

20062/0/9 B

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～平成18年度 総合研究報告書

主任研究者 江角 浩安

平成19（2007）年 3月

目 次

I. 総合研究報告書		
新戦略に基づく抗がん剤の開発に関する研究	-----	1
江角 浩安		
國元 節子		
百瀬 功		
北 潔		
田中 雅嗣		
上野 隆		
門田 守人		
松村 保広		
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	17

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）

総合研究報告書

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

乏血性の癌細胞がどのようなメカニズムを使い生存しているのか解析し、AKT, AMPK, ARK5の他に、LKB1, NDR2, ATMの関与を明らかにした。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。大腸がん組織で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、がん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。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。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、臨床がんでは盛んにオートファジーが起り診断マーカーに出来ることを見出した。

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

國元 節子 財団法人微生物化学研究会

百瀬 功 微生物化学研究センター・沼津創薬医科学研究所 副所長/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

分子標的治療薬など、新しく画期的ながん治療薬は開発され、臨床でも目覚ましい効果を上げつつあるものもある。しかし、これらの中で効果のあるがんはきわめて少数であり、依然として新しい標的の探索から、治療薬の発見および開発が望まれている。本研究は、単に単一の分子に注目するのではなく、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標

的とした治療薬を生み出そうとする独創的なものである。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. 方法及び結果

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。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。

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。固形がんに見られる栄養飢餓状態は、正常組織には見られない特有の性質であることから、栄養状態のよ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は、がん組織特異的治療薬になると考えられる。そこで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、放線菌の培養液より antimycins、oligomycin、glucopiericidin A、nonactin を、カビの培養液より atpenins、ophiobolins、viomellein、beauvericin、leucinostatin を見出した。

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。

4. Kigamicin の作用

培養マウス肝細胞や膵がん細胞を使った成績では、Kigamicin は rapamycin と似た効果を示し、リボソーム S6 サブユニット、S6 kinase の脱リン酸化や不活性化を引き起こし、オートファジー（タンパク分解）に対する効果も、影響ないかやや促進的に働いた。しかし、PANC-1 細胞では培地（DMEM/10%FCS）のグルコースを除いた条件下でのみタンパク分解は顕著に阻害された。すなわち、Kigamicin は、グルコースが欠乏したときにタン

パク分解を抑える働きがあると考えられる。

5. Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) レセプターチロシンキナーゼ阻害剤による栄養飢餓選択的細胞毒性

がん細胞における栄養飢餓耐性メカニズムを明らかにするために、各種の阻害剤および制がん剤を用いてヒト膵臓がん PANC-1 細胞における栄養飢餓選択的細胞毒性を測定した。その結果、IFG-I レセプターチロシンキナーゼ阻害剤である AG1024 が、通常の栄養培地に比べ栄養飢餓培地において非常に強い細胞毒性を示した。AG1024 は IGF-1 による IGF-1 レセプターのリン酸化および IGF-1 シグナル伝達の下流の Akt、Erk 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 Capan-1、MIA Paca-2、BxPC-3、PSN1 細胞（いずれもヒト膵臓がん細胞）においても認められ、別の IFG-I レセプターチロシンキナーゼ阻害剤である I-OMe-AG538 においても栄養飢餓選択的な細胞毒性を認めた。

6. 50mM ピルビニウムによるヒトミトコンドリア複合体 II 活性に対する効果

ヒト colon cancer cell line, DLD-1

をグルコース欠乏培地で培養後、ミトコンドリアを単離し、好氣的複合体 II 活性 (SQR, SDH) に対するピルビニウムの効果を調べた。通常の条件下の培養で検出された複合体 II の活性上昇作用はグルコース欠乏細胞ミトコンドリアでは見られなくなった。これにより、グルコース欠乏時にはピルビニウムの複合体 I に対する阻害効果から細胞をレスキューする複合体 II の活性上昇効果が無くなることから、細胞障害があらわれるものと考えられる。

グルコース欠乏細胞ミトコンドリアではさらにピルビニウムによる NADH-fumarate reductase 阻害効果が高くなった。複合体 I に対する阻害効果は変わらないことから、この阻害効果の上昇は嫌氣的複合体 II 活性に対する阻害効果の上昇と考えられる。つまり、グルコース欠乏により、ピルビニウムは好氣的複合体 II 活性上昇作用の消失、および嫌氣的複合体 II に対する阻害効果の上昇により細胞障害性をもたらすものと考えられる。

7. ミトコンドリアゲノム変異を有するがん細胞における遺伝子発現解析

ミトコンドリア DNA (mtDNA) 変異が細胞内の物質代謝に与える影響を解明し、mtDNA 変異を有するがん細胞の代謝に即した抗がん剤の治療効果判定のための指標となる分子を同定す

るために、網羅的遺伝子発現解析を行った。【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・ウェ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。【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。

8. がんに関連するミトコンドリアゲノム多型に関する遺伝疫学的研究

ミトコンドリアゲノム多型が多様な成人発症性疾患に関連していることを明らかにした。岐阜県立 3 病院において生活習慣病患者群および対照群の 2908 人を対象として大規模関連解析を行い、メタボリック症候群・糖尿病・心筋梗塞・脳梗塞に関連するミトコンドリアゲノム多型を解析した。その結果次のような研究成果が得られた。

ミトコンドリアハプログループ N9a を有する日本人特に女性において 2 型糖尿病のリスクが低いことを明らかにし (オッズ比 = 0.27, 95%CI 0.10-0.27, P = 0.0042)、韓国ソウル大学内科学講座の Hong Kyu Lee 教授との共同研究によって、アジア人においてハプログループ N9a が 2 型糖尿病に対する防御因子であることを明確にした (Fuku et al. Am J Hum Genet, in press)。ハプログループ N9a を有する日本人特に女性においてメタボリック症候群の頻度が低いことを明らかにし (オッズ比 = 0.21, 95%CI 0.07-0.58, P =

0.0042)、このハプログループがメタボリックシンドロームに対する防御因子となっていることを示した。3. ハプログループ N9b を有する個体、特に男性において心筋梗塞のリスクが低いことを明らかにした。4. ハプログループ A を有する女性においてアテローム血栓性脳梗塞のリスクが高いことを明らかにした。5. 東京都老人医療センターの連続剖検例 (約 1500 例) において、がんの有無とミトコンドリアゲノム多型の関連を解析し、がんの発生リスクを上昇させる 2 種のハプログループを見いだした。

9. 臨床がんの微小環境の解析

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。この成果は Clin Cancer Res に受理された。

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 TOP 10 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。

DDS を利用しきわめて有効であることを確認し、臨床導入した

LLC 腫瘍移植 C57B マウスにタキソール内包ミセル体 NK105 とタキソールを 45mg/kg 静注後 24 時間目に放射線を 12Gy 照射した結果、NK105 と放射線併用群がタキソールと放射線併用群より有意に高い抗腫瘍効果を認めた。抗がん剤投与後の腫瘍を切除し、FACS で分画を調べた結果、NK105 投与群において G2/M 分画が高い傾向にあったことが、放射線併用での抗腫瘍効果を高めた一因と考える。

マウス移植小細胞肺癌において、1/3 MTD 量の SN-38 内包ミセルは MTD 量の CPT-11 より著しい高い抗腫瘍効果をしめすことを明らかにした。また大腸癌細胞 HT-29 腫瘍に対する 5-FU との併用実験において、MTD 量の

CPT-11 と 5-FU との併用でコントロールに比較し、有意な抗腫瘍効果を認めましたが、腫瘍を消滅させるパワーはなかったのに対し、1/3 MTD 量の SN-38 内包ミセルと 5-FU との併用は同腫瘍を完全に消滅させることを明らかにした。

C. 考察

3年間の研究で、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。

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が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、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繁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。

D. 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。

E. 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. Minchenko OH, Ogura T, Esumi H, et al., Splice isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4: expression and hypoxic regulation, *Mol Cell Biochem*, 280; 227-34, 2005
10. Suzuki A, Iida S, Esumi H, et al., ARK5 is transcriptionally regulated by the Large-MAF family and mediates IGF-1-induced cell invasion in multiple myeloma: ARK5 as a new molecular determinant of malignant multiple

- myeloma, *Oncogene*, 24; 6936-44, 2005
11. Suzuki A, Kusakai G, Esumi H, et al., Involvement of transforming growth factor-beta 1 signaling in hypoxia-induced tolerance to glucose starvation, *J Biol Chem*, 280; 31557-63, 2005
 12. Lu J, Imamura K, Esumi H, et al., Chemopreventive effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on gastric carcinogenesis in mice. *Cancer Res*, 65; 4769-74, 2005
 13. Minchenko OH, Ochiai A, Esumi H, et al., Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors. *Biochimie*, 87; 1005-10, 2005
 14. Suzuki A, Kusakai G, Esumi H, et al., IGF-1 phosphorylates AMPK-alpha subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner, *Biochem Biophys Res Commun*, 324; 986-92, 2004
 15. Minchenko O, Opentanova I, Esumi H, et al., Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation. *FEBS Lett*, 576; 14-20, 2004
 16. Muto M, Nakane M, Esumi H, et al., Squamous cell carcinoma in situ at oropharyngeal and hypopharyngeal mucosal sites. *Cancer*, 101; 1375-81, 2004
 17. Kusakai G, Suzuki A, Esumi H, et al., ARK5 expression in colorectal cancer and its implications for tumor progression. *Am J Pathol*, 164; 987-95, 2004
 18. Kusakai G, Suzuki A, Ogura T, Kaminishi M, Esumi H, Strong association of ARK5 with tumor invasion and metastasis, *J Exp Clin Cancer Res*, 23; 263-8, 2004
 19. Esumi H, Lu J, Kurashima Y, et al., 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; 685-90, 2004
 20. Suzuki A, Lu J, Esumi H, et al., ARK5 is a tumor invasion-associated factor downstream of Akt signaling. *Mol Cell Biol*, 24; 3526-35, 2004
 21. Suzuki A, Kusakai G, Esumi H, et al., Regulation of caspase-6 and FLIP by

- the AMPK family member ARK5. *Oncogene*, 23; 7067-75, 2004
22. Lu J, Kunimoto S, Esumi H, et al., 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
 23. 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
 24. 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
 25. Masuda T, Kunimoto S, et al. Augmentation of cellular immunity by kigamicin D, *J. Antibiotics*, 59(4); 215-9, 2006
 26. Masuda T, Kunimoto S, et al. Antitumor effect of kigamicin D on mouse tumor models, *J. Antibiotics*, 59(4); 209-14, 2006
 27. Momose I, et al., Structure-based design of derivatives of tyropeptin A as the potent and selective inhibitors of mammalian 20S proteasome. *Bioorg Med Chem Lett*, 15; 1867-71, 2005
 28. Momose I, et al., Synthesis and activity of tyropeptin A derivatives as potent and selective inhibitors of mammalian 20S proteasome. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69(9); 1733-44, 2005
 29. Someno T, Kunimoto S, et al., Absolute configuration of kigamicins A, C, and D. *J. Antibiotics*, 58(1); 56-60, 2005
 30. Lu J, Kunimoto S, et al., Kigamicin D, a novel anticancer agent based on a new anti-austerity strategy targeting cancer cells' tolerance to nutrient starvation. *Cancer Sci*, 95(6); 547-52, 2004
 31. Kita K, Shiomi K, and Ōmura S., Parasitology in Japan: Advances in drug discovery and biochemical studies, *Trends in Parasitol*, in press
 32. 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
 33. 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

34. 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
35. 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
36. 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
37. 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
38. 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
39. Ui H, Shiomi K, Kita K, et al., Verticipyrene, a new NADH-fumarate reductase inhibitor, produced by *Verticillium* sp. FKI-1083, J. Antibiot., 59; 785-90, 2006
40. 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
41. Shinjyo N and Kita K., Up-regulation of Heme Biosynthesis during Neuronal Differentiation of neuro2a cell, J. Biochem., 139; 373-81, 2006
42. 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
43. 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
44. Sariego I, Annoura T, Kita K, et al., Genetic diversity and kinetic properties of *Trypanosoma cruzi*

- dihydroorotate dehydrogenase, *Parasitol. Int.*, 55; 11-6, 2006
45. 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
 46. Verma M, Naviaux R, Tanaka M, et al., Mitochondrial DNA and cancer epidemiology, *Cancer Res*, 67; 437-9, 2007
 47. Tanaka M, Fuku N, Nishigaki Y, et al., Women with mitochondrial haplogroup N9a are protected against metabolic syndrome, *Diabetes*, 56; 518-21, 2007
 48. 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
 49. 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
 50. 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
 51. 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
 52. 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
 53. 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
 54. Umetsu K, Tanaka M, Yuasa I, et al., Multiplex amplified product-length polymorphism analysis of 36 mitochondrial single-nucleotide polymorphisms for haplogrouping of East Asian populations. *Electrophoresis*, 26; 91-8, 2005
 55. Niemi A K, Moilanen J S, Tanaka M, et al., A combination of three common inherited mitochondrial DNA polymorphisms promotes longevity in Finnish and Japanese subjects. *Eur J Hum Genet*, 13; 166-70, 2005

56. Naoi M, Maruyama W, Tanaka M, et al., Oxidative stress in mitochondria: decision to survival and death of neurons in neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*, 31; 81-93, 2005
57. Munakata K, Bundo M, Tanaka M, et al., Co-existing point mutations of mitochondrial DNA in a patient with a heart abnormality and Pearson syndrome-like symptoms. *Am J Med Genet A*, 139; 162-4, 2005
58. Kazuno A A, Munakata K, Mori K, Tanaka M, et al., Mitochondrial DNA sequence analysis of patients with 'atypical psychosis'. *Psychiatry Clin Neurosci*, 59; 497-503, 2005
59. Guo L J, Oshida Y, Fuku N, Tanaka M, et al., Mitochondrial genome polymorphisms associated with type-2 diabetes or obesity. *Mitochondrion*, 5; 15-33, 2005
60. Tanaka M, Takeyasu T, Fuku N, et al., Mitochondrial genome single nucleotide polymorphisms and their phenotypes in the Japanese. *Ann N Y Acad Sci*, 1011; 7-20, 2004
61. Tanaka M, Cabrera V M, Gonzalez A M, et al., Mitochondrial genome variation in eastern Asia and the peopling of Japan. *Genome Res*, 14; 1832-50, 2004
62. Takagi K, Yamada Y, Tanaka M, et al., 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
63. Munakata K, Tanaka M, Mori K, et al., Mitochondrial DNA 3644T → C mutation associated with bipolar disorder. *Genomics*, 84; 1041-50, 2004
64. 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
65. 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
66. 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
67. Komatsu M, Ueno T, et al., Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice, *Nature*, 441; 880-4, 2006
 68. 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
 69. 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
 70. Iwata J, Ueno T, et al., Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals., *Journal of Biological Chemistry*, 281; 4035-41, 2006
 71. Kouno T, Ueno T, et al., Solution structure of micro-tubule-associated protein light chain 3 and identification of its functional subdomains. *Journal of Biological Chemistry*, 280; 24610-7, 2005
 72. Komatsu M, Ueno T, et al., Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice, *Journal of Cell Biology*, 169; 425-34, 2005
 73. Tanida I, Ueno T, et al., Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 279; 47704-10, 2004
 74. Jager S, Ueno T, et al., Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *J. Cell Sci.*, 117; 4837-48, 2004
 75. Tanida I, Ueno T, et al., HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain3- and GABAA receptor associated protein-phospholipid conjugates. *J. Biol. Chem.*, 279; 36268-76, 2004
 76. Komatsu A, Ueno T, et al., A novel protein conjugating system for Ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO J.*, 23; 1977-86, 2004
 77. Tsujino T, Monden M, et al., Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer, *Clin. Cancer Res.*, 5; in press

78. 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
79. 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
80. 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
81. 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
82. 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
- 日本語論文
1. 福典之、西垣裕、田中雅嗣、ヒトミトコンドリアゲノム多型データベース (mtSNP), *蛋白質核酸酵素*, 50; 1753-8, 2005
- F. 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. 特許出願
- 1) ARK 5
発明者：江角 浩安
：鈴木 敦
出願日：平成 15 年 8 月 19 日
国際出願番号：PCT/JP03/10435
- 2) 癌検出方法
発明者：安藤 正海
：河合 敏昭

: 山崎 克人

: 江角 浩安

出願番号：特願 2005-205748

- 3) ネブライザ・デニューダ連結
による連続濃縮気体採取装置
及び当該気体採取装置を組み
込んだ気体分析装置並びに分
析方法

発明者：黒澤 きよ子

: 蓼沼 克嘉

: 神田 征夫

: 武藤 学

: 江角 浩安

出願番号：特願 2003-18304

3. 実用新案登録

なし

4. その他 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

別紙 4

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Ueno T, et al.	Autophagy and neuro-muscular diseases	D. J. Klionsky	Autophagy	Landes Bio-Science	Georgetown Texas, U.S.A.	2004	264-86

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
Minchenko OH, Ogura T, <u>Esumi H</u> , et al.	Splice isoform of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4: expression and hypoxic regulation.	Mol Cell Biochem	280	227-34	2005
Suzuki A, Iida S, <u>Esumi H</u> , et al.	ARK5 is transcriptionally regulated by the Large-MAF family and mediates IGF-1-induced cell invasion in multiple myeloma: ARK5 as a new molecular determinant of malignant multiple myeloma.	Oncogene	24	6936-44	2005
Suzuki A, Kusakai G, <u>Esumi H</u> , et al.	Involvement of transforming growth factor-beta 1 signaling in hypoxia-induced tolerance to glucose starvation.	J Biol Chem	280	31557-63	2005

研究成果の刊行に関する一覧表

Lu J, Imamura K, <u>Esumi H</u> , et al.	Chemopreventive effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma on gastric carcinogenesis in mice.	Cancer Res	65	4769-74	2005
Minchenko OH, Ochiai A, <u>Esumi H</u> , et al.	Overexpression of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 in the human breast and colon malignant tumors.	Biochimie	87	1005-10	2005
Suzuki A, Kusakai G, <u>Esumi H</u> , et al.	IGF-1 phosphorylates AMPK-alpha subunit in ATM-dependent and LKB1-independent manner.	Biochem Biophys Res Commun	324	986-92	2004
Minchenko O, Opentanova I, <u>Esumi H</u> , et al.	Hypoxia induces transcription of 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase-4 gene via hypoxia-inducible factor-1alpha activation.	FEBS Lett	576	14-20	2004
Muto M, Nakane M, <u>Esumi H</u> , et al.	Squamous cell carcinoma in situ at oropharyngeal and hypopharyngeal mucosal sites.	Cancer	101	1375-81	2004
Kusakai G, Suzuki A, <u>Esumi H</u> , et al.	ARK5 expression in colorectal cancer and its implications for tumor progression.	Am J Pathol	164	987-95	2004
Kusakai G, Suzuki A, Ogura T, Kaminishi M, <u>Esumi H</u> .	Strong association of ARK5 with tumor invasion and metastasis.	J Exp Clin Cancer Res	23	263-8	2004
<u>Esumi H</u> , Lu J, Kurashima Y, et al.	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	685-90	2004
Suzuki A, Lu J, <u>Esumi H</u> , et al.	ARK5 is a tumor invasion-associated factor downstream of Akt signaling.	Mol Cell Biol	24	3526-35	2004
Suzuki A, Kusakai G, <u>Esumi H</u> , et al.	Regulation of caspase-6 and FLIP by the AMPK family member ARK5.	Oncogene	23	7067-75	2004
Lu J, Kunimoto S, <u>Esumi H</u> , et al.	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
<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