

## 論文の内容の要旨

農学生命科学研究科 獣医学専攻  
平成 23 年度博士課程入学

氏名 佐伯 亘平

指導教員名 西村 亮平

論文題目 Anti-tumor effect of the mitochondrial respiratory chain complex inhibitors on canine mammary gland tumor cells  
(犬悪性乳腺腫瘍に対するミトコンドリア呼吸鎖複合体阻害薬の抗腫瘍効果)

腫瘍はヒトにおける主要な死亡原因であり、年 1,000 万人程度の患者が腫瘍により死亡している。悪性腫瘍の多くは病期の進行に伴い全身へと播種し、多くの罹患患者ではこの転移の進行が腫瘍死と密接に関連している。そのため腫瘍患者の予後改善のためには転移の制御を目的とした治療法の確立が不可欠である。医療の発展による動物の高齢化に伴い、腫瘍は犬の死亡要因においても大きな割合を占めている。特に雌犬に発生する乳腺腫瘍 (Canine mammary gland tumor; CMGT) は未避妊雌犬に発生する腫瘍のおよそ半数を占め、またその中の約半分の症例が悪性腫瘍と診断されるため、特に注目すべき腫瘍性疾患である。CMGT では領域リンパ節や遠隔臓器への転移が重要な負の予後因子として認識されており、転移の進行が症例の生存と大きく関連する腫瘍である。そのため CMGT に対する治療法を改善する上でも、転移能を持つ細胞の制御が非常に重要な検討課題である。

近年の研究により腫瘍組織は均質な腫瘍細胞によって構成されているのではなく、多種多様な腫瘍細胞と非腫瘍細胞および細胞外基質からなる不均質な集合体であるとの理解が進んできた。特に腫瘍細胞内の不均一性は転移の発生を含めた疾患の進行に大きく関与していると考えられる。1970 年代に B16 マウス悪性黒色腫株から樹立されたサブクローン株間に顕著な転移能の違いあることが明らかにされ、その後腫瘍内には異なる性質を持った複数のクローンが存在し、また転移能や薬剤耐性能は特定のクローンのみが遺伝子変異の蓄積によって獲得するという癌のクローン進化説が提唱された。この仮説は各クローンの変異の検出によって血液腫瘍及び固形腫瘍で実証され、がん幹細胞(Cancer Stem Cell; CSC)仮説とともに腫瘍不均一性の発生に大きく関与すると考えられている。

最近の研究で、1 つの CMGT 細胞株(CHMp 株)からクローニングされた異なるサブクローン間にも大きな転移能の差が存在することが見出された。高転移クローンである

CHMp-5b 株は免疫不全動物内で巨大な原発腫瘍と 100 を超える肺転移巣を形成するが、低悪性クローンと考えられた CHMp-13a 株は動物に生着するものの、継続的な腫瘍増大や転移巣形成は認めなかった。

このような背景と知見から、CMGT にもクローン進化が存在し、転移能を持つクローンを選択的に傷害するような薬剤を治療に応用することで CMGT 患者の予後を改善することができるのではないかと仮説を立てた。この研究の目的は、高転移クローンの生存を選択的に抑制する薬剤を探索しその臨床応用可能性を検討する(第 2 章、第 3 章)とともに、それら薬剤の作用機序と選択的細胞障害性のメカニズムを解明する(第 2 章、第 3 章、第 4 章)ことである。

第 2 章ではまずマイクロアレイチップを用いた CMGT クローン株のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、高転移 CHMp-5b 株はいずれも腫瘍の悪性度に関連すると報告されている上皮間葉転換関連因子や CSC 関連分子、ECM 分解酵素分子を高発現していた。一方で低悪性 CHMp-13a 株には正常上皮分化に関連した因子や、腫瘍組織で良好な予後と関連する分子の強い発現が認められた。従って CHMp-5b 細胞は CHMp-13a 細胞と比較して高い幹細胞性や浸潤能を持つと推測され、幹細胞マーカであるアルデヒドデヒドロゲナーゼの活性測定と、ボイデンチャンバー法による浸潤能測定によってその有意な上昇が確認された。これらの知見を基に CHMp-5b を CMGT のクローン進化の結果生じた転移能の高い悪性クローン、CHMp-13a を比較的 low 悪性度なクローンのモデル細胞株と捉え以降の実験を行った。

続いて転移細胞を標的とした治療法の開発のために、転移クローン CHMp-5b の増殖を選択的に抑制する分子標的薬を CHMp-13a 細胞を対照として無作為薬剤スクリーニングにより探索した。検討には文部科学省化学療法基盤支援活動が提供する標準阻害剤キット(321 薬剤)を用いた。その結果 7 薬剤が複数濃度で有意に CHMp-5b の増殖を抑制した ( $p < 0.05$ ; versus CHMp-13a) が、これらの薬剤のうち 3 つの薬剤がミトコンドリア呼吸鎖複合体阻害薬(Mitochondrial respiratory complex inhibitors; MRCIs) (ロテノン、アンチマイシン、オリゴマイシン)であった。この結果からミトコンドリアにおける酸化リン酸化(oxidative phosphorylation; OXPHOS)の阻害が転移腫瘍細胞選択的な細胞障害性を発揮する可能性が示唆された。

さらに MRCIs の作用機序に関する知見を得るために、OXPHOS 阻害の結果変化すると考えられた細胞内 ATP 量、活性酸素種(ROS)量、ならびに AMP-activated protein kinase (AMPK)活性を評価した。AMPK 分子は細胞内 AMP:ATP 比の増加によってアロステリックな活性化を起こし、多様な作用機序を介して細胞のエネルギー産生及び消費を調節し、また時に細胞増殖を抑制する分子である。その結果 ROS 産生量の増加とミトコンドリアにおける ATP 産生量の減少は 2 細胞間で同様であったが、AMPK の活性化は CHMp-13a で強く生じることが明らかになった。この結果は AMPK 活性化阻害薬である Compound C 存在下で MRCIs による CHMp-13a の細胞障害性が減弱することからも支持された。これ

ら一連の実験により、MRCIs が転移細胞選択的な薬剤となる可能性が示唆され、またその結果は OXPHOS 抑制に対する細胞反応の違いによって生じると考えられた。しかしこの 3 つの MRCIs はいずれも薬剤として生体への使用適応がなく、臨床応用を行うためには類似の作用機序を持つ薬剤について検討する必要がある。メトホルミンは人医領域で 2 型糖尿病患者の治療に用いられる経口血糖降下薬であるが、近年になってその作用機序がミトコンドリア呼吸鎖複合体 1 の阻害(ロテノンと同様)によると報告され、また既にいくつかのヒト固形腫瘍に対する抗腫瘍効果が示唆されている薬剤である。そこで第 3 章では糖尿病治療薬として使用され生体での十分な安全性が証明されているメトホルミンに着目し、転移腫瘍細胞への選択性、臨床応用の可能性及び作用機序に関する検討を行った。

その結果メトホルミンは *in vitro* で他の MRCIs 同様に高転移クローン CHMp-5b の細胞増殖を CHMp-13a と比較して有意に強く抑制した。また免疫不全動物を用いた CHMp-5b 細胞の異種移植モデルにおいても、原発巣の成長を有意に低下させた。統計的に有意ではなかったが、メトホルミンにより転移巣の形成数も減少傾向にあった。細胞内 ATP 量、AMPK 活性、さらに AMPK の下流標的分子である mTOR 及びそのエフェクター分子である 4EBP、p70S6K 分子の活性化を検討したところ、メトホルミンによる両細胞株のミトコンドリア ATP 産生量の低下が確認された。しかし他の MRCIs 同様に、AMPK 分子の活性化と mTOR 及びその下流分子の抑制、また CompoundC による細胞増殖抑制効果の消失は CHMp-13a のみで顕著に認められた。再び OXPHOS 抑制に対する細胞反応の違いが観察され、薬剤感受性に関連している可能性が示唆された。MRCI 高感受性の転移性クローン CHMp-5b における作用機序をより詳細に探索するために、薬剤暴露後の細胞から mRNA を抽出し、コントロールと比較して発現変動が認められる遺伝子をマイクロアレイチップを用いて検出した。全 1802 個の遺伝子に発現変化が見られ、発現低下遺伝子(n=971)を Gene Ontology 解析に供したところ、メトホルミン暴露による細胞周期進行の抑制が示唆された。メトホルミン暴露による細胞周期関連分子の発現量と細胞周期の変化を検討したところ、cyclinD1 の減少と Rb 分子のリン酸化減少が認められ G1/S チェックポイントの通過阻害による細胞周期進行の停止が示唆された。これはフローサイトメトリーによる細胞周期解析の結果とも一致し、CHMp-5b におけるメトホルミンへの高感受性には AMPK 非依存的な細胞周期進行の抑制が関与していると結論付けられた。

メトホルミンを用いた検討により MRCI の転移性クローンに対する選択性が再認され、また移植モデルから臨床応用の可能性が示唆された。またメトホルミンは他の MRCIs 同様に二つの異なる転移能を持つクローン株に対して異なる機序、すなわち AMPK 依存的な mTOR 経路抑制もしくは AMPK 非依存的な細胞周期抑制を介して作用していた。

第 4 章では高転移株で観察されたメトホルミンによる AMPK 非依存的な作用機序に関してさらなる検討を行った。これまでの検討でメトホルミンは細胞障害が認められ始める濃度(~2 mM)よりも高濃度帯(>5mM)で主に ATP を減少させること、細胞内のエネルギーセンサーである AMPK 分子が活性化していないことから、CHMp-5b 細胞における MRCI に

よる OXPHOS 抑制の本態はミトコンドリア ATP 産生量の減少以外に存在すると推測された。またロテノンを用いた神経細胞障害性に関する近年の報告は、呼吸鎖複合体 1(NADH デヒドロゲナーゼ)の阻害が、細胞内 NAD の減少を介して細胞障害を引き起こす可能性を示唆していた。そこでメトホルミンによる細胞周期停止は細胞内 NAD 量の減少によって発生すると仮説を立て、メトホルミン暴露及びそれに加えた NAD 添加が細胞増殖、細胞周期、細胞内 ATP 産生量、細胞内 NAD/NADH 濃度に与える影響を評価した。

その結果、メトホルミン暴露は CHMp-5b 細胞に細胞増殖の抑制、細胞周期の停止、細胞内 NAD 濃度の低下を引き起こすが、これらの作用は細胞外より NAD を添加することでほぼ完全に消失することが観察された。またこのいずれの操作においても細胞内 ATP 濃度は全く変化しておらず、CHMp-5b 細胞における AMPK 非依存的な細胞周期停止には細胞内 NAD 量の減少が関与していることが強く示唆された。

以上の研究により①CMGT における高転移クローン選択的増殖抑制薬としての MRCIs の可能性、②高転移クローンと低悪性度クローン間で異なる OXPHOS 抑制に対する細胞反応、③臨床応用可能な MRCI としてのメトホルミンの有用性、④細胞内 NAD 量の減少を介するメトホルミンの新たな抗腫瘍作用機序、を明らかにすることができた。メトホルミンは人医領域では CSC 特異的な阻害剤としても多く報告があり、本研究においても悪性度の高い細胞に対し選択性を示した点は非常に興味深く、今後さらなる作用機序解明と臨床応用に向けた検討が期待される。今後、腫瘍細胞内における NAD の働きに関してもより詳細な研究が必要であり、MRCIs への感受性と表現型としての高浸潤性、幹細胞性及び高転移能との関連を明らかにすることが重要である。