のマーカーとして転移性肝癌をモデルとしてCA9の有用性を明らかにした。新しいがん特異的治療薬候補としてアクチゲニン、エンジェルマリンを見つけた。パクリタキセル（PTX）ミセル内包体でin vivoにおける放射線増感作用についてPTXとの比較検討を行機の有効性を確認した。

分担研究者氏名・所属機関名・職名

江角 浩安 国立がんセンター東病院  
臨床開発センター・センター長

百瀬 功<sup>④</sup>/ 財団法人微生物化学研究会

國元 節子<sup>⑤</sup>微生物化学研究センター 沼津創薬医科学研究所・<sup>④</sup>ユニット長/<sup>⑤</sup>副所長

北 潔 東京大学大学院医学系研究科・教授

田中 雅嗣 東京都老人総合研究所・参事研究員

上野 隆 順天堂大学医学部・助教授

門田 守人 大阪大学大学院医学系研究科・教授

松村 保広 国立がんセンター東病院  
臨床開発センター・がん治療開発部・部長

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

A. 研究目的

本研究は、画期的がん治療法の開発を目指し、がん組織の構造と機能の異常を明ら

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17年度の研究方法と結果を簡潔に述べる。

1. 昨年度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 倍に増強されることを見いだした。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、アドリアマイシンでも認められた。このメカニズムを調べるため、放射標識下ゲムシタビンの細胞内取込みに対するキガマイシンの効果をみたが、影響はなかった。しかし、ゲムシタビンのDNAへの取り込みは約5倍に増加した。細胞内での薬剤の有効濃度に影響があると考え、それ自体が蛍光を発するアドリアマイシンで調べると、キガマイシン処理3時間できわめて顕著な差が出た。すなわち、キガマイシン未処理細胞では多くの蛍光は細胞質のER, ゴルジ装置にあったが、キガマイシン処理細胞では核に移行していた。細胞内小器官のpHに影響があると考え、アクリジンオレンジで検討したところ、キガマイシン処理で、細胞内小器官が皆中性化していることがわかっ

た。そこで、細胞内小器官のpHを下げるv-ATPaseに対する影響を調べると、やく50nMで阻害することがわかった。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、ピルヴァイニウムパモエートやPI3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ビンの細胞毒性増強は認められなかった。またV-ATPase阻害効果はなかった。また、v-ATPase阻害剤であるomeprazolでは増強効果は認められた。これらのことから、増強効果はv-ATPase阻害効果による細胞内pHの変化により抗癌剤の細胞内分布が変化することによると考えられた。上のようなメカニズムを考えれば、あまりライソソームの発達していない正常組織では増強効果のないことは説明できると考えられた。

2. キガマイシンDの免疫賦活作用を明らかにした。抗原特異的細胞性免疫反応である遅延型過敏症反応を舞う背腕顕著に促進した。このマウスの秘蔵細胞を培養し、惹起抗原刺激すると、Th1およびTh2のサイトカインが著しく増強していた。とくにIFN- $\gamma$ の産生が約25倍に増強されていた。キガマイシンDは、成熟樹状細胞に対しては抗原認識を強め腫瘍拒絶を引き出すことが出来ると考えられた。

3. キガマイシンの抗腫瘍効果を各種の腫

瘍モデルで調べると、人の膵臓がん細胞である PANC-1, Capan-1 などでは明らかな抗腫瘍性を示すが、LX-1, DMS-273 肺腫瘍に対しては弱く、マウスの colon26 に対しては抗腫瘍性を示さなかった。今後その効果と腫瘍の性質の検討が必要である。

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。
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、アミノ酸飢餓に対する応答遺伝子としての、ATF4, Asparagine synthetase, Gadd153 などが顕著に誘導がかかっていた。ミトコンドリア異常により、細胞内の還元状態が変わり NADH 過剰となりアミノ酸プールに関し、aspartate- oxaloacetate- malate への変化が促進されていると考えられた。また、ミトコンドリア異常により呼吸鎖障害を持つ細胞では、細胞外マトリックスの再構成に関わる、DTGF, PLAU, TIMP-1 の過剰発現が認められた。これらの知見は、後に述べるがん細胞でのオートファジーや、嫌氣的呼吸のよく一致する。

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。この本体は、一部は不明なところはあるがコハク酸脱水素酵素の逆反応と考えられた。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、強い阻害効果を示す事が判った。しかしながら好氣的条件での反応である、コハク酸脱水素酵素活性にはほとんど影響がなかった。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。以前に明らかにしていた、ピルヴィニウムパモエートの栄養飢餓耐性解除活性、および抗腫瘍性とよく一致する。

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. 従来、がんの栄養飢餓耐性解除に着目した新規抗がん剤で抗腫瘍性を確認していたのは、キガマイシン D とピルヴィニウムパモエートであったが、今年度新たに、漢方薬の牛蒡子からアクチゲニンを活性物質として取り出しその抗腫瘍性を証明した。また同じく漢方薬の、唐独活よりエンジェルマリンを発見しその抗腫瘍性を確認できた。今後メカニズムを含め解析し、臨床導入を含めた検討を要する
9. Lewis Lung Carcinoma(LLC)をもちい、PTX ミセル封入体と放射線の協調作用を検討し、放射線の併用は有意に高い抗腫瘍効果を有することが示された。一方で、肺毒性に関しては、PTX+放射線と同程度であった。以上より、さらなる詳細な NK105 と放射線併用効果についての見当が必要と思われた。

#### (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、研究の二年目で班員の研究が有機的に動き始めた。とくに、長年懸案であった、哺乳動物細胞での嫌氣的呼吸の存

在を証明とその機構の解析、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の一つ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膜がん細胞が、オートファジーに偏っていること、さらに飢餓状態での細胞の生存がオートファジーと密接に結びついていること、呼吸鎖の不全がそれ自体としてアミノ酸からリンゴ酸への代謝変化を起こさせること、またマトリックスの再構築に向かう反応を引き起こすことの解明など、従前の各々の研究ではなしえなかった新しい研究の展開があった。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す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。また、その内の一つは新たに臨床導入が開始された。さらにキガマイシンだけでなく新しい候補薬の抗腫瘍性が確認できたことは今後抗腫瘍性のメカニズムを解明する上でもおおきな進歩であると考えられた。さらに、キガマイシンDでこのたび発見したごとく、がん細胞で異常に発達している細胞内小器官の酸性環境を利用した特異的治療、あるいは抗がん剤感受性増強剤の開発が可能であることが分かった。

#### 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。またそのメカニズムに関しても解明され、従前は全く考えられてもいなかったアミノ酸をエネルギー源とした嫌氣的呼吸をがん細胞が利用していることが明らかになりがんと悔い適地良薬の開発に大きく一步を踏み出した。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

- 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.* 65(11):4769-4774, 2005
- Minchenko OH, Opentanova IL, Ogura T., Minchenko DO, Komoisarenko SV, Caro J., Esumi H. Expression and hypoxia-responsiveness of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4 in mammary gland malignant cell lines. *Acta Biochim Pol.* 2005.
- Suzuki A., Kusakai G., Shimojo Y., Chen J., Ogura T., Kobayashi M. and Esumi H.

- Involvement of transforming growth factor- $\beta$  1 signaling in hypoxia-induced tolerance to glucose starvation. *J Biol Chem.* 280(36):31557-31563, 2005.
- Minchenko OH, Ochiai A, Opentanova IL, Ogura T., Minchenko DO, Caro J., Komisarenko SV, Esumi H. Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie.* 87(11):1005-10, 2005.
  - Suzuki A., Iida S., Kato-Uranishi M., Tajima E., Zhan F., Hanamura I., Huang Y., Ogura T., Takahashi S., Ueda R., Barlogie B., Shaughnessy J. Jr. and Esumi H. ARK is transcriptionally regulated by the Large-MAF Family and mediates IGF-1-induced cell invasion in multiple myeloma; ARK5 is a new molecular determinant of malignant multiple myeloma. *Oncogene* 24:6936-6944, 2005.
  - Awale S, Nakashima EM, Kalauni SK, Tezuka Y, Kurashima Y, Lu J, Esumi H and Kadota S. Angelmarin, a novel anti-cancer agent able to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Bioorg Med Chem Lett.* 16(3):581-3, 2005.
  - Kishimoto A., Ogura T. and Esumi H. A pull-down assay for 5' AMP-activated protein kinase activity using the GST fused protein. *Molecular Biotechnol.* 32(1):17-22, 2006.
  - Awale S., Lu J., Kalauni SK, Kurashima Y., Tezuka Y., Kadota S. and Esumi H. Identification of arctigenin as an anti-tumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Res.* 66(3):1751-1757, 2006.
  - Morito N, Yoh K, Fujioka Y, Nakano T, Shimohata H, Hashimoto Y, Yamada A, Maeda A, Matsuno F, Hata H, Suzuki A, Imagawa S, Mitsuya H, Esumi H, Koyama A, Yamamoto M, Mori N and Takahashi S. Overexpression of c-Maf Contributes to T-Cell Lymphoma in Both Mice and Human. *Cancer Res.* 66(2):812-819, 2006.
  - Suzuki A, Ogura T and Esumi H. Ndr2 acts as the upstream kinase of ARK5 during IGF-1 signaling. *J Biol Chem* (in press)
2. 学会発表
- AACR (Cancer, Proteases, and the Tumor Microenvironment)／消化器癌発生学会
- 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 平成17年12月まで：國元 節子（財）微生物化学研究会  
微生物化学研究センター・沼津創薬医科学研究所 副所長  
平成18年1月から：百瀬 功（財）微生物化学研究会  
微生物化学研究センター・沼津創薬医科学研究所 ユニット長

研究要旨 ヌードマウスに移植したヒト膵臓がん細胞に経口投与で良好な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.膵臓がん以外のヌードマウスに移植したヒトがんへの制がん効果 2.syngeneic tumor model での制がん効果 3.免疫系へ及ぼす効果の評価 4.細胞性免疫の増強作用の機構の研究 5.水溶性誘導体の合成とその生物活性

A. 研究目的

「栄養飢餓状態で選択的に殺細胞作用を示す制がん剤」という新しい戦略で微生物代謝産物を探索し、ヌードマウスに移植したヒト膵臓がんに対する良好な制がん活性を有するキガマイシン D を得た。今年度は、膵臓がん以外のヒトがんおよび syngeneic tumor model で評価すること、臨床応用した場合の免疫系の動きをマウスモデルで予測すること、さらに水溶性の誘導体を作りその評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

キガマイシン D および誘導体の *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り行った。*In vivo* での制がん活性は、各種ヒトまたはマウスの癌細胞をマウスの皮下に移植し、キガマイシン D は 5%DMSO-0.5%Tween 80 を含む生理食塩水に溶解して経口投与し、抗腫瘍効果を評価した。免疫系への作用は、Graft versus host 反応 (GvHR)、混合リンパ球培養反応、NK 細胞の活性化、および遅延型過敏症反応によって評価した。キガマイシン D の水溶性誘導体の合成は、酸水解によりアグリコン（キガマイシノン）を調製し出発物質とした。無水コハク酸と室温で 20 時間反応し

Sephadex LH-20 chromatography で精製しコハク酸エステルを得た。ピリジン・三酸化硫黄コンプレックスと室温で 15 時間攪拌し Sephadex LH-20 chromatography で精製し硫酸エステルを得た。

(倫理面への配慮)

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

### C. 研究結果

キガマイシン D の xenograft tumor model での制がん効果は、LX-1、DMS-273 ヒト肺癌細胞および DLD-1 大腸癌細胞で調べたが、良好な抗腫瘍効果を示さなかった。syngeneic tumor model での制がん効果は、マウスの colon26 大腸癌では有意な効果を示さなかった。IMC carcinoma 扁平上皮癌では薬剤濃度によっては腫瘍増殖を促進した (最大 231%)。IMC carcinoma の結果から、キガマイシン D が免疫拒絶活性を持ち腫瘍に対する免疫を抑制し腫瘍の増殖を促進する、または腫瘍細胞に対して免疫寛容を成立させる可能性が考えられ、免疫応答に関する作用を検討した。キガマイシン D は GvHR および混合リンパ球培養反応を抑制せず、免疫拒絶活性を示さなかった。BGF1 マウスの脾臓細胞の NK 活性

は亢進されていないことが示された。一方、キガマイシン D は、抗原特異的な細胞性免疫反応であるマウスの遅延型過敏症反応を有意に促進した。このマウスの脾臓細胞を培養し、惹起抗原で刺激すると Th1 および Th2 のサイトカインの生産が著しく増強していた。特に IFN- $\gamma$  の産生は 25 倍と増強が顕著であった。キガマイシン D は難溶性であり、投薬量依存性が認められない場合があることから水溶性誘導体の合成を試みた。15 位の水酸基のコハク酸エステル体、および 15 位の硫酸エステル体を合成し、*in vitro*での生物活性を測定したが、それぞれ 4.5 分の 1, 14.2 分の 1 に活性が弱くなった。

### D. 考察

キガマイシン D は膵臓がん以外の腫瘍には制がん効果が著しく弱かった。この膵臓がん特異的な制がん効果に加え、細胞性免疫応答を著しく増強する活性を持つことが判明した。実際のヒトの癌は allogenic で多くの腫瘍関連抗原の存在が確認されており、免疫系が作用する。細胞性免疫応答を著しく増強するキガマイシン D は腫瘍抗原を利用した樹状細胞療法の強化に利用できる可能性が考えられる。これにより膵臓がん以外のいろいろな腫瘍に対しても使用できる可能性がある。

## E. 結論

キガマイシンDは膵臓がん特異的な制がん効果に加え、抗原特異的な細胞性免疫応答を著しく増強する活性を持つことが *in vivo* および *in vitro* で示された。免疫を獲得したマウスの脾臓細胞を培養し、惹起抗原で刺激するとTh1およびTh2のサイトカインの生産が著しく増強していた。特にIFN- $\gamma$ の産生は25倍と増強が顕著であった。免疫による腫瘍の拒絶は完全なので、細胞性免疫応答を著しく増強するキガマイシンDによって腫瘍抗原を利用した樹状細胞療法の強化ができれば、膵臓がん以外のいろいろな腫瘍に対して完全治癒、転移の阻止が期待できる。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

・Momose I., Umezawa Y., Hirose S., Iinuma H. and Ikeda D. Structure-based design of derivatives of tyropeptin A as the potent and selective inhibitors of mammalian 20S proteasome. *Bioorg Med Chem Lett*, 15: 1867-1871, 2005  
・Momose I., Umezawa Y., Hirose S., Iijima M., Iinuma H. and Ikeda D.

Synthesis and activity of tyropeptin A derivatives as potent and selective inhibitors of mammalian 20S proteasome. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69: 1733-1742, 2005

### 2. 学会発表

1) 第64回日本癌学会学術総会  
新規抗癌抗生物質 Kigamicin D の免疫増強作用

大藪三千代、増田徹、川田学、飯島正富、池田大四郎、江角浩安、國元節子

2) 第64回日本癌学会学術総会  
新規抗がん剤 Kigamicin D と Gemcitabine の相乗的な効果：呂杰、國元節子、倉島由紀子、上西紀夫、江角浩安

3) 第64回日本癌学会学術総会  
プロテアソーム阻害剤 TP-110 耐性細胞株の樹立と耐性機序の解析

飯島正富、百瀬功、池田大四郎

4) 第47回天然有機化合物討論会  
新規抗腫瘍性抗生物質キガマイシン類の構造

染野哲也、國元節子、中村光、長縄博、池田大四郎

5) 第9回がん分子標的治療研究会  
プロテアソーム阻害剤 TP-110 耐性多発性骨髄腫細胞株の樹立と耐性メカニズムの解析

百瀬功、飯島正富、池田大四郎

6 ) AACR-NCI-EORTC International conference. Molecular Targets and Cancer Therapeutics.

Proteasome inhibitor resistance and MDR1 expression in human multiple myeloma RPMI8226 cells.

Momose I., Iijima M. and Ikeda D.

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

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 駆虫剤ピルビニウムパモエートはグルコース欠乏下にて抗がん作用を有する事が判っている。この作用機序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ことによるだけでなく、グルコース欠乏による好気呼吸に対する効果の変化によることが判った。

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

本年度はグルコース欠乏下のがん細胞ミトコンドリアにおけるピルビニウムパモエートの阻害効果の作用機序を明確にする目的で、以下の方法によって研究を行った。

グルコース欠乏培地下にて大腸由来腺がん細胞 DLD-1 および HT-29 を 1 週間培養後、ミトコンドリアを調製し、呼吸鎖複合体 I (NADH-ユビキノン還元酵素)、複合体 II (コハク酸-ユビキノン還元酵素) さらに嫌氣的複合体 I と

複合体 II の活性である NADH-フマル酸還元系の活性に対するピルビニウムの阻害効果を調べた。

また、好気呼吸に対するピルビニウムの阻害効果をためウシ心筋ミトコンドリアを用いて NADH およびコハク酸による酸素呼吸に対する影響を測定した。

本実験ではすべて培養細胞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

昨年度は、ピルビニウムは回虫筋肉およびウシ心臓ミトコンドリアの複合体 I および嫌氣的複合体 II (キノールフマル酸還元酵素) に対し阻害効果を示す事を報告した。そこで今回は、哺乳類ミトコンドリアにおいて好氣的複合体 II の活性であるコハク酸-ユビキノン還元酵素活性に対するピル

ピルビニウムの影響を調べた結果、ピルビニウムが複合体 II の活性上昇作用を示す事が明らかになった。この効果は哺乳類ミトコンドリアに特異的であり、回虫ミトコンドリア複合体 II のコハク酸-ユビキノン還元酵素活性に対しては、ピルビニウムは阻害効果を示した。

すなわち培養細胞ミトコンドリアでは 25 $\mu$ M ピルビニウムにより複合体 II のコハク酸-ユビキノン還元酵素活性が 1.3-1.4 倍に上昇し、酸素電極で調べたウシ心臓ミトコンドリアのコハク酸添加による呼吸活性も 1.5 倍に上昇した。一方、NADH を基質とした呼吸活性はピルビニウムにより抑制され、これは複合体 I の NADH-ユビキノン還元酵素活性阻害効果と同様のパターンであった。しかしグルコース欠乏下で培養したがん細胞ミトコンドリアではコハク酸-ユビキノン還元酵素活性に対する上昇効果が消失した。さらに、嫌氣的呼吸活性である NADH-フマル酸還元系に対する阻害効果が有意に上昇した。

#### D. 考察

以上の結果より、グルコース欠乏下におけるピルビニウムの抗がん作用は好氣的複合体 II の活性上昇作用の消失および嫌氣的呼吸活性に対する阻害効果の増強によることが明らか

となった。正常環境下において、ピルビニウムは好氣的複合体 I の活性阻害を引き起こすが、好氣的複合体 II の活性上昇作用によって細胞の障害を抑える。しかしグルコース欠乏により複合体 II に対するピルビニウムの活性化効果が消失し、細胞障害が引き起こされるものと考えられる。さらにグルコース欠乏下では嫌氣的代謝への変化が起これ、ピルビニウムの効果が増強されると考えられる。

以上の様にピルビニウムパモエートはがん細胞における特殊なエネルギー代謝に対して特異的に作用し、効果を示すと考えられる。

#### E. 結論

がん細胞の増殖環境の 1 つであるグルコース欠乏が、がん細胞のエネルギー代謝の変化をもたらし、ピルビニウムはそのミトコンドリア呼吸系の変化に対応して阻害効果を発現する事が示された。

この結果は、ピルビニウムパモエートががん特異的代謝を利用した生化学的抗がん剤として有用であることを示している。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

## 1. 論文発表

- 1) Inaok, D. K., Takashima, E., Osanai, A., Shimizu, H., Nara, T., Aoki, T., Harada, S. and Kita, K. Expression, purification, and crystallization of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase complexed with orotate. Acta Crystallographica F61, 875-878, 2005
- 2) Nakamura, K., Sakamoto, K. Kido, Y., Fujimoto, Y., Suzuki, T., Suzuki, M., Yabu, Y., Ohta, N., Tsuda, A., Onuma, M. and Kita, K. Mutational analysis of the *Trypanosoma vivax* alternative oxidase: the E(X)<sub>6</sub>Y motif is conserved in both mitochondrial alternative oxidase and plastid terminal oxidase and is indispensable for enzyme activity. Biochem. Biophys. Res. Commun. 334, 593-600, 2005
- 3) 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. 1056, 46-54, 2005
- 4) Yuasa, K., Mi-ichi, F., Kobayashi, T., Yamanouchi, M., Kotera, J., Kita, K. and Omori, K. PfPDE1, a novel cGMP-specific phosphodiesterase, from the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Biochem. J. 392, 221-229, 2005
- 5) Yabu, Y., Suzuki, T., Nihei, C., Minagawa, N., Hosokawa, T., Nagai, K.,

- Kita, K. and Ohta, N. Chemotherapeutic efficacy of ascofuranone in *Trypanosoma vivax*-infected mice without glycerol. Parasitol. Int. 55, 39-43, 2006
- 6) Sariago, I., Annoura, T., Nara, T., Hashimoto, M., Tsubouchi, A., Iizumi, K., Makiuchi, T., Murata, E., Kita, K. and Aoki, T. Genetic diversity and kinetic properties of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase. Parasitol. Int. 55, 11-16, 2006
  - 7) Shinjyo, N. and Kita, K. Up-regulation of Heme Biosynthesis during Neuronal Differentiation. J. Biochem. in press

## 2. 学会発表

- 1) Tomitsuka Eriko, Murayama Kumiko, Goto Yu-ichi, Kita Kiyoshi. Mutations in Type I flavoprotein subunit of complex II (succinate-ubiquinone reductase) in human mitochondrial myopathy. 3<sup>rd</sup> conference of the Asian society for mitochondrial research and medicine, Tokyo, December 2005.

## 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に変異を有する2種類のサイブリッド癌細胞を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、ミトコンドリアDNA変異は（1）アミノ酸飢餓応答を介して癌細胞の増殖に対して抑制的に働くこと、（2）細胞外マトリックスリモデリングに関わる遺伝子の発現変化を通して、癌細胞の浸潤・転移に影響を及ぼす可能性が示された。以上のことから、これらの細胞応答に関わる分子を標的とした抗癌剤開発の可能性が示唆された。

A. 研究目的

膵臓癌においてミトコンドリアDNA (mtDNA) 変異に基づくミトコンドリア機能低下が観察される。mtDNA変異が癌細胞の代謝・増殖・浸潤・転移等の細胞応答に与える影響を解明し、mtDNA変異を有する癌細胞特異的に、増殖抑制・細胞死あるいは浸潤・転移抑制を誘導できる薬剤を開発するための標的分子同定を目的として、網羅的遺伝子発現解析を行った。

B. 研究方法

mtDNA 変異を有するモデル癌細胞として、ヒト骨肉腫由来 143B 細胞に MELAS (Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) 患者で認められる A3243G [tRNA-Leu(UUR)] 変異を導入したサイブリッド細胞株 (2SD 細胞) ならびに NARP (Neuropathy, taxia, retinitis pigmentosa) 患者の T8993G [ATPase6

Arg156Leu] 変異を導入したサイブリッド細胞株 (NARP3-1 細胞) を用いた。正常 mtDNA を持つ 143B 細胞を対照として DNA マイクロアレイ解析を行うことにより、2 種類の mtDNA 変異により発現レベルが変化する遺伝子を同定した。さらに、一部の遺伝子については、定量的 RT-PCR・ウエスタンブロッティングにより、遺伝子・タンパクレベルでの発現変化を確認した。

C. 研究結果

(1) アミノ酸飢餓応答：2SDおよび NARP3-1細胞では、ATF4 (activating transcription factor 4), CHOP (Gadd153), AS (asparagine synthetase) 等、細胞をアミノ酸飢餓条件下で培養した時に誘導される遺伝子群の発現が上昇していた。一方、我々は最近 aspartate glutamate carrier (AGC) = Citrin欠損症 (成人発症シトルリン血症) のモデルマウスの肝灌流実験において、ピルビン酸投



与によって細胞質のNADH濃度を低下させ、NADを供給することによって、細胞質において malate → oxaloacetate → aspartateの経路を活性化し、細胞質における尿素合成を回復させることに成功した (Moriyama et al. J Hepatol 2006)。このことは、細胞内の酸化還元状態が、アミノ酸プールに大きな影響を与えていることを示唆している。

(2) 細胞外マトリックスリモデリング：2SDならびにNARP3-1細胞では、CTGF (connective tissue growth factor), PLAU (plasminogen activator, urokinase), TIMP1 (TIMP metalloproteinase inhibitor 1) の mRNA レベルが変化していた。これら細胞外マトリックスリモデリングに関わる遺伝子の発現変化は癌細胞の浸潤・転移と関連することが知られており、2SDおよびNARP3-1細胞で認められた遺伝子発現変化から、mtDNA変異が癌細胞の悪性度を増加させる可能性が示唆された。

#### D. 考察

2SDおよびNARP3-1細胞においては、呼吸鎖の異常により細胞質内およびミトコンドリア内のNADHが過剰となるため、TCAサイクルの中間体が還元状態となり、aspartate → oxaloacetate → malateの経路およびglutamate →  $\alpha$ -ketoglutarate → citrateの経路が活性化される結果、aspartateおよびglutamateの減少をきたし、アミノ酸飢餓応答が起こっているものと推定された。したがって、mtDNA変異を有する癌細胞で認められる増殖抑制には、アミノ酸飢餓応答が

関与しているものと考えられた。癌細胞の浸潤・転移と関連することが知られており、2SDおよびNARP3-1細胞で認められた細胞外マトリックスリモデリングに関わる遺伝子の発現変化は、mtDNA変異が癌細胞の悪性度を増加させる可能性を示唆している。

#### E. 結論

mtDNA変異は(1) アミノ酸飢餓応答を介して癌細胞の増殖に対して抑制的に働くこと、(2) 細胞外マトリックスリモデリングに関わる遺伝子の発現変化を通して、癌細胞の浸潤・転移に影響を及ぼすことが示され、これらmtDNA変異により誘導される細胞応答に関わる分子を標的とした抗癌剤開発の可能性が示された。

#### F. 健康危険情報

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Umetsu K, Tanaka M, Yuasa I, Adachi N, Miyoshi A, Kashimura S, Park KS, Wei YH, Watanabe G, Osawa M., Multiplex amplified product-length polymorphism analysis of 36 mitochondrial single-nucleotide polymorphisms for haplogrouping of East Asian populations. *Electrophoresis* 26 (1): 91-8, 2005.
2. Naoi M, Maruyama W, Shamoto-Nagai M, Yi H, Akao Y, Tanaka M., Oxidative stress in mitochondria: decision to survival and death of neurons in neurodegenerative disorders.

- Mol Neurobiol 31 (1-3): 81-93, 2005.
3. Niemi AK, Moilanen JS, Tanaka M, Hervonen A, Hurme M, Lehtimäki T, Arai Y, Hirose N, Majamaa K., A combination of three common inherited mitochondrial DNA polymorphisms promotes longevity in Finnish and Japanese subjects. Eur J Hum Genet 13 (2): 166-70, 2005.
  4. Munakata K, Bundo M, Kato T, Ono H, Sakura N, Oosaki M, Waki C, Tanaka M., Co-existing point mutations of mitochondrial DNA in a patient with a heart, abnormality and Pearson syndrome-like symptoms. Am J Med Genet 139 (2): 162-4, 2005
  5. Kazuno AA, Munakata K, Mori K, Tanaka M, Nanko S, Kunugi H, Umekage T, Tochigi M, Kohda K, Sasaki T, Akiyama T, Washizuka S, Kato N, Kato T., Mitochondrial DNA sequence analysis of patients with 'atypical psychosis'. Psychiatry Clin Neurosci 59 (4): 497-503, 2005.
  6. Guo LJ, Oshida Y, Fuku N, Takeyasu T, Fujita Y, Kurata M, Sato Y, Ito M, Tanaka M, Mitochondrial genome polymorphisms associated with type-2 diabetes or obesity. Mitochondrion 5 (1): 15-33, 2005.
  7. Moriyama M, Li MX, Kobayashi K, Sinasac DS, Kannan Y, Iijima M, Horiuchi M, Tsui LC, Tanaka M, Nakamura Y, Saheki T, Pyruvate ameliorates the defect in ureogenesis from ammonia in citrin-deficient, mice. J Hepatol. in press
2. 学会発表
1. Tanaka M, Nishigaki Y, Fuku N, Fujita Y, Ito M, Nozawa Y, Takeyasu T, Shimada K, Yamada Y, Women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against metabolic syndrome., International Conference on Mitochondria and Life, Tokyo, Japan, Dec 14-17, 2005.
  2. Nishigaki Y, Fuku N, Yamada Y, Tanaka M, Japanese women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against atherothrombotic infarctions. International Conference on Mitochondria and Life, Tokyo, Japan, Dec 14-17, 2005.
  3. Nishigaki Y, Fuku N, Yamada Y, Tanaka M, mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarctions in Japanese men. International Conference on Mitochondria and Life, Tokyo, Japan, Dec 14-17, 2005.
  4. Fuku N, Nishigaki Y, Yamada Y, Tanaka M, mitochondrial haplogroups F, A, and D41 are genetic risk factors for type 2 diabetes in women. International Conference on Mitochondria and Life, Tokyo, Japan, Dec 14-17,

2005.

5. Fujita Y, Ito M, Oshida Y, Tanaka M, Gene expression analysis in cybrids with A3243G or T8993G mtDNA mutation. International Conference on Mitochondria and Life, Tokyo, Japan, Dec 14-17, 2005.

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

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

分担研究者 順天堂大学医学部生化学第一講座 上野 隆

研究要旨 複数の培養臓がん細胞の長寿命タンパク分解をマウスの初代培養肝細胞の分解と比較した結果、肝細胞の半分程度のオートファジー活性を確認した。また、オートファジーの阻害剤として知られる 3-methyladenine (3MA) や Kigamicin の効果において両者の分解活性の感受性に違いが見出され、がん細胞ではオートファジーを制御するシグナル伝達の一部が肝細胞のそれとは異なっていることが示唆された。

#### A. 研究目的

血管造成を誘導することなく、低栄養、低酸素分圧下で増殖する PANC-1 などの膵がん細胞は、オートファジーで自身のタンパク質を分解し、得られるアミノ酸を再利用して生存に役立てると考えられている。膵がんのオートファジーの特性を明らかにする目的で  $^{14}\text{C}$ -leucine 標識した長寿命タンパク分解測定を行い、がん細胞とマウス肝細胞のオートファジーを比較し、阻害剤に対する感受性を検討した。

#### B. 研究方法

1) 培養膵がん細胞 (PANC-1、PaCa-2、Capan-1) とマウス初代肝細胞を  $^{14}\text{C}$ -leucine を加えた培地 (0.5 mCi/ml) で 2 時間培養し、非放射性的の 2 mM leucine を含む培地で 2 時間チェイスを行い、その後さまざまなメディアウム中で 3-4 時間培養。培地に放出される酸可溶性の放射活性と細胞に残存する酸不溶性の放射活性を定量し分解率を求めた。

2) オートファジーをコントロールするシグナル伝達分子の動態を知るために、a. 栄養飢餓条件 (Krebs-Ringer bicarbonate buffer, 以下 KRB) b. 10% FCS を含む富栄養培地、c. b にさらに rapamycin 添加と、さまざまな条件下に置いた細胞についてウ

ェスタンブロットを行い、標的シグナルタンパクが活性化されているか不活性化されているかを検討した。

(倫理面への配慮) マウス肝細胞単離に際しては、「倫理的基準に基づいたヒト以外の動物種を用いた医学生物学実験の分類」のカテゴリー B に従って行った。

#### C. 研究結果

##### 1) 長寿命タンパク分解

マウスの初代培養肝細胞を栄養飢餓条件 (Krebs-Ringer bicarbonate buffer, 以下 KRB) と富栄養条件下 (10% FCS を含む Williams E medium) でインキュベートし、長寿命タンパクの分解率を比較すると、1 時間あたり、栄養飢餓条件下で 4-5 %、富栄養条件下で 2 % という値を示した。栄養飢餓で促進されるタンパク分解は、リソソームプロテアーゼ阻害剤である E64d と pepstatin を加えたときほぼ完全に阻害されるので、典型的な飢餓誘導で起こるオートファジーであると結論される。一方、PANC-1 の場合は、KRB でインキュベートした飢餓条件下での分解率が 1 時間あたり 2 %、富栄養条件下 (DMEM/10 % FCS) でのそれが 1.5 % となり、分解率はどちらの条件下でも肝細胞の半分を下回る値となった。これは他の膵がん細胞 (PaCa-2、Capan-1)