

がん細胞の糖代謝と微小環境の相互作用の分子機構解明とその制御

所属機関 公益財団法人がん研究会  
研究者名 富田章弘

## 《研究の概要》

がん細胞は、一般に、主に解糖系でエネルギーを産生し、大量のグルコースを消費しつつ増殖する。一方、腫瘍組織では一般に、血管不全などによって正常組織とは異なる微小環境が構築され、グルコースの供給が十分ではない。その結果、腫瘍内微小環境においては、がん細胞はグルコース飢餓にしばしば曝され、それに適応応答する必要がある。本研究では、グルコース飢餓に対する細胞の恒常性維持機構を新しい標的として捉え、その分子基盤を明らかにし、それを制御する治療法開発のための基盤を築くことを目的として行った。具体的には、エネルギー代謝に重要な役割を果たしているミトコンドリアの機能に着目して、ミトコンドリアの機能に依存して起こる細胞応答とミトコンドリアの機能を欠失した際に起こる細胞応答とに分け、研究を進めた。前者については、ストレス応答 UPR (unfolded protein response) に着目し、主として、これまでに見出してきたグルコース飢餓環境下で選択的に UPR を抑制し抗腫瘍効果を示す化合物を活用した研究を展開した。そして、ミトコンドリア呼吸機能とリンクした UPR の制御には、タンパク合成開始抑制因子 4E-BP1 の適切な制御が重要な役割を果たしていることなどを見出した。また、UPR のシグナル伝達経路で主要な役割を演じている PERK 経路について、新たな制御因子を同定し、その機能解析を進めた。一方、ミトコンドリアが機能しない状態で起こる、がん細胞の新たな適応機構については、ミトコンドリア DNA を欠損した  $\rho^0$  細胞株を用いて研究を展開した。その結果、ミトコンドリア機能を欠損し、上記の UPR を誘導できないがん細胞が腫瘍内環境に適応するメカニズムとして、低酸素応答機構の恒常的な活性化を見出すことに成功した。こうした研究に加え、本研究においては、特有の微小環境に存在するがん幹細胞の生存と代謝制御の研究に取り組み、がんの微小環境下での生存や再発に関わることを示唆する因子の同定に成功した。さらに、これらの基礎的検討から得られる遺伝子発現情報をもとに、種々の公開ならびに独自のデータベースを活用したゲノム情報解析を行い、臨床応用への筋道などを探った。今後は、本研究事業で得られた成果を基盤として、臨床材料での検討を含めた検証研究を進めるとともに、新たな治療法の考案に向け研究を発展させていきたいと考えている。

富田 章弘	公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター ゲノム研究部部長	研究全体のとりまとめ・微小環境 における細胞防御と代謝制御
松浦 正明	公益財団法人がん研究会 がん研究所 がんゲノム研究部部長	ゲノム情報解析・代謝と環境の相 互作用の治療標的としての検証
馬島 哲夫	公益財団法人がん研究会 がん化学療法センター 分子生物治療研究部研究員	がん幹細胞生存因子と代謝制御

## 研究報告

### I 研究目的

がん細胞は、酸素の有無に関わらず、主に解糖系でエネルギーを産生する。この解糖形質は、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異の結果として起こり、Warburg 効果と呼ばれる。この特性のため、がん細胞は大量のグルコースを消費しつつ増殖する。一方、腫瘍組織では一般に、血管不全などによって正常組織とは異なる微小環境が構築され、グルコースの供給が十分ではない。したがって、腫瘍内微小環境においては、がん細胞はグルコース飢餓にしばしば曝されるため、それに応答し、細胞自身の恒常性維持機構を発動するとともに、より有利な微小環境を構築する必要がある。

我々は、グルコース飢餓に対する細胞の恒常性維持機構を新しい標的として捉え、ストレス応答 UPR (unfolded protein response) に着目し研究を展開してきた。そして、グルコース飢餓環境下で選択的に UPR を抑制し抗腫瘍効果を示す化合物を見出し、その機序解析や治療への応用研究を進めてきた。こうした従来成果を基盤とし、本研究では、がんの特徴的な糖代謝制御機構とそれに基づく微小環境の再構築機構の解明に取り組むこととした。また、新たな試みとして、特有の微小環境に存在するがん幹細胞の生存と代謝制御の研究に取り組むこととした。さらに、こうした基礎的検討から得られる遺伝子発現情報をもとに、最新のゲノム情報解析技術を駆使し、病態との関連解析や阻害剤のインシリコ探索等を行い、治療研究への展開を睨んだ研究を同時に行うこととした。

このように、本研究は、がん細胞と微小環境の相互作用の分子基盤を明らかにし、それを制御する治療法開発のための基盤を築くことを目的として行ったものである。

### II 研究計画及び材料と方法

本研究においては、①微小環境における細胞防御と代謝制御、②がん幹細胞生存因子と代謝制御、③代謝と環境の相互作用の治療標的としての検証 の大きく3つの研究項目に分け、相互に連携しつつ研究を推進することとした。以下にそれぞれの項目ごとに、具体的研究計画・方法を記す。

## ①微小環境における細胞防御と代謝制御

本研究項目では、エネルギー代謝に重要な役割を果たしているミトコンドリアの機能に着目して、ミトコンドリアの機能に依存して起こる細胞応答とミトコンドリアの機能を欠失した際に起こる細胞応答とに分け、それぞれ、1) グルコース飢餓における細胞応答 UPR と糖代謝、2) ミトコンドリア機能異常と細胞防御・微小環境再構築因子 の小項目をたてて研究を進めた。

### 1) グルコース飢餓における細胞応答 UPR と糖代謝

UPR は腫瘍増殖に重要な役割を果たす細胞のストレス応答で、がん組織に特徴的なグルコース飢餓によって誘導される。これまでに、グルコース飢餓環境下では、ミトコンドリア機能依存的に UPR が起こることを見出してきた。他方で、グルコース飢餓環境で選択的に UPR を抑制し抗腫瘍活性を有する化合物として、versipelostatin やビグアナイド系糖尿病薬などを見出してきた。こうした実績に基づき本研究項目では、我々の見出してきた UPR 阻害化合物群を活用し、グルコース飢餓環境下で起こる UPR の分子機序解析を進めた。具体的には、ミトコンドリア依存的に起こる UPR の制御因子として、これまでに同定してきた蛋白合成開始抑制因子 4E-BP1 がどのような機序で UPR 制御に関与するかの検討や、新たに見出した UPR 阻害剤についての検討を進めた。また、これまでに見出してきた一群の UPR 阻害剤について、ミトコンドリア機能に対する影響を検討した。具体的には、細胞外フラックスアナライザー XF24 (Seahorse Bioscience) を用い、主にミトコンドリア酸化的リン酸化に由来する細胞の酸素消費速度、ならびに、主に嫌氣的解糖系に由来する乳酸放出量を指標として、細胞に阻害剤を処理した際の影響を検討した。

また、UPR 活性化因子の一つである PERK の機能を阻害された細胞は、グルコース飢餓に脆弱化し死滅しやすくなることに着目し、PERK 結合因子として我々が同定した TBL2 の機能解析を中心に、UPR 制御と糖代謝制御との関連について検討した。さらに、ミトコンドリアと小胞体のクロストークに関与する分子などを含め、ミトコンドリア機能に関与する因子について、siRNA フォーカスライブラリーを構築し、グルコース飢餓等のストレス下で細胞死を誘導する siRNA の探索を行った。

### 2) ミトコンドリア機能異常と細胞防御・微小環境再構築因子

ミトコンドリア DNA を欠損した  $\rho^0$  細胞株は、酸化的リン酸化が行えず、解糖に依存した形質を示す。我々は、ヒト結腸がん HT-29 細胞より単離した  $\rho^0$  細胞株を用い、 $\rho^0$  細胞はグルコース飢餓に対し高感受性で速やかに死滅すること、このとき GRP78 などの典型的な UPR 標的遺伝子の誘導が起こらないことを報告してきた。こうした成果に基づき、本研究項目では、樹立済みの各種  $\rho^0$  細胞を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行い、解糖に依存した細胞のグルコース飢餓環境下への適応応答についての性状解析を進めた。一方で我々は、UPR が腫瘍増殖に重要な役割を果たすことと合致し、HT-29 由来  $\rho^0$  細胞の造腫瘍性が非常に低いことを見出していた。そこで、ヌードマウスへの移植実験を繰返すことにより、*in vivo* 環境に適応した  $\rho^0$ /xngft 変異株を単離することに成功した。この  $\rho^0$ /xngft 変異株を用いることで、解糖に依存したがん細胞の造腫瘍性メカニズムの解析を行った。

## ②がん幹細胞生存因子と代謝制御

がん細胞は、足場非依存性の生存維持機構や、特有の微小環境下における選択的な生存維持機構を有し、これらが腫瘍形成において重要な役割をもつ。近年、がん細胞集団の中に、高い腫瘍形成能および自己複製能を有する「がん幹細胞」が存在することが明らかにされ、新たな治療標的として注目されている。但し、固形がんのがん幹細胞の生存因子に関する知見は極めて乏しい状態にあった。そこで本研究項目では、幹細胞の存在が確認され、また代謝異常の認められる前立腺がんなどに着目し、がん幹細胞分画を分離した。そして、ゲノムワイドRNAiライブラリーおよびメタボローム関連因子阻害剤をふくむケミカルライブラリーを、(1)がん幹細胞と非がん幹細胞(がん細胞集団全体)、(2)通常細胞培養条件と足場非依存性培養条件、(3)in vitroとin vivoにおいて処理および比較し、がん微小環境下およびがん幹細胞選択的な生存因子をスクリーニングした。また、研究項目③のゲノム情報解析との連携により、がん幹細胞やがん微小環境下に選択的な発現を示す腫瘍増殖形成に重要な分子の同定を試みた。他方、研究項目①との連携により、糖代謝、メタボローム関連因子の関与の可能性を検討した。

## ③代謝と環境の相互作用の治療標的としての検証

上記の研究により取得したマイクロアレイによる遺伝子発現データを用い、がんの代謝状態や環境適応状態と相関する遺伝子発現シグネチャーを同定することを目指し、種々の公開ならびに独自のデータベースを活用したゲノム情報解析を行った。特に近年注目されてきているGene set enrichment analysis、Connectivity map、またこれらの改良型として開発した独自の解析システムGene module-based connection search、さらにはパスイ解析が可能なKEGG等を駆使し、臨床における悪性化や転移との関連性、あるいは、がん化・細胞老化等との関連性についての検索を行った。また、新たな治療法の開発研究への展開を図るため、UPR関連因子等の種々の安定ノックダウン細胞を作製し、あるいは、siRNAによりノックダウンによって、グルコース飢餓環境下での細胞生存率やゼノグラフトを用いた遺伝子発現解析等を行い、治療標的としての可能性について検討した。

## III 研究成果

### ①微小環境における細胞防御と代謝制御

#### 1) グルコース飢餓における細胞応答UPRと糖代謝

本研究小項目では、グルコース飢餓環境下において、ミトコンドリア機能依存的に起こるストレス応答UPRに焦点を当て、研究を進めた。

グルコース飢餓状態のがん細胞において、ミトコンドリアの機能が欠損するとUPRが阻害されるが、その分子メカニズムを検討したところ、タンパク合成開始抑制因子4E-BP1の異常活性化が起こり、タンパク合成系が強力に抑制され、その結果として、UPRが抑制されるというメカニズムの存在が明らかになった。この4E-BP1の異常活性化には、阻害剤等を用いた検討の結果、mTORシグナル伝達経路の遮断が関与することがわかった。重要なことに、UPR抑制化合物として我々が同定した、ビッグアノイド系化合物のブホルミンを用いて検討したところ、薬剤処理による4E-BP1の異常活性化がゼノグラフトモデルにおいても観察されることがわかった。一方で、新たなUPR阻害剤の探索を進めていたところ、エ

エネルギー代謝制御因子 AMP-activated kinase に対する阻害剤として知られる compound C が、UPR 阻害活性を有することを見出した。興味深いことに、この UPR 阻害は、AMP-activated kinase の阻害とは関係なく起こることが明らかになった。さらに、従来見出してきた UPR 阻害剤とは異なり、compound C は、4E-BP1 の異常活性化を伴わずに UPR 阻害活性を示すことを見出した。

次に、versipelostatin、ビッグアナイド類（メトホルミン、ブホルミン、フェンホルミン）、パモ酸ピルビニウムなどに加え、compound C をも含めた UPR 阻害化合物群について、細胞外フラックスアナライザーを用い検討した。その結果、ミトコンドリア呼吸阻害活性を有する化合物と有しない化合物に分離されることが分かった。このミトコンドリア呼吸阻害活性の有無は、グルコース飢餓環境下での 4E-BP1 の異常活性化の誘導能と合致していた。すなわち、グルコース飢餓環境下における UPR の活性化には、ミトコンドリア呼吸機能とリンクした 4E-BP1 の適切な制御が重要であることが改めて示されるとともに、それ以外のドラッグブルな UPR 制御因子が存在することが示唆された。なお、これまでに見出てきた UPR 阻害化合物群の多くが、ミトコンドリア呼吸阻害活性を有していたが、細胞外フラックスアナライザーによる測定結果の詳細について検討したところ、典型的な呼吸鎖阻害剤のロテノン等とは明らかに異なる阻害様式を示す化合物があり、これらについては今後さらに作用機序解析を進める予定である。

一方、UPR 制御因子の PERK や我々が同定した TBL2 についての研究においては、TBL2 の安定ノックダウン細胞の樹立に成功し、この細胞が低グルコース・低酸素環境下で死滅しやすく、高感受性を示すことを見出した。したがって、TBL2 は、PERK と同様に糖代謝制御に関与する可能性が示唆された。さらに、TBL2 についての機能解析研究を進め、TBL2 は、構成的に mRNA やリボソームとも複合体を形成しており、ストレス下での翻訳制御に関与することで、低グルコース・低酸素環境下での細胞生存に寄与することが考えられた。また、ミトコンドリア機能制御やミトコンドリアー小胞体のクロストークに関与する分子、また糖代謝に関与する分子などに注目して、50 以上の分子に対する siRNA のフォーカスライブラリーを構築し、グルコース飢餓等のストレス下で細胞を死滅させる因子の探索を行った。その結果、ミトコンドリアの融合分裂を制御する因子の中に、ストレス下での細胞生存率を低下させるものがあることを見出した。

## 2) ミトコンドリア機能異常と細胞防御・微小環境再構築因子

本研究小項目では、グルコース飢餓環境や腫瘍内環境における細胞応答のうち、ミトコンドリア DNA を欠損し極度に解糖に依存した形質を示す  $\rho^0$  細胞株を用いた解析に焦点を当て、研究を進めた。具体的には、第一に、樹立済みの各種  $\rho^0$  細胞（結腸がん HT-29 細胞、線維肉腫 HT1080 細胞、腎がん 786-0、OS-RC-2 細胞由来）を用いてマイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。その結果、ミトコンドリア DNA を欠損した  $\rho^0$  細胞株では、グルコース飢餓環境下で UPR 標的遺伝子群の発現誘導が起こらないこと、一方で  $\rho^0$  細胞株において特異的に誘導される遺伝子群も存在することが明らかになった。興味深いことに、これらの  $\rho^0$  細胞株において親株よりも強く誘導される遺伝子の中には、IL8 などの炎症や血管新生に関与し、微小環境の再構築に重要な役割を果たす因子が含まれており、ミトコンドリア機能異常が腫瘍内微小環境の再構築に影響を及ぼす可能性が考えられた。

次に、ミトコンドリア機能異常細胞の腫瘍内環境への適応機構を検討するため、HT-29由来  $\rho^0$  細胞を用い、ヌードマウスへの移植実験を繰返すことにより、in vivo での環境に適応した  $\rho^0$ /xngft 変異株を単離し、その性状解析や遺伝子発現解析を進めた。 $\rho^0$ /xngft 変異株についての基本的な性状として、依然としてミトコンドリア DNA を欠損していること、GRP78 などの UPR マーカータンパク質の検討により、グルコース飢餓環境下での UPR 誘導能を欠損していることを確認した。さらに性状解析を進め、 $\rho^0$ /xngft 変異株は、 $\rho^0$  細胞に比べて、グルコース飢餓に対し耐性を獲得していることを見出した。この  $\rho^0$ /xngft 変異株を用い、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行ったところ（下記の研究項目③も参照）、低酸素応答性遺伝子の一部が恒常的に高発現していること、またこれと合致して、低酸素応答性遺伝子の転写を促進する転写因子 HIF-1 が恒常的に活性化していることを見出した。この恒常的な低酸素応答活性化に関与する因子として、遺伝子発現情報解析の結果に基づき、MIMA (mitochondria-independent microenvironment-adaptive gene) 1 の同定に成功した。MIMA1 は、変異株において恒常的に高発現しており、ノックダウンによって、変異株の低酸素応答が顕著に減弱することが明らかになった。

## ②がん幹細胞生存因子と代謝制御

がん細胞集団の中に、高い腫瘍形成能および自己複製能を有する「がん幹細胞」が存在すること、これらは特有の微小環境下において選択的な生存維持機構を有していることが示唆されている。本研究項目では、幹細胞の存在が確認され、また代謝異常の認められる前立腺がんなどに着目し、がん幹細胞分画を分離することを試みた。また、がん幹細胞選択的な生存因子の探索に向け、ゲノムワイド RNAi やシグナル伝達阻害化合物のライブラリーを用いたスクリーニング系の構築を行い、スクリーニングを進めた。さらに、得られた候補についてのさらなる解析を進めた。

具体的には、前立腺がん培養細胞 PC3 細胞と DU145 細胞を用い、制限培地条件下でのスフェア形成法にて、がん幹細胞様の細胞を分離した。分離した細胞は、通常条件下で培養した細胞と比べ、足場非依存性の増殖能が亢進しており、また免疫不全マウスへの細胞移植により高い造腫瘍性を示すことを確認した。前立腺がん幹細胞の細胞表面マーカーとして、最近、複数の候補マーカーが報告されている。これらについて、比較検討を進め、CD151/CD166/TRA1-60 陽性分画が、スフェアでの濃縮および免疫不全マウスでの造腫瘍性の両面で、最も優れたマーカーであることがわかった。

一方、がん幹細胞選択的な生存因子を探索するため、RNAi や各種シグナル伝達阻害化合物のライブラリーを用いた包括的スクリーニングを進めた。PC3 細胞を中心に用いたスクリーニングの結果、複数の陽性候補について、がん幹細胞の濃縮されたスフェア分画選択的に毒性を示すことが確認された。この中で、とくにがん幹細胞選択的な生存因子の候補となる分子について、複数の RNAi による発現抑制が、がん幹細胞マーカー陽性分画の割合をたしかに低下させること、および、がんの臨床組織において発現の亢進が認められることなどを指標として、がん化やがん幹細胞の生存に重要な因子を絞りこむことができた。さらに、RNAi による発現抑制時に見られる細胞内の遺伝子発現変化をマイクロアレイによって調べ、得られた因子の細胞内生存シグナルや代謝制御における機能を解析した。

### ③代謝と環境の相互作用の治療標的としての検証

本研究項目では、研究項目①の研究で取得したマイクロアレイによる遺伝子発現データの情報解析を中心に研究を進めた。HT-29 由来  $\rho^0$  細胞とその  $\rho^0$ /xngft 変異株のデータを用い検討したところ、両者ともにグルコース飢餓環境下で UPR 標的遺伝子の発現が起こらないことに加え、発現変動する遺伝子群には大きな違いがないことが明らかになった。そこで、定常状態の  $\rho^0$ /xngft 変異株において特異的に発現が認められた遺伝子群を抽出し、その遺伝子発現シグネチャーについて、Gene Set Enrichment Analysis 等の高次の情報解析を進めたところ、 $\rho^0$ /xngft 変異株においては低酸素応答が恒常的に活性化していることが明らかになった（研究項目①参照）。さらに、HT-29 由来  $\rho^0$ /xngft 変異株の低酸素応答の恒常的発現に寄与する因子として、MIMA1 の同定に成功した（研究項目①参照）が、TCGA データベースを活用し情報解析を進めたところ、ヒト腎明細胞がんにおいては、MIMA1 の発現量とミトコンドリア呼吸鎖遺伝子群の発現が逆相関することを見出し、同変異株がヒト腎明細胞がんのモデルとなる可能性が考えられた。

一方で、UPR 制御因子等について治療標的としての検証実験への展開を図るため、レンチウイルスベクターを用い種々のノックダウン細胞株を樹立して検討を進めた。具体的には、PERK や TBL2 に加え、UPR 制御に関与する IRE1、ATF6、GRP78 の安定ノックダウン細胞を複数のがん細胞株を用いて樹立し、細胞増殖能、および、10 種類以上の抗がん剤に対する感受性を検討した。各分子のノックダウンについてはイムノブロット法にて確認した。いずれのノックダウン細胞株も、通常条件下での細胞増殖能や抗がん剤感受性については特に変化していないことが分かった。研究項目①に記したように、PERK や TBL2 の安定ノックダウン細胞（ヒト腎がん細胞 786-0）では、低グルコース・低酸素環境下に対して、高感受性を示したことから、ゼノグラフト形成試験を行ったところ、今回用いた条件では対照と比較して有意な腫瘍増殖能の差は認められなかった。しかしながら、ゼノグラフト形成した PERK ならびに TBL2 のノックダウン細胞株の遺伝子発現解析を行ったところ、対照細胞とは異なる発現パターンを示す遺伝子群が多数存在し、PERK や TBL2 が *in vivo* での腫瘍内環境への適応応答に何らかの影響を及ぼしていることが示唆された。

## IV 考察

本研究では、特になん細胞の解糖経路に依存した形質とがん微小環境で認められるグルコース飢餓環境との関係に注目し、こうした一見矛盾する状態に対してがん細胞がどのように対応して適応するのか、またそのような適応機構は新たな治療標的になるのかという観点から検討を進めてきた。こうした適応機構の研究を進めるにあたり、エネルギー代謝に重要な役割を果たしているミトコンドリアの機能を中心に据え、ミトコンドリア機能に依存して起こる、グルコース飢餓環境下でのストレス応答 UPR の制御機構と、ミトコンドリアが機能しない状態で起こる、がん細胞の新たな適応機構について検討した。これらの二つの視点からの研究は、グルコース飢餓環境下にあるがん細胞を標的とする治療法を考案する上で、相互に補完する関係にあり、有効なアプローチであると考えている。

グルコース飢餓環境下における UPR 誘導に対して、ミトコンドリアは必須の役割を果たしているが、本研究から、mTOR によるタンパク合成開始制御への関与が明らかになった。mTOR は、アミノ酸などの栄養分や増殖因子シグナルなどの細胞内外の環境情報を統合し、



それらに応じた細胞の成長や分裂、生存などを調節する役割を担っている。がんの分子標的としても大変注目されており、新たな阻害剤の開発も精力的に進められている。こうした mTOR 阻害剤の治療効果と UPR 抑制効果との関係も興味深い点であり、今後研究を展開していきたいと考えている。一方で、UPR による糖代謝制御、特に、解糖経路とミトコンドリア酸化リン酸化経路の切換え制御についての研究を継続したいと考えている。上記のように、グルコース飢餓による UPR の活性化にはミトコンドリア機能が必須であるが、逆に、UPR の活性化がミトコンドリア機能に作用し糖代謝の制御に関与する可能性が考えられる。本研究において樹立した PERK 等のノックダウン細胞では、こうした観点からの解析は、ノックダウン効率の問題等で十分に進めることができなかった。しかしながら、つい最近、選択的かつ強力な PERK 阻害剤が開発され、入手して予備的検討を行ったところ、グルコース飢餓をはじめとする小胞体ストレスへのがん細胞の感受性を強力に増大させることを見出し、こうした新たなツールを用いて、さらなる検討を加えたいと考えている。こうした方向の研究については、ミトコンドリアを直接の標的とした化合物の臨床開発は大変困難であるために、ミトコンドリアに直接作用しないドラッグブルな標的を明らかにすることが有用であるという点からも重要であると考えている。

一方、ミトコンドリアが機能しない状態で起こる、がん細胞の新たな適応機構についての検討については、従来の研究からは発想しにくい結果を得ることに成功した。特に、 $\rho^0/xngft$  変異株において、低酸素応答が恒常的に活性化し、それと合致して、転写因子 HIF-1 の恒常的活性化を見出すことに成功したこと、また、この恒常的な低酸素応答に関与する因子として、従来低酸素応答への関与の知られていなかった、MIMA1 の同定に成功したことは、新たな治療戦略を考案する上で、大変重要な発見であると考えている。こうした新治療戦略の対象についても、MIMA1 の発現量とミトコンドリア呼吸鎖遺伝子群の発現が逆相関するという点から、ヒト腎明細胞がんは大変興味深い候補と考えられ、今後さらなる検証実験を行っていききたいと考えている。

これらの研究に加えて、がん幹細胞の研究に新たに取り組んだ。種々の腫瘍組織においてがん幹細胞の存在が報告されているが、がん幹細胞のマーカー分子については研究グループにより異なるなど、まだ不確定な部分が多い。今回我々は、複数の候補マーカーについて、前立腺がん幹細胞マーカーとしての妥当性を比較検討し、CD151/CD166/TRA1-60 陽性分画がより優れたマーカーであるという結論を得た。ただし、マーカー陽性細胞の腫瘍源性やスフェア培養での濃縮率は用いるマーカーによって異なることから、がん幹細胞の分画については切り口により異なることもありうる。これらの点については、臨床材料での検討を含め、今後さらなる解析が必要である。他方、今回、スクリーニングにより、前立腺がん幹細胞に選択的と考えられる生存因子を絞り込んだ。この因子については、がんの微小環境下での生存や再発に関わることを示唆する結果を得ている。また、当該因子は、UPR 制御に関与する可能性を示すデータも得ており、その阻害剤探索を含めた今後の解析により、がんの治療改善につながる成果が期待できる可能性があると考えている。

最後に、本研究事業に貴重なご支援を賜りました公益財団法人車両競技公益資金記念財団にこの場をお借りして深謝申し上げます。

## V 研究成果の発表

1. Saito S, **Tomida A**. Use of chemical genomics in assessment of the UPR. **Methods Enzymol** 491:327-341, 2011.
2. Awale S, Linn TZ, Li F, Tezuka Y, Myint A, **Tomida A**, Yamori T, Esumi H, Kadota S. Identification of chrysopenetin from *Vitex negundo* as a potential cytotoxic agent against PANC-1 and a panel of 39 human cancer cell lines (JFCR-39). **Phytother Res** 25:1770-1775, 2011.
3. Ito Y, Nagasaki K, Miki Y, Iwase T, Akiyama F, **Matsuura M**, Horii R, Makita M, Tokudome N, Ushijima M, Yoshimoto M, Takahashi S, Noda T, Hatake K. Prospective randomized phase II study determines the clinical usefulness of genetic biomarkers for sensitivity to primary chemotherapy with paclitaxel in breast cancer. **Cancer Sci** 102:130-136. 2011.
4. Aida J, Yokoyama A, Izumiyama N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, Fujiwara M, Sawabe M, **Matsuura M**, Arai T, Takubo K. Alcoholics show reduced telomere length in the oesophagus. **J Pathol**, 223:410-416, 2011.
5. Seki S, Fujiwara M, **Matsuura M**, Fujita S, Ikeda H, Asahina I, Ikeda T. Prediction of outcome of patients with oral squamous cell carcinoma using vascular invasion and the strongly positive expression of vascular endothelial growth factors. **Oral Oncol**, 47:588-593, 2011.
6. **Mashima T**, Okabe S, Seimiya H. Molecular pharmacological approaches reveals potential new strategies to suppress androgen receptor signaling in prostate cancer. **Mol Cell Pharmacol** 3:7-12, 2011.
7. Matsuo J, Tsukumo Y, Saito S, Tsukahara S, Sakurai J, Sato S, Kondo H, Ushijima M, **Matsuura M**, Watanabe T, **Tomida A**. Hyperactivation of 4E-binding protein 1 as a mediator of biguanide-induced cytotoxicity during glucose deprivation. **Mol Cancer Ther** 11:1082-1091, 2012.
8. Saito S, Furuno A, Sakurai J, Park HR, Shin-ya K, **Tomida A**. Compound C prevents the unfolded protein response during glucose deprivation through a mechanism independent of AMPK and BMP signaling. **PLoS One** 7:e45845, 2012.
9. Matsunuma R, Oguchi M, Fujikane T, **Matsuura M**, Sakai T, Kimura K, Morizono H, Iijima K, Izumori A, Miyagi Y, Nishimura S, Makita M, Gomi N, Horii R, Akiyama F, Iwase T. Influence of lymphatic invasion on locoregional recurrence following mastectomy: indication for postmastectomy radiotherapy for breast cancer patients with one to three positive nodes. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 83:845-52, 2012.
10. Fujiwara T, Hiramatsu M, Isagawa T, Ninomiya H, Inamura K, Ishikawa S, Ushijima M, **Matsuura M**, Jones MH, Shimane M, Nomura H, Ishikawa Y, Aburatani H. ASCL1-coexpression profiling but not single gene expression profiling defines lung adenocarcinomas of neuroendocrine nature with poor prognosis. **Lung Cancer**, 75:119-125, 2012.
11. Ushijima M<sup>#</sup>, **Mashima T**<sup>#</sup>, **Tomida A**<sup>#\*</sup>, Dan S, Saito S, Furuno A, Tsukahara S, Seimiya

- H, Yamori T, **Matsuura M**\*. Development of a gene expression database and related analysis programs for evaluation of anticancer compounds. **Cancer Sci** 104: 360-368, 2013. (#: equal first authors, \*: corresponding authors)
12. Migita T, Okabe S, Ikeda K, Igarashi S, Sugawara S, **Tomida A**, Taguchi R, Soga T, Seimiya H. Inhibition of ATP citrate lyase induces an anticancer effect via reactive oxygen species: AMPK as a predictive biomarker for therapeutic impact. **Am J Pathol** 182:1800-1810, 2013.
  13. Aida J, Yokoyama A, Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Terai M, Poon S, **Matsuura M**, Fujiwara M, Sawabe M, Arai T, Takubo K. Telomere shortening in the esophagus of Japanese alcoholics: relationships with chromoendoscopic findings, ALDH2 and ADH1B genotypes and smoking history. **PLoS One** 8:e63860, 2013.
  14. Horii R, **Matsuura M**, Iwase T, Ito Y, Akiyama F. Comparison of dual-color in-situ hybridization and fluorescence in-situ hybridization in HER2 gene amplification in breast cancer. **Breast Cancer** 2013 Jan 12. [Epub ahead of print]
  15. Migita T, Okabe S, Ikeda K, Igarashi S, Sugawara S, **Tomida A**, Soga T, Taguchi R, Seimiya H. Inhibition of ATP citrate lyase induces triglyceride accumulation with altered fatty acid composition in cancer cells. **Int J Cancer** 135:37-47, 2014.
  16. Matsumura S, Yuge R, Sato S, **Tomida A**, Ichihashi T, Irie H, Iijima S, Shiba K, Yudasaka M. Ultrastructural Localization of Intravenously Injected Carbon Nanohorns in Tumor. **Int J Nanomedicine** in press.
  17. Wada Y, **Matsuura M**, Sugawara M, Ushijima M, Miyata S, Nagasaki K, Noda T, Miki Y. Development of detection method for novel fusion gene using GeneChip exon array. **J Clin Bioinforma** 4:3, 2014.
  18. **Mashima T**, Soma-Nagae T, Migita T, Kinoshita R, Iwamoto A, Yuasa T, Yonese J, Ishikawa Y, Seimiya H. TRIB1 supports prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival by regulation of endoplasmic reticulum chaperone expression. **Cancer Res** 2014 in press.
  19. Tsukumo Y, Tsukahara, S, Furuno A, Iemura Shun, Natsume T, **Tomida A**. TBL2 is a novel PERK-binding protein that modulates stress-signaling and cell survival during endoplasmic reticulum stress. submitted.
  20. Tsukumo Y, Tsukahara, S, Furuno A, Iemura Shun, Natsume T, **Tomida A**. The mRNA-protein complex consisting of TBL2-eIF2-60S ribosomal subunit-ATF4 mRNA potentially regulates ATF4 translation on the PERK pathway. in preparation.