

崎洋子、川田学、百瀬功、池田大四郎

4) 第65回日本癌学会学術総会

Tyrphostin 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

5) 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

る研究：飯島正富、百瀬功、池田大四郎

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

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 抗ギョウ虫薬ピルビニウムパモ酸はグルコース欠乏下で抗がん作用を有する事が判っている。この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がん細胞特異的に誘導される嫌氣的呼吸活性である NADH-フマル酸還元酵素系に対する阻害効果によることが明らかとなった

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実績をふまえ、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に焦点を絞った化学療法の標的を探索する。

B. 研究方法

1. 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酸の阻害効果の作用機序を明確にする目的で、正常細胞と比較しつつ、以下の方法によって研究を行った。すなわちグルコース欠乏培地下にて大腸由来腺がん細胞DLD-1および正常筋芽細胞を用い、以下の解析を行なった。グルコースを除いた培地で培養した細胞にピルビニウムを添

加し、24hr 後その細胞生存率を測定した。さらに添加するピルビニウムの濃度を変化させ、 IC_{50} を求めた。次に、ミトコンドリアにおけるピルビニウムの標的と考えられる嫌氣的複合体 I, II、NADH-フマル酸還元酵素活性に対するピルビニウムの効果をグルコース欠乏のがん細胞および正常筋芽細胞について比較解析した。さらにピルビニウムに腸管吸収を阻害するため加えられているパモ酸に付いてもその影響の確認のため調べた。

本実験ではすべて培養細胞および市販のウシ心臓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

これまでにウシ心筋ミトコンドリアにおいてピルビニウムが複合体 I (NADH-ユビキノン還元酵素) 活性を阻害し、一方、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し、活性上昇作用を示す事を明らかにした。そこで今回は培養細胞を用い、グルコース欠乏条件下のがん細胞特異的なピルビニウムの効果について解析を行なった。その結果、これまでに報告のあったスイ臓がん由来の Panc1 細胞ばかりでなく、大腸由来腺がん細胞 DLD-1 においてもピルビニウムによる細胞生存率の低下が観察された。しかしこの現象はグルコース存在下では見られず、また正常筋芽細胞ではグルコース添加の有無に関わらず、ピルビニウムの効果は観察されなかった。さらにグルコース欠乏下のがん細胞の 50%阻害濃度は 0.1 μM と、通常のグルコース濃度のがん細胞および正常細胞と比較すると 10 分の 1 以下と低かった。すなわちピルビニウムはグルコース欠乏のがん細胞特異的に細胞障害作用を示す事が確認された。

続いて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の標的である嫌氣的複合体 I, II、NADH-フマル酸還元酵素活性と、それらに対するピルビニウムの影響を調べた。その結果、正常細胞では嫌氣的な NADH-フマル酸還元酵素活性は非常に低いままであるのに対し、グルコース欠乏下のがん細胞ではその活性が増加し、ピルビニウムがこの活性増加

を阻害する事が明らかになった。またパモ酸が回虫ミトコンドリアのコハク酸-ユビキノン還元活性を阻害する事が判ったので、哺乳類ミトコンドリアに対する影響を調べたが、ウシ心筋および培養細胞においては、阻害効果は観察されなかった。

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がん細胞特異的に誘導される嫌氣的呼吸活性である NADH-フマル酸還元酵素系に対する阻害効果によることが明らかとなった。

すなわち、正常細胞における通常的环境下において、ピルビニウムは複合体 I を阻害する一方、好氣的複合体 II の活性を上昇させる事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上昇効果が消失し、複合体 I の阻害と合わせて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のがん細胞では嫌氣的代謝が誘導され、ピルビニウムの効果が増強されると考えられる。

E. 結論

ここで得られた結果から、ピルビニ

ウムパモ酸はがん細胞ミトコンドリアの特殊な嫌氣的呼吸系である NADH-フマル酸還元系に作用し、がん細胞のエネルギー代謝系を特異的に阻害する事によって、抗がん細胞効果を示すと考えられる。

この結果は、ピルビニウムパモ酸ががん細胞特異的代謝を標的とした有望な生化学的抗がん剤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) Genetic diversity and kinetic properties of *Trypanosoma cruzi* dihydroorotate dehydrogenase. Sario, I., Annoura, T., Nara, T., Hashimoto, M., Tsubouchi, A., Iizumi, K., Makiuchi, T., Murata, E., Kita, K. and Aoki, T. (2006) Parasitol. Int. 55, 11-16
- 2) Kinetics and strain variation of phagosome proteins of *Entamoeba histolytica* by proteomic analysis. Okada, M., Hustond, C. D., Ouea, M., Manne, Petri, W.J. Jr. Kita, K. and Nozaki, T. (2006) Mol. Biochem. Parasitol. 145, 171-183
- 3) Identification and characterization of amino acid residues essential for the active site of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase (MurB) from *Staphylococcus aureus*. Nishida, S., Kurokawa, K., Matsuo, M., Sakamoto, K., Ueno, K.,

Kita, K. and Sekimizu, K. (2006) J. Biol. Chem. 281, 1714-1724

4) Up-regulation of Heme Biosynthesis during Neuronal Differentiation. Shinjyo, N. and Kita, K. (2006) J. Biochem. 139, 373-381

5) Intraerythrocytic *Plasmodium falciparum* utilize a broad range of serum-derived fatty acids with limited modification for their growth. Mi-ichi, F., Kita, K. and Mitamura, T. (2006) Parasitology, 133, 399-410

6) Verticipyron, a new NADH-fumarate reductase inhibitor, produced by *Verticillium* sp. FKI-1083. Ui, H., Shiomi, K., Suzuki, H., Hatano, H., Morimoto, H., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Sunazuka, T., Shimamura, H., Sakamoto, K., Kita, K., Miyoshi, H., Tomoda, H., and Omura, S. J. Antibiot. (2006) 59, 785-790

7) Overexpression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator -1 α (PGC-1 α) Develops Muscle Atrophy with Depletion of ATP. Miura, S., Tomitsuka, E., Kamei, Y., Yamazaki, T., Kai, Y., Tamura, M., Kita, K., Nishino, I., and Ezaki, O. Am. J. Physiol. (2006) 169, 1129-1139

8) An evolutionary "intermediate state" of mitochondrial translation systems found in *Trichinella* species of parasitic nematodes: Co-evolution of tRNA and EF-Tu. Arita, M., Suematsu, T., Osanai, A., Inaba, T., Kamiya, H., aruo; Kita, K., Sisido, M., Watanabe, Y., and Ohtsuki, T. (2006) Nuc. Acid. Res. 34, 5291-5299

9) Paecilaminol, a New NADH-Fumarate Reductase Inhibitor, Produced by *Paecilomyces* sp. FKI-0550. Ui, H., Shiomi, K., Suzuki, H., Hatano, H., Morimoto, H., Yamaguchi, Y., Masuma, R., Sakamoto, K., Kita, K., Miyoshi, H.,

- Tomoda, H., Tanaka, H., Omura, S. J. Antibiot. (2006) 59, 591-596
- 10) Mitochondria and apicoplast of *Plasmodium falciparum*: behaviour on subcellular fractionation and the implication. Kobayashi T., Sato, S., Takamiya, S., Komaki-Yasuda, K., Yano, K., Hirata, A., Onitsuka, I., Hata, M., Mi-ichi, F., Tanaka, T., Hase, T., Miyajima, A., Kawazu, S., Watanabe, Y., Kita, K. Mitochondrion (2007) 7, 125-132
- 11) Independent evolution of pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* in Melanesia. Mita, T., Tanabe, K., Takahashi, N., Tsukahara, T., Eto, H., Dysoley, L., Ohmae, H., Kita, K., Krudsood, S., Looareesuwan, S., Kaneko, A., Bjokman, A., and Kobayakawa, T. Antimicrob. Agents. Chemother. (2007) 51, 1071-1077
- 12) Cloning and characterization of ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase from human malaria parasite. Kimata-Ariga, Y., Kurisu, G., Kusunoki, M., Aoki, S., Sato, D., Kobayashi T., Kita, K., Horii, T., and Hase, T. J. Biochem. in press
- 13) Parasitology in Japan: Advances in drug discovery and biochemical studies. Kita, K., Shiomi K., and Ōmura, S. Trends in Parasitol. in press
2. 学会発表
- 1) 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
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

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 がん細胞において高頻度に変異ミトコンドリア DNA が検出される。これに基づくミトコンドリア機能異常が、がん細胞に特異的なシグナル伝達系を活性化させている。本研究により、mtDNA 変異を有する細胞においてアミノ酸飢餓応答系が特に活性化されていることが明らかになった。がん特異的な分子レベルでの治療の標的としてアミノ酸飢餓応答系の転写制御因子が注目された。

A. 研究目的

がん細胞において高頻度にミトコンドリア DNA (mtDNA) 変異が検出される。mtDNA 変異が細胞内物質代謝に影響を与え、それに対してがん細胞特異的なシグナル伝達系が活性化されている可能性がある。本研究では mtDNA 変異を有するがん細胞における物質代謝異常に応答する分子を同定するために、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 3243A>G [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, ataxia, retinitis pigmentosa) 患者の 8993T>G [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

2SD および NARP3-1 細胞では、ATF4 (activating transcription factor 4), CHOP (Gadd153), ASNS (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。

Reporter assay により、ATF4 が CHOP 遺伝子の AARE (amino acid regulatory element) と ASNS 遺伝子の NSRE-1 (nutrient-sensing response element-1) にそれぞれ結合し発現上昇をもたらしていることが示された。さらに、ATF4 を RNA 干渉により knockdown すると、CHOP と ASNS 遺伝子の転写が 2SD および NARP3-1 細胞において減少した。

D. 考察

以上の結果は、ミトコンドリア機能異常が細胞内アミノ酸プールに影響を与え、これが細胞内の遺伝子発現に影響を与えていることを示している。本研究で見いだされた遺伝子発現の変化を指標として、ミトコンドリア病に対する治療薬の効果を評価しうると考えられた。現在、ピルビン酸ナトリウムあるいは乳酸ナトリウムを培地に添加して、細胞内アミノ酸プールの異常が正常化あるいは悪化するかどうかを検証している。また CHOP 遺伝子および ASNS 遺伝子の発現を制御する物質のスクリーニングが可能になった。

E. 結論

がん細胞において高頻度に変異ミトコンドリア DNA が検出される。これに基づくミトコンドリア機能異常が、

がん細胞に特異的なシグナル伝達系を活性化させている。本研究により、mtDNA 変異を有する細胞においてアミノ酸飢餓応答系が特に活性化されていることが明らかになった。がん特異的な分子レベルでの治療の標的としてアミノ酸飢餓応答系の転写制御因子が注目された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Mitochondrial haplogroup N9a confers resistance against type 2 diabetes in Asians. Fuku N, Park KS, Yamada Y, Nishigaki Y, Cho YM, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Yamaguchi S, Nozawa Y, Lee HK, Tanaka M *Am J Hum Genet* 80: 407-415, 2007
2. Women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against metabolic syndrome. Tanaka M, Fuku N, Nishigaki Y, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Yamaguchi S, Ito M, Nozawa Y, Yamada Y. *Diabetes* 56: 518-521, 2007
3. Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males. Nishigaki Y, Yamada Y, Fuku N, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Yamaguchi S, Nozawa Y, Tanaka M. *Hum Genet* 120: 827-836, 2007

4. Mitochondrial haplogroup A is a genetic risk factor for atherothrombotic cerebral infarction in Japanese females. Nishigaki Y, Yamada Y, Fuku N, Matsuo H, Segawa T, Watanabe S, Kato K, Yokoi K, Yamaguchi S, Nozawa Y, Tanaka M. *Mitochondrion* 7: 72-79, 2007
5. Mitochondrial DNA and cancer epidemiology. Verma M, Naviaux R, Tanaka M, Kumar D, Franceschi, C, Singh K. *Cancer Res* 67: 437-439, 2007
6. Enrichment of longevity phenotype in mtDNA haplogroups D4b2b, D4a, and D5 in the Japanese population. Alexe G, Fuku N, Bilal E, Ueno H, Nishigaki Y, Fujita Y, Ito M, Arai Y, Hirose N, Bhanot G, Tanaka M. *Hum Genet* (in press) 2007
7. CHOP (C/EBP homologous protein) and ASNS (asparagine synthetase) induction in cybrid cells harboring MELAS and NARP mitochondrial DNA mutations. Fujita Y, Ito M, Nozawa Y, Yoneda M, Oshida Y, Tanaka M. *Mitochondrion* 7: 80-88, 2007
8. Pyruvate ameliorates the defect in ureogenesis from ammonia in citrin-deficient mice. Moriyama M, Li MX, Kobayashi K, Sinasac DS, Kannan Y, Iijima M, Horiuchi M, Tsui LC, Tanaka M, Nakamura Y, Saheki T. *J Hepatol* 44: 930-938, 2006
9. Identification of mitochondrial DNA polymorphisms that alter mitochondrial matrix pH and intracellular calcium dynamics. Kazuno A, Munakata K, Nagai T, Shimozono S, Tanaka M, Yoneda M, Kato N, Miyawaki A, Kato T. *PLoS Genet* 2: e128, 2006
2. 学会発表
なし
- 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

培養膵がん細胞である PANC-1 の長寿命タンパク分解を富栄養条件、アミノ酸・血清除去条件、グルコース除去条件で比較した。Kigamicin は富栄養条件やアミノ酸・血清除去条件下のタンパク分解に影響を与えないが、グルコース除去条件下でのタンパク分解を強く阻害した。Kigamicin がグルコース飢餓におけるタンパク分解誘導のシグナル伝達に作用す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。膵がん細胞においてオートファジーがその生存にどのように寄与しているかを調べ、また、江角らによって単離された Kigamicin のオートファジーへの効果をオートファジーのシグナル伝達系への作用という観点から解析した。

B. 研究方法

1) 培養膵がん細胞 (PANC-1) やマウス初代肝細胞を ^{14}C -leucine を加えた培地 (0.5 mCi/ml) で 2 2 時間培養し、非放射性 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、タンパク分解率を求めた。富栄養条件 (10% FCS を含む Williams E medium、以下 Williams E/10 % FCS) とアミノ酸や血清を除いた栄養飢餓条件 (Krebs-Ringer bicarbonate buffer, 以下 KRB) に加えて、グルコースを除いた培養条件 (Williams E/10 % FCS- glucose) 下での比較を行った。

2) 1) と関連して、上記 3 条件下で PANC-1 細胞のオートファジー関連シグナル伝達分子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。また、この 3 条件にさらに Kigamicin を添加し、その影響を調べた。

(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 に従った。

C. 研究結果

1) 長寿命タンパク分解

ヒト膵がん細胞である PANC-1 を栄養飢餓条件下と富栄養条件下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、3 時間あたり、栄養飢餓条件下で 7%、富栄養条件下で 5 % という値を示した。初代培養肝細胞ではそれぞれ 15 % と 7-8 % 程度なので、PANC-1 のオートファジー活性そのものは肝細胞に較べてかなり小さく、栄養飢餓によって著しく亢進するという事も無かった。また、グルコース除去条件下でのタンパク分解の大きさは栄養飢餓条件下におけるタンパク分解の規模とほぼ同等であった。ところが、Kigamicin は飢餓条件下でのタンパク分解にはほとんど影響を与えないかむしろ有意に活性化する効果があるのに対し、グルコース除去条件下でのタンパク分解に強い阻害を及ぼした。

2) シグナル伝達分子の振る舞い

栄養飢餓で誘導されるオートファジーで

は、インスリンによるシグナリングやアミノ酸のシグナリングが複雑に絡み合っており、これを制御していると考えられており、中でも Tor を中心とする S6 kinase の経路が有力視されていることに注目して、これらのシグナル伝達分子のリン酸化・脱リン酸化について調べた。

富栄養条件で培養したときの PANC-1 では、Tor、S6 kinase、リボソーム S6 サブユニットはいずれもリン酸化されており、栄養飢餓条件に置くと速やかに脱リン酸化される。このことは、培養肝細胞と同じように、少なくとも Tor からその下流へ向けてのシグナル伝達は栄養飢餓条件下へ移行すると並行して脱リン酸化されることが解った。また、富栄養条件でオートファジーを誘導する rapamycin の効果も肝細胞と PANC-1 で共通しており、Tor およびその下流のシグナル伝達分子の不活化を引き起こす。Kigamicin の作用はこの rapamycin といくつかの点でよく似ているが、重要な違いとして富栄養条件下で S6 のリン酸化に影響が無いのに対し、グルコース飢餓では脱リン酸化を引き起こすことが解った。

D. 考察

PANC-1 細胞では、オートファジーの大きさは肝細胞と比べて2分の1以下であり、多くの培養細胞での大きさとほぼ同等であった。今回検討したグルコース除去条件下でのタンパク分解の大きさは富栄養条件下でのそれとほとんど同じであったが、Kigamicin の作用において顕著な違いがあった。すなわち、Kigamicin は、富栄養条件下や飢餓条件下(血清とアミノ酸非存在下)でオートファジーにほとんど影響を与えないのに対し、グルコース除去条件下でのみタンパク分解を強く阻害した。また、このとき S6 の脱リン酸化を引き起こすことが解った。

グルコース除去によるシグナル伝達にはア

ミノ酸やインスリン除去と共通した道筋と独立した経路が存在することが示唆された。

E. 結論

1. PANC-1 細胞のタンパク分解はグルコース除去条件下で Kigamicin によって強く阻害されるがアミノ酸や血清除去では全く影響されない。

2. グルコース除去とアミノ酸・血清除去のシグナル伝達系は共通部分と異なる部分があり、異なる部分に Kigamicin が作用すると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表 (英文)

1. Sou, YS., Tanida, I., Komatsu, M., Ueno, T., Kominami, E. Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16.

J Biol Chem, 281: 3017-3024, 2006

2. Kumanomidou, T., Mizushima, T., Komatsu, M., Suzuki, A., Tanida, I., Sou, YS., Ueno, T., Kominami, E., Tanaka, K., Yamane, T. The crystal structure of human Atg4B, a processing and de-conjugating enzyme for autophagosome-forming modifiers.

J Mol Biol, 355: 612-618, 2006

3. Iwata, J., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., Tanaka, K., Kominami, E. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals.

J Biol Chem, 281: 4035-4041, 2006

4. Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., Tanaka, K. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice.

Nature, 441: 880-884, 2006

5. Tanida, I., Sou, YS., Minematsu-Ikeguchi, N., Ueno, T., Kominami, E. Atg8L/Apg8L is the fourth mammalian modifier of mammalian Atg8 conjugation mediated by human Atg4B, Atg7 and Atg3.

FEBS J, 273: 2553-2562, 2006

6. Tanida, I., Wakabayashi, M., Kanematsu, T., Minematsu-Ikeguchi, N., Sou, YS., Hirata, M., Ueno, T., Kominami, E. 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: 264-271, 2006

7. Kouroku ,Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, RJ., Kominami, E., Momoi, T. ER stress (PERK/eIF2a phosphorylation) mediates the polyglutamine -induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation.

Cell Death and Differentiation, 14: 230-239,
2007

2. 和文総説

上野 隆、内山安男、木南英紀、オートファジーと神経疾患

蛋白質核酸酵素増刊「ユビキチン-プロテアソーム系とオートファジー」（田中啓二、大隅良典編）51 巻 1525-1531, 2006

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

臨床的ゲノム情報に基づいた抗がん剤の開発

分担研究者 門田守人 大阪大学大学院医学系研究科消化器外科学 教授

研究要旨：癌は周囲の微小環境をハイジャックし自己の拡大のために有利な環境を整える。したがって癌の治療戦略は、癌と間質の両者を意識したアプローチが必要とされる。本研究では、癌の性質として Wnt signal 系の異常に注目し、間質の成分として、myofibroblast と腫瘍血管に注目して主として in vivo システムでの解析を行った。

A. 研究目的

癌とその間質反応の相互関係について注目し、癌治療へ展開する成果を得ることを目的とした。癌については Wnt signal 系の異常が癌細胞の形態や腫瘍血管新生へ及ぼす影響について検討し、間質については間質反応の中心的役割を果たす Myofibroblast の予後因子としての意義、新規血管新生遺伝子の同定、血管分化阻害による癌治療について検討した。

B. 研究方法

(研究対象) 大腸癌原発巣、肝転移巣の外科切除標本を用いた。ヌードマウス、胃癌・大腸癌細胞株、HUVEC 血管内皮細胞を利用した。

(方法) 1. 免疫染色：beta catenin, PPAR delta, alphe-SMA, CD34, collagen

2. Western blot: cyclin D1, VEGF, STAT3, actin

3. RT-PCR: VEGF など

4. Adenovirus easy system による antisense cyclin D1, control adenovirus Mock, adenovirus-GFP の作製

5. 各種細胞 assay: 細胞増殖、ヌードマウス皮下腫瘍、in vitro tube formation, matrigel plug assay

6. Transfection: wild STAT3 cDNA, dominant negative STAT3 cDNA

7. Reporter assay: VEGF 転写活性

8. Laser capture microdissection (LCM) により肝転移巣の血管の豊富な領域と、欠乏領域を切り出し、ヒト全遺伝子解析用の DNA microarray で両者で発現差の大きい遺伝子セットを求めた。

9. VEGF 中和抗体、Angiopoietin2 中和抗体を用いてマウス皮下腫瘍の増殖抑制効果（それぞれの単独効果および

併用効果)を調べた。

(倫理面への配慮)

動物実験に関しては学内の倫理委員会、動物実験施設委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. PPAR delta は beta catenin の異常蓄積の結果、大腸癌腫瘍細胞の細胞質に蓄積し、核の巨大化、球状化などの悪性形態と関連した。

2. STAT3 転写因子は大腸癌細胞 DLD1 の VEGF 産生を亢進させた。Antisense cyclin D1 は、STAT3 のリン酸化を抑制し腫瘍細胞の VEGF 産生を抑制した。また直接血管内皮細胞に作用し、in vitro, in vivo で腫瘍血管新生を抑制した。

3. Myofibroblast の発現誘導は大腸癌の独立した予後因子となるが、間質量そのものは予後を反映しなかった。原発巣と転移巣の間質反応の程度は症例毎に同レベルであった。

4. 肝転移巣の血管欠乏域から得られた低酸素遺伝子候補群の約8割はこれまでに低酸素遺伝子と認識されていないものであり、低酸素への応答反応が新たな機能として加わる可能性がある。またそのうちの多くはこれまで機能が不明であった未知遺伝子であった。

5. VEGF 中和抗体、Angiopoietin 2 中和抗体のいずれもがマウス皮下腫瘍

の増殖を抑制した。また両者の併用により、相加的な腫瘍抑制効果が確認された。腫瘍の病理組織学的、免疫組織化学的検索から、そのメカニズムは異なることが示唆された。すなわち、VEGF 抗体は血管内皮細胞の増殖抑制を通じて血管数、血管サイズの減少をもたらし、angiopoietin 2 抗体は血管内皮細胞の増殖抑制は顕著ではなく、血管内腔の形成不全(血管分化の抑制)が主作用と考えられた。

D. 考察

・主として In vivo 材料を用いて、種々の癌細胞と癌間質反応の関連について検討した。

・Wnt signal の異常は細胞形態をより悪性度の高いものに誘導し、この系の阻害が癌の進展を抑制すると考えられる。Cyclin D1 は Wnt signal の末端で働く癌遺伝子であるが、VEGF レベルの維持に働くと共に、血管内皮細胞の増殖に必須であり腫瘍血管新生に重要な役割を果たす。

・原発巣と同程度の間質反応が転移巣でもみられたことから、癌が主体的に間質反応を誘導し自己の勢力を拡大してゆくことが想定される。

・In vivo 血管新生では、内皮細胞の増殖(細胞の伸長)と分化(内腔形成)が内皮・周皮細胞の相互作用の結果、達成され VEGF, Angiopoietin 2 がそ

れぞれ重要な役割を果たすと考えられた。

E. 結論

癌の間質反応は癌細胞の性質と並び腫瘍進展に重要な役割を果たす。腫瘍血管の抑制には VEGF 抗体と共に、血管内皮・周皮細胞の相互作用に働く Angiopoietin 2 抗体が有効であり、両者は異なるメカニズムに立脚するので、併用効果が期待される。肝転移巣から多数の新規低酸素遺伝子候補が得られ、この中には血管新生に働くもの潜んでいると考えている。これらは VEGF のように新たな治療標的となる可能性があり今後の展開が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tsujino, T., Seshimo, I., Yamamoto, H., Ngan, CY., Ezumi K., Takemasa, I., Ikeda, M., Sekimoto, M., Matsuura, N., Monden, M.: Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. Clin.Cancer Res., in press.
- 2) Takayama O, Yamamoto H, Damdinsuren B, Sugita Y, Ngan CY, Xu X, Tsujino T, Takemasa I, Ikeda

M, Sekimoto M, Matsuura N, Monden M. Expression of PPARdelta in multistage carcinogenesis of the colorectum: implications of malignant cancer morphology.Br J Cancer. 2006 Oct 9;95(7):889-95. Epub 2006 Sep 12.

- 3) Yasui, M., Yamamoto, H., Ngan, CY., Damdinsuren, B., Sugita, Y., Fukunaga, H., Gu, J., Maeda, M., Takemasa, I., Ikeda, M., Fujio, Y., Sekimoto, M., Matsuura, N., Weinstein, IB., Monden, M. Antisense to cyclin D1 inhibits vascular endothelial growth factor-stimulated growth of vascular endothelial cells: implication of tumor vascularization. Clin. Cancer Res., 12: 4720-4729, 2006.
- 4) Seki, Y., Yamamoto, H., Ngan, CY., Yasui, M., Tomita, N., Kitani, K., Takemasa, I., Ikeda, M., Sekimoto, M., Matsuura, N., Albanese, C., Kaneda, Y., Pestell, RG., Monden, M. Construction of a novel DNA decoy that inhibits the oncogenic beta-catenin/T-cell factor pathway. Mol. Cancer Ther. 5:985-994, 2006.

2. 学会発表

なし

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

厚生労働科学研究費補助金（対がん戦略研究事業）

分担研究報告書

腫瘍脈管構築に基づくがん化学療法の開発

分担研究者 松村 保広 国立がんセンター東病院臨床開発センター がん治療開発部長

カンプトテシン誘導体 SN-38 ミセル内包化により、SN-38 固形腫瘍への選択的腫瘍集積性を図り、逆に正常組織への分布を抑えることで毒性の軽減をもたらし、結果として治療域の増大を達成できた。

A. 研究目的

NK012 は CPT-11 の活性型である SN-38 の固形腫瘍への選択的デリバリーを向上させるための SN-38 ミセル内包体である。本研究の目的は NK012 の薬理学的特性を明らかにすることである。

B. 研究方法

- 1) SN-38 はポリエチレングリコールとポリグルタミン酸鎖のブロック共重合体の疎水鎖部分にエステル結合させることにより、水系でミセル内包化された。ミセルサイズおよび種々の条件での SN-38 のミセルからのリリースについて検討した。
- 2) *In vitro* 殺細胞効果 NK012、SN-38、および CPT-11 の殺細胞効果を WiDR、SW480、Lovo、HT-29（大腸がん）、PC-14、A431（非小細胞肺癌）、SBC-3（小細胞肺癌）

において、MTT 法を用いて検討した。

- 3) *In vivo* 抗腫瘍効果 大腸がん HT-29 をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍重量が 70-170mm³ に達した時点で NK012 の MTD である 30mg/kg と、1/2MTD の 15mg/kg、1/4MTD の 7.5mg/kg を 0、4、8 日の 3 回静注 CPT-11 は MTD 量である 66.7mg/kg を 0、4、8 日の 3 回静注した。小細胞肺癌については SBC-3/Neo と SBC-3/VEGF をヌードマウス皮下に移植し、腫瘍重量が 1500mm³ と巨大な腫瘍をそれぞれ形成した時点で治療実験を開始した。NK012 は 20mg/kg と 10mg/kg を CPT-11 は 30mg/kg と 15mg/kg を 0、4、8 日に静注した。
- 4) 薬理的検討 HT-29 腫瘍担がんマウスに NK012 は 30mg/kg、CPT-11 は 66.7mg/kg 静注し、各種薬理的パラメーターと各主要臓

器および腫瘍への SN-38 の分布を調べた。

C. 研究結果

- 1) NK012 全重量のうち 20%を SN-38 がしめていた。NK012 の粒子径は約 20nm であった。37°Cでの SN-38 のミセルからのリリースは 5%グルコース液において、ほとんど認められなかったのに対し、PBS 中では 48 時間以内に約 80%の SN-38 がリリースされることがわかった。
- 2) In vitro 細胞毒性に関しては、NK012 が SN-38 より 2-3 倍弱いという結果であった。CPT-11 は NK012 や SN-38 に比べて 40-350 倍弱いという結果であった。
- 3) HT-29 大腸がんに対する抗腫瘍効果においては、CPT-11 の MTD 投与群に比べ、NK012 の MTD 投与群と 1/2MTD 投与群両方とも有意に優っていた。小細胞肺がんの SBC-3/Neo 腫瘍に対して、NK012 が有意に CPT-11 より優っていた。VEGF 強制発現させた SBC/VEGF においては、NK012 の 10mg/kg および 20mg/kg いずれにおいても、すべての巨大腫瘍が消滅するといった、著明な効果が認められた。
- 4) NK012 と CPT-11 の薬理学的比較において、血漿 AUC は NK012 が CP-11 の約 250 倍高い値を示し

た。腫瘍内 AUC に関しても非結合型 SN-38 で比較すると、NK012 投与群のほうが約 10 倍高い値をしめした。正常臓器においては肝や脾において NK012 のほうが集積しやすいことが判明した。しかしながら、小腸を含むその他の臓器においては、NK012 投与群と CPT-11 投与群で差はなかった。

D. 考察

NK012 は 5%グルコース液で長時間安定で中味の SN-38 のリリースがほとんどみられなかった。一方で PBS 中では徐々に SN-38 がリリースされ 48 時間で約 80%の SN-38 がリリースされた。このことは臨床的に重要な知見である。すなわち、患者に投与する前は 5%グルコースに溶解し、患者に投与したあとは、NK012 は EPR 効果で腫瘍に集積したのち、中味の SN-38 が効率よくリリースされシャープな抗腫瘍効果を発揮できると推察される。事実本研究において、NK012 が CPT-11 に比べて著しい抗腫瘍効果を発揮している。特に、VEGF 産生腫瘍において、全腫瘍の根絶が得られたことは特筆すべきである。

E. 結論

本研究において SN-38 のミセル化は著しい治療域の拡大をもたらした。したがって、臨床評価の価値があると考

える。また、大腸がんの標準治療のひとつである、5-FU/CPT-11 併用療法との将来の比較試験に向けて、5-FU と NK012 の併用効果につき、非臨床において至急検討すべきと考える。

G. 研究発表

論文発表

1. T Negishi, Y Matsumura, et al. NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, is a more potent radiosensitizing agent compared to free paclitaxel. Brit J Cancer. 95:601-606 2006.
2. F Koizumi, Y Matsumura, et al. Novel SN-38-incorporated polymeric micelles, NK012, eradicate vascular endothelial growth factor-secreting bulky tumors. Cancer Res 66:10048-10056.2006.

研究成果の刊行に関する一覧表

別紙 4

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Zaidi SF, Awale S, <u>Esumi H</u> , et al.	Diterpenes from "Pini Resina" and their Preferential Cytotoxic Activity under Nutrient-Deprived Condition.	Planta Med			2006
Masuda T, Ohba S, <u>Esumi H</u> , et al.	Antitumor effect of kigamicin D on mouse tumor models.	J Antibiot (Tokyo)	59	209-14.	2006
Suzuki A, Ogura T, <u>Esumi H</u> .	NDR2 acts as the upstream kinase of ARK5 during insulin-like growth factor-1 signaling.	J Biol Chem	281	13915-21	2006
Awale S, Nakashima EM, <u>Esumi H</u> , 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
Awale S, Lu J, <u>Esumi H</u> , 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
Morito N, Yoh K, <u>Esumi H</u> , et al.	Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human.	Cancer Res	66	812-9	2006
Kishimoto A, Ogura T, <u>Esumi H</u> .	A pull-down assay for 5' AMP-activated protein kinase activity using the GST-fused protein.	Mol Biotechnol	32	17-21	2006
<u>Momose I</u> , et al.	A new proteasome inhibitor, TP-110, induces apoptosis in human prostate cancer PC-3 cells	Biosci Biotechnol Biochem	71	in press	2007
Yamazaki Y, <u>Momose I</u> , et al.	Inhibitory activity of the hypoxia-inducible factor-1 pathway by tartrolone C.	J. Antibiotics	59(11)	693-7	2006
Masuda T, <u>Kunimoto S</u> , et al.	Augmentation of cellular immunity by kigamicin D.	J. Antibiotics	59(4)	215-9	2006
Masuda T, <u>Kunimoto S</u> , et al.	Antitumor effect of kigamicin D on mouse tumor models.	J. Antibiotics	59(4)	209-14	2006
<u>Kita K</u> , Shiomi K, and <u>Ômura S</u> .	Parasitology in Japan: Advances in drug discovery and biochemical studies.	Trends in Parasitol.			in press
Kimata-Arigo Y, Kurisu G, <u>Kita K</u> , et al.	Cloning and characterization of ferredoxin and ferredoxin-NADP ⁺ reductase from human malaria parasite.	J. Biochem.			in press
Mita T, Tanabe K, <u>Kita K</u> , et al.	Independent evolution of pyrimethamine resistance in <i>Plasmodium falciparum</i> in Melanesia.	Antimicrob. Agents. Chemother.	51	1071-7	2007

研究成果の刊行に関する一覧表

Kobayashi T, Sato S, <u>Kita K</u> , et al.	Mitochondria and apicoplast of <i>Plasmodium falciparum</i> : behaviour on subcellular fractionation and the implication.	Mitochondrion	7	125-32	2007
Ui H, Shiomi K, <u>Kita K</u> , et al.	Paecilaminol, a New NADH-Fumarate Reductase Inhibitor, Produced by <i>Paecilomyces</i> sp. FKI-0550	J. Antibiot.	59	591-6	2006
Arita M, Suematsu T, <u>Kita K</u> , et al.	An evolutionary "intermediate state" of mitochondrial translation systems found in <i>Trichinella</i> species of parasitic nematodes: Co-evolution of tRNA and EF-Tu.	Nuc. Acid. Res.	34	5291-9	2006
Miura S, Tomitsuka E, <u>Kita K</u> , 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
Yabu Y, Suzuki T, <u>Kita K</u> , et al.	Chemotherapeutic efficacy of ascofuranone in <i>Trypanosoma vivax</i> -infected mice without glycerol	Parasitol. Int.	55	39-43	2006
Ui H, Shiomi K, <u>Kita K</u> , et al.	Verticipyronone, a new NADH-fumarate reductase inhibitor, produced by <i>Verticillium</i> sp. FKI-1083	J. Antibiot.	59	785-90	2006
Mi-ichi F, <u>Kita K</u> , and Mitamura T.	Intraerythrocytic <i>Plasmodium falciparum</i> utilize a broad range of serum-derived fatty acids with limited modification for their growth	Parasitology	133	399-410	2006
Shinryo N and <u>Kita K</u> .	Up-regulation of Heme Biosynthesis during Neuronal Differentiation of neuro2a cell	J. Biochem.	139	373-81	2006
Nishida S, Kurokawa K, <u>Kita K</u> , et al.	Identification and characterization of amino acid residues essential for the active site of UDP-N-acetylenolpyruvylglucosamine reductase (MurB) from <i>Staphylococcus aureus</i>	J. Biol. Chem.	281	1714-24	2006
Okada M, Hustond C D, <u>Kita K</u> , et al.	Kinetics and strain variation of phagosome proteins of <i>Entamoeba histolytica</i> by proteomic analysis	Mol. Biochem. Parasitol.	145	171-83	2006
Sariego I, Annoura T, <u>Kita K</u> , et al.	Genetic diversity and kinetic properties of <i>Trypanosoma cruzi</i> dihydroorotate dehydrogenase	Parasitol. Int.	55	11-6	2006