

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07160

研究課題名(和文) エネルギー調節と未分化性制御の協調的相互関係の分子基盤

研究課題名(英文) Molecular mechanisms regulating energy metabolism and stemness property

研究代表者

小林 昌彦 (Kobayashi, Masahiko)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：70285633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がんの悪性進展において、がん特有の代謝調節の存在やその重要性が示されてきた。しかし、代謝調節がいかにがんの未分化性・悪性形質と連関しているのが、その詳細は不明である。本研究において、申請者は、細胞内カルシウムのホメオスタシスとミトコンドリアの機能を傷害し、エネルギー生産を抑制する化合物は膠芽腫細胞に対し細胞毒性を示し、その効果はオートファジーの阻害によって増強されることを明らかにした。これらの結果から、オートファジー代謝調節の阻害とカルシウムホメオスタシスの攪乱化合物の組み合わせは、膠芽腫の抑制に効果的であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は、治療抵抗性の予後不良悪性疾患であり、未だ治癒に至る有効な治療法は開発されていない。本研究では、がん特有の代謝調節を標的とした膠芽腫に対する新たな治療法の探索を行い、カルシウムホメオスタシスを攪乱する化合物とオートファジー阻害の組み合わせが膠芽腫の抑制に効果的であることを示した。これまで、がんの抑制におけるオートファジーの効果は相反する報告があり曖昧であったが、本研究の結果はオートファジー抑制によって感受性が増加する標的経路を特定するものである。また、本研究の結果は、膠芽腫の新たな治療法を提案するものである。

研究成果の概要(英文)：Metabolism change plays a critical role in tumor progression and malignancy, but how regulation of metabolism contributes to cancer cells' responses to chemotherapeutics remains to be fully elucidated. In this study, we showed that compounds, which mobilize intracellular calcium, impair mitochondrial functions and reduce cellular ATP levels, were enhanced the glioma-suppressive efficacy by autophagy inhibition. Furthermore, using a patient-derived xenograft model, we demonstrated that chloroquine, a pharmacological autophagy inhibitor, dramatically enhanced the glioma-suppressive efficacy of compounds selected in this study. These results suggested that inhibition of autophagic metabolic regulation makes glioma cells susceptible to disturbance of calcium homeostasis. Our findings propose a novel therapeutic strategy in which calcium-mobilizing compounds are combined with autophagy inhibitors to treat glioma patients.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：glioma

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんの悪性化には、がん特有の代謝調節が重要であることが示されてきた。例えば、古くより、がんの悪性化を支える代謝制御の代表としてワールブルク効果が知られている。ワールブルク効果とは、酸素の有無に関わらず、主に解糖系によって ATP が産生されるという状態を指し、このようなエネルギー産生様式ががんの悪性化には有利に働くと考えられてきた。これに反して、ここ数年、転移や治療抵抗性など、がんの悪性形質や未分化性獲得・維持において、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化の重要性を示す知見も次々と報告されている。しかし、エネルギー代謝調節がいかにがんの未分化性・悪性形質と関連しているのか、詳細は不明であり、その分子機構を明らかにすることは、がんの本態を理解する上で極めて重要な課題である。申請者は、これまで遺伝子改変マウスをベースとした膠芽腫モデルを用い、栄養・エネルギー制御の中心的役割を果たす mTOR 複合体 1 の未分化性制御機構について研究を進めてきた。mTOR 複合体 1 は、アミノ酸、成長因子、糖をはじめとした様々な栄養素に反応して活性化するリン酸化キナーゼ複合体である。また、多くの腫瘍で変異が認められる PI3K-AKT 経路の下流にあり、膠芽腫を含めた多くの腫瘍において活性化が認められる。申請者らは、mTOR 複合体 1 の負の制御因子である TSC1 の欠失を誘導する膠芽腫モデルを用いて検討した結果、mTOR 複合体 1 の活性化は、未分化性亢進、血管新生亢進、顕著な細胞増殖亢進の原因となることを報告した (J. Biochem. 155:227, 2014)。さらに、膠芽腫悪性化機構の解析を進めた結果、mTOR 複合体 1 の活性化は、酸化的リン酸化 (OXPHOS) を活性化し、ATP 産生の増加によって、脳腫瘍スフィア形成や腫瘍形成能を促進させ、膠芽腫幹細胞の増強を促すことを見出した (J. Biol. Chem., 291:21496, 2016)。同時に、本モデルを用いた化合物スクリーニングを行った結果、酸化的リン酸化の抑制と ATP レベルの低下を誘導する化合物群は、AMPK およびオートファジーの活性化を伴う膠芽腫幹細胞の未分化性の喪失 (スフィア形成能低下、未分化マーカー OLIG2 発現低下) を誘導することによって、著しい治療効果を示すことを見出した (J. Biol. Chem., 291:21496, 2016)。以上の知見は、ミトコンドリアのエネルギー代謝制御ががん幹細胞の動態制御にとって極めて重要な役割を果たすことを示す成果であった。

### 2. 研究の目的

悪性神経膠腫 (グリオーマ) はグリア細胞由来の脳腫瘍であり、病理組織像により WHO I-IV に分類され、その中で最も未分化であり悪性度が高いのが、グレード IV の膠芽腫である。膠芽腫は正常脳内への浸潤性の高さから外科的な完全除去は困難であり、放射線療法や化学療法にも耐性化する。そのため、これらの悪性要因に打ち勝つ革新的治療法の開発が望まれている。これまで、がんの悪性進展において、がん特有の代謝調節の存在やその重要性が示されてきた。しかし、エネルギー代謝調節がいかにがんの未分化性・悪性形質と関連しているのか、その詳細は不明である。申請者は、膠芽腫モデルと化合物スクリーニングを組み合わせ、mTOR 複合体 1 の活性化が、酸化的リン酸化を介した ATP 産生亢進作用によって未分化性を維持していることを見出した。また、膠芽腫細胞の未分化性を効果的に抑制する化合物のスクリーニングを行い、イオンの膜透過性を高める複数のイオノフォア化合物 (候補化合物) を同定し、それらがミトコンドリアの機能傷害による ATP 産生の低下と未分化性の抑制を引き起こすことを明らかにした (J. Biol. Chem., 291:21496, 2016)。本研究では、これらの知見や解析ツールを活用し、エネルギー代謝による未分化性維持機構の解明を通じ、「エネルギー調節と未分化性制御の協調的相互関係の分子基盤」を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

mTOR 複合体 1 によるエネルギー代謝を介した未分化性維持・促進制御機構の解明

mTOR 複合体 1 の活性化によって未分化な膠芽腫幹細胞が増強されるため、これまで、mTOR 複合体 1 活性化型膠芽腫細胞を抑制する化合物スクリーニングを行い、複数の候補化合物を得た。これらの候補化合物は mTOR 複合体 1 が誘導する細胞内 ATP 量の増加を顕著に低下させたため、代謝の変動を介して膠芽腫の抑制に作用している可能性が考えられる。また、ATP 量の低下は AMPK の活性化、mTOR 複合体 1 の抑制を介してオートファジーを活性化する。そこで、膠芽腫の未分化性維持・促進制御メカニズムを、エネルギー代謝の面から解明するため、これらの化合物について、膠芽腫における未分化性抑制作用をスフィア形成能や未分化マーカーの発現を基に解析する。さらに、免疫不全マウスへの移植による腫瘍形成能に対する影響を解析し、膠芽腫の未分化形質の制御に寄与する代謝経路を特定する。また、膠芽腫モデルを用いた遺伝子発現解析とメタボローム解析により、関連する代謝経路を探索し、候補標的経路の阻害剤やノックアウト法を用いて、未分化性、及び、免疫不全マウスへの移植による腫瘍形成能に対する影響を解析し、新たな未分化性制御経路を明らかにする。

患者由来膠芽腫細胞を用いた治療標的有用性の検証

標的候補分子について、臨床的な膠芽腫の治療標的としての有用性を複数の患者由来膠芽腫細胞を用いて検討する。ヒト患者サンプルの場合、形質が症例間で大きく異なり、その多様性が特徴として知られている。そのため、多数の症例から樹立された膠芽腫細胞を用い、候補分子に対する阻害剤処理、または、ノックアウトによる生存率、未分化マーカーへの影響を解析する。また、膠芽腫細胞を免疫不全マウスへ移植し、候補分子の阻害による腫瘍抑制効果を解析することにより、候補分子の治療標的としての有用性を評価する。

### 4. 研究成果

申請者はこれまで、エネルギー代謝調節とがんの未分化性・悪性形質との関連性を明らかにす

るため、悪性脳腫瘍（膠芽腫）モデルと化合物スクリーニングを組み合わせ、mTOR 複合体 1 の活性化が、酸化的リン酸化を介した ATP 産生亢進作用によって未分化性を維持していることを明らかにした (J. Biol. Chem. 2016, 291(41):21496-21509)。この過程において得られた、mTOR 複合体 1 の活性が高い膠芽腫細胞のスフィア形成能をより効果的に抑制する化合物（候補化合物）は、mTOR 複合体 1 の下流機能であるオートファジーを誘導した。オートファジーは細胞の飢餓状態時に、自食作用によってエネルギーやアミノ酸の供給に働くとされている。がんにおけるオートファジーの機能はがんの種類や状況によって異なり、がんの促進や治療薬に対する抵抗性に働く場合、逆に、発がん抑制や治療薬に対する感受性に働く場合の両方が報告されている。そのため、オートファジー経路をがん治療に利用するためには、がん細胞の薬剤応答におけるオートファジーの役割とその機構を明らかにする必要がある。そこで申請者は、エネルギーや様々な細胞内代謝産物の調節に関与するオートファジーの膠芽腫における役割を明らかにするために、ゲノム編集技術を用いて、患者由来膠芽腫細胞のオートファジー関連因子 ATG5 ノックアウト細胞を作製した。ATG5 欠損細胞は LC3-II の形成が起こらず、標準的なオートファジー機能の欠損が確認できた。しかし、オートファジー欠損膠芽腫細胞のスフィア形成能、増殖能、マウスにおける腫瘍形成能はコントロール細胞と差が見られなかった（図 1）。また、膠芽腫の治療薬 テモゾロミドに対しても、オートファジー欠損膠芽腫細胞はスフィア形成能、腫瘍増殖能において、コントロール細胞と比較して感受性に差がなく（図 2）他の DNA 損傷剤や mTOR 複合体 1 経路阻害剤に対しても、オートファジー欠損による影響は見られなかった。そこで、阻害剤ライブラリーを用いて、オートファジー欠損細胞に対して効果的な化合物のスクリーニングを行った。その結果、オートファジー欠損細胞がより高い感受性を示すものとして得られた化合物は、上述の mTOR 複合体 1 の活性が高い膠芽腫細胞のスフィア形成能をより効果的に抑制する候補化合物と重複するものであった。候補化合物の作用の解析の結果、候補化合物は細胞内カルシウム濃度を増加させ、カルシウムシグナルの異常を引き起こし、ミトコンドリアの活性酸素やアポトーシスを増加させること、さらに、その効果がオートファジー阻害によって増強されることを明らかにした。また逆に、カルシウムシグナルの阻害剤や抗酸化剤処理によって候補化合物に対する感受性が抑制された。これらのことから、候補化合物は、オートファジー欠損膠芽腫細胞において、カルシウムシグナルの異常な活性化とそれに伴う酸化ストレスを引き起こし、細胞死を誘導していることを明らかにした。また、マウスへの移植実験により、オートファジー阻害とカルシウムシグナルの異常を引き起こす候補化合物の組み合わせが、単剤の処置と比較し、より腫瘍抑制効果があることを示した (Cancer Sci. 2018, 109(8):2497-2508) (図 3)。これらの効果は、複数の患者由来膠芽腫細胞においても確認できたため、腫瘍細胞抑制における候補化合物とオートファジー阻害との相乗効果は、膠芽腫において共通してみられるものと考えられる。しかし、候補化合物はその性質から膠芽腫の治療薬としては適さないものであった。そのため、さらなるスクリーニングの精査を行い、カルシウムシグナルの異常を引き起こす候補化合物と同様の効果があり、血液脳関門を通過できる化合物を同定することができた。今後、この化合物の詳細な効果と作用機構の解析を行う予定である。また、オートファジーは細胞の飢餓状態時に、自食作用によって、エネルギーやアミノ酸の供給に働くとされている。そのため、カル

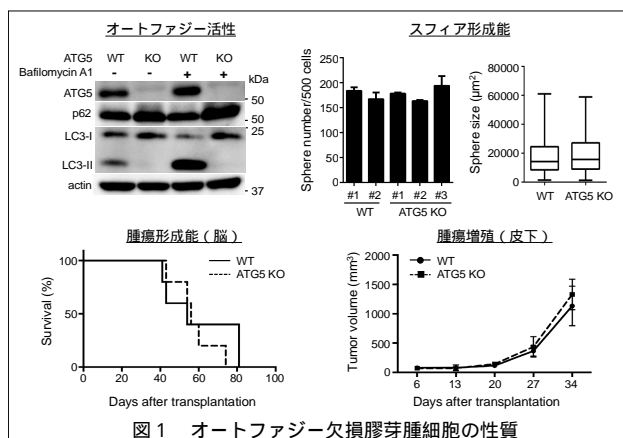


図 1 オートファジー欠損膠芽腫細胞の性質

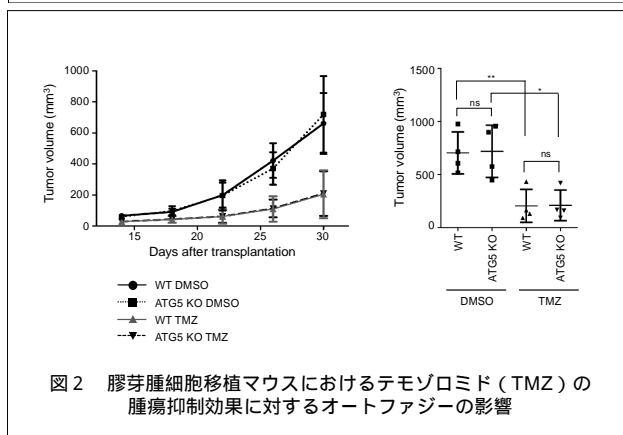


図 2 膠芽腫細胞移植マウスにおけるテモゾロミド (TMZ) の腫瘍抑制効果に対するオートファジーの影響

理によって候補化合物に対する感受性が抑制された。これらのことから、候補化合物は、オートファジー欠損膠芽腫細胞において、カルシウムシグナルの異常な活性化とそれに伴う酸化ストレスを引き起こし、細胞死を誘導していることを明らかにした。また、マウスへの移植実験により、オートファジー阻害とカルシウムシグナルの異常を引き起こす候補化合物の組み合わせが、単剤の処置と比較し、より腫瘍抑制効果があることを示した (Cancer Sci. 2018, 109(8):2497-2508) (図 3)。これらの効果は、複数の患者由来膠芽腫細胞においても確認できたため、腫瘍細胞抑制における候補化合物とオートファジー阻害との相乗効果は、膠芽腫において共通してみられるものと考えられる。しかし、候補化合物はその性質から膠芽腫の治療薬としては適さないものであった。そのため、さらなるスクリーニングの精査を行い、カルシウムシグナルの異常を引き起こす候補化合物と同様の効果があり、血液脳関門を通過できる化合物を同定することができた。今後、この化合物の詳細な効果と作用機構の解析を行う予定である。また、オートファジーは細胞の飢餓状態時に、自食作用によって、エネルギーやアミノ酸の供給に働くとされている。そのため、カル

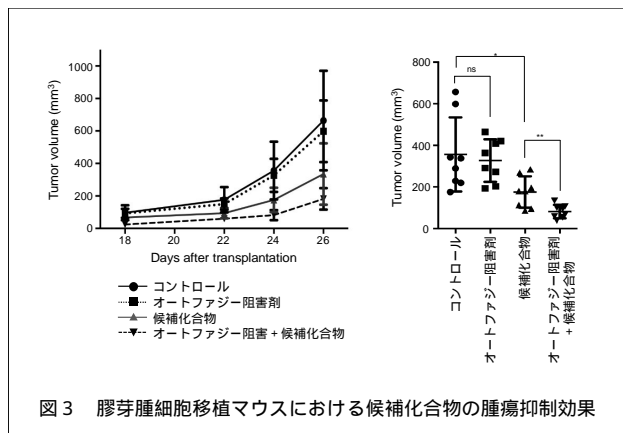


図 3 膠芽腫細胞移植マウスにおける候補化合物の腫瘍抑制効果

シウムシグナルの異常な活性化とそれに伴う酸化ストレスを引き起こし、細胞死を誘導していることを明らかにした。また、マウスへの移植実験により、オートファジー阻害とカルシウムシグナルの異常を引き起こす候補化合物の組み合わせが、単剤の処置と比較し、より腫瘍抑制効果があることを示した (Cancer Sci. 2018, 109(8):2497-2508) (図 3)。これらの効果は、複数の患者由来膠芽腫細胞においても確認できたため、腫瘍細胞抑制における候補化合物とオートファジー阻害との相乗効果は、膠芽腫において共通してみられるものと考えられる。しかし、候補化合物はその性質から膠芽腫の治療薬としては適さないものであった。そのため、さらなるスクリーニングの精査を行い、カルシウムシグナルの異常を引き起こす候補化合物と同様の効果があり、血液脳関門を通過できる化合物を同定することができた。今後、この化合物の詳細な効果と作用機構の解析を行う予定である。また、オートファジーは細胞の飢餓状態時に、自食作用によって、エネルギーやアミノ酸の供給に働くとされている。そのため、カル

シウムシグナルの異常を誘導する候補化合物に対する感受性における、代謝の影響を調べるために、オートファジー経路阻害時の代謝異常をメタボローム解析により探索した。その結果、オートファジー阻害と候補化合物の処理によって、アミノ酸や塩基の代謝異常が起こっていることが認められた。そこで、候補化合物に対する感受性における、これらの経路の阻害の影響を調べたところ、一部の代謝経路の阻害が膠芽腫細胞の候補化合物への感受性を増加させることを見出した。今後これらの効果の詳細なメカニズム解析を行っていく予定である。以上より、本研究は、膠芽腫において、オートファジーと薬剤応答を結びつける機構を明らかにし、オートファジー抑制によって感受性が増加する標的経路を特定するものである。また、膠芽腫の治療における、新しい治療法を提案するものである。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Vu HT, Kobayashi M, Hegazy AM, Tadokoro Y, Ueno M, Kasahara A, Takase Y, Nomura N, Peng H, Ito C, Ino Y, Todo T, Nakada M, Hirao A	4. 巻 109
2. 論文標題 Autophagy inhibition synergizes with calcium mobilization to achieve efficient therapy of malignant gliomas.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2497-2508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13695	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tadokoro Y, Hoshii T, Yamazaki S, Eto K, Ema H, Kobayashi M, Ueno M, Ohta K, Arai Y, Hara E, Harada K, Oshima M, Oshima H, Arai F, Yoshimura A, Nakauchi H, Hirao A	4. 巻 22
2. 論文標題 Spred1 Safeguards Hematopoietic Homeostasis against Diet-Induced Systemic Stress.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 713-725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2018.04.002.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kitabayashi T, Dong Y, Furuta T, Sabit H, Jiapaer S, Zhang J, Zhang G, Hayashi Y, Kobayashi M, Domoto T, Minamoto T, Hirao A, Nakada M	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of GSK3 inhibitor kenpauillone as a temozolomide enhancer against glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10049-10060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46454-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Peng H, Kasada A, Ueno M, Hoshii T, Tadokoro Y, Nomura N, Ito C, Takase Y, Vu HT, Kobayashi M, Xiao B, Worley PF, Hirao A	4. 巻 495
2. 論文標題 Distinct roles of Rheb and Raptor in activating mTOR complex 1 for the self-renewal of hematopoietic stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 1129-1135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2017.11.140.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Li R, Gunarta IK, Suzuki R, Boldbaatar J, Nakazato R, Yuliana D, Davaakhuu G, Oyunsuren T, Takamatsu N, Kobayashi M, Hirao A, Yoshioka K	4. 巻 501
2. 論文標題 JLP-JNK signaling protects cancer cells from reactive oxygen species-induced cell death.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 724-730
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.05.055.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ali MAE, Fuse K, Tadokoro Y, Hoshii T, Ueno M, Kobayashi M, Nomura N1 Vu HT, Peng H, Hegazy AM, Masuko M, Sone H, Arai F, Tajima A, Hirao A	4. 巻 7
2. 論文標題 Functional dissection of hematopoietic stem cell populations with a stemness-monitoring system based on NS-GFP transgene expression.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11442-11453
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-11909-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Dong Y, Furuta T, Sabit H, Kitabayashi T, Jiapaer S, Kobayashi M, Ino Y, Todo T, Teng L, Hirao A, Zhao SG, Nakada M	4. 巻 8
2. 論文標題 Identification of antipsychotic drug fluspirilene as a potential anti-glioma stem cell drug	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 111728-111741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.22904.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Kobayashi M, Vu HT, Hegazy AM, Jing Y, Chen X, Tadokoro Y, Ueno M, Kasahara A, Hirao A
2. 発表標題 Identification of molecular targets in autophagy pathway to achieve efficient therapy of malignant gliomas
3. 学会等名 The 14th international symposium of the institute network for biomedical sciences (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林昌彦、平尾敦
2. 発表標題 膠芽腫イニシエーティング細胞の特性解析のための未分化細胞レポーターシステムの構築
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林昌彦、平尾敦
2. 発表標題 Autophagy inhibition synergizes with calcium mobilization to achieve efficient therapy of malignant gliomas
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi M, Vu HT, Yamada D, Hegazy AM, Hirao A
2. 発表標題 Metabolic regulation of malignant phenotypes of glioma stem cells
3. 学会等名 The 1st NanoLSI International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中田 光俊  (Nakada Mitsutoshi)		

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力者	上野 将也  (Ueno Masaya)		
連携 研究者	山田 大祐  (Yamada Daisuke)  (50733680)	新潟薬科大学・薬学部・助手    (33101)	現在は、岡山大学，医歯薬学総合研究科，助教。