

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業  
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 代謝シグナルによる未分化性制御機構を標的とした新規がん治療法の開発  
(英語) Development of innovative cancer therapeutics by targeting undifferentiated properties supported by metabolic regulation
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人金沢大学 がん進展制御研究所 教授 平尾敦  
所属 役職 氏名： (英語) Cancer Research Institute, Kanazawa University, Professor, Atsushi Hirao
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 代謝シグナルによる未分化性制御機構を標的とした新規がん治療法の開発  
開発課題名： (英語) Development of innovative cancer therapeutics by targeting undifferentiated properties supported by metabolic regulation
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人金沢大学 がん進展制御研究所 教授 平尾敦  
所属 役職 氏名： (英語) Cancer Research Institute, Kanazawa University, Professor, Atsushi Hirao
- 分担研究 (日本語) 悪性脳腫瘍新規治療法の臨床的有用性の評価  
開発課題名： (英語) Evaluation of efficacy of therapeutic candidates for malignant glioma
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人金沢大学 医薬保健研究域医学系 脳・脊髄機能制御学  
教授 中田光俊  
所属 役職 氏名： (英語) Department of Neurosurgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Professor, Mitsutoshi Nakada

- 分担研究 (日本語) ミトコンドリア機能調節制御機構の解明と治療法開発  
開発課題名: (英語) Molecular mechanisms of mitochondrial biogenesis for cancer therapy
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人金沢大学 がん進展制御研究所 (新学術創成機構)  
助教 笠原敦子
- 所属 役職 氏名: (英語) Cancer Research Institute (Institute for Frontier Science Initiative),  
Kanazawa University, Assistant Professor, Atsuko Kasahara
- 分担研究 (日本語) ハイスループット分子機能評価システムの開発  
開発課題名: (英語) Development of high-throughput functional screening for target  
molecules
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人金沢大学 医薬保健研究域医学系 革新ゲノム情報学 教授  
田嶋敦
- 所属 役職 氏名: (英語) Department of Bioinformatics and Genomics, Graduate School of  
Advanced Preventive Medical Sciences, Kanazawa University,  
Professor, Atsushi Tajima

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究開発では、代謝シグナルに着目し、がんの幹細胞性の獲得・維持機構の解明を通じて、がんの悪性進展や治療耐性を解除するための新規がん治療の開発を目指している。具体的には、①悪性脳腫瘍に対する新規治療法の開発および②白血病の治療耐性克服のための新規治療開発を目的とし、以下のような成果を見いだした。

### ①悪性脳腫瘍に対する新規治療法の開発

研究代表者は、これまでに栄養センサーmTOR の活性化によるエネルギー代謝の亢進が、脳腫瘍幹細胞の未分化性亢進の鍵となることを見いだしている。TSC1 欠損による mTOR 活性化脳腫瘍モデルでは、酸素消費量の増加などのミトコンドリア活性化が悪性化亢進と関連することを見いだした。そこで、悪性化促進モデルとして、この mTOR 活性化脳腫瘍モデル (マウス) を用いて、より悪性化形質を示す腫瘍に対して効果を示す候補化合物スクリーニングを実施した。約 1,300 の既存薬スクリーニングを実施した結果、13 化合物が、mTOR 活性化状態で高い抗腫瘍効果を発揮することを見いだした。これらの化合物のうち、5 化合物では ATP レベルが低下しており、エネルギー代謝の異常を誘導することを見いだした。この中でも、Nigericin は、既存のヒト脳腫瘍患者由来細胞株のスフィア形成能の抑制、未分化マーカーの発現低下を示し、脳腫瘍の未分化性を抑制することで抗腫瘍効果を発揮することを明らかにした。Nigericin について、酸化リン酸化を検討したところ、プロトン濃度勾配を解除する FCCP 処理後の酸化リン酸化の上昇が抑制されていたことから、電子伝達系の異常が ATP 低下の原因ではないかと考えられた。これらの結果は、治療標的としてのミトコンドリアエネルギー代謝の重要性を示す知見である。今後、さらに、候補化合物の評価を進め、実用化に向けた取り組みを推進する予定としている。

脳腫瘍患者の多様性に対する候補化合物の効果を正確に評価するシステムを構築するため、悪性脳腫瘍患者検体から幹細胞培養によって株化を行い、新たな脳腫瘍細胞株を作製した。既存の細胞株に加え、新たな細胞株に対しても、Nigericinは、顕著な増殖抑制効果、スフィア形成能の抑制を示したことから、上記の脳腫瘍治療薬スクリーニングの有用性が確認できた。今後更なる有効性を示す化合物の探索を進める。

## ②白血病の治療耐性克服のための新規治療開発

現在、様々ながん分子標的薬が開発されているが、その代表治療薬であり、複数のがん種に使用されているのがキナーゼ阻害剤 (TKI) である。しかし、症例によっては、初期耐性を示すものが存在すること、また、初期には顕著な奏功性を示していても、後には耐性を示し、再発することが知られるようになり、臨床的に大きな問題となっている。このような TKI に対する治療耐性メカニズムの解明とその克服を目指し、TKI の関与するシグナルとして mTOR 複合体経路に焦点を絞り検討を行った。BCR-ABL 陽性 K562 細胞に対し、本経路を失活させる遺伝子破壊細胞株を作製し、TKI 感受性に関する評価を行った。その結果、本経路の失活細胞は、培養中では顕著な増殖異常は認められなかったものの、特定の治療に高感受性を示したことから、本経路が TKI 耐性克服の標的分子となること、また、その下流を探索することにより、TKI 耐性克服のための標的分子を探索することが可能であると考えられた。そこで、本経路の失活細胞において遺伝子発現解析を実施し、変動する約 1000 遺伝子を選択した。これらの sgRNA ライブラリーを作製し、K562 細胞に導入し、イマチニブ添加によるクローンの変動を観察した。sgRNA ライブラリーを導入後の K562 細胞から DNA を抽出し、PCR で増幅した sgRNA バーコード領域を次世代シーケンサーにて解析することにより、それぞれの sgRNA の頻度を算出した。その結果、導入された約 12,000 種類の sgRNA の 99%以上が認められたことから、本システムが安定していることが示唆された。また、イマチニブによる感受性の亢進を示す sgRNA も 100 種類以上認められ、今後の機能評価の対象とすることにした。その他の耐性機構として、白血病幹細胞の未分化性維持に必須とされる FOXO ファミリーに着目した検討も実施した。FOXO 機能評価と標的分子の探索のため、CRISPR/CAS9 によって、FOXO1, FOXO3 および FOXO4 の欠損細胞株を作製した。FOXO1/3/4 欠損白血病細胞株は、顕著な増殖抑制を示した。さらに遺伝子発現解析を行ったところ、活性酸素制御に関わる経路の異常に加え、インターフェロンなどの免疫経路の活性化経路の異常が認められ、今後の更なる検討を行うこととした。

### 1. Development of novel therapeutics for malignant glioma

Glioblastoma (GBM) is the most common high-grade malignant glioma in humans. GBM is categorized as a WHO grade IV astrocytoma, a very aggressive, invasive and destructive brain tumor. We found that hyper-activation induced by conditional TSC1 deletion increased numbers of glioma-initiating cells (GICs) *in vitro* and *in vivo*. To translate this observation into the development of novel therapeutics targeting malignant gliomas, we screened drug libraries (1,300) to select compounds showing greater efficacy in inhibiting the proliferation/survival of TSC1-deficient cells compared to controls. We identified 5 compounds able to preferentially inhibit mitochondrial activity, dramatically reducing ATP levels and blocking glioma sphere formation. In human patient-derived glioma cells, nigericin, which reportedly suppresses cancer stem cell properties, remarkably induced apoptosis. Thus, targeting mTORC1-driven processes, particularly those involved in maintaining a cancer cell's energy balance, may be an effective therapeutic strategy for glioma patients. We will do further analysis of candidate compounds and screening of other candidates.

## 2. Development of novel approach to overcome drug-resistance in leukemia therapy

Tyrosine kinase inhibitor (TKI) that represents a breakthrough treatment for BCR-ABL+ leukemia. However, one of the clinical problems is presence of patients showing TKI-resistance. Although previous studies reported numerous mechanisms of such TKI-resistance, it has remain unclear how TKI-resistance is overcome. To develop novel therapeutic approach, we focused on mTOR complex, because abnormalities of mTOR signaling are observed in many patients with leukemia. We developed a leukemia cell line with mTOR complex inactivation by CRISPR/CAS9 and found that mTOR complex inactivation contributes to sensitization of TKI treatment. To find candidate molecular targets for overcoming TKI-resistance, we performed functional screening. First, we selected approximately 1,000 genes as mTOR complex downstream, and generated sgRNA library. After introduction of the library into CML cell line, the cell line were treated with TKI. By comparison of frequencies of individual sgRNA between cells with and without TKI treatment, we identified more than 100 sgRNA as candidate targeting molecules for sensitizing TKI treatment. We will try evaluation of function of individual molecules. In addition, we generated FOXO deficient leukemia cell line (AML) because FOXO family plays a critical roles in maintenance of undifferentiated status of myeloid leukmima. Gene expression profiling suggest that FOXO inactivation leads to abnormalities in ROS regulatory pathways and inflammatory pathways. We will find candidate molecules for targeting undifferentiated status among FOXO downstream.

### III. 成果の外部への発表

#### (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 1件、国際誌 2件）

1. Hegazy AM, Yamada D, Kobayashi M, Kohno S, Ueno M, Ali MA, Ohta K, Tadokoro Y, Ino Y, Todo T, Soga T, Takahashi C, Hirao A. Therapeutic Strategy for Targeting Aggressive Malignant Gliomas by Disrupting Their Energy Balance. *J Biol Chem*. 2016 291:21496-21509.
2. 中田光俊, 脳腫瘍に対するドラッグリポジショニング研究 *Neuro-Oncology の進歩* 2016, 23(3): 1-8
3. Furuta T, Sabit H, Yu D, Miyashita K, Kinoshita M, Uchiyama N, Hayashi Y, Hayashi Y, Minamoto T, Nakada M. Biological basis and clinical trial of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ -targeted therapy by drug repositioning for glioblastoma *Oncotarget* 2017, 8:22811-22824

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Hirao A: Molecular mechanism linking hematopoietic stem cell aging and leukemogenesis. Fifth JCA-AACR Special Joint Conference on the Latest Advances in Hematological Cancer Research July.13-15, 2016, Urayasu、口頭、国内
2. Hirao A: Molecular mechanism regulating stem cell properties mediated by nutrient signals. 46th International Symposium of the Princess Takamatsu Cancer Research Fund Nov.8, 2016, Tokyo、口頭、国内

3. Hirao A: Regulation of stem cell properties by nutrient signals in hematopoietic neoplasms. 21st Japan-Korea Cancer Research Workshop Dec.23, 2016, Goyang, Korea、口頭、国外
4. 平尾敦：がん幹細胞の代謝制御 第74回日本がん分子標的治療学会、平成28年5月31日、別府、口頭、国内
5. 平尾敦：幹細胞 第9回研修医のための血液学セミナー 平成28年7月8日、大津、口頭、国内
6. 平尾敦：栄養シグナルと幹細胞制御 第39回日本分子生物学会年会 平成28年12月3日、横浜、口頭、国内
7. Nakada M, Dong Y, Kitabayashi Y, Sabit H, Furuta T, Hirao A. Screening of existing drugs to target glioma stem cells. 13th Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO) Meeting, September 11-14, 2016, Sydney, Australia ポスター、国外
8. 中田光俊, 董宇, 北林朋宏, 淑瑠へムラサビット, 古田拓也, 平尾敦 既存薬の応用による膠芽腫に対する新規化学療法 第75回日本脳神経外科学会総会、平成28年9月29日-10月1日、福岡、口頭、国内
9. 中田光俊 脳腫瘍に対するドラッグリポジショニングの試み（特別講演）第9回香川県脳腫瘍学術講演会、平成28年10月28日、高松、口頭、国内
10. 中田光俊 悪性神経膠腫の最新知見（特別講演）第11回岐阜脳腫瘍研究会、平成28年10月29日、岐阜、口頭、国内
11. Nakada M, Dong Y, Kitabayashi Y, Sabit H, Furuta T, Hirao A. Drug repositioning targeting glioma stem cells. Society for Neuro-Oncology 21st Annual Meeting 2016, November 17-20, 2016, Scottsdale, Arizona, USA、ポスター、国外
12. 中田光俊, 董宇, 北林朋宏, 淑瑠へムラサビット, 古田拓也, 平尾敦 既存薬による膠芽腫に対する新規化学療法 第34回日本脳腫瘍学会、平成28年12月4日-6日、甲府、口頭、国内
13. 董宇, Hemragul Sabit, 北林朋宏, 古田拓也, Shabierjiang Jiapaer, 平尾敦, 中田光俊 Identification of antipsychotic drug as a potential anti-glioma agent 第17回日本分子脳神経外科学会、平成26年8月26日-27日、東京、口頭、国外

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. がん研究の最前線「幹細胞とがん」、平尾敦、金沢大学公開講座 2016/6/18, 国内

(4) 特許出願

特願 2016-140810 号