

20062/019A

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18年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 江角 浩安

平成19（2007）年 3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. がん微小環境とエネルギー代謝に着目した抗がん剤の開発	-----	11
江角 浩安		
2. 微生物代謝産物からの抗がん剤の探索	-----	16
百瀬 功		
3. 嫌氣的代謝を利用した抗がん剤の開発	-----	20
北 潔		
4. 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	---	24
田中 雅嗣		
5. 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	---	27
上野 隆		
6. 臨床的ゲノム情報に基づいた抗がん剤の開発	-----	30
門田守人		
7. 腫瘍脈管構築に基づくがん化学療法の開発	-----	34
松村 保広		
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	37

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）

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

平成18年度は、飢餓状態での癌細胞の生存のメカニズムについて新たに、LKB1、NDR2、ATMの関与を明らかにした。また、嫌気的にアミノ酸を用いたエネルギー産生系の存在を酵素学的に確認した。ヒト大腸がん組織は極端な低グルコースかつ正常アミノ酸濃度であることを明らかにした。放線菌からピエリシジンをはじめとするミトコンドリア呼吸鎖の阻害物質が繰り返し栄養飢餓耐性解除活性物質として検出され、飢餓状態での生存と呼吸鎖酵素の関連が強く疑われた。伝統薬からエンジェルマリン、アクチゲニンを見出した。アクチゲニンは早期の臨床導入を目指す。栄養欠乏状態になるとオートファジーを活性化するが、ヒトの大腸がん細胞を用いこの反応が生存に関わることを、臨床がんでは盛んにオートファジーが起こり診断マーカーに出来ることを見出した。ポリマーミセルシスプラチンは、神経毒性、腎毒性が顕著に抑制され、日英共同研究として臨床第一相に入った。また、SN38内包ミセルは、血管新生が盛んな動物腫瘍では劇的抗腫瘍性を示した。臨床第一相試験を国立がんセンターで開始した。

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 財団法人微生物化学研究会
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

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

A. 研究目的

ヒトのがん組織の特徴、特に血管系の機能の特徴に着目し、がん細胞の低酸素・低栄養に対する抵抗性を治療標的とした新しい薬剤の基礎的臨床的開発を行う。また癌組織の脈管の特徴に注目し従来の抗がん剤のポリマーミセル内包によるDDSを目指す。

B. 研究方法

乏血性がん細胞生存メカニズムに関し、培養細胞を用いた生化学的および分子生物学的解析とともに、ヒトの手術材料を用いたメタボロミクス解析

を行った。飢餓状態でのオートファジーの意義に関する研究では、培養細胞を用いた研究とともに、大腸癌に関してはヒトの試料も解析した。がん組織の微小環境の解析では、ミトコンドリアの変異に関しては、ヒトの試料の解析を行った。DDSの研究に関しては、動物を用いたモデル実験の後、臨床導入を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は、すべて倫理審査委員会においての承認を経ている。遺伝子検査、臨床検体の解析動物実験も同様である。

C. 研究結果

乏血性腫瘍の微小環境とそこにおける腫瘍の細胞生存戦略の解析の解析乏血性の癌細胞がどのような生化学的、分子生物学的メカニズムを使い生存しているのか、そのメカニズムを解析し、AKT, AMPK, ARK5の関与をすでに明らかにしてきた。本年度は、これらに加えて、LKB1, NDR2, ATMの関与を明らかにした。LKB1は、Peutz-Jeghers 症候群の原因遺伝子である。LKB1は、AMPKおよび多くのAMPK関連キナーゼの活性を直接制御する上位のキナーゼであることが明らかにされている。特に、グルコース欠乏の場合のAMPK α の活性化は、LKB1

を欠損した細胞では起こらなかった。また、これらの細胞ではグルコース飢餓に対する抵抗性は低かった。PANC-1細胞で、LKB1遺伝子をsiRNAでknockdownすると、グルコース飢餓に対する抵抗性が顕著に抑制された。これらのことから、グルコース飢餓耐性にLKB1が関与することが明らかになった。

また、嫌氣的にアミノ酸を用いたエネルギー産生系の存在を確認した。メタボロミクス的手法を用いて、ヒト大腸がんおよびその肝転移巣組織の、数多くの代謝産物を解析した。その結果、がんの微小環境は正常組織と比較すると、極端にグルコース濃度が低いことが分かった。他方、アミノ酸濃度を調べると正常組織より高いぐらいであったが、特にグリシンやヒドロキシプロリンは正常組織の数倍の濃度であり、盛んにコラーゲンが分解されていることを窺わせた。

栄養飢餓耐性解除を指標とした新規薬剤の探索

キガマイシンに続く放線菌からの新規物質の探索を行ったが、残念ながら新規物質は見出せなかった。しかし、ピエリシジンははじめとするミトコンドリア呼吸鎖の複合体2及び3の阻害剤が繰り返し検出された。がんの生存と呼吸鎖酵素の関連が強く疑わ

れる。一方、伝統薬からアクチゲニン、エンジェルマリンに続いて候補薬を見出した。アクチゲニンは早期の臨床導入を目指した研究を行っている。

オートファジーのがん生存における役割の解明

細胞は栄養欠乏状態になると自食反応（オートファジー）を活発化するが、ヒトの大腸がん細胞を用いこの反応が生存に関わることを明らかにした。ヒト大腸がん細胞SW480およびDLD1を、リソソームの酸性タンパク質分解酵素阻害剤である、E64D及びペプスタチン処理をすると、DMEMでは毒性をほとんど示さない。しかし、アミノ酸欠乏や、グルコース欠乏にすると顕著な毒性を示すようになった。この条件で、EGFPで標識したLC3の発現ベクターを過剰発現させると、きれいなオートファゴソームを形成した。さらに、オートファジーの阻害剤である3メチルアデニンを培地中に入れても、アミノ酸欠乏で顕著な毒性を示した。これらのことは、オートファジーがある条件下では細胞の生存に働くことを示す。

癌の間質形成の中心的役割を担うmyofibroblast（筋線維芽細胞）について、臨床的病期、予後のわかっている大腸癌組織を用いて、定量化を試みた。その結果、myofibroblast量の多い癌間質をもつ症例は、予後不良であ

ることがわかった。一方、myofibroblastが産生するcollagen量は予後規定因子とはならなかった。

大腸癌の肝転移で血流の豊富な部分と、虚血部分とをLaser capture microdissection(LCM)にて顕微鏡下に切り出し両者の遺伝子発現の差をヒト全遺伝子解析型マイクロアレイで解析した。その結果、VEGF遺伝子は2万以上解析した遺伝子のうちTOP10に位置し、その他多数の未知遺伝子が低酸素誘導遺伝子の候補として挙げられた。

血管内皮細胞から周皮細胞を乖離させるAngiopoietin因子を阻害することで、ヌードマウス皮下腫瘍の増殖抑制がみられた。その組織像はユニークで、血管内皮細胞が針葉樹のように細く、時に分枝を示しながら伸びてゆき、血管内腔はほとんど認められなかった。

D. 考察

本年度の研究では、ヒトの癌組織が我々が想定していたように、グルコースがきわめて欠乏した状態にありながら、アミノ酸はほとんど正常組織並みに維持されていることが大腸がん組織で分かった。この結果は、血流の乏しいがんでは栄養飢餓状態が特にグルコースにおいて著しいに違いな

いとしていう仮説に合致するものである。この点に関しては、ヒトの大腸癌の肝転移層の詳細な脈管系の解析、および低酸素状態の解析でも明確に示されたことは、今後の微小環境に立脚した治療薬の開発という点からきわめて重要な発見であった。

本年度の研究でも、また以前の研究でもヌードマウスにヒトのがん細胞を移植したゼノグラフトでは、キガマイシンが有効なものとあまり効果ははっきりしないものがあることが分かっていたが、動物実験モデルでのがんの微小環境を再検討する必要があることを、強く示唆した。

血流の乏しい、グルコースが欠乏しさらに低酸素状態でいかにしてがん細胞がエネルギーを得ているかという点に関しては、本年度は二つの点で進歩した。まず第一は、酵素学的に嫌氣的呼吸が起こりうることを示したことである。また、ヒトのミトコンドリアに機能異常がある細胞を用いた研究、および我々が開発した薬物スクリーニング法で、栄養飢餓耐性を解除する物質を検索すると、呼吸鎖の酵素の阻害活性を持った物質が頻りに活性物質として分離されることから、従来とは異なる呼吸をしている可能性を示したことである。その詳細な生化学的解析は、今後の新しい治療薬を開発する上での、メカニズムの重要な部分

を占めるものであり、是非とも解明する必要がある。

一方、腫瘍組織の血管網の特殊性である透過性が高くかつリンパ流が不十分であることを利用したDDS製剤が、きわめて顕著な効果を示す腫瘍が見つかったことは今後の臨床開発のための大きな一歩である。この腫瘍系の特徴を十分に解析し、ヒトの腫瘍でいかなる特徴を持ったものに大きな効果が来されるのかを明らかにすることは、DDSを用いた革新的がん治療薬の開発という点からきわめて重要である。

E. 結論

がん組織の微小環境は、正常組織と大きく違い、がんの微小環境に基づく治療薬の開発が必須でかつ現実的であることが分かった。がん組織の特異な脈管系に基づくDDSがきわめて有効ながんがあることが分かった。臨床導入を開始した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Zaidi SF, Awale S, Esumi H, et al. Diterpenes from "Pini Resina" and their Preferential Cytotoxic Activity

- under Nutrient-Deprived Condition. *Planta Med* 2006.
2. Zaidi SF, Awale S, Esumi H, et al. Supporting Information to Diterpenes from "Pini Resina" and their Preferential Cytotoxic Activity under Nutrient-Deprived Condition. *Planta Med* 2006.
 3. Masuda T, Ohba S, Esumi H, et al. Antitumor effect of kigamicin D on mouse tumor models. *J Antibiot (Tokyo)* 59; 209-14. 2006
 4. Suzuki A, Ogura T, Esumi H. NDR2 acts as the upstream kinase of ARK5 during insulin-like growth factor-1 signaling. *J Biol Chem* 281; 13915-21, 2006
 5. Awale S, Nakashima EM, Esumi H, et al. Angelmarin, a novel anti-cancer agent able to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Bioorg Med Chem Lett*, 16: 581-3, 2006
 6. Awale S, Lu J, Esumi H, et al. Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Res*, 66; 1751-7, 2006
 7. Morito N, Yoh K, Esumi H, et al. Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human. *Cancer Res*, 66; 812-9, 2006
 8. Kishimoto A, Ogura T, Esumi H. A pull-down assay for 5' AMP-activated protein kinase activity using the GST-fused protein. *Mol Biotechnol*, 32; 17-21, 2006
 9. Momose I, et al. A new proteasome inhibitor, TP-110, induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71; in press, 2007
 10. Yamazaki Y, Momose I, et al. Inhibitory activity of the hypoxia-inducible factor-1 pathway by tartrolone C. *J. Antibiotics*, 59(11); 693-7, 2006
 11. Masuda T, Kunimoto S, et al. Augmentation of cellular immunity by kigamicin D, *J. Antibiotics*, 59(4); 215-9, 2006
 12. Masuda T, Kunimoto S, et al. Antitumor effect of kigamicin D on mouse tumor models, *J. Antibiotics*, 59(4); 209-14, 2006
 13. Kita K, Shiomi K, and Ōmura S., *Parasitology in Japan: Advances in drug discovery and biochemical studies*, *Trends in Parasitol*, in press
 14. Kimata-Arigo Y, Kurisu G, Kita K, et al., Cloning and characterization of ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase from human malaria parasite, *J. Biochem*, in press

15. Mita T, Tanabe K, Kita K, et al., Independent evolution of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in Melanesia, *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 51; 1071-7, 2007
16. Kobayashi T, Sato S, Kita K, et al., Mitochondria and apicoplast of *Plasmodium falciparum*: behaviour on subcellular fractionation and the implication, *Mitochondrion*, 7; 125-32, 2007
17. Ui H, Shiomi K, Kita K, et al., Paecilaminol, a New NADH-Fumarate Reductase Inhibitor, Produced by *Paecilomyces* sp. FKI-0550, *J. Antibiot.*, 59; 591-6, 2006
18. Arita M, Suematsu T, Kita K, et al., An evolutionary "intermediate state" of mitochondrial translation systems found in *Trichinella* species of parasitic nematodes: Co-evolution of tRNA and EF-Tu., *Nuc. Acid. Res.*, 34; 5291-9, 2006
19. Miura S, Tomitsuka E, Kita K, et al., Overexpression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator -1 α (PGC-1 α) Develops Muscle Atrophy with Depletion of ATP, *Am. J. Physiol.*, 169; 1129-39, 2006
20. Yabu Y, Suzuki T, Kita K, et al., Chemotherapeutic efficacy of ascofuranone in *Trypanosoma vivax*-infected mice without glycerol, *Parasitol. Int.*, 55; 39-43, 2006
21. Ui H, Shiomi K, Kita K, et al., Verticipyron, a new NADH-fumarate reductase inhibitor, produced by *Verticillium* sp. FKI-1083, *J. Antibiot.*, 59; 785-90, 2006
22. Mi-ichi F, Kita K, and Mitamura T., Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilize a broad range of serum-derived fatty acids with limited modification for their growth, *Parasitology*, 133; 399-410, 2006
23. Shinjyo N and Kita K., Up-regulation of Heme Biosynthesis during Neuronal Differentiation of neuro2a cell, *J. Biochem.*, 139; 373-81, 2006
24. Nishida S, Kurokawa K, Kita K, et al., Identification and characterization of amino acid residues essential for the active site of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase (MurB) from *Staphylococcus aureus*, *J. Biol. Chem.*, 281; 1714-24, 2006
25. Okada M, Hustond C D, Kita K, et al., Kinetics and strain variation of

- phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 145; 171-83, 2006
26. Sariego I, Annoura T, Kita K, et al., Genetic diversity and kinetic properties of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase, *Parasitol. Int.*, 55; 11-6, 2006
 27. Fujita Y, Ito M, Nozawa Y, Tanaka M, et al., CHOP (C/EBP homologous protein) and ASNS (asparagine synthetase) induction in cybrid cells harboring MELAS and NARP mitochondrial DNA mutations, *Mitochondrion*, 7; 80-8, 2007
 28. Verma M, Naviaux R, Tanaka M, et al., Mitochondrial DNA and cancer epidemiology, *Cancer Res*, 67; 437-9, 2007
 29. Tanaka M, Fuku N, Nishigaki Y, et al., Women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against metabolic syndrome, *Diabetes*, 56; 518-21, 2007
 30. Nishigaki Y, Yamada Y, Tanaka M, et al., Mitochondrial haplogroup A is a genetic risk factor for atherothrombotic cerebral infarction in Japanese females, *Mitochondrion*, 7; 72-9, 2007
 31. Nishigaki Y, Yamada Y, Tanaka M, et al., Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males, *Hum Genet*, 120; 827-36, 2007
 32. Fuku N, Park K S, Tanaka M, et al., Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians, *Am J Hum Genet*, 80; 407-15, 2007
 33. Alexe G, Fuku N, Tanaka M, et al., Enrichment of longevity phenotype in mtDNA haplogroups D4b2b, D4a, and D5 in the Japanese population, *Hum Genet*, in press
 34. Moriyama M, Li M X, Tanaka M, et al., Pyruvate ameliorates the defect in ureogenesis from ammonia in citrin-deficient mice, *J Hepatol*, 44; 930-8, 2006
 35. Kazuno A, Munakata K, Tanaka M, et al., Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics, *PLoS Genet*, 2; e128, 2006
 36. Kouroku Y, Ueno T, et al., ER stress (PERK/eIF2a phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation, *Cell Death and Differentiation*, 14; 230-9, 2007

37. Tanida I, Ueno T, et al., Lysosomal turnover of GABARAP-phospholipid conjugate is activated during differentiation of C2C12 cells to myotubes without inactivation of the mTor kinase-signaling pathway, *Autophagy*, 2; 264-71, 2006
38. Tanida I, Ueno T, et al., Atg8L/Apg8L is the fourth mammalian modifier of mammalian Atg8 conjugation mediated by human Atg4B, Atg7 and Atg3, *FEBS J*, 273; 2553-62, 2006
39. Komatsu M, Ueno T, et al., Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice, *Nature*, 441; 880-4, 2006
40. Sou YS, Ueno T, et al., Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16, *Journal of Biological Chemistry*, 281(6); 3017-24, 2006
41. Kumanomidou T, Ueno T, et al., The crystal structure of human Atg4b, a processing and de-conjugating enzyme for autophagosome-forming modifiers., *Journal of Molecular Biology*, 355; 612-8, 2006
42. Iwata J, Ueno T, et al., Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals., *Journal of Biological Chemistry*, 281; 4035-41, 2006
43. Tsujino T, Monden M, et al., Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer, *Clin.Cancer Res.*, 5; in press
44. Seki Y, Monden M, et al., Construction of a novel DNA decoy that inhibits the oncogenic β -catenin/T-cell factor pathway. *Mol Cancer Ther*, 12; 985-94, 2006
45. Yasui M, Monden M, et al., Antisense to cyclin D1 inhibits vascular endothelial growth factor-stimulated growth of vascular endothelial cells: implication of tumor vascularization., *Clin Cancer Res.*, 12; 4720-9, 2006
46. Takayama O, Monden M, et al., Expression of PPAR δ in multistage carcinogenesis of the colorectum: implications of malignant cancer morphology, *Br J Cancer*, 95(7); 889-95, 2006
47. Negishi T, Koizumi F, Matsumura Y, et al., NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, is a more potent radiosensitizing agent compared to

free paclitaxel, Brit J Cancer, 95; 601-6, 2006

48. Koizumi F, Kitagawa M, Matsumura Y, et al., Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors, Cancer Res., 66; 10048-56, 2006

2. 学会発表

1) 2006. 8. 12-17

AMPK : Impact on Mammalian Metabolism and Disease

「ARK and cancer」 江角 浩安

2) 2007. 1. 21-25

7th AACR / JCA Joint International Conference

「 Tumor Microenvironment - oriented Therapy: Anti-austerity」 江角 浩安

3) 第 10 回がん分子標的治療研究会総会

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

4) 第 10 回がん分子標的治療研究会総会

炎症性サイトカインによるアンドロゲンレセプター機能の変化 : 山崎洋子、川田学、百瀬功、池田大四郎

5) 第 65 回日本癌学会学術総会
前立腺癌／間質細胞共培養系における炎症性サイトカインのアンドロゲンレセプター機能への影響 : 山崎洋子、川田学、百瀬功、池田大四郎

6) 第 65 回日本癌学会学術総会
Tyrophostin AG1024 による栄養飢餓状態選択的細胞毒性 : 百瀬功、國元節子、大園三千代、江角浩安、池田大四郎

7) 第 65 回日本癌学会学術総会
プロテアソーム阻害剤 TP-110 耐性前立腺癌細胞株の耐性因子に関する研究 : 飯島正富、百瀬功、池田大四郎

8) 富塚江利子、江角浩安、北 潔
哺乳類ミトコンドリア呼吸鎖酵素活性に対する Pyrvinium Pamoate の効果- 環境変化への適応と複合体 II- 第 6 回日本ミトコンドリア学会大会 (東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1) 新規抗生物質キガマイシン類とその用途

発明者 : 國元 節子

: 江角 浩安

: 呂 杰

登録日 : 平成 19 年 1 月 12 日

特許番号 : 特許第 3902530 号

2) 抗癌剤及び抗癌用薬理組成物

発明者：江角 浩安

登録日：平成 19 年 3 月 2 日

特許番号：特許第 3921535 号

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

がん微小環境とエネルギー代謝に着目した抗がん剤の開発

分担研究者 江角 浩安 国立がんセンター東病院臨床開発センター

研究要旨 臨床がんのメタボロミクス解析で、癌組織はグルコース濃度が極度に低くアミノ酸は正常組織並みにあること、この条件でがん細胞が生存するためにグルコース飢餓耐性を使っていること、その耐性にはオートファジーもメカニズムとして組み込まれていることが明らかになった。新しい候補薬としてアクチゲニン、エンジェルマリンを見出した。

A. 研究目的

がんの微小環境を酸素や栄養素の供給というエネルギー代謝を中心に解析し、その中でのがん細胞の生存戦略を分子生物学的・生化学的に解析し、これを標的とした画期的治療薬を見出すことを目的とした。

B. 研究方法

新しい候補薬のスクリーニングは、我々ががん克服戦略事業の中で開発した方法を用いた。簡略に述べると、ヒト膵臓がん細胞株PANC-1細胞を96穴プレートに播き、24時間後にその半分の48穴を栄養飢餓培地に交換し、活性を検討する被検物質を栄養飢餓培地と富栄養培地の入ったウェルに比較しやすいように入れ、24時間後に生存細胞数をWST-8法で測定した。栄養飢餓培地で選択

的毒性を示す物質を候補薬として選び、精製した。

栄養飢餓耐性のメカニズムの解析は、多くは、PANC-1細胞を用いた通常の分子生物学的解析法で行った。

オートファジーの解析は、大腸がん細胞株、SW480およびDLD1を用いた。LC3のオートファゴソームへの取り込みは、EGFPで標識したLC3の発現ベクターを予めこれらの細胞にトランスフェクションしておき、36-48時間後に適宜培地を交換してから蛍光顕微鏡化に観察した。オートファジーの生存に対する影響を観察するためには、オートファゴソーム形成の阻害剤である3メチルアデニン、オートファジーの最後の段階でのタンパク質分解酵素阻害剤である、ペプスタチン、E64Dを培地中に入れ、24-72時間後に生存細胞数を数えた。

倫理的配慮に関しては、すべての動物実験は、国立がんセンター実験動物倫理審査委員会の審査を受け承認を得てから行った。臨床検体のメタボロミクス解析、免疫染色はすべて国立がんセンター倫理審査委員会の承認の下に行った。説明同意書は、がんセンター東病院包括同意書の形式に従った。

C. 研究結果

1. 乏血性腫瘍の微小環境とそこにおける腫瘍の細胞生存戦略の解析の解析

乏血性の癌細胞がどのような生化学的、分子生物学的メカニズムを使い生存しているのか、そのメカニズムを解析し、AKT, AMPK, ARK5の関与をすでに明らかにしてきた。本年度は、これらに加えて、LKB1, NDR2, ATMの関与を明らかにした。LKB1は、Peutz-Jeghers症候群の原因遺伝子である。LKB1は、AMPKおよび多くのAMPK関連キナーゼの活性を直接制御する上位のキナーゼであることが明らかにされている。特に、グルコース欠乏の場合のAMPK α の活性化は、LKB1を欠損した細胞では起こらなかった。また、これらの細胞ではグルコース飢餓に対する抵抗性は低かった。PANC-1細胞で、LKB1遺伝子を

siRNAでknockdownすると、グルコース飢餓に対する抵抗性が顕著に抑制された。これらのことから、グルコース飢餓耐性にLKB1が関与することが明らかになった。

また、嫌氣的にアミノ酸を用いたエネルギー産生系の存在を確認した。この点に関しては、酵素活性が存在することと、代謝産物の量の変化が矛盾しないことを確認した。メタボロミクスの手法を用いて、ヒト大腸がんおよびその肝転移巣組織の、数多くの代謝産物を解析した。その結果、がんの微小環境は正常組織と比較すると、極端にグルコース濃度が低いことが分かった。他方、アミノ酸濃度を調べると、正常組織より高いぐらいであったが、特にグリシンやヒドロキシプロリンは正常組織の数倍の濃度であり、盛んにコラーゲンが分解されていることを伺わせた。

2. 栄養飢餓耐性解除を指標とした新規薬剤の探索

キガマイシンに続く放線菌からの新規物質の探索を行ったが、残念ながら新規物質は見出せなかった。しかし、ピエリシジンをはじめとするミトコンドリア呼吸鎖の複合体2及び3の阻害剤が繰り返し検出された。がんの生存と呼吸鎖酵素の関連が強く疑われる。一方、伝統薬からアクチゲニン、エンジェルマリンに続いて候補薬を

見出した。アクチゲニンは早期の臨床導入を目指した研究を行っている。

3. オートファジーのがん生存における役割の解明

細胞は栄養欠乏状態になると自食反応（オートファジー）を活発化するが、ヒトの大腸がん細胞を用いこの反応が生存に関わることを明らかにした。ヒト大腸がん細胞SW480およびDLD1を、リソソームの酸性タンパク質分解酵素阻害剤である、E64D及びペプスタチン処理をすると、DMEMでは毒性をほとんど示さない。しかし、アミノ酸欠乏や、グルコース欠乏にすると顕著な毒性を示すようになった。この条件で、EGFPで標識したLC3の発現ベクターを過剰発現させると、きれいなオートファゴソームを形成した。さらに、オートファジーの阻害剤である3メチルアデニンを培地中に入れても、アミノ酸欠乏で顕著な毒性を示した。これらのことは、オートファジーがある条件下では細胞の生存に働くことを示す。

D. 考察

本年度の研究結果から、LKB1が栄養飢餓耐性に関与していることが明らかになった。一方、LKB1はPeutz-Jeghers症候群の原因遺伝子であるがん抑制遺伝子である。また、最

近の研究で肺腺癌ではしばしば突然変異が認められ、またLOHも認められている。がんでは機能を失っている可能性があることから、栄養飢餓耐性に関与し悪性化に関与するという考え方と矛盾する。しかし、我々が示した如く、AMPKにはLKB1非依存性の活性化機構が存在する。特にサイトカイン、増殖因子による活性化はLKB1非依存性である場合が多く腫瘍の微小環境の中ではLKB1依存的AMPK依存的p53の活性化はLKB1の変異で遮断されるが、増殖因子依存性のAMPK活性化はグルコース欠乏に関与している可能性はあり、矛盾しないかもしれない。

がんの微小環境に、グルコースの極度の欠乏とは裏腹にアミノ酸が十分に存在することは、低酸素下でアミノ酸を基質としたエネルギー産生が起こっている可能性を良く支持する。この反応が、回虫などで起こっている嫌氣的呼吸と全く同じか、あるいはさらに新しい反応を伴うものかは今後の生化学的、メタボロミクス解析によらなければ確定は出来ないが、現在得られているすべてのデータは、回虫などと極めて類似した反応であることを強く示唆する。

特に、放線菌から次々と呼吸鎖の阻害物質がスクリーニングで活性物質として精製されてくることは上の仮

説と良く一致する。

E. 結論

従来から我々が予測し主張していた如く、がん組織では単に低酸素状態だけではなく、極度の低グルコースが存在すること、さらにグルコースは欠乏しているがアミノ酸濃度は正常域であることなどが証明され、栄養飢餓状態、特にグルコース飢餓に対する耐性が治療薬開発の標的となることが証明された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. Zaidi SF, Awale S, Esumi H, et al. Diterpenes from "Pini Resina" and their Preferential Cytotoxic Activity under Nutrient-Deprived Condition. *Planta Med* 2006.
2. Zaidi SF, Awale S, Esumi H, et al. Supporting Information to Diterpenes from "Pini Resina" and their Preferential Cytotoxic Activity under Nutrient-Deprived Condition. *Planta Med* 2006.
3. Masuda T, Ohba S, Esumi H, et al. Antitumor effect of kigamicin D on mouse tumor models. *J Antibiot (Tokyo)* 59; 209-14. 2006
4. Suzuki A, Ogura T, Esumi H. NDR2 acts as the upstream kinase of ARK5 during insulin-like growth factor-1 signaling. *J Biol Chem* 281; 13915-21, 2006
5. Awale S, Nakashima EM, Esumi H, et al. Angelmarin, a novel anti-cancer agent able to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Bioorg Med Chem Lett*, 16: 581-3, 2006
6. Awale S, Lu J, Esumi H, et al. Identification of arctigenin as an antitumor agent having the ability to eliminate the tolerance of cancer cells to nutrient starvation. *Cancer Res*, 66; 1751-7, 2006
7. Morito N, Yoh K, Esumi H, et al. Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human. *Cancer Res*, 66; 812-9, 2006
8. Kishimoto A, Ogura T, Esumi H. A pull-down assay for 5' AMP-activated protein kinase activity using the GST-fused protein. *Mol Biotechnol*, 32; 17-21, 2006

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

- 1) 新規抗生物質キガマイシン類とその用途

発明者：國元 節子
：江角 浩安
：呂 杰

登録日：平成 19 年 1 月 12 日
特許番号：特許第 3902530 号

2) 抗癌剤及び抗癌用薬理組成物
発明者：江角 浩安

登録日：平成 19 年 3 月 2 日
特許番号：特許第 3921535 号

2. 実用新案登録
該当なし

3. その他
該当なし

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）

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 百瀬 功 財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究センター
沼津創薬医科学研究所

研究要旨 栄養飢餓状態のがん細胞に選択的に細胞毒性を示す物質の探索を行なった。微生物代謝産物および化合物ライブラリーよりスクリーニングを行なったところ、10種類の化合物を得ることができた。その中にはエネルギー代謝阻害剤や IGF-1 レセプターチロシンキナーゼ阻害剤が含まれており、これらの化合物が栄養飢餓選択的細胞毒性を示すことが分かった。

A. 研究目的

多くの固形癌は不十分な血管形成ならびに血流の欠乏により慢性的に栄養が欠乏した栄養飢餓状態にある。このような栄養飢餓状態は正常組織にはなく、固形癌に特有な性質であることから、栄養飢餓状態の細胞に選択的に細胞毒性を示す物質は、優れた制がん剤になりうると考えられる。そこで栄養状態の良い細胞には細胞毒性を示さず、栄養飢餓状態の細胞に選択的に細胞毒性を示す化合物を探索することを目的とする。

B. 研究方法

栄養培地として DMEM (10% FBS 含) を、栄養飢餓培地として NDM (DMEM よりグルコース、アミノ酸、FBS を除いた培地) を用いて、ヒト膵臓がん

PANC-1、Capan-1、MIA Paca-2、BxPC-3、PSN1 細胞における栄養飢餓選択的細胞毒性を MTT 法により測定した。栄養飢餓選択的細胞毒性物質は放線菌、カビの培養液および化合物ライブラリーより探索を行なった。固体培養もしくは液体培養を行なった微生物培養液からの栄養飢餓選択的細胞毒性物質の単離精製は、酢酸エチル、ブタノールなどの溶媒抽出法、およびシリカゲル、ゲル濾過、イオン交換樹脂、HPLC などの各種カラムクロマトグラフィー法を適宜組み合わせることにより行なった。単離した化合物は TLC 呈色反応、NMR、MS、UV スペクトルの詳細な解析により、それらの化学構造を決定した。Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) によるシグナル伝達はウェスタンブロット法により

IGF-1 レセプター、AKT、ERK の発現量およびリン酸化について調べた。

(倫理面への配慮)

当研究センター内の動物実験指針および環境安全委員会規定に従い実験を行なった。

C. 研究結果

ヒト膵臓がん PANC-1 細胞を用いて、数千の微生物培養液より栄養飢餓選択的細胞毒性物質のスクリーニングを行ったところ、数培養液に強い栄養飢餓選択的細胞毒性が認められた。それらの活性成分を単離精製したところ、放線菌の培養液より antimycins、oligomycin、glucopiericidin A、nonactin が見出され、カビの培養液より atpenins、ophiobolins、viomellein、beauvericin、leucinostatin が見出された。いずれも既知物質ではあったが、これまでに栄養飢餓選択的細胞毒性を有することは知られていなかった。

次に化合物ライブラリーより栄養飢餓選択的細胞毒性物質のスクリーニングを行なったところ、IGF-1 レセプターチロシンキナーゼ阻害剤である tyrphostin AG1024 が、栄養培地に比べて栄養飢餓培地において非常に強い細胞毒性を示すことが分かった。その選択性は 100 倍以上であった。AG1024 は IGF-1 による IGF-1 レセプタ

一のリン酸化および IGF-1 シグナル伝達の下流の AKT、ERK1/2 のリン酸化を栄養飢餓状態において著しく抑制した。AG1024 による栄養飢餓選択的細胞毒性は PANC-1 細胞の他に Capan-1、MIA Paca-2、BxPC-3、PSN1 細胞においても認められた。AG1024 とは化学構造の異なる IGF-1 レセプターチロシンキナーゼ阻害剤である tyrphostin I-OMe-AG538 においても栄養飢餓選択的細胞毒性が確認された。一方、Epidermal growth factor (EGF) レセプターチロシンキナーゼ阻害剤である tyrphostin AG1478 や AG825、Genistein はいずれも栄養飢餓選択的細胞毒性を示さなかった。

D. 考察

微生物由来の栄養飢餓選択的細胞毒性物質の探索において、ミトコンドリアの複合体 I、II、III の阻害剤などエネルギー代謝を阻害する化合物が多く見出され、栄養飢餓状態におけるエネルギー代謝の重要性が示唆された。また IGF-1 によるシグナル伝達を遮断する IGF-1 レセプターチロシンキナーゼ阻害剤が、栄養飢餓状態のがんに選択的に細胞毒性を示したことから、栄養飢餓耐性メカニズムにおいて IGF-1 経路が重要であることが示唆された。IGF-1 はがん細胞自身によっても産生されるが、がん間質細胞にお

いて多く産生され、特に膵臓がんは間質細胞に富むがんであることから、特にIGF-1に依存した生存を示すと考えられる。

E. 結論

エネルギー代謝を阻害する化合物が栄養飢餓状態のがん細胞に対して選択的に細胞毒性を示したことから、エネルギー代謝系が新たな抗がん剤の標的となりうることが分かった。また tyrphostin AG1024 などの IGF-1 レセプターチロシンキナーゼ阻害剤が栄養飢餓選択的細胞毒性を示したことから、IGF-1 経路を標的とする化合物が抗がん剤となりうることが分かった。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Momose, I., Iijima, M., Kawada, M., Ikeda, D. A new proteasome inhibitor, TP-110, induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71: 2007. in press
- 2) Yamazaki, Y., Someno, T., Minamiguchi, K., Kawada, M., Momose, I., Kinoshita, N., Doi, H.,

Ikeda, D. Inhibitory activity of the hypoxia-inducible factor-1 pathway by tartrolone C. *J. Antibiotics* 59:693-703, 2006.

3) Masuda, T., Ohba, S., Kawada, M., Iijima, M., Inoue, H., Osono, M., Ikeda, D., Kunimoto, S. Augmentation of cellular immunity by kigamicin D. *J. Antibiotics* 59:215-219, 2006.

4) Masuda, T., Ohba, S., Kawada, M., Osono, M., Ikeda, D., Esumi, H., Kunimoto, S. Antitumor effect of kigamicin D on mouse tumor models. *J. Antibiotics* 59:209-214, 2006.

2. 学会発表

1) 第 10 回がん分子標的治療研究会総会

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

2) 第 10 回がん分子標的治療研究会総会

炎症性サイトカインによるアンドロゲンレセプター機能の変化：山崎洋子、川田学、百瀬功、池田大四郎

3) 第 65 回日本癌学会学術総会

前立腺癌／間質細胞共培養系における炎症性サイトカインのアンドロゲンレセプター機能への影響：山