



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

慢性骨髄性白血病細胞に対する中鎖脂肪酸誘導体の
抗がん作用とエネルギー代謝

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2016-07-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 篠原, 悠 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/54543

慢性骨髄性白血病細胞に対する
中鎖脂肪酸誘導体の抗がん作用とエネルギー代謝

Anti-cancer effects of medium-chain fatty-acid derivative through perturbation of
energy metabolism in chronic myeloid leukemia

2016

篠原 悠

目次

第1章 緒言	1
第2章 研究の背景と目的	
第1節 慢性骨髄性白血病の発症機構	4
第2節 慢性骨髄性白血病治療の変遷と問題点	6
第3節 がん細胞特異的エネルギー代謝機構: Warburg 効果	10
第4節 がん細胞における脂肪酸酸化の役割	13
第5節 中鎖脂肪酸の生理活性	15
第3章 慢性骨髄性白血病細胞に対する中鎖脂肪酸誘導体の増殖抑制作用	
第1節 序	17
第2節 慢性骨髄性白血病細胞株に対する中鎖脂肪酸誘導体の増殖抑制効果	18
第3節 中鎖脂肪酸誘導体によるオートファジー細胞死の誘導	19
第4節 BCR-ABL の発現に対する作用	23
第5節 がん細胞のエネルギー代謝に対する作用	25
第6節 中鎖脂肪酸誘導体の標的分子の探索	29
第7節 小括	31

第4章	がん細胞のエネルギー代謝に対する中鎖脂肪酸誘導体とイマチニブの比較	
第1節	序	33
第2節	中鎖脂肪酸誘導体およびイマチニブによる細胞死の比較	33
第3節	BCR-ABL と解糖系に対する作用	36
第4節	脂肪酸酸化に対する作用	38
第5節	白血病幹細胞における AIC-47 の有効性	42
第6節	小括	44
第5章	miR-124/PTBP1 カスケードによるがん細胞のエネルギー代謝制御	
第1節	序	47
第2節	miR-124 の組織分布	47
第3節	中鎖脂肪酸誘導体およびイマチニブによる miR-124 の発現変化	48
第4節	がんの発症過程における miR-124 の発現変化	49
第5節	miR-124 によるがん細胞のエネルギー代謝制御	51
第6節	小括	54
第6章	総括	56
	結語	60
	謝辞	61

実験の部	62
第3章に関する実験	69
第4章に関する実験	72
第5章に関する実験	76
参考文献	78
研究業績目録	86

第1章 緒言

ヒトゲノム計画終了後、様々な疾患の原因となる遺伝子の塩基配列が明らかになり、がんに対する創薬は発がんに関わるドライバー遺伝子産物に対する分子標的治療薬がトレンドとなった。最も成功した分子標的治療薬の1つが慢性骨髄性白血病 (chronic myeloid leukemia; CML) に対するイマチニブである。

CMLはt(9; 22) 転座由来のキメラ遺伝子 *BCR-ABL* を原因遺伝子とする造血器腫瘍であり、*BCR-ABL* の翻訳タンパク質が示す恒常的なチロシンキナーゼ活性により、がんとしての形質を獲得する。イマチニブを始めとしたチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) は *BCR-ABL* の ATP 結合部位を選択的に阻害することで下流のシグナルを不活化し優れた増殖抑制作用を示す。TKI の導入によって CML の治療成績は飛躍的に向上したが、TKI に対する耐性の獲得や残存した白血病幹細胞による再発が問題となっており、TKI 単剤による CML の根治は難しい。そのため、TKI 非感受性細胞に対しても有効な治療薬の開発が望まれている。

分子標的治療薬はドライバー遺伝子産物のタンパク質立体構造に依存して作用することから、変異による耐性の獲得が高頻度で生じる。また、再発の原因となる幹細胞は、ヘテロな遺伝子発現を有しドライバー遺伝子非依存的に生存しているため分子標的治療薬に対する感受性が低い。これらのことから、TKI 非感受性細胞の治療には従来の抗がん剤とは異なる作用点を持つ薬剤が必要であると考えられる。近年、新たな創薬のターゲットとして注目されているのが、がん細胞のエネルギー代謝である。がん細胞は低酸素・低栄養環境で生存するために代謝のリプログラミングを行っている。その代謝機構をターゲットとする治療法が白血病細胞のみならず白血病幹細胞にも有効であることが明らかにされつつある。

本研究では、CML に対する新規治療薬の創薬シーズとして中鎖脂肪酸誘導体

の有用性を評価した。これまでの研究では長鎖および短鎖脂肪酸に焦点が当てられており、これらの脂肪酸に関しては抗がん活性を始めとして様々な知見が得られている。しかしながら、ヒトにおける中鎖脂肪酸の生理活性はこれまでほとんど報告されておらず、抗がん剤のシーズとしても注目されてこなかった。本研究では、中鎖脂肪酸誘導体の抗がん活性を評価し、その作用メカニズムをエネルギー代謝という観点から解明した (第 3 章)。続いてイマチニブと中鎖脂肪酸誘導体との作用点の違いを検証し、中鎖脂肪酸誘導体のドライバー遺伝子産物非依存的な作用点を明らかにした (第 4 章)。さらに、がん細胞特異的なエネルギー代謝機構の獲得とがん化の過程との関連性について検討を加え、エネルギー代謝ががん治療の有用なターゲットとなることを示した (第 5 章)。

本学位論文は、下記の原著論文をもとに作成し岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科に提出したものである。

- (1) Perturbation of energy metabolism by fatty-acid derivative AIC-47 and imatinib in BCR-ABL-harboring leukemic cells.
Haruka Shinohara, Minami Kumazaki, Yosuke Minami, Yuko Ito, Nobuhiko Sugito, Yuki Kuranaga, Kohei Taniguchi, Nami Yamada, Yoshinori Otsuki, Tomoki Naoe, Yukihiro Akao.
Cancer Letters; **371** (1): 1-11 (2016).

- (2) Anti-cancer fatty-acid derivative induces autophagic cell death through modulation of PKM isoform expression profile mediated by bcr-abl in chronic myeloid leukemia.
Haruka Shinohara, Kohei Taniguchi, Minami Kumazaki, Nami Yamada, Yuko Ito, Yoshinori Otsuki, Bunji Uno, Fumihiko Hayakawa, Yosuke Minami, Tomoki Naoe, Yukihiro Akao.
Cancer Letters; **360** (1): 28-38 (2015)

- (3) MicroRNA-124 inhibits cancer cell growth through PTB1/PKM1/PKM2 feedback cascade in colorectal cancer.
Kohei Taniguchi, Nobuhiko Sugito, Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Nami Yamada, Yoshihito Nakagawa, Yuko Ito, Yoshinori Otsuki, Bunji Uno, Kazuhisa Uchiyama, Yukihiro Akao.
Cancer Letters; **363** (1) 17-27 (2015)

第2章 研究の背景と目的

第1節 慢性骨髄性白血病の発症機構

CMLは多能性造血幹細胞の腫瘍化によって発症する疾患であり、t(9; 22) 転座により形成されるフィラデルフィア (Philadelphia; Ph) 染色体 を特徴とする^{1,2)}。この転座染色体上に形成されるキメラ遺伝子 *BCR-ABL* は、CMLのドライバー遺伝子として機能することが知られている (Fig. 1A)³⁾。また、多くの固形腫瘍は複数の遺伝子に多段階的に変異が生じることで発症するのに対し、CMLは1つの遺伝子変異 *BCR-ABL* のみで発症することが明らかにされている⁴⁾。*BCR-ABL*の転写産物および翻訳タンパク質は、*ABL* 遺伝子のものとは全く異なる性質を示す⁵⁾。*ABL* が自己調節性のリン酸化能を有するのに対し、*BCR-ABL* は *BCR* のもつ重合能により二量体もしくは四量体を形成して分子間でのリン酸化が可能になるため、恒常的なチロシンキナーゼ活性を示す⁶⁾。このキナーゼ活性により細胞増殖、細胞周期の亢進、プログラム細胞死への耐性に関わる様々なシグナルが活性化され、白血病細胞の異常な増殖が可能になる (Fig. 1B)^{1,7,8)}。

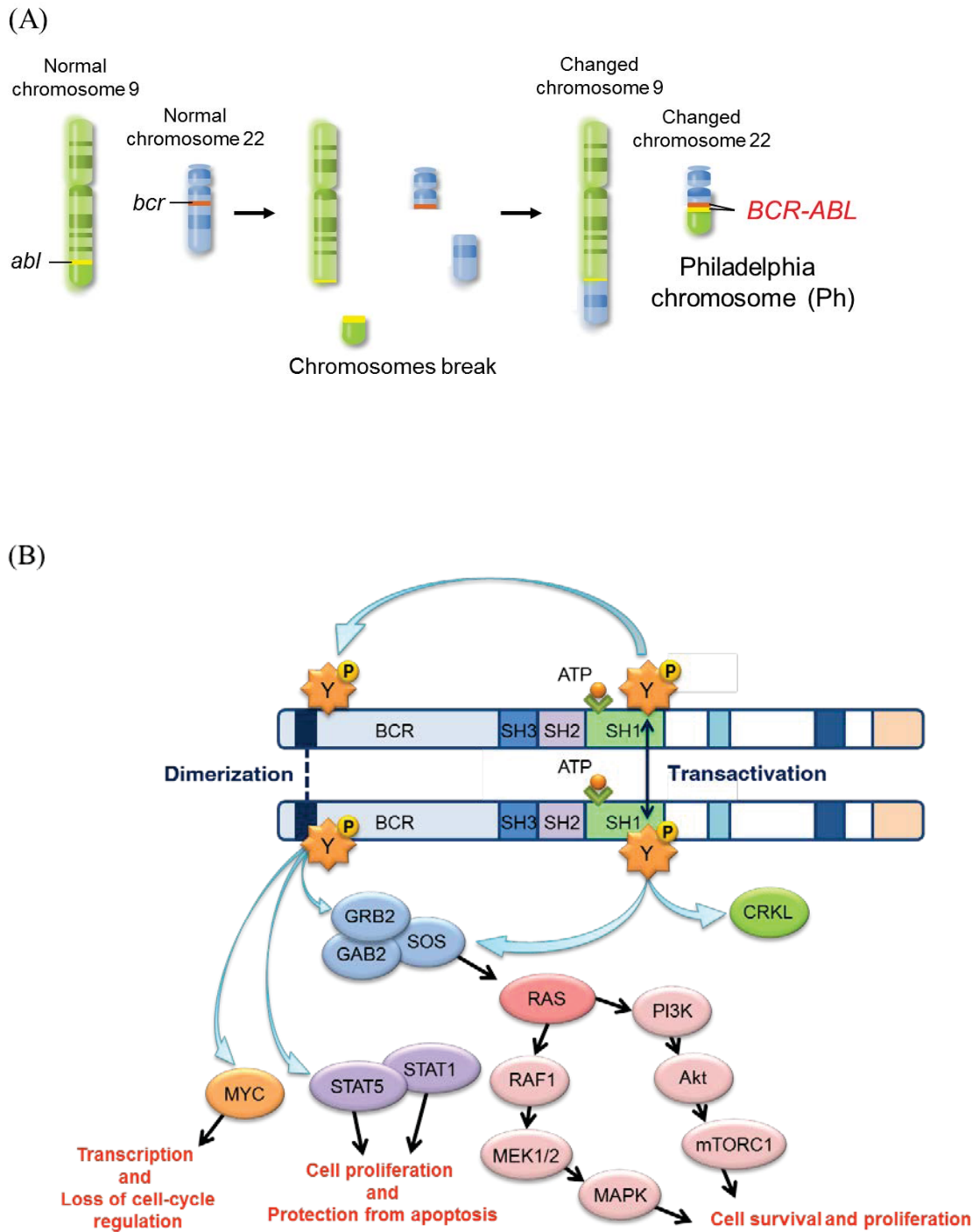


Fig. 1 Pathogenic mechanism of chronic myeloid leukemia (CML)

(A) The generation of the *BCR-ABL* fusion gene. (B) The molecular pathway activated by *BCR-ABL*.

第2節 慢性骨髄性白血病治療の変遷と問題点

CMLはWHO分類の基準により定義された3つの病期、すなわち白血病や血小板の増加を認めるが自覚症状の乏しい慢性期 (chronic phase: CP)、顆粒球の分化異常が進行する移行期 (accelerated phase: AP)、未分化な芽球が増加する急性転化期 (blast crisis phase: BP) を経て進行する⁹⁾。約85%の患者がCP期で診断されることから、CML治療はPh⁺細胞のコントロールと病期進行の回避を目標として行われる¹⁰⁾。これまでのCML治療では、ブスルファンやヒドロキシウレアによる化学療法、インターフェロン α (IFN α) 療法が行われてきた。化学療法ではPh⁺細胞数のコントロールは可能であったが、5年生存率は38%、10年生存率は17%であり生存期間の延長は困難であった。続いて登場したIFN α 療法では5年生存率が63%と生存期間の延長が認められたが、10年生存率は29%であり長期成績の改善には至らなかった (Fig. 2)¹¹⁾。

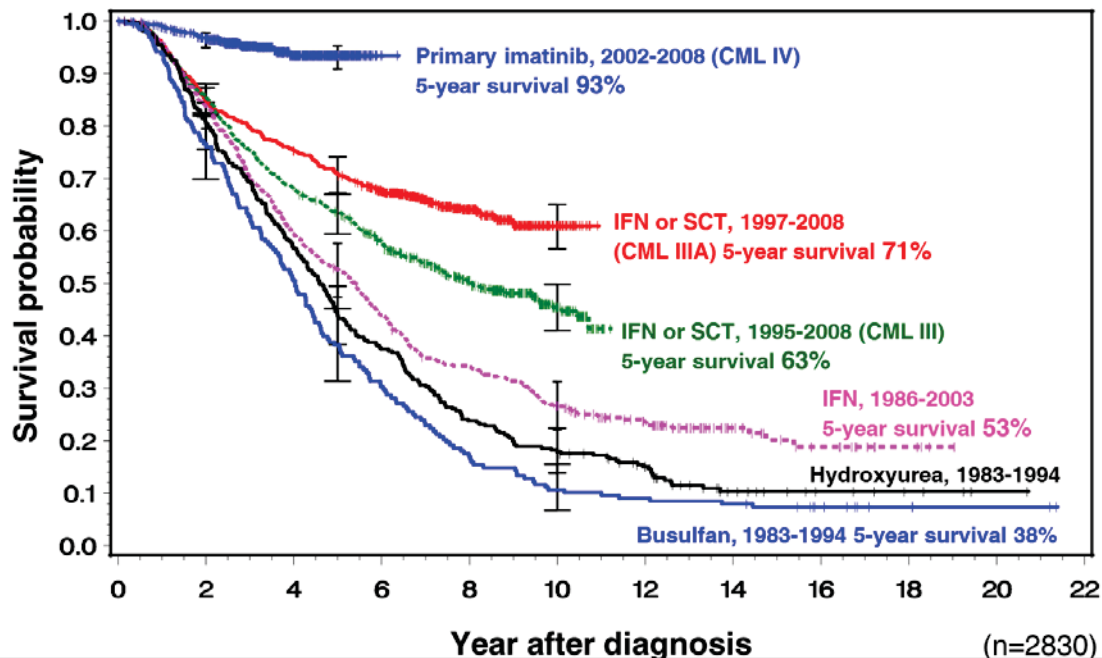


Fig. 2 Change of the treatment and survival of patients with CML

(German CML Study Group, 2008 より抜粋)

ヒトゲノム計画終了後、がん治療を目標とした創薬はドライバー遺伝子産物に対する分子標的治療薬がトレンドとなった。CML に対する BCR-ABL 選択的チロシンキナーゼ阻害剤 (tyrosine kinase inhibitor; TKI) はその代表的な薬剤の 1 つである。最初に開発された TKI であるイマチニブは、5 年生存率 93%、8 年生存率 85% と優れた長期成績を示したことから、IFN α に替わって CP 期の CML に対する第一選択薬となった (Fig. 2)¹²⁾。現在は、第一世代のイマチニブ、第二世代のニロチニブ、ダサチニブ、ボスチニブ、第三世代のポナチニブが開発されており、ニロチニブおよびダサチニブも第一選択薬として承認されている。

BCR-ABL チロシンキナーゼは ATP binding site に ATP を結合し、そのリン酸基によって基質のチロシン残基をリン酸化する。イマチニブを始めとする TKI は、ATP binding site に結合することで ATP の結合を競合的に阻害し、基質のリン酸化とそれに続く下流シグナルの活性化を抑制する (Fig. 3A)¹³⁾。その結果、Ph⁺細胞選択的に増殖抑制とアポトーシスが誘導される¹⁴⁾。一部の急性リンパ性白血病 (acute lymphoblastic leukemia; ALL) においても Ph 染色体が観察され、同様の作用機序で TKI が有効性を示すことから、Ph⁺ALL に対しても TKI が使用されている¹⁵⁾。

TKI の導入により CML の治療成績は飛躍的に向上したが、TKI に対する耐性の獲得や断薬後の再発が大きな問題となっている。イマチニブに対する耐性の獲得機構としては、BCR-ABL 依存性と非依存性のものが考えられている。これまでに報告されている主な機構を Table 1 にまとめた。

Mechanism of imatinib-resistance	References
BCR-ABL-dependent	
キナーゼドメインの点突然変異 (Point mutation)	16,17)
<i>BCR-ABL</i> 遺伝子の増幅 (Amplification)	18)
<i>BCR-ABL</i> 遺伝子の選択的スプライシング (Alternative splicing)	19)
BCR-ABL-independent	
白血病幹細胞 (Stem cell)	20,21)
イマチニブ結合タンパク α -1-acid glycoprotein の増加	22,23)
multi-drug resistance (MDR) による薬剤の排出亢進	24)
アポトーシス誘導因子 Bim の遺伝子多型	25)
代替シグナルの活性亢進	24,26)

Table 1 Mechanism of resistance to imatinib in CML

これらの機構の中で、BCR-ABL キナーゼドメインの点突然変異が最も高頻度であることが報告されている¹⁶⁾。点突然変異が生じるとキナーゼドメインに存在するアミノ酸の1つが別のアミノ酸に置換され、タンパクの立体構造が変化する。その結果、BCR-ABL とイマチニブとの結合親和性が低下し、チロシンキナーゼ活性の阻害とそれに続く増殖抑制とアポトーシスが誘導されにくくなる (Fig. 3B)。耐性の獲得は特に AP 期、BP 期の患者に多く、予後を悪化させることが報告されている²⁷⁾。

また、CML の再発には白血病幹細胞の残存が関与していることが知られている。白血病幹細胞は細胞周期から脱し、静止期 (G₀ 期) に止まっているために TKI に対する感受性が低いことが明らかにされている²⁸⁾。白血病幹細胞では BCR-ABL のキナーゼ活性非依存的に細胞の生存が維持されることから、TKI 単

剤での治療は困難である²⁰⁾。さらに、TKIの服薬を中断すると2年以内に約60%の患者で再発することが報告されており²⁹⁾、現在のところTKIを中止できる基準はなく、分子遺伝学的完全奏功が得られても治療を続けることが勧められている。一般に分子標的治療薬は薬剤費が高額であり、経済的な負担が大きいことから治療の続行が難しくなってしまうケースが少なくない³⁰⁾。そのため、比較的安価に提供することができ、再発の原因になる白血病幹細胞にも有効な新規治療薬の開発が望まれている。白血病幹細胞を根絶させるための治療法の研究は、近年盛んに行われている。BCR-ABLの下流分子mTORの阻害剤とTKIとの併用^{31,32)}や、白血病幹細胞の細胞周期を静止期から通常の周期に追い出すような治療法³³⁾が提案されている。また、白血病幹細胞が特異的に利用しているジペプチドの取り込みを阻害する薬剤とTKIとの併用が有効であることも報告されており³⁴⁾、CMLの根治にエネルギー代謝の制御が有用である可能性が示唆されている。

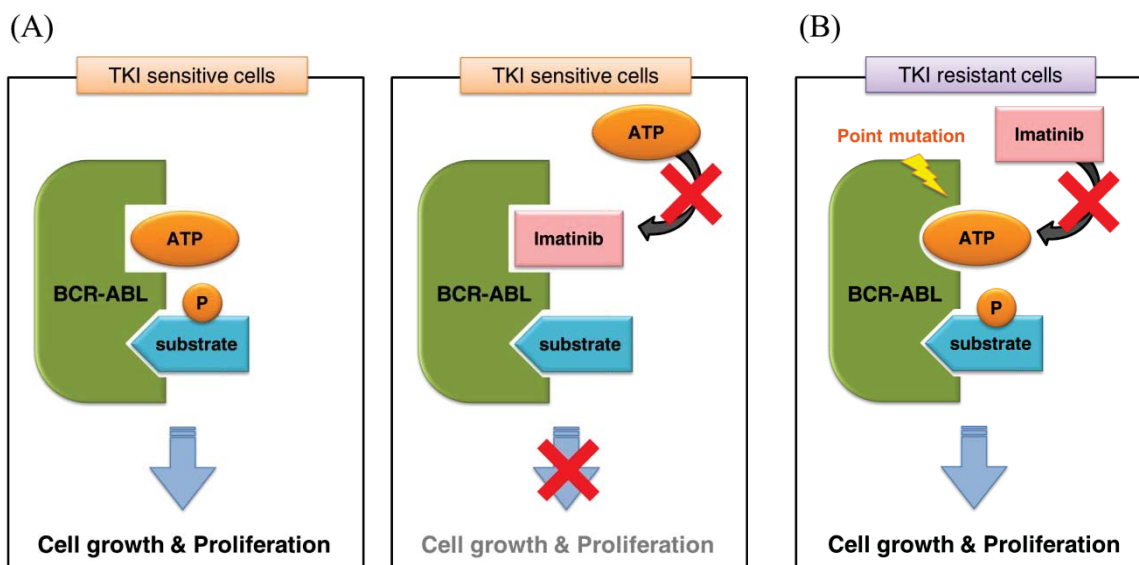


Fig. 3 Schematic mechanism of anti-cancer effects of imatinib and acquisition of TKI resistance

第3節 がん細胞特異的エネルギー代謝機構: Warburg 効果

近年、がんに対する新たな創薬のターゲットとしてエネルギー代謝が注目されている³⁵⁾。がん細胞は低酸素・低栄養状態において限られたエネルギー源を有効利用するために代謝機構のリプログラミングを行っている³⁶⁾。その1つが「Warburg 効果」という現象である。Warburg 効果は、「がん細胞は好氣的条件下においても TCA サイクルを活用せず、常に嫌氣的解糖を利用してグルコースを代謝し、大量の乳酸を分泌する」という現象を Otto Warburg が提唱したものである^{37,38)}。がん細胞が Warburg 効果を獲得するのに重要な役割を果たしている分子が、pyruvate kinase muscle (PKM) である^{39,40)}。Warburg 効果の獲得機構を Fig. 4 に示した。

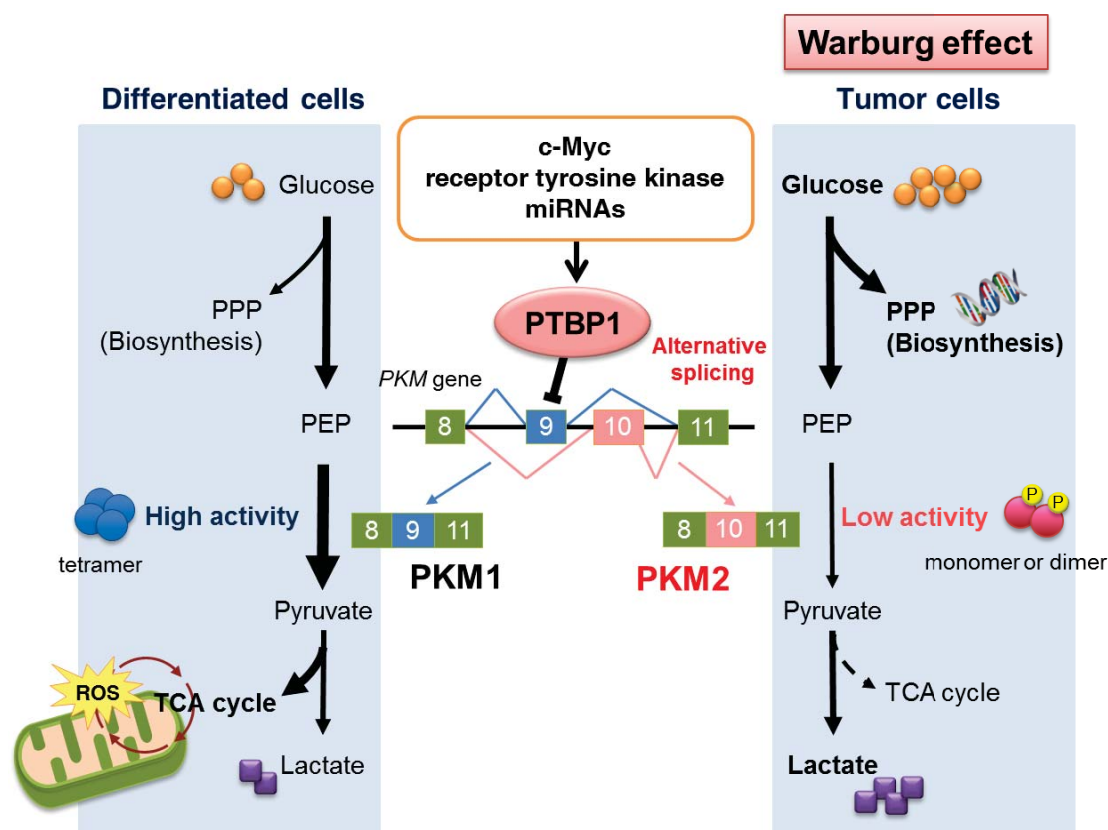


Fig. 4 Cancer-specific energy metabolism “Warburg effect”

PKM, pyruvate kinase muscle; PTBP1, polypyrimidine tract-binding protein 1; PPP, Pentose phosphate pathway; PEP, phosphoenolpyruvate

PKM は解糖系の最終ステップであるホスホエノールピルビン酸 (PEP) からピルビン酸への反応を触媒する酵素であり、解糖系の律速酵素として働く⁴¹⁾。PKM には PKM1 と PKM2 の 2 つのアイソザイムが存在し、スプライシング過程においてエクソン 8、9、11 を取り込むと PKM1、エクソン 8、10、11 を取り込むと PKM2 が作られる^{39,42)}。がん細胞においてはスプライサーである hnRNP A1、hnRNP A2、polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTBP1) が高発現することでエクソン 9 の取り込みが阻害され、エクソン 10 を取り込んだ PKM2 が高発現することが知られている^{43,44)}。筆者らはほぼすべてのがん種において PKM2 が高発現していることを確認している⁴⁵⁾。

TCA サイクルを介したグルコース代謝ではグルコース 1 モル当たり 36 ATP が産生されるのに対し、解糖系では 2 ATP しか産生することができないため ATP の産生効率が低い。しかしながら、解糖系は TCA サイクルと比較して反応ステップが単純であるため ATP の産生速度が早く、がん細胞はグルコースの取り込みを亢進させることで大量の ATP 産生を可能にしている^{46,47)}。また、解糖系の使用には 2 つの利点が挙げられる (Fig. 4)。1 つ目は TCA サイクルの過程で発生する活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) の発生を抑制できることである^{38,48)}。細胞内で過剰産生された ROS はアポトーシスやオートファジーなどのプログラム細胞死の原因となるため⁴⁹⁾、解糖系を使用することで ROS の発生を抑制していると考えられている。2 つ目は、解糖系の中間代謝産物を利用した核酸合成が可能になることである^{38,39)}。PKM1 が常に活性型の四量体で存在するのに対し、PKM2 は比較的活性の低い単量体もしくは二量体で存在する。この多量体化の制御機構には PKM2 のチロシンリン酸化が関与しており、リン酸化を受けた PKM2 は四量体の形成が困難になる⁵⁰⁾。PKM2 をリン酸化する上流分子としては、FGFR、JAK2 の他に BCR-ABL が報告されている⁵⁰⁾。PKM2 のキナーゼ

活性が低い状態に保たれることで、細胞内では解糖系の中間代謝産物が蓄積しやすくなる。細胞はこの中間代謝産物をペントースリン酸経路 (PPP) に動員し、細胞分裂に必要な核酸の合成に使用している³⁹⁾。

PKM 遺伝子のスプライサーである *PTBP1* の発現制御には、*c-Myc*⁴⁴⁾、受容体型チロシンキナーゼ⁵¹⁾などの関与が知られており、筆者らも *PTBP1* をターゲットとする microRNA (miRNA, miR) による発現調節を報告している⁴⁵⁾ (**Fig. 4**)。miRNA は 18~25 塩基から成る一本鎖の non-coding RNA であり、標的とする mRNA の 3'非翻訳領域 (UTR) 領域の相補的配列部位に結合することでその翻訳を負に制御する⁵²⁾。miRNA は遺伝子の転写後発現調節を担うことで、生物の発生⁵³⁾、細胞死⁵⁴⁾、分化⁵⁵⁾、細胞増殖⁵⁶⁾といった生命現象を制御するだけでなくがんの発症や進行との関連性^{52,57)}も示唆されている。miRNA に関するデータベース、Target Scan 6.2 database (<http://www.targetscan.org/>) および miRBase (<http://www.mirbase.org/>) では、*PTBP1* を標的とする miRNA は miR-1、miR-9、miR-124、miR-133、miR-137 の 5 つが示されており、このうち miR-124 および miR-133 は *PTBP1* の 3'UTR 領域内に 2 か所の相補的配列部位を有している。筆者らは大腸がん患者のがん部において miR-124 および miR-133 の発現が低下しており、がん部における *PKM2* の高発現に寄与していることを報告してきた⁴⁵⁾。しかしながら、がんの発症過程におけるこれらの miRNA の発現変化は今まで明らかにされていない。

以上の通り、Warburg 効果はがん細胞の増殖、生存、エネルギーの獲得にアドバンテージを与える極めて重要な機構である。白血病、大腸がんを始めとした様々ながん種において、解糖阻害剤の併用が抗がん剤の感受性を高めることが報告されており³⁵⁾、Warburg 効果を破綻させる治療法が治療成績の向上や薬剤耐性の克服に期待されている。

第4節 がん細胞における脂肪酸酸化の役割

前述の通り、がん細胞においては Warburg 効果によるグルコースを中心としたエネルギー代謝で ATP が産生される。しかしながら、細胞内の ATP 需要が過剰になるとグルコースのみならず脂肪酸をエネルギー源として ATP を産生することが知られている^{58,59)}。脂肪酸酸化 (fatty-acid oxidation; FAO) は Fig. 5 に示すようなステップを経て進行する。まず、脂肪酸は細胞質内で脂肪酸アシル-CoA に変換され、カルニチンと結合した後にミトコンドリア内に取り込まれる。このカルニチンとの結合を触媒する酵素 carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) が反応全体の律速酵素である⁶⁰⁾。ミトコンドリアのマトリックス内に取り込まれた脂肪酸は再び脂肪酸アシル-CoA に再生され、トランス- Δ^2 -エノイル化、水和、脱水素化、チオリシスの4つのステップを経て β 位から順に切断され、最終的にアセチル-CoA になる。アセチル-CoA は TCA サイクルを介した電子伝達系により ATP に変換される。また、反応過程で生じる FADH₂ および NADH₂ も電子伝達系を介して ATP 合成に使用される。

脂肪酸酸化の律速酵素である CPT1 には3つのアイソフォーム、CPT1A (肝臓型)、CPT1B (筋肉型)、CPT1C (脳型) が存在するが、がん細胞における脂肪酸酸化の活性化には CPT1C の発現亢進が関与している^{60,61)}。BCR-ABL⁺細胞において S6K1 シグナルの阻害により解糖系を抑制しても細胞死は誘導されず、CPT1C の発現増加を介して脂肪酸酸化が活性化され、細胞のエネルギー産生および生存が維持されることが報告されている⁶²⁾。また、脂肪酸酸化の活性化は白血病細胞に対する薬剤感受性の低下を誘導することも知られている²⁰⁾。がん細胞におけるエネルギー代謝の研究は、グルコース代謝を中心に進められてきたことから、脂肪酸酸化に関しては議論が待たれている部分も多い。脂肪酸酸化は解

糖系の代償性機構として機能することが既に報告されているが、Warburg 効果との直接的な関連性に関しては明らかにされていない。

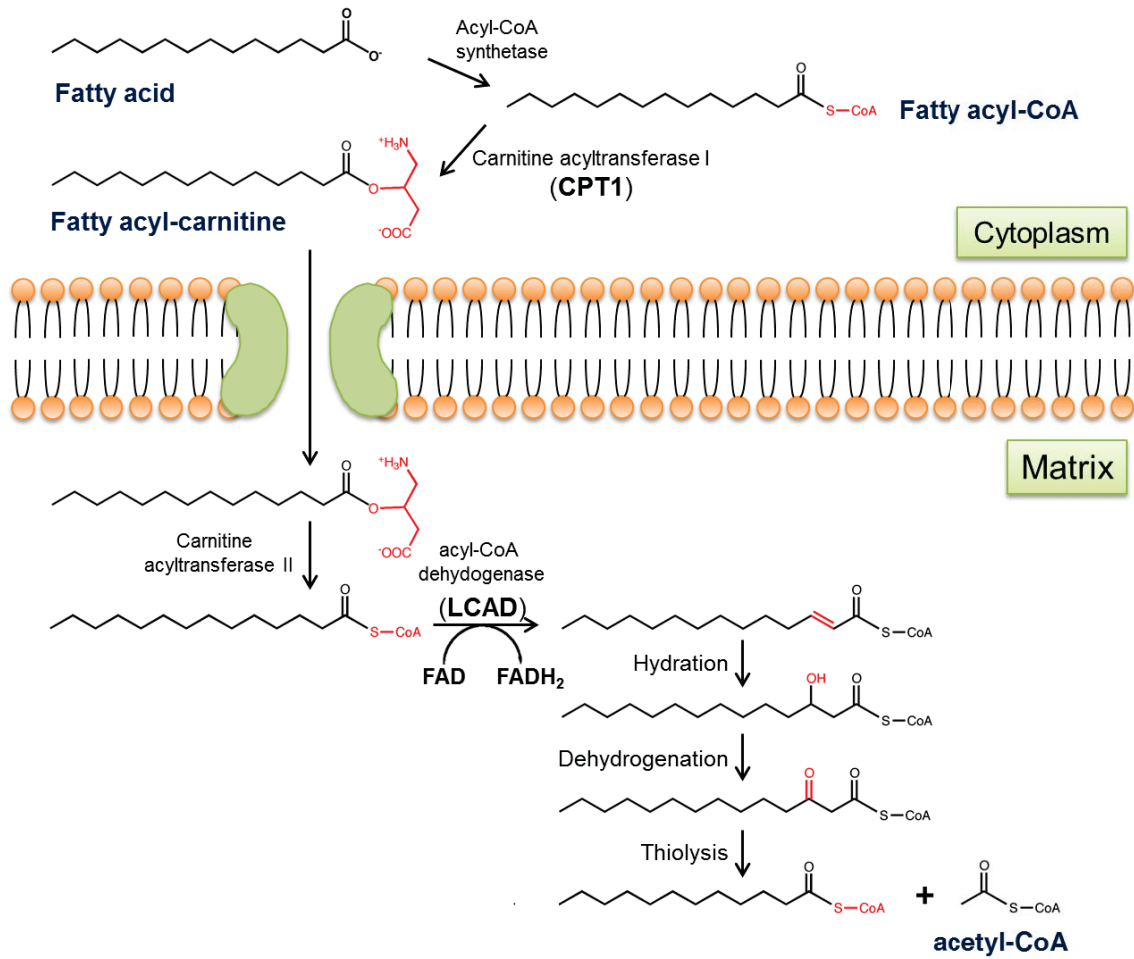


Fig. 5 Metabolic pathway of fatty-acid oxidation (FAO)

第5節 中鎖脂肪酸の生理活性

脂肪酸は、主鎖を構成する炭素数により短鎖脂肪酸 (C6 以下)、中鎖脂肪酸 (C8~14)、長鎖脂肪酸 (C16 以上) に分類される⁶³⁾。長鎖脂肪酸には植物由来のオレイン酸、リノール酸、魚油由来のエイコサペンタエン酸 (EPA)、ドコサヘキサエン酸 (DHA) などが分類される。これらの長鎖脂肪酸に関してはこれまでに積極的な研究が進められ、栄養学および医薬学的な面での知見が多数得られてきた⁶⁴⁻⁶⁶⁾。短鎖脂肪酸についてもブチル酸 (C4) およびその誘導体による抗がん活性、免疫抑制作用などが報告されており、その生理機能が明らかにされつつある^{67,68)}。しかしながら、中鎖脂肪酸とヒトとの関わりについての研究は極めて少数に留まっている。ヒトの生体内においては脂肪酸酸化により一時的に中鎖脂肪酸が存在するが、中間代謝物として止まることなくアセチル-CoA まで代謝される (Fig. 5)。一方、植物界ではサンショウの辛味成分などが^{63,69)}、動物界では昆虫のフェロモン類が中鎖脂肪酸で構成されており⁷⁰⁾、植物や昆虫類は中鎖脂肪酸を生体内に止めて利用し、種の保存に役立てている。

そこで、筆者らはヒトにおける中鎖脂肪酸およびその誘導体の生理活性の探索を目的として約 800 種の中鎖脂肪酸誘導体を合成し、中鎖脂肪酸誘導体ライブラリーを作製した。筆者はこのうち 102 種の誘導体に関して抗がん活性のスクリーニングを行い、3-デセン酸誘導体に強い活性を見出した⁷¹⁾ (Fig. 6)。デセン酸 (10-hydroxy-2-decenoic acid) はミツバチが作るローヤルゼリー中に含まれる中鎖脂肪酸であり、抗がん活性を有することが既に報告されているが⁷²⁾、活性が弱く、作用メカニズムが不明であったことからその用途は健康食品のみに留まっていた。ヒト CML 細胞株 K562 細胞を用いた構造活性相関の検討により、3-デセン酸が抗がん活性の核となる構造であり、アミドまたはエステル誘導体に変換することでその活性が顕著に上昇することが明らかとなった。特に、アミ

ド誘導体である (*E*)-1-(azocan-1-yl) dec-3-en-1-one (AIC-47) は K562 に対し、既存の抗がん剤であるエトポシドとほぼ同等の抗がん作用を示し⁷¹⁾ (Fig. 6)、CML に対する新規治療薬の創薬シーズとなる可能性が示唆された。

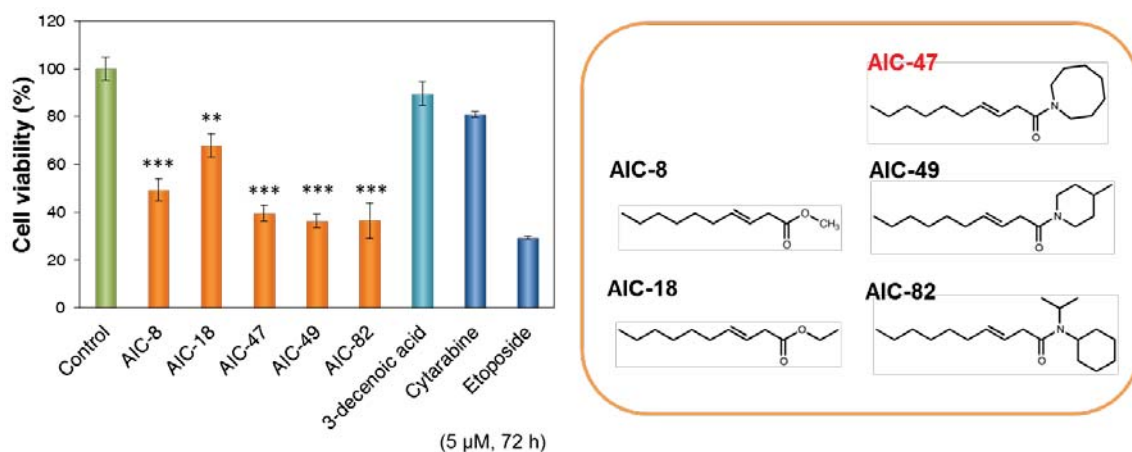


Fig.6 Anti-cancer effects of medium-chain fatty-acid derivatives on K562 cells

Left panel shows growth inhibition at 72 h after treatment of medium-chain fatty-acid derivatives (AIC-8, -18, -47, -49, -82), 3-decenoic acid, Cytarabine or Etoposide in human CML K562 cells. Data are expressed as the means \pm SD of 3 different experiments. Right panel shows chemical structures of AIC-8, -18, -47, -49, -82.

(Shinohara *et al.*, 2013 より抜粋)

そこで本研究では、CML に対する新規治療薬としての有効性が示唆された中鎖脂肪酸誘導体 AIC-47 について

- 1) これまで不明であった中鎖脂肪酸の抗がん活性の作用機序を解明すること
- 2) 第一選択薬として使用されているイマチニブとの作用の違いを明らかにし、イマチニブ抵抗性を示す白血病幹細胞に対する有効性を評価することを目的とし、がん細胞のエネルギー代謝という観点から研究を展開した。

第3章 慢性骨髄性白血病細胞に対する中鎖脂肪酸誘導体の増殖抑制作用

第1節 序

脂肪酸の生理活性に関するこれまでの研究は、長鎖および短鎖脂肪酸に焦点を当てたものであり、ヒトにおける中鎖脂肪酸の生理活性はほとんど明らかにされていない。デセン酸はローヤルゼリーに含まれる中鎖脂肪酸の一種であり、白血病モデルマウスにおける抗がん活性が報告されているが⁷²⁾、その詳細な作用メカニズムはいまだ不明である。そこで本章では、中鎖脂肪酸誘導体ライブラリーより見出した (*E*)-1-(azocan-1-yl) dec-3-en-1-one (AIC-47) について、ヒト CML 細胞株に対する増殖抑制効果を検討し、増殖抑制メカニズムの解明を試みた。

第2節 慢性骨髄性白血病細胞株に対する中鎖脂肪酸誘導体の増殖抑制効果

2種のヒトCML細胞株K562およびKCL-22にAIC-47を添加し、72時間後の細胞生存率をトリパンプルー色素排除試験法により測定した。その結果、AIC-47は1 μM 以上の濃度で有意な増殖抑制作用を示した (Fig. 7)。次に、正常細胞に対するAIC-47の増殖抑制を検討するため、正常ヒト末梢血リンパ球に対する効果を検討した。分裂促進剤Concanavalin Aで刺激後のヒト末梢血リンパ球にAIC-47を作用させたところ、10 μM 以下の濃度では細胞生存率の低下は認められなかった (Fig. 7)。以上の結果から、AIC-47はがん細胞特異的に増殖抑制作用を示すことが示唆された。

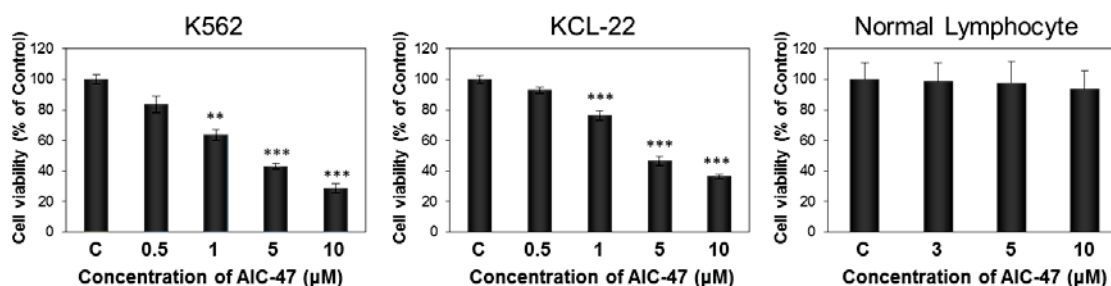


Fig. 7 Anti-cancer effects of medium-chain fatty-acid derivative AIC-47 in human CML cells and normal lymphocytes

Effects of AIC-47 on cell growth of K562 and KCL-22 cells, and mitogen-stimulated human blood lymphocytes. Cells were treated with DMSO (Control) or AIC-47 for 72 h. Human peripheral blood lymphocytes were stimulated with Concanavalin A for 48 h and treated with DMSO or AIC-47.

第3節 中鎖脂肪酸誘導体によるオートファジー細胞死の誘導

AIC-47による増殖抑制作用を解明するため、細胞の表現型すなわち細胞死の形態を検証した。細胞死は大きく分類してプログラム細胞死と非プログラム細胞死に分けられる。さらにプログラム細胞死は形態学上の違いから、アポトーシス、オートファジー細胞死、ネクロトーシスの3つに分類することができる⁷³⁾。脂肪酸による細胞増殖抑制作用のメカニズムとしては、アポトーシス^{64,67)}、オートファジーの誘導⁷⁴⁾によるものが知られており、筆者はAIC-47がアポトーシスを誘導しないことを既に報告している⁷¹⁾。そこで、オートファジー関連シグナル (**Fig. 8**) について解析を行った。

オートファジーは、一般に栄養飢餓など様々なストレス条件下において活性化され、細胞の生存促進機構として働く。また、オートファジーは細胞内の異常タンパク質や損傷を受けたオルガネラを分解し、細胞の恒常性を維持するための生理的な細胞機能でもある。一方、細胞に強いストレスが長期間加わった際にはオートファジーが無秩序に亢進し、細胞死誘導機構として作用する⁷⁵⁾。オートファジーシグナルは**Fig. 8**に示す伝達経路により活性化される。増殖・生存シグナルの不活化によりオートファジーシグナルが誘導されると、Beclin-1を含む複合体が形成される。この複合体形成を介して細胞内に隔離膜が生じ、膜上にAtg5複合体が結合することで膜が伸長する。Atg3およびAtg7によって切断されたLC3 IがLC3 IIとなり、膜上に結合することでさらに膜の伸長が進み、膜内にp62を足場としてタンパク質やオルガネラなどが取り込まれてオートファゴソームが形成される。オートファゴソームの形成にLC3 IIが必須であることから、LC3 IからLC3 IIへの移行はオートファゴソームマーカーとして使用されている⁷⁶⁾。オートファゴソームはリソソームと融合し、オートリソソームとなる。オートファゴソーム内のタンパク質やオルガネラは

リソソーム内の加水分解酵素で分解され、アミノ酸となってストレス応答に必要なタンパク質の合成に再利用される⁷⁷⁾。また、オートファゴソームの膜内に結合した LC3 II および p62 も同時に分解されることから、p62 もオートファジー特異的分子マーカーとなることが知られている⁷⁶⁾。

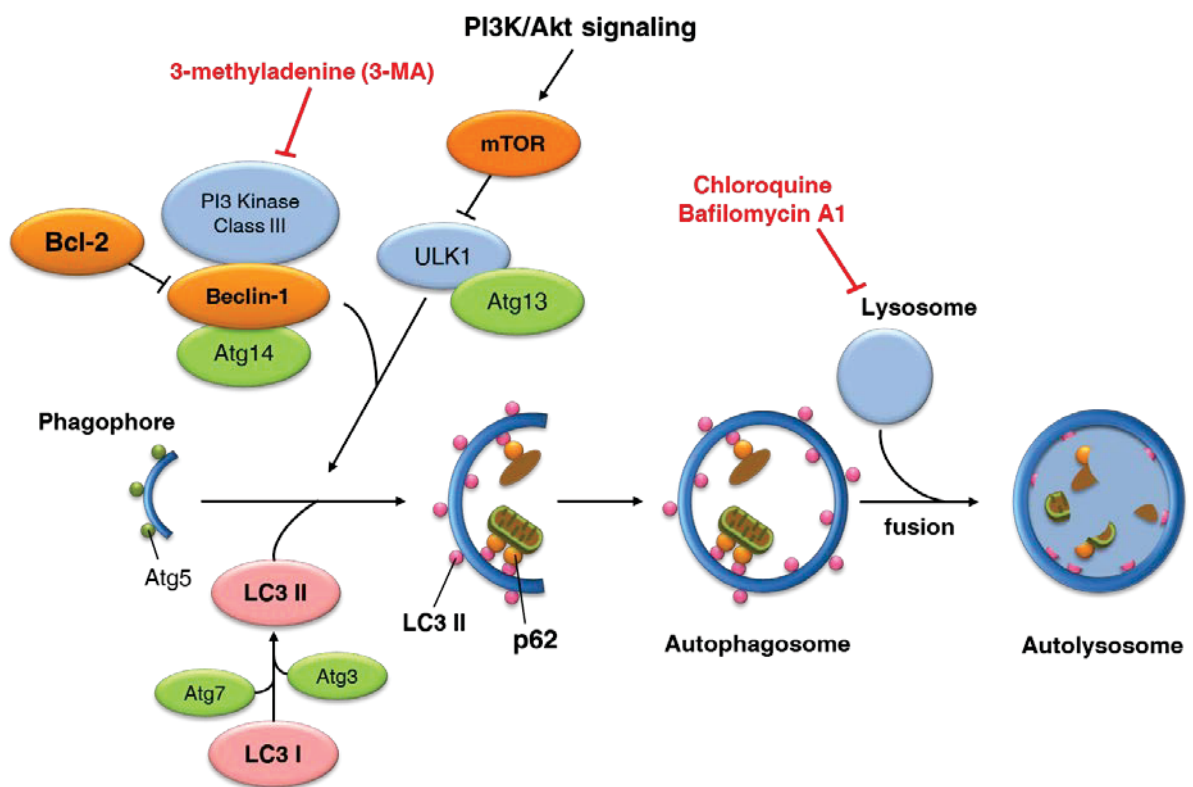


Fig. 8 Schematic diagram of the autophagy signaling pathway.

まず、オートファジーシグナルをウェスタンブロットにより検証した。AIC-47 添加細胞では、オートファゴソームの形成を示唆する LC3B I から II への移行、上流シグナルである Bcl-2 の発現低下とそれに伴う Beclin-1 の発現増加、および増殖シグナルである PI3K/Akt/mTOR シグナルの不活化が観察された (**Fig. 9A**)。さらに、電子顕微鏡解析により AIC-47 添加後の K562 細胞の形態学的変化を検証したところ、細胞内にオートファゴソームの形成が観察された。さらにオートファゴソーム内には脂肪滴 (黒色矢印) の蓄積が認められ、AIC-47 がオートファジーの一種である lipophagy を誘導することが明らかとなった (**Fig. 9B**)。

続いて、AIC-47 によるオートファジーが細胞の生存促進もしくは細胞死のいずれの機構のものであるかを検証するために、オートファジー阻害剤と AIC-47 との併用実験を行った。各阻害剤の作用点は **Fig. 8** に示した。阻害剤の効果判定は p62 の分解抑制を指標とした。PI3K Class III の阻害剤である 3-Methyladenine (3-MA) を併用すると、AIC-47 による細胞生存率の低下と LC3B I から II への移行が一部抑制された (**Fig. 9C**)。オートファゴソームとリソソームの融合を阻害する Bafilomycin A1 を併用した場合にも細胞生存率の回復が認められ、LC3B II の蓄積が観察された (**Fig. 9C**)。以上の結果から、AIC-47 がオートファジー細胞死を誘導することが明らかとなった。

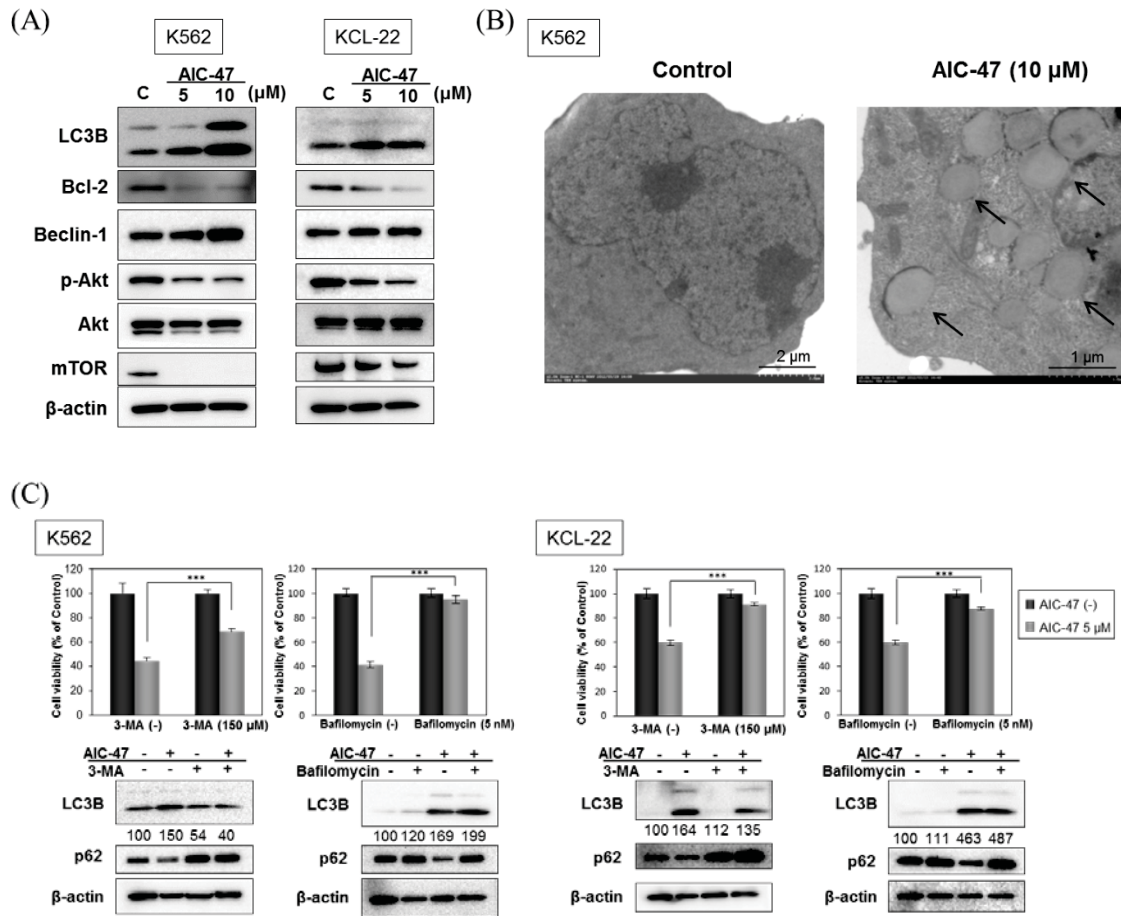


Fig. 9 Medium-chain fatty-acid derivative AIC-47 induced autophagic cell death in K562 and KCL-22 cells.

(A) Effect of AIC-47 on autophagy flux and cell growth signaling. Proteins related with autophagy flux in K562 and KCL-22 cells treated with AIC-47 for 72 h were examined by Western blot analysis. (B) Morphological evidence of AIC-47-induced autophagosome formation in K562 cells. K562 cells were treated with AIC-47 for 72 h and then examined by TEM. Scale bar, 1 or 2 μm. The arrows indicate lipid droplets. (C) Inhibition of autophagy by 3-methyladenine (3-MA) and Bafilomycin A1. Both K562 and KCL-22 cells were pre-incubated or not with 150 μM 3-MA or 5 nM Bafilomycin for 8 h and then treated or not with AIC-47 for 72 h, after which the cell viability was estimated. Expression of LC3B and p62 were examined by Western blot analysis. The numbers below LC3B indicate each band density relative to that of the Control (taken as 100), which values were determined by densitometry.

第4節 BCR-ABLの発現に対する作用

CMLのドライバー遺伝子である *BCR-ABL* はオートファジー抑制因子として機能する。そこで、AIC-47による *BCR-ABL* の発現変化を Real-time PCR およびウェスタンブロットにて検証した。AIC-47添加細胞では mRNA およびタンパク質レベルで *BCR-ABL* の発現が顕著に低下しており、それと相関して c-Myc の発現低下も観察された (**Fig. 10A**)。 *BCR-ABL* のリン酸化ターゲットである CrkL のリン酸化レベルが低下していたことから、AIC-47による *BCR-ABL* の機能低下が確認された (**Fig. 10A**)。 *BCR-ABL* の発現低下が mRNA レベルで誘導されていたことから、AIC-47が *BCR-ABL* の転写を阻害する可能性が示唆された。

GeneCards (<http://www.genecards.org/>) データベース上、*BCR-ABL* のプロモーター領域に結合する可能性のある遺伝子を siRNA にてノックダウンする実験を行った。その結果、c-Myc をノックダウンした場合のみに *BCR-ABL* の発現低下が認められた (**Fig. 10B**)。そこで、c-Myc と *BCR-ABL* 遺伝子との結合性を検証するために ChIP アッセイを行った。*BCR-ABL* のプロモーター領域に c-Myc が結合し、AIC-47 を添加することでその結合が解除されることが明らかとなった (**Fig. 10C**)。以上の結果から、c-Myc が *BCR-ABL* の転写因子として作用しており、AIC-47 は c-Myc の発現低下を介して *BCR-ABL* の発現を抑制することが示唆された。

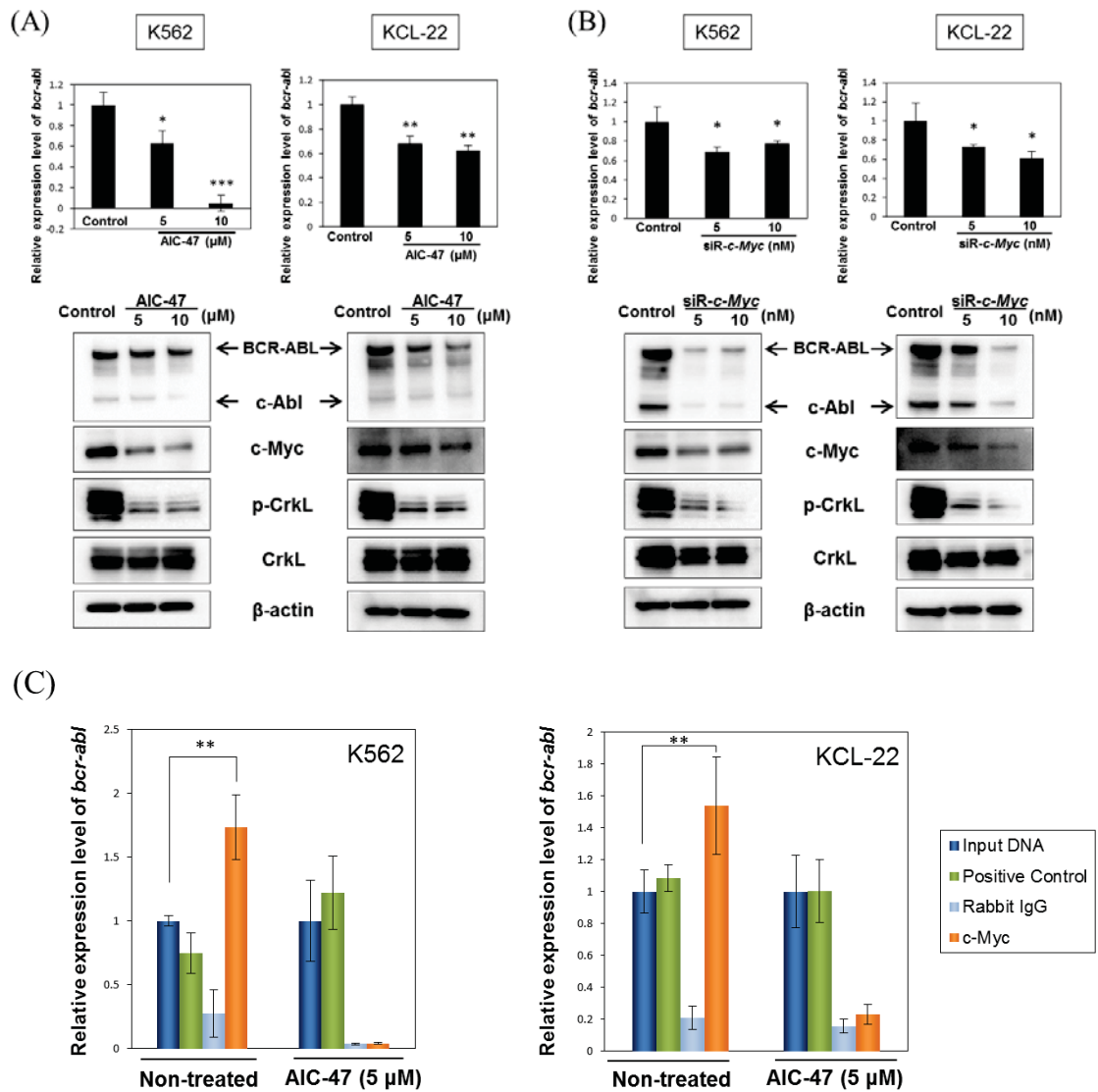


Fig. 10 Transcriptional repression of *BCR-ABL* by AIC-47 was induced through down-regulation of *c-Myc*.

(A, B) Expression levels of *BCR-ABL* mRNA (bar graphs) and protein (Western blots) after treatment with AIC-47 (A) or transfection with siR-*c-Myc* (B) for 72 h. (C) Real-time PCR analysis of ChIP DNA. The data are plotted as the ratio of immunoprecipitated DNA vs. total input DNA.

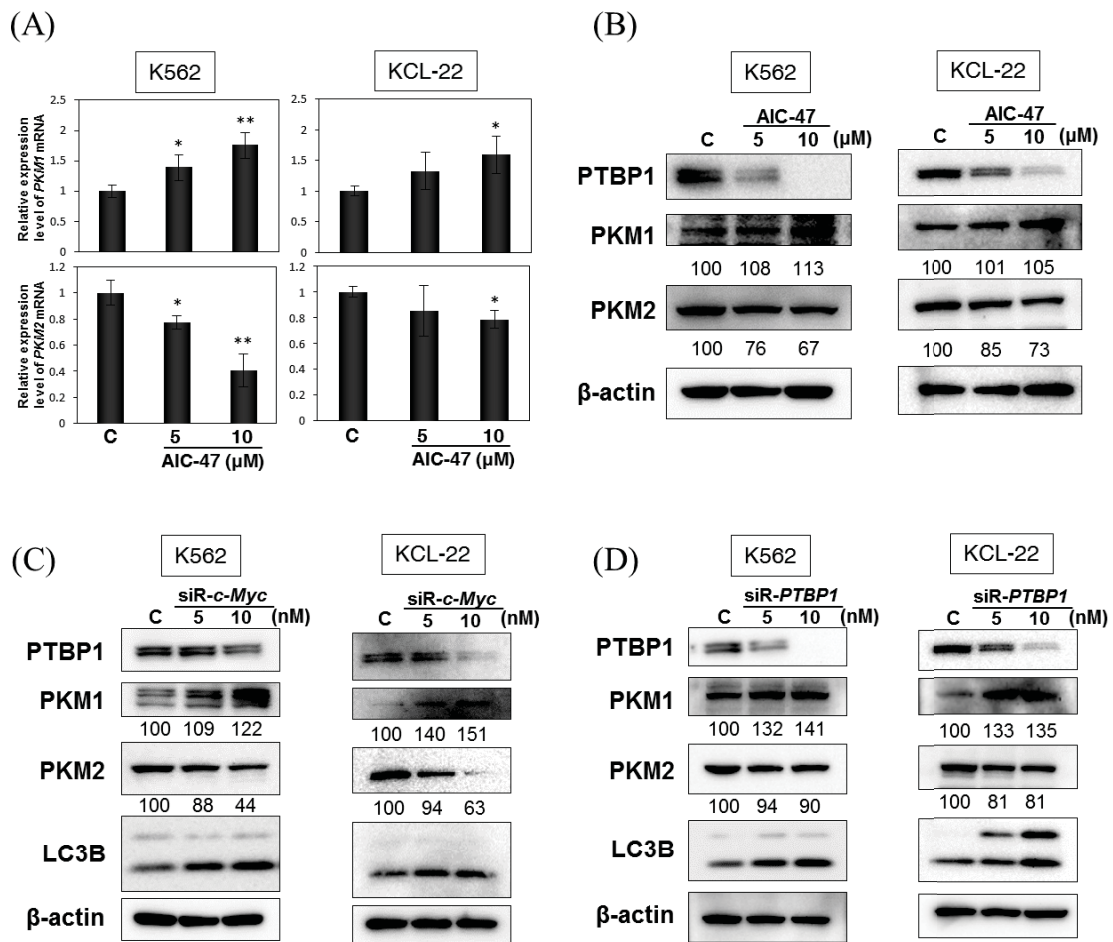
第5節 がん細胞のエネルギー代謝に対する作用

がん細胞特異的なエネルギー代謝機構である Warburg 効果は PTBP1/PKM カスケードによって成立しており、PTBP1 の発現調節には c-Myc が関与している⁴⁴⁾。第3節で AIC-47 による c-Myc の発現低下が認められたことから、AIC-47 と Warburg 効果との関連性を検証した。Warburg 効果の成立に寄与する PTBP1、PKM1 および PKM2 の発現を Real-time PCR およびウェスタンブロットにより検証した結果、PTBP1 および PKM2 の発現低下と PKM1 の発現増加が認められた (Fig. 11A, B)。c-Myc、PTBP1 の発現をそれぞれ siRNA を用いてノックダウンしたところ、PKM2 から PKM1 への発現スイッチが観察され、オートファジーの誘導を示唆する LC3B I から II への移行も確認された (Fig. 11C, D)。

受容体型チロシンキナーゼはその下流で PTBP1/PKM カスケードを活性化させ、Warburg 効果を亢進させていることが報告されている⁵¹⁾。そこで、非受容体型チロシンキナーゼである BCR-ABL が Warburg 効果と関連しているかどうかを検証するために、siRNA を用いて BCR-ABL の発現をノックダウンしたところ、PTBP1 および PKM2 の発現低下と PKM1 の発現増加、LC3B の I から II への移行が観察された (Fig. 11E)。

PKM2 から PKM1 にスイッチすることで、嫌氣的解糖優位な状態から TCA サイクルを介した酸化的リン酸化が優位な状態にスイッチすることが予想された。そこで嫌氣的解糖の最終産物である L-lactate を定量したところ、AIC-47、siR-BCR-ABL、siR-c-Myc、siR-PTBP1 のいずれを作用させた細胞においても細胞内 lactate 産生量の低下が認められた (Fig. 11F)。さらに、TCA サイクルによる ROS の発生を電子スピン共鳴法 (Electron Spin Resonance; ESR) を用いて測定した。ROS の一種であるスーパーオキシドアニオン (O_2^-) およびその他の酸素ラジカルは、AIC-47 を添加した K562 細胞で有意に増加していた (Fig. 11G)。フ

リーラジカルの捕捉剤である *N*-acetylcysteine (NAC) と AIC-47 を併用すると、AIC-47 による増殖抑制作用および LC3B の移行が一部抑制された (Fig. 11H)。以上の結果から、AIC-47 は PKM2 から PKM1 に発現スイッチを誘導することで Warburg 効果を破綻させ、グルコース代謝経路を嫌氣的解糖から TCA サイクルにスイッチさせることが明らかとなった。また、非受容体型チロシンキナーゼである BCR-ABL も Warburg 効果を亢進させることを見出した。AIC-47 によるオートファジー細胞死の誘導は、TCA サイクルの回転による ROS を発生が原因であることが示唆された。



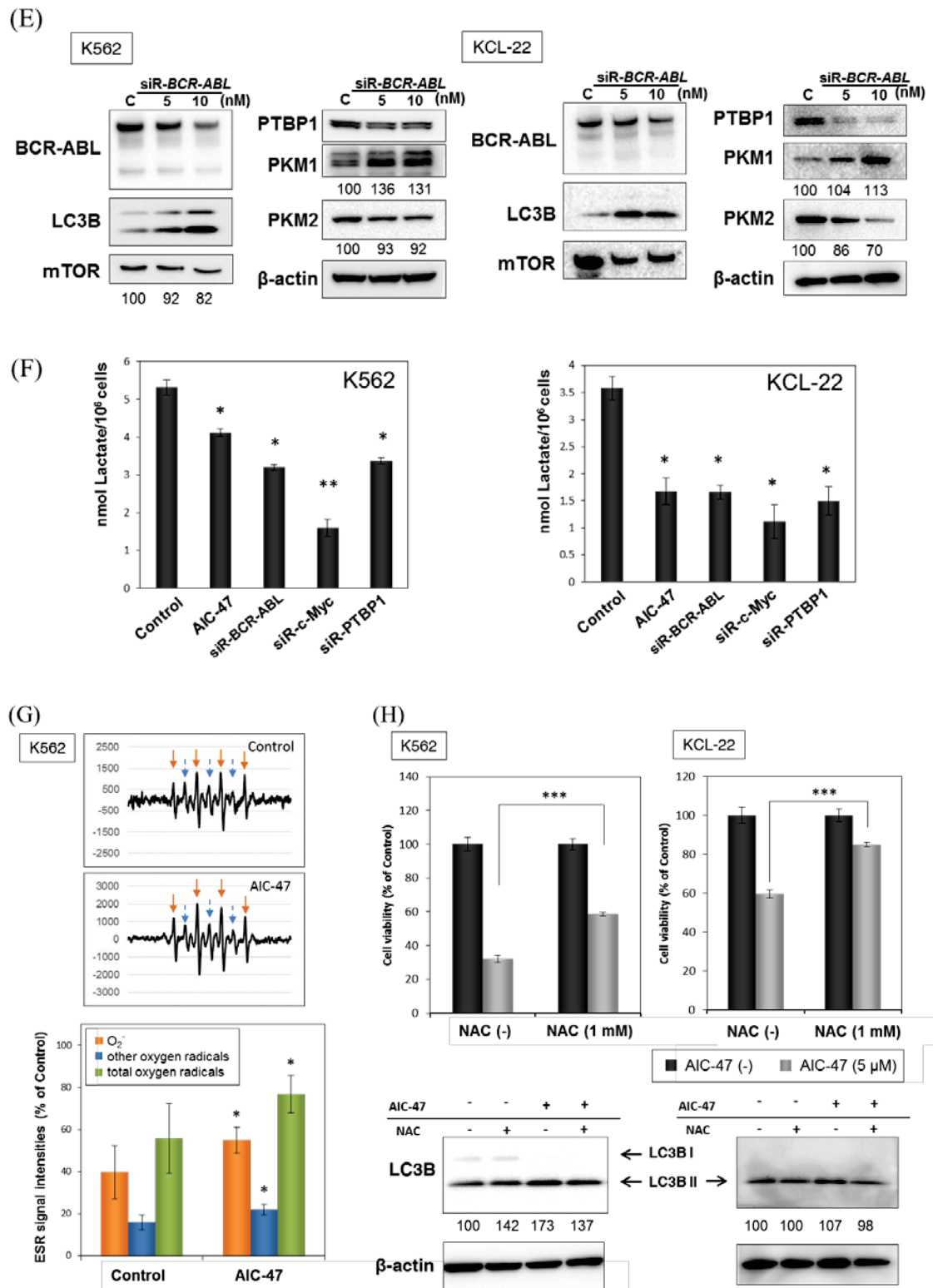


Fig. 11 Dys-regulation of PTBP/PKM axis through c-Myc and BCR-ABL down-regulation induced autophagy.

(A, B) Expression levels of mRNAs **(A)** and proteins **(B)** after treatment of K562 and KCL-22 cells with AIC-47 for 72 h. **(B)** The numbers below PKM1 and PKM2 indicate each band density relative to that of the Control (taken as 100), which values were determined by densitometry. **(C, D, E)** Effects of silencing *c-Myc* **(C)**, *PTBP1* **(D)** or *BCR-ABL* **(E)** on autophagy flux in K562 and KCL-22 cells at 72 h. **(F)** Lactate production in K562 and KCL-22 cells after treatment of them with AIC-47 (5 μ M) or transfection of them with siR-*BCR-ABL*, siR-*c-Myc*, or siR-*PTBP1* (5 nM) for 72 h. **(G)** The production of free-radicals was measured by electron spin resonance spectroscopy (ESR). K562 cells were treated or not with AIC-47 (5 μ M) for 8 h. The representative ESR spectrum for the Control and AIC-47 are depicted in the upper panels. The intensities of the spin adducts are shown in the lower panel. **(H)** K562 and KCL-22 cells were pre-incubated or not with 1 mM *N*-acetylcysteine (NAC) for 4 h and then treated or not with AIC-47 (5 μ M) for 48 h. Thereafter, the cell viability was estimated; and the conversion of LC3B was examined by Western blot analysis.

第 6 節 中鎖脂肪酸誘導体の標的分子の探索

本章第 2 節、第 3 節に示した検討結果から、AIC-47 による増殖抑制メカニズムの中心分子が c-Myc であることが示唆された。そこで、AIC-47 が直接的に標的としている分子を探索し、c-Myc の発現低下 (本章第 2 節 **Fig. 10A**) との関連性を検討した。低分子化合物の標的分子の探索にはビーズ担体に化合物を結合させて固定化し、標的タンパク質をケミカルプルダウンする方法を用いることができるが、AIC-47 は化合物の構造特性上ビーズ担体に結合させることが困難であった。そのため、ドッキング・シミュレーションによる *in silico* 解析を行った。

パルミチン酸 (C16 脂肪酸) は、STAT3 に結合することでオートファジーを誘導することが報告されている⁷⁸⁾。STAT3 と AIC-47 との結合親和性を確認した。その結果、AIC-47 と STAT3 との結合親和性は低く、結合エネルギーは -5.21 kcal/mol であった。このことから、AIC-47 の標的分子はパルミチン酸のものと異なっていることが明らかとなった。そこで、脂肪酸をリガンドとする受容体との結合親和性を検証した。Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) はグルコース、脂質などのエネルギー代謝の調節因子として知られている⁷⁹⁾。また、PPAR γ のアゴニストとして開発されたピオグリタゾン⁸⁰⁾は糖尿病治療薬として長年用いられてきたが、CML 幹細胞の治療にも有効であることが報告されている⁸⁰⁾。AIC-47 と PPAR γ との結合エネルギーは -7.60 kcal/mol であり、検討を行った標的分子の中で最も高い結合親和性を示した。AIC-47 と PPAR γ の結合モデルを **Fig. 12A** に示した。がん細胞においては、活性化された PPAR γ によって β -catenin が細胞質内で分解され、 β -catenin による転写が抑制されることが知られている⁸¹⁾。c-Myc は β -catenin の転写標的であることが報告されている⁸²⁾。そこで、AIC-47 添加細胞の核内および細胞内のタンパク質を分画抽出し β -catenin

の局在を検討したところ、細胞質内での分解が亢進し、核内への移行が抑制されていた (**Fig. 12B**)。さらに、siRNA を用いて β -catenin の発現をノックダウンすると、c-Myc の発現低下が認められた (**Fig. 12C**)。以上の結果から、AIC-47 は PPAR γ を活性化させ、 β -catenin の核内移行を抑制することで c-Myc の発現低下を誘導することが示唆された。しかしながら、本節での検討は間接的な実験系によるものであるため、さらに詳細な検討が必要である。

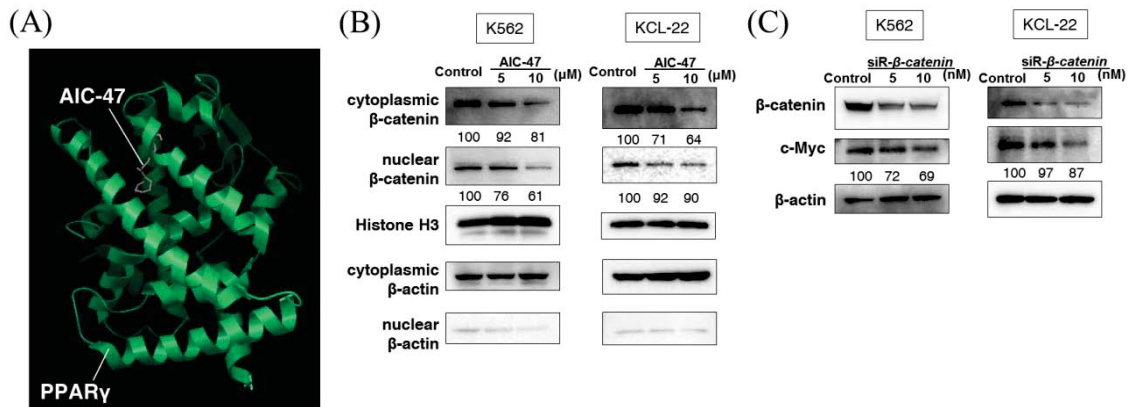


Fig. 12 Degradation of β -catenin after AIC-47 bound to PPAR γ induced the down-regulation of c-Myc.

(A) Molecular model of PPAR γ binding with AIC-47. PPAR γ is shown by a ribbon diagram. The top-scored docking model was visualized. (B) Effect of AIC-47 on subcellular distribution of β -catenin. The expression levels of cytoplasmic and nuclear β -catenin at 72 h after the treatment of K562 and KCL-22 cells with AIC-47 were examined by Western blot analysis. Cell lysates were collected and fractionated into cytoplasmic and nuclear extracts. The efficiency of fractionation was verified by staining for Histone H3 as a nuclear marker and for β -actin as a cytoplasmic marker and also as an indicator for contamination of the nuclear fraction with cytoplasmic protein. (C) Effect of silencing β -catenin with siR- β -catenin on the expression of c-Myc at 72 h after transfection. Effects of the silencing with siR- β -catenin on the expression of β -catenin and c-Myc were examined by Western blot analysis. Numbers below blots in “B” and “C” indicate each band density relative to that of the Control (taken as 100), which values were determined by densitometry.

第7節 小括

本章では、これまで明らかにされていなかった中鎖脂肪酸の生理活性の1つとして、中鎖脂肪酸誘導体 AIC-47 がオートファジー細胞死を誘導することで抗がん作用を示すことを明らかにした。大腸がん細胞に対するブチル酸誘導体 (C4) の抗がん活性は 2 mM 以上⁶⁷⁾、肝臓がん細胞に対するパルミチン酸 (C16) およびステアリン酸 (C18) の抗がん活性は 200 μ M 以上⁸³⁾で認められることが報告されており、がん種は異なるものの、短鎖・長鎖脂肪酸と比較して中鎖脂肪酸誘導体がより強い抗がん活性を示すことが明らかとなった。

また、CML のドライバー遺伝子である BCR-ABL ががん細胞特異的エネルギー代謝機構 (Warburg 効果) の亢進に寄与しているという新たな知見を得た。本章の検討結果から考えられた AIC-47 の増殖抑制メカニズムは Fig. 13 に示した通りである。まず、AIC-47 は PPAR γ を活性化させ、 β -catenin を介して c-Myc の発現を抑制する。続いて c-Myc の発現低下が転写標的である BCR-ABL の発現を減少させる。c-Myc および BCR-ABL の発現低下は共に PTBP1/PKM カスケードの脱制御を誘導し、がん細胞のグルコース代謝を解糖系から TCA サイクルにスイッチさせる。最終的に TCA サイクルから発生する ROS が原因となり、オートファジー細胞死が誘導されると考えられた。

中鎖脂肪酸誘導体は BCR-ABL および Warburg 効果というがん細胞特異的に発現している機構を作用点とすることで、がん細胞のみを選択的に傷害しており、比較的安全性の高い創薬シーズとなる可能性が示唆された。

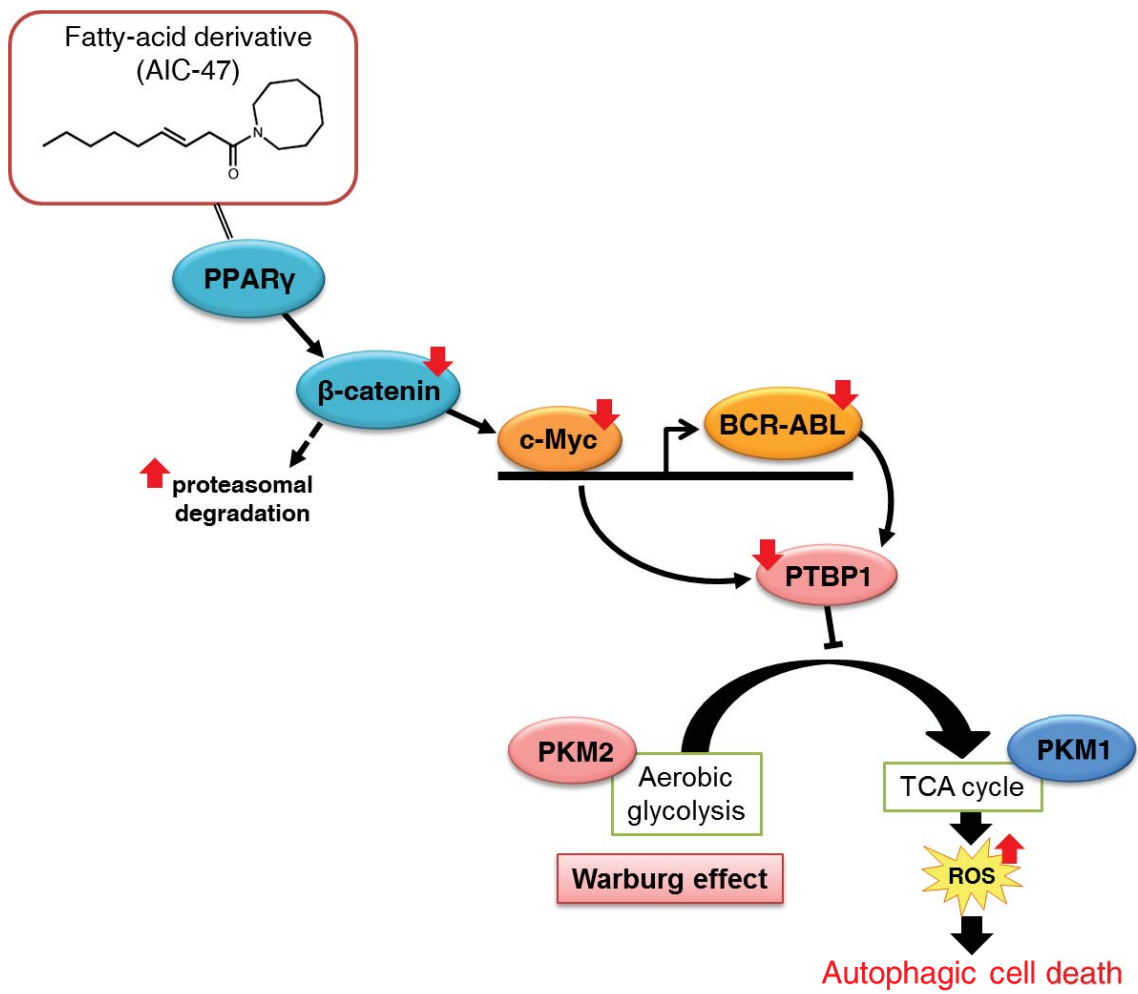


Fig. 13 Schematic diagram of AIC-47-induced autophagic cell death in BCR-ABL CML cells.

第4章 がん細胞のエネルギー代謝に対する中鎖脂肪酸誘導体とイマチニブの比較

第1節 序

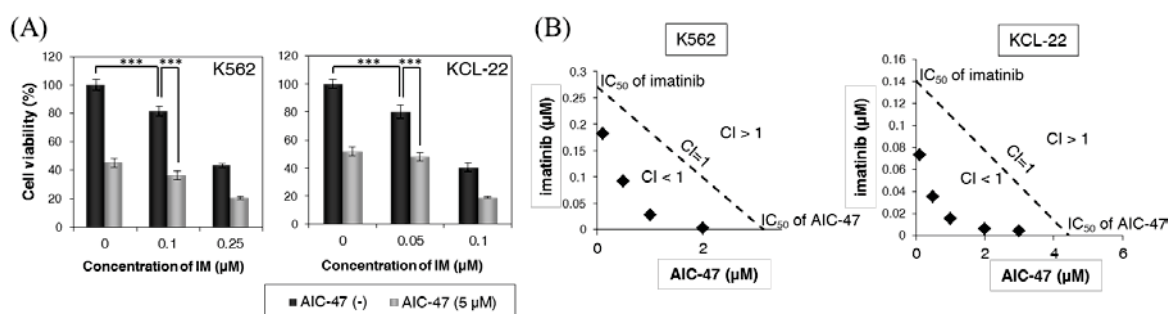
CMLの第一選択薬として使用されるイマチニブは、BCR-ABLのキナーゼ活性を標的とした治療薬であり、非常に優れた治療成績を示している。その一方で、再発の原因となる白血病幹細胞に対しては治療効果が低く、白血病幹細胞にも有効な治療薬の開発が望まれている。近年、白血病幹細胞に対する治療法の研究が盛んに行われており、様々な併用薬の有効性が報告されている。その中で、エネルギー代謝を制御するような治療法も提案されてきた。そこで、本章ではまず中鎖脂肪酸誘導体 AIC-47 とイマチニブの作用点の違いをエネルギー代謝という観点から非幹細胞性の CML 細胞で比較検討し、さらに白血病幹細胞における AIC-47 の有効性を検証した。

第2節 中鎖脂肪酸誘導体およびイマチニブによる細胞死の比較

K562 および KCL-22 に AIC-47 またはイマチニブ (IM) を添加し、48 時間後の細胞生存率をトリパンプルー色素排除試験法により測定した。AIC-47 およびイマチニブはそれぞれ単剤でも有意な増殖抑制を示したが、2 剤を併用することにより増殖抑制作用の増強が認められた (Fig. 14A)。そこで、併用効果の定量的指標となる併用係数 (Combination Index; CI) をプロットすると $CI < 1$ であった (Fig. 14B)。以上の結果から、AIC-47 とイマチニブの併用は相乗的な増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。

続いて、各薬剤による細胞死の形態を検証した。アポトーシスの指標として PARP-1 を、オートファジーの指標として p62 の発現をそれぞれウェスタンブロットにより解析した。その結果、AIC-47 添加細胞では PARP-1 の切断が確

認められず、p62 の分解のみが観察されたが、イマチニブを添加した細胞では PARP-1 の切断と p62 の分解が認められた (Fig. 14C)。さらに、電子顕微鏡解析により各薬剤添加後の K562 細胞の形態学的変化を検証した。AIC-47 添加細胞では、第 3 章第 3 節での検討結果と同様にオートファゴソーム (AP) の形成と脂肪滴の蓄積が確認された (Fig. 14D)。イマチニブ添加細胞では核の断片化が認められ、アポトーシスの誘導が示唆された (Fig. 14D)。また、2 剤の併用により AIC-47 の特徴である lipophagy とイマチニブの特徴である核の断片化が同一細胞内に観察された (Fig. 14D)。次に、イマチニブによるオートファジーが細胞の生存促進もしくは細胞死のいずれの機構に寄与しているかを検証するために、オートファジー阻害剤であるクロロキンとの併用実験を行った。クロロキンの効果判定は p62 の分解抑制を指標とした。クロロキンの併用により AIC-47 添加細胞では細胞生存率が回復し (Fig. 14E)、第 3 章第 3 節の結果と一致した。一方、イマチニブ添加細胞ではオートファジーの阻害により細胞生存率がさらに低下した (Fig. 14E)。この結果から、イマチニブ添加細胞では生存維持機構としてのオートファジーが誘導されていることが示唆され、これまでの報告と一致した。以上の結果から、AIC-47 はオートファジー細胞死、イマチニブはオートファジーを伴うアポトーシスで増殖抑制作用を示しており、各薬剤による細胞死の形態が異なっていることが確認された。



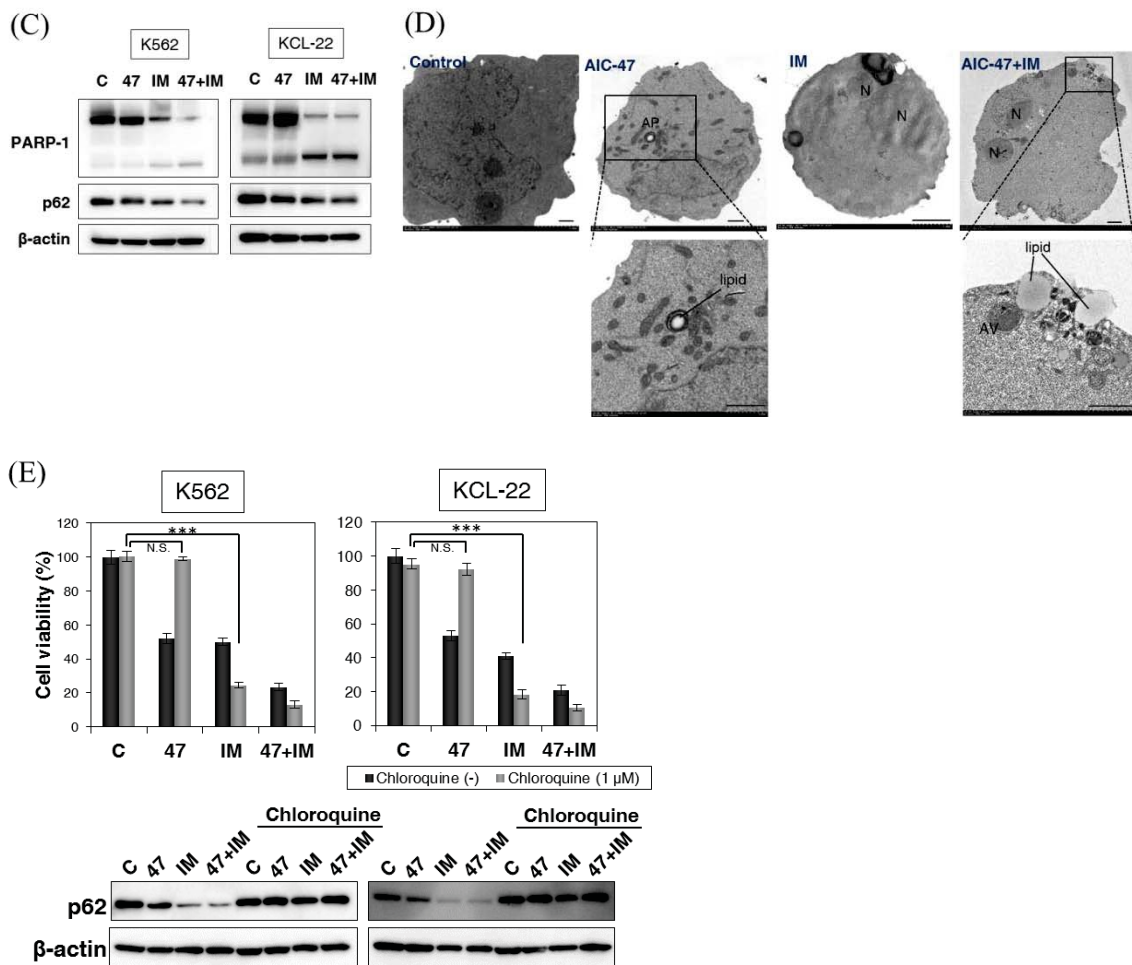


Fig. 14 Morphological features of cells treated with AIC-47 and/or imatinib

Cells were treated with DMSO (Control; C), AIC-47 (47; 5 μ M), imatinib (IM; 0.25 μ M for K562, 0.1 μ M for KCL-22) or their combination (47+IM) for 48 h. (A) Viability of K562 and KCL-22 cells treated with AIC-47 and/or imatinib for 48 h. (B) Synergistic effects of AIC-47 and imatinib. Combination Index (CI) was calculated by Chou-Talalay's method. The dashed line indicates the zero interaction of the isobole. (C) Effects of AIC-47, imatinib or their combination on apoptosis and autophagy. (D) Morphology of the AIC-47 and/or imatinib (IM)-treated K562 cells at 48 h was determined by TEM. Representative images (scale bar, 1 μ m) are shown. N: nucleus, AP: autophagosome, AV: autophagic vacuole. (E) Effects of inhibition of autophagy by chloroquine on cytotoxicity of AIC-47, imatinib or their combination. Expression of p62 was examined by Western blot analysis.

第3節 BCR-ABL と解糖系に対する影響の比較

第3章第4節で AIC-47 が BCR-ABL の転写抑制を誘導し、がん細胞の解糖系 (Warburg 効果) を破綻させることを明らかにした。そこでイマチニブによる BCR-ABL および Warburg 効果への影響を検証した。まず、BCR-ABL の発現およびリン酸化レベルの変化をウェスタンブロットにより解析すると、AIC-47 は BCR-ABL の発現とリン酸化レベルの両方を抑制するのに対し、イマチニブはリン酸化のみを抑制し、BCR-ABL の発現は変化させないことが確認された (Fig. 15A)。また、2 剤の併用では BCR-ABL の発現、リン酸化レベルともに顕著に抑制されていた (Fig. 15A)。続いて、各薬剤の Warburg 効果に対する影響を検証した。イマチニブは、グルコーストランスポーター GLUT-1 の発現を減少させることで細胞内へのグルコースの取り込みを抑制することが報告されているが^{84,85)}、PTBP1/PKM カスケードに対する報告はない。そこでウェスタンブロットによる解析を行ったところ、AIC-47 と同様にイマチニブも PTBP1 および PKM2 の発現を低下させ、PKM1 の発現を増加させることが明らかとなった (Fig. 15A)。この現象は AIC-47 よりもイマチニブで強く認められた。細胞内の PKM1 および PKM2 を免疫染色したところ、PKM2 から PKM1 への発現スイッチが single-cell レベルで誘導されていることが明らかとなった (Fig. 15B)。嫌氣的解糖の最終産物である L-lactate 産生量も各薬剤添加後に有意に減少していた (Fig. 15C)。以上の結果から、AIC-47 およびイマチニブはともに Warburg 効果の破綻を誘導することが明らかとなり、BCR-ABL による Warburg 効果の亢進にはチロシンリン酸化が重要であることが示唆された。

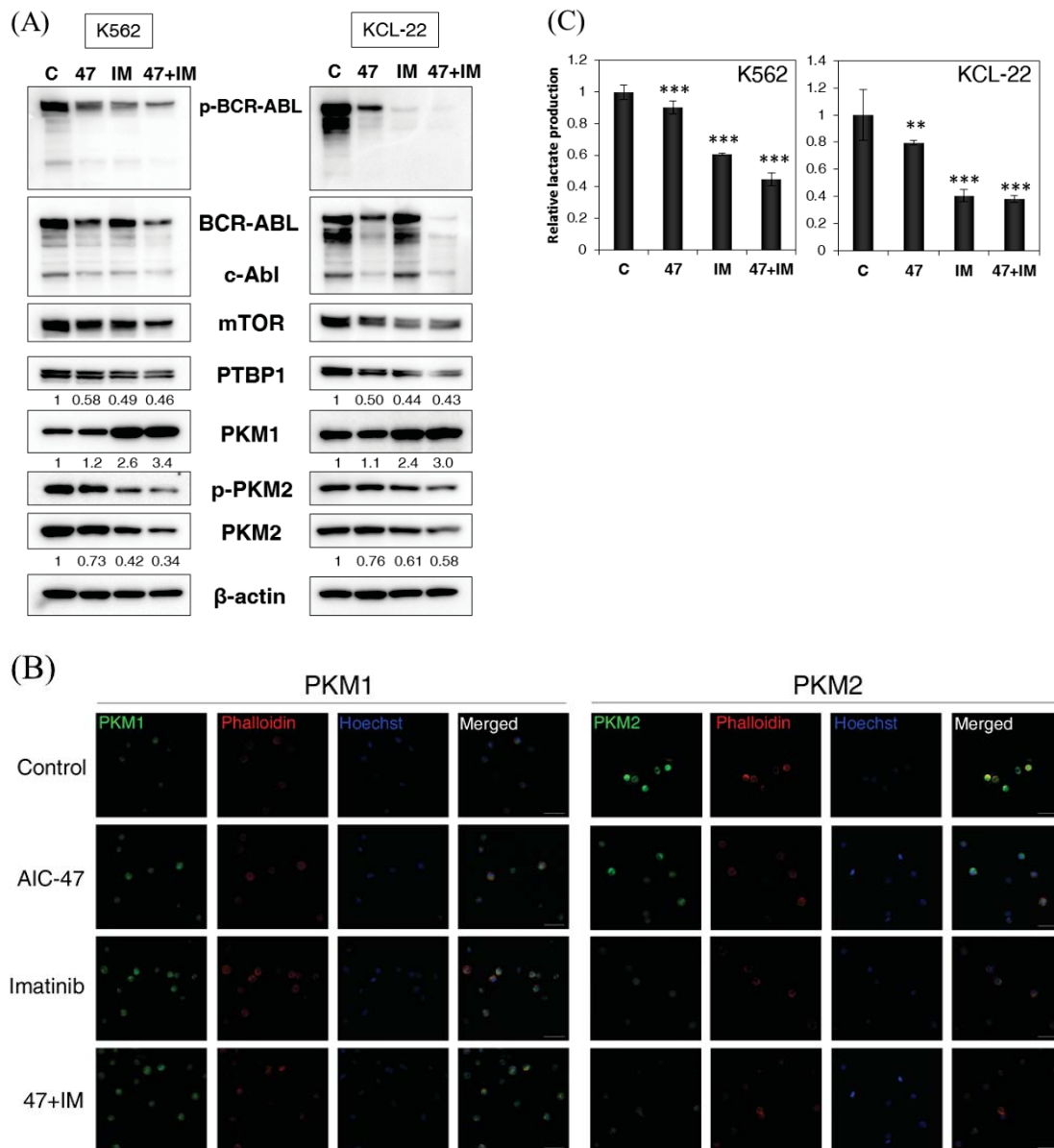


Fig. 15 Effects of AIC-47 and/or imatinib on BCR-ABL and Warburg effect.

Cells were treated with DMSO (Control; C), AIC-47 (47; 5 μ M), imatinib (IM; 0.25 μ M for K562, 0.1 μ M for KCL-22) or their combination (47+IM) for 48 h. (A) Effects of AIC-47, imatinib or their combination on expression of BCR-ABL and Warburg effect-related proteins. The numbers below PTBP1, PKM1, and PKM2 indicate each band density relative to that of the Control (taken as "1"). (B) Immunofluorescence of PKM1 and PKM2 in K562 cells. Representative images (scale bar, 50 μ m) are shown. (C) Lactate production in K562 and KCL-22 cells. The lactate production was normalized to cell numbers.

第4節 脂肪酸酸化に対する作用

細胞の主要なエネルギー源は糖（グルコース）であるが、糖代謝による ATP の供給が不足すると脂肪酸やアミノ酸を利用して ATP を産生することが知られている。白血病細胞においても解糖系の上流分子を阻害することで CPT1C の発現が増加し、脂肪酸酸化が活性化されることが報告されている⁶²⁾。そこで、CPT1C の発現量をウェスタンブロットにより解析すると、イマチニブを単剤で添加した場合のみに CPT1C の発現亢進が認められ、AIC-47 を添加した細胞ではその発現が抑制されることが明らかとなった (**Fig. 16A**)。白血病細胞における脂肪酸酸化の活性化が化学療法に対する感受性の低下と関わっていることが報告されている⁸⁶⁾。CPT1 の阻害剤である Etomoxir を用い、脂肪酸酸化を阻害すると各薬剤による細胞増殖抑制作用の増強が認められ、その作用は特にイマチニブで強いことが明らかとなった (**Fig. 16B**)。以上の結果から、イマチニブは CPT1C の発現増加を介して脂肪酸酸化を活性化するのに対し、AIC-47 は脂肪酸酸化を抑制していることが示唆された。そこで培地の組成を変更し、各薬剤を添加した細胞の ATP レベルを測定した。グルコースと脂肪酸が存在する通常の培地 (Glucose +, Fatty-acid +) では、いずれの薬剤を添加した場合にも細胞内 ATP レベルは低下した (**Fig. 16C**)。グルコースのみを除いた培地中 (Glucose -, Fatty-acid +) ではイマチニブ添加細胞の ATP レベルが顕著に増加し、さらに脂肪酸を共に除くと (Glucose -, Fatty-acid -) イマチニブ添加細胞での ATP レベルの増加が抑制された (**Fig. 16C**)。以上の結果から、イマチニブ添加細胞は脂肪酸を利用し細胞内の ATP レベルを維持していることが示唆された。

本章第3節でイマチニブが Warburg 効果の破綻を誘導することが示されたことから、Warburg 効果の破綻と脂肪酸酸化の活性化との関連性を検証した。

BCR-ABL および *PTBP1* の発現をノックダウンしたところ、*CPT1C* の発現亢進が認められた (**Fig. 16D, E**)。この結果から、*BCR-ABL/PTBP1* カスケードを介した Warburg 効果の破綻が代償的な脂肪酸酸化の活性化に寄与していることが示された。また、*AIC-47* は同じカスケードを介して Warburg 効果を破綻させるにも関わらず *CPT1C* の発現を増加させないため、Warburg 効果とは独立した経路で脂肪酸酸化の活性化を抑制していると考えられた。

そこで、ガスクロマトグラフィーにより *K562* 細胞内の脂肪酸組成を検証した。*AIC-47* 添加後の細胞内では主鎖の炭素数が 14 (C14) の脂肪酸、すなわちミリスチン酸およびミリストレイン酸の含有量が増加する傾向が認められた (**Fig. 16F**)。脂肪酸酸化の過程において C14 脂肪酸はミトコンドリア内に取り込まれた後、long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD) により代謝される (第 2 章第 4 節 **Fig. 5**)。AIC-47 が C14 脂肪酸の代謝に影響している可能性が考えられたことから、無細胞系で LCAD の酵素活性を測定した。AIC-47 共存下では LCAD による C14 脂肪酸の代謝が競合的に阻害された (**Fig. 16G**)。以上の結果から、AIC-47 は LCAD の阻害を介して C14 脂肪酸の代謝を妨げ、Warburg 効果非依存的に脂肪酸酸化を阻害することが示唆された。

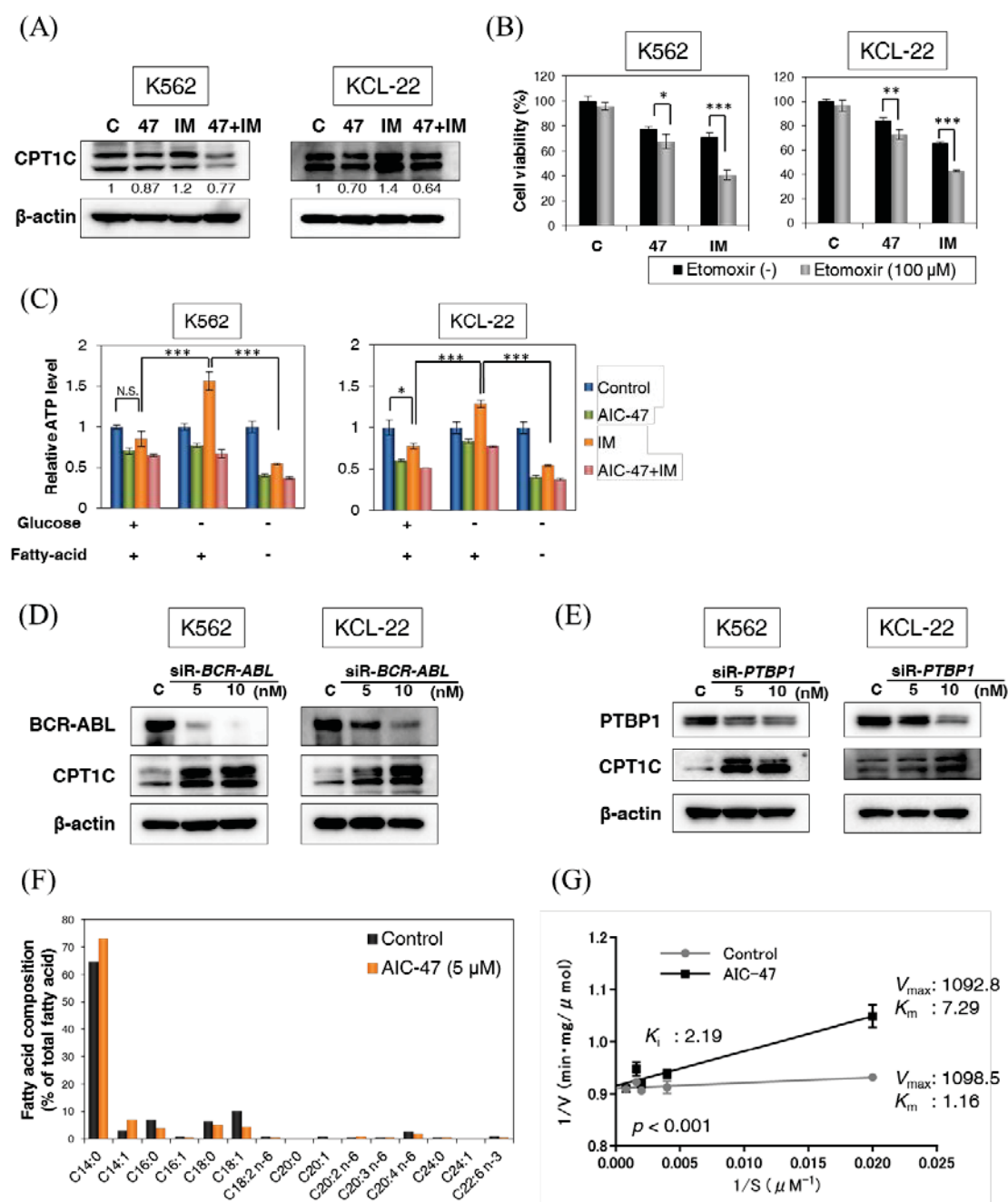


Fig. 16 Compensatory activation of fatty-acid oxidation after treatment with imatinib and its suppression by AIC-47

K562 and KCL-22 cells were treated with DMSO (C; Control), AIC-47 (47; 5 μ M), imatinib (IM; 0.25 μ M for K562, 0.1 μ M for KCL-22) or their combination (47+IM) for 48 h. **(A)** Expression of CPT1C. The numbers below CPT1C indicate each band density relative to that of the Control (taken as "1"). **(B)** Inhibition of FAO by Etomoxir. K562 and KCL-22 cells were co-incubated or not with 100 μ M Etomoxir and each agent for 48 h. **(C)** ATP production in K562 and KCL-22 cells after treatment with each agent for 6 h. The cells were cultured in medium as described below the graph. The ATP production was

normalized to cell numbers. **(D, E)** Expression of CPT1C in K562 and KCL-22 cells after transfection with siR-*BCR-ABL* **(D)** or *PTBP1* **(E)** for 72 h. **(F)** Fatty-acid composition analyzed by gas chromatography. **(G)** Enzyme activity of long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD) with or without AIC-47 (10 nM). The dimensions of apparent V_{max} , K_m , and K_i values were $\text{nmol min}^{-1}(\text{mg of protein})^{-1}$, μM , and μM , respectively.

第5節 白血病幹細胞における AIC-47 の有効性

白血病細胞における幹細胞マーカーには CD34 が用いられている。白血病幹細胞における AIC-47 の有効性を検証するために、CML 患者の血球細胞から CD34⁺分画の採取を試みた。しかしながら CML の幹細胞は他の白血病幹細胞と比較して非常に壊れやすく、薬剤効果の検討を行うことが困難であった。そこで、Ph⁺ ALL のモデルマウスより採取した CD34⁺分画を実験に使用した。まずこの幹細胞様分画に対し AIC-47 およびイマチニブを作用させたところ、AIC-47 は単独で有意な細胞生存率の低下が認められたが、0.5 μM のイマチニブでは細胞生存率に変化は認められなかった (Fig. 17A)。非幹細胞性の CML に対してイマチニブは 0.1 μM で有意な増殖抑制を示している (本章第2節 Fig. 14A) ことから、CD34⁺分画ではイマチニブに対する感受性が低下していることが明らかとなった。続いて、細胞内シグナルをウェスタンブロットにより解析した。その結果、いずれの薬剤を添加した細胞においても Warburg 効果関連分子の脱制御、すなわち PTBP1 の発現低下と PKM2 から PKM1 の発現スイッチは共通の現象として観察された (Fig. 17B)。一方、イマチニブを単剤で添加した細胞のみで CPT1C の発現亢進が認められた (Fig. 17B)。そこで、Etomoxir を用い脂肪酸酸化を阻害したところ、単剤では細胞の生存率を変化させなかったイマチニブにおいても有意な細胞生存率の低下が認められた (Fig. 17C)。以上の結果から、幹細胞におけるイマチニブ非感受性の獲得には脂肪酸酸化の活性化が寄与しており、脂肪酸酸化を阻害する AIC-47 が白血病幹細胞に対しても有効な治療薬となる可能性が示唆された。

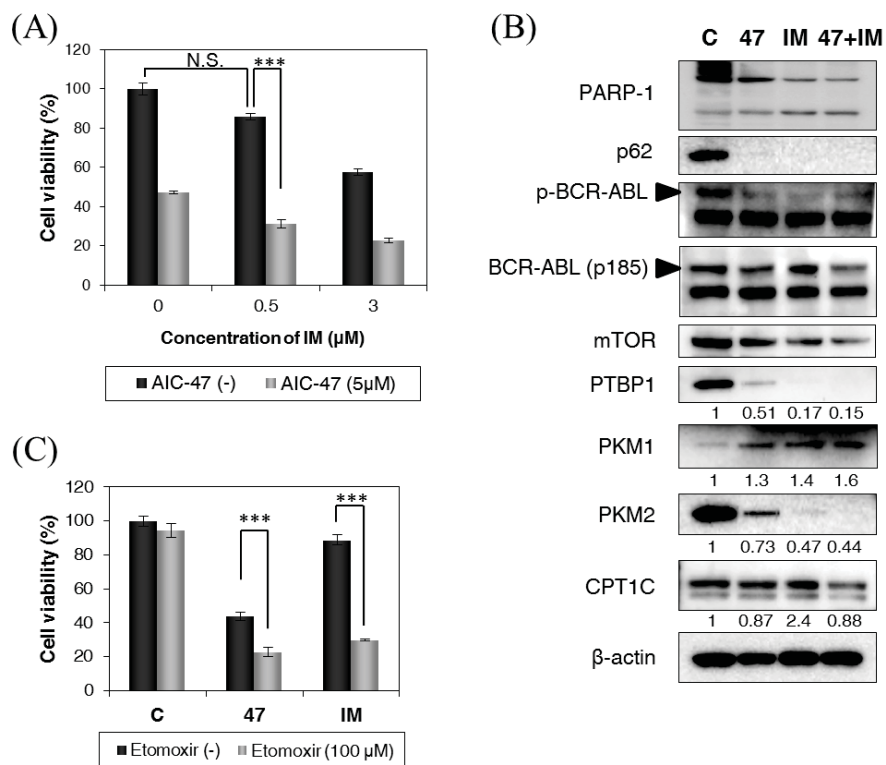


Fig. 17 *Ex vivo* effects of AIC-47 on the CD34⁺ fraction of Ph-positive ALL cells

(A) Viability of Ph-positive CD34⁺ murine ALL stem cells treated with DMSO (Control), AIC-47, imatinib (IM) or their combination for 48 h. (B) Effects of AIC-47, imatinib or their combination on apoptosis, autophagy, Warburg effect-related proteins, and CPT1C. Cells were treated with DMSO (Control; C), AIC-47 (47; 5 μM), imatinib (IM; 1 μM) or their combination (47+IM) for 48 h. The numbers below PTBP1, PKM1, PKM2, and CPT1C indicate each band density relative to that of the Control (taken as "1"). (C) Inhibition of FAO by Etomoxir. Cells were co-incubated or not with 100 μM Etomoxir and AIC-47 (47; 5 μM), or imatinib (IM; 1 μM) for 48 h.

第6節 小括

本章では、中鎖脂肪酸誘導体 AIC-47 と既存薬イマチニブの作用点の違いをエネルギー代謝という観点から比較検討した。検討結果を **Fig. 18** および **Table 2** にまとめた。AIC-47 とイマチニブは異なった細胞死を誘導し、BCR-ABL の発現に対する作用も異なっていることを確認した。また、イマチニブが Warburg 効果を強力に破綻させることを見出した。これまでの研究ではイマチニブとエネルギー代謝との関連性はほとんど明らかにされておらず、グルコースの取り込みを制御する GLUT-1 の発現を変化させることが報告されているのみであった^{84,85)}。イマチニブによる優れた殺細胞効果は、BCR-ABL の下流に存在する生存・増殖関連シグナルの不活化によるものだけではなく、がん細胞の主要なエネルギー獲得機構である解糖系を阻害することにも起因していると考えられた。しかしながら、Warburg 効果の破綻は代償的な脂肪酸酸化の活性化を誘導することが明らかとなり、イマチニブは脂肪酸酸化を活性化させることが示された。一方、AIC-47 は Warburg 効果と独立した機構で脂肪酸酸化の活性化を抑制することが示唆された。

また、幹細胞様の性質を有する CD34⁺ 分画に対し、AIC-47 は単剤でも細胞生存率の低下を認めた。白血病幹細胞の TKI 非感受性の獲得は細胞周期の静止によるものであることが知られているが²⁸⁾、本章での検討により代償的な脂肪酸酸化の活性化も一因となることが明らかとなった。単剤では有効性の低いイマチニブも脂肪酸酸化を阻害することで幹細胞の細胞生存率を低下させることから、白血病幹細胞は脂肪酸酸化を巧みに利用することで薬剤耐性を獲得していると考えられ、解糖系と脂肪酸酸化を共に阻害する治療法が有効である可能性が示唆された。

脂肪酸酸化はエネルギー産生のみならず NADPH の供給源として機能することが知られている⁸⁷⁾。白血病および白血病幹細胞において脂肪酸酸化から生じた NADPH が細胞内の ROS を捕捉し、細胞の生存維持に働くことが報告されている^{86,88)}。白血病幹細胞は ROS に対する感受性が高いため^{89,90)}、非幹細胞性の白血病細胞よりもさらに脂肪酸酸化を活性化させており、その結果薬剤感受性が低下していると考えられた。

以上のことから、AIC-47 は Warburg 効果と脂肪酸酸化の両方を破壊させ、細胞内のエネルギーを枯渇させるとともに ROS の捕捉に関わる NADPH の発生を抑制することで殺細胞効果を示していると考えられ、既存薬とは異なる新たな作用点を持つことが明らかになった。また、AIC-47 とイマチニブは相乗効果を示したことから併用薬としての有効性も期待でき、創薬シーズとして有用である可能性が示唆された。

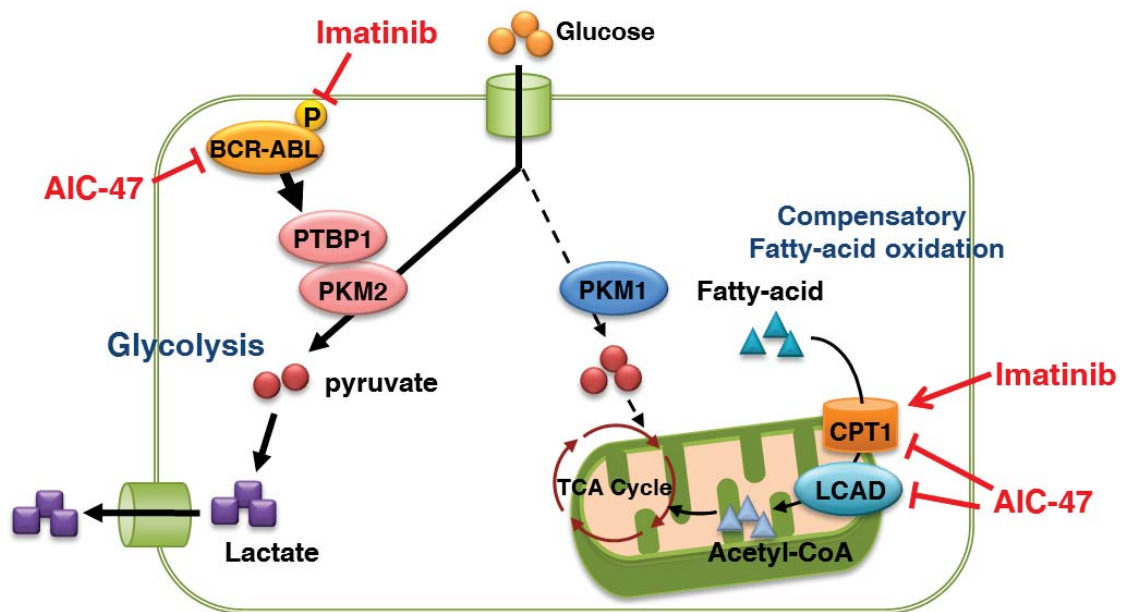


Fig. 18 Schematic diagram of the effects of AIC-47 and imatinib on cancer metabolism in BCR-ABL-transformed leukemia cells

	AIC-47	Imatinib
Cell death	Autophagic cell death	Apoptosis
BCR-ABL	Expression suppression	Inhibitory phosphorylation
Glycolysis	Dys-regulation	Dys-regulation
Fatty-acid oxidation	Inhibition	Activation

Table 2. Differences in mechanism between AIC-47 and imatinib

第5章 miR-124/PTBP1 カスケードによるがん細胞のエネルギー代謝制御

第1節 序

Warburg 効果の成立に関与する PTBP1 は c-Myc⁴⁴⁾、受容体型チロシンキナーゼ⁵¹⁾のほか、複数の miRNA⁹¹⁾により発現を制御されている。筆者らもこれまでに miR-124 および miR-133 の発現ががんで低下しており、それと相関して PKM2 の発現が亢進していることを報告してきた⁴⁵⁾。しかしながら、がんの発症過程におけるこれらの miRNA の発現変化や PTBP1/PKM カスケードの制御は今まで明らかにされていない。第2章の検討結果から、AIC-47 は c-Myc および非受容体型チロシンキナーゼ BCR-ABL を介して Warburg 効果の破綻を誘導することが示された。そこで本章ではまず AIC-47 およびイマチニブによる miR-124 の発現変化を検証した。さらに、がんの発症過程における miR-124 の発現変化と miR-124 による PTBP1/PKM カスケードの制御を検証した。

第2節 miR-124 の組織分布

miR-124 は脳に特異的に発現している miRNA であり、神経の分化や発達を調節していることが知られている⁵⁵⁾。ヒトの正常組織における miR-124 の組織分布を検証した結果、miR-124 は脳で最も高発現しており、次いで脾臓や骨髄のような造血器で発現が高いことが明らかとなった (Fig. 19)。

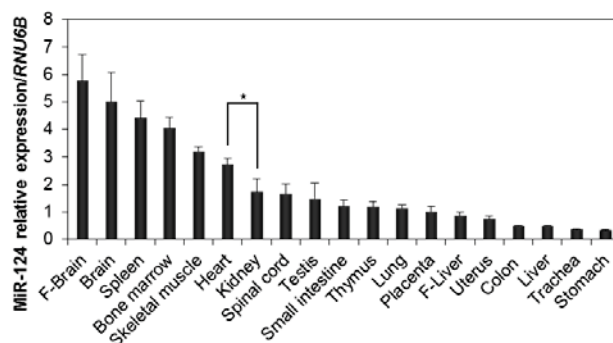


Fig. 19 Expression profile of miR-124 in human normal tissues.

第3節 中鎖脂肪酸誘導体およびイマチニブによる miR-124 の発現変化

AIC-47 およびイマチニブを添加した CML 細胞内の miR-124 の発現を Real-time PCR にて検証した。その結果、イマチニブはいずれの細胞株においても有意な miR-124 の発現増加を示した。AIC-47 も増加傾向は認められたが、KCL-22 細胞に対しては有意差が認められなかった (Fig. 20)。以上の結果から、イマチニブによる Warburg 効果の破綻には miR-124 の発現増加が関与している可能性が示唆された。また、AIC-47 による Warburg 効果の破綻においては miR-124 の発現変化の寄与度が小さいと考えられた。

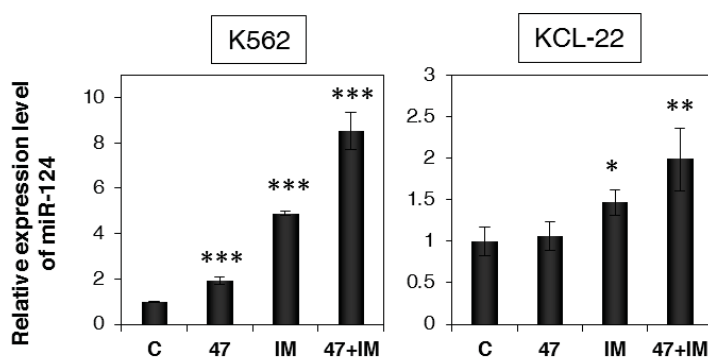


Fig. 20 Effects of AIC-47 and/or imatinib on the expression of miRNA-124 targeting PTBP1.

Expression level of miR-124 in K562 and KCL-22 cells after treatment with DMSO (C; Control), AIC-47 (47; 5 μ M), imatinib (IM; 0.5 μ M for K562, 0.1 μ M for KCL-22) or their combination (47+IM) for 48 h.

第4節 がんの発症過程における miR-124 の発現変化

がんの発生には、initiation、promotion、progression という3つの段階が存在することが知られている。miR-124 は *STAT3* など細胞増殖に関与する遺伝子を標的としがん抑制的に機能する miRNA であり⁹²⁾、様々ながん種で発現が低下していることが報告されている^{92,93)}。しかしながら、がんの発症過程において miR-124 の発現低下がどの段階に位置するかは明らかでない。そこでがんの発症過程における miR-124 の発現変化を検証することとした。CML は1つの遺伝子変異 *BCR-ABL* で発症するため、段階的な発がんの過程をとらない。また、造血幹細胞の腫瘍であるため同一患者から正常骨髄細胞を得ることができない。そこで、adenoma-carcinoma sequence の遺伝子変異の蓄積により段階的に腫瘍化し、同一患者からの正常組織およびがん組織の採取が可能な大腸がん患者の臨床検体を用いた。Real-time PCR により各組織中の miR-124 の発現量を定量し、正常組織とがん組織で発現を比較した。各臨床パラメータで分類した症例数 (n) と、がん組織で miR-124 の発現が低下していた症例数およびその割合 (%) は **Table 3** に示す通りとなった。miR-124 の発現低下は 81.8% の adenoma 症例で確認され、miR-124 は良性腫瘍の段階からすでに発現が低下していることが明らかとなった。その他の臨床パラメータとの有意な相関は認められなかったことから、miR-124 はがんが発生する前段階、すなわち initiation の段階において発現が低下し、がん抑制 miRNA としての機能を失うと考えられた。

Characteristic	n	miR-124 (↓) Case, (%)
Sex		
Male	36	25 (69.4)
Female	19	12 (63.1)
Tumor		
Cancer	33	19 (57.6)
Adenoma	22	18 (81.8)
Location		
Right colon	15	9 (60)
Left colon	40	28 (70)
Depth in cancer		
Mucosa (M)	5	2 (40)
Submucosa (SM)	5	3 (60)
Mucosa propria (MP)	5	5 (100)
Subserosa (SS)	9	4 (44.4)
Serosa exposure, Serosa onvasion (SE, SI)	9	5 (55.6)
Tumor diameter in cancer (mm)		
< 45	16	10 (62.5)
> 45	17	9 (52.9)
Dukes classification system		
A	18	11 (61.1)
B	1	1 (100.0)
C	14	7 (50)
Tumor diameter in adenoma (mm)		
< 10	10	8 (80.0)
> 10	12	10 (83.3)
Grade in adenoma		
Low-grade dysplasia	11	10 (90.9)
High-grade dysplasia	11	8 (72.7)

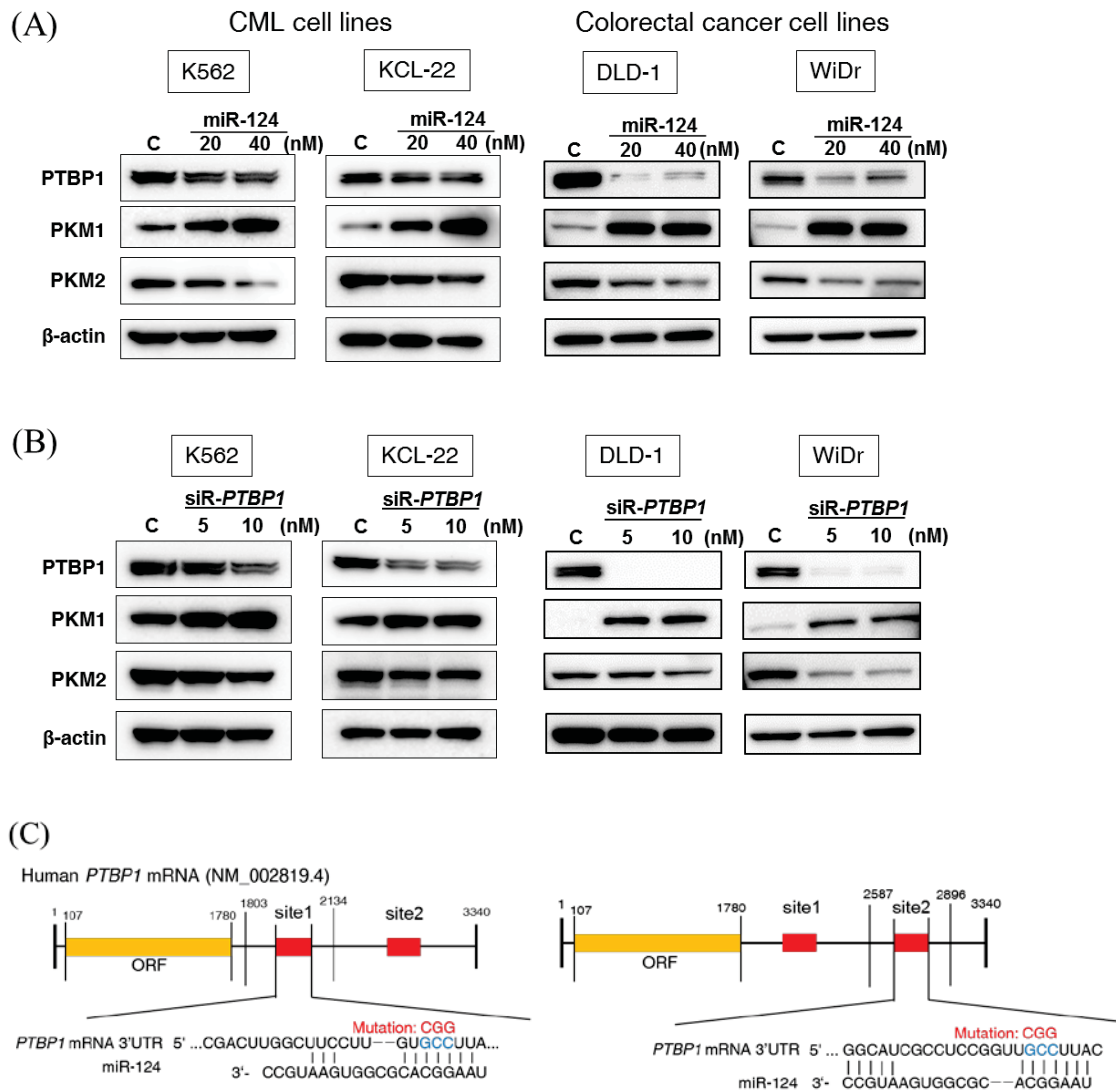
Table 3. Characteristics of study population and expression of miR-124 in colorectal tumors

第5節 miR-124によるがん細胞のエネルギー代謝制御

筆者らはほぼすべてのがん種の cell line において PKM2 が高発現していることを報告している⁴⁵⁾。このことから、ほぼすべてのがん種で PTBP1/PKM カスケードを介して Warburg 効果が成立していると考えられる。そこで、miR-124 による PTBP1/PKM カスケードの制御を CML 細胞と大腸がん細胞で検証した。まず、ヒト CML 細胞株 K562 および KCL-22、ヒト大腸がん細胞株 DLD-1 および WiDr に対し miR-124 を導入し過剰発現させると、PTBP1 の発現低下と PKM2 から PKM1 への発現スイッチが観察された (Fig. 21A)。PKM の2つのアイソザイムの発現スイッチは、siRNA を用いて PTBP1 の発現をノックダウンした場合にも認められた (Fig. 21B)。以上の結果から、miR-124 が PTBP1/PKM カスケードの発現制御に関与していることが明らかとなった。

Target Scan Database 上で PTBP1 の 3'UTR 領域には2か所の miR-124 結合領域が確認された。そこで、Fig. 21C に示すようにそれぞれの miR-124 結合領域を含むように PTBP1 の 3'UTR 領域をクローニングし、Luciferase レポーターベクターに組み込んだ (wild)。また、PTBP1 上で miR-124 が結合する相補的配列の一部に変異を導入し、miR-124 が結合できない変異ベクター (mut) を作製した。これらのベクターを用い、Luciferase reporter assay を行った。miRNA は標的遺伝子の発現を負に制御する。Wild type の配列には miRNA が結合し、その発現が抑制されるため Luciferase 活性が低下する。一方、PTBP1 の配列の一部に変異を入れることで miRNA との結合が解除され、Luciferase 活性の低下も解除される (Fig. 21D)。この実験により、miRNA が標的遺伝子に結合し、その遺伝子発現を制御しているかどうかを確認することができる。Wild type の PTBP1 配列を有するベクター (wild) と miR-124 を共に導入した K562 細胞では Luciferase 活性の有意な低下が認められ、変異を入れたベクター (mut) に

替えることでその Luciferase 活性の低下が解除された (Fig. 21E)。続いて、miR-124 inhibitor を使用し、miR-124 の機能活性を低下させたときの PTBP1 の発現変化を検証した。ヒト CML およびヒト大腸がん細胞に対して miR-124 inhibitor を導入した結果、いずれの細胞株においても miR-124 による PTBP1 の発現低下が解除された (Fig. 21F)。以上の結果から、miR-124 は *PTBP1* の 3'UTR 領域に結合し、PTBP1 の発現を抑制していることが明らかとなった。また、CML 細胞と大腸がん細胞での検討結果が一致したことから、miR-124 の機能はがん細胞において共通である可能性が示された。



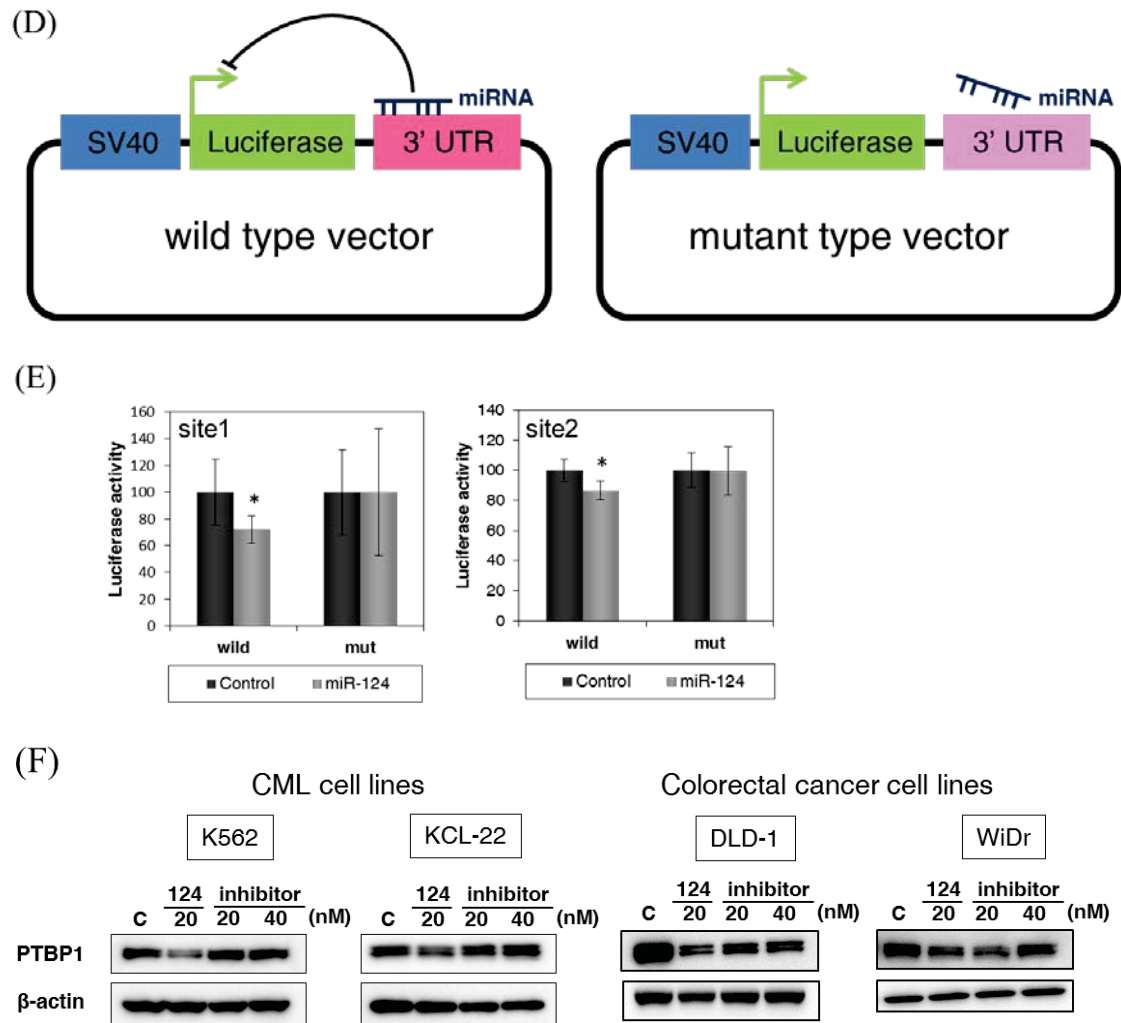


Fig. 21 *PTBP1* is direct target of miR-124.

(A and B) Expression levels of *PTBP1*, *PKM1*, and *PKM2* in K562 and KCL-22 cells after transfection with miR-124 (A) or siR-*PTBP1* (B) for 72 h. (C) Predicted binding sites for miR-124 in the 3'UTR region of human *PTBP1* mRNA (site 1 and site 2) are shown. (D) Schematic of luciferase reporter assay. (E) Luciferase activities measured after co-transfection with control RNA or miR-124 (20 nM) and wild or mutant-type pMIR vectors. (F) Effects of miR-124 inhibitor on the expression of *PTBP1*.

第6節 小括

本章では、Warburg 効果の成立に重要な PTBP1/PKM カスケードの成立に miR-124 が関与していることを検証した。miR-124 は様々ながん種での発現が低下していることが報告されているが、本章での検討の結果、大腸がんにおける miR-124 の発現低下は良性腫瘍の段階で起こっていることが明らかとなった。このことから、がん細胞特異的エネルギー代謝機構である Warburg 効果は発がんの前段階で獲得されている可能性が示唆された (Fig. 22)。また、その他の臨床パラメータとの有意な相関は認められなかったことから、がんの進展や悪性度に関わらず、miR-124 の発現低下による PTBP1/PKM カスケードが成立していると推察された。CML は 1 つの遺伝子変異で発がんに至るため、発がんの過程と miR-124 の発現変化との関連性を検証することができなかったが、CML 細胞においても大腸がん細胞と同様に、miR-124 が PTBP1/PKM カスケードの発現制御に関与していることが明らかとなった。CML の第一選択薬であるイマチニブは miR-124 の発現を優位に増加させたが、AIC-47 は増加傾向のみが認められた。このことから、イマチニブによる Warburg 効果の破綻には miR-124 の発現増加が関与している可能性が示唆された。以上のことから、miR-124 はがん種に依存せず PTBP1/PKM カスケードを介して Warburg 効果を制御していることが明らかとなった (Fig. 22)。

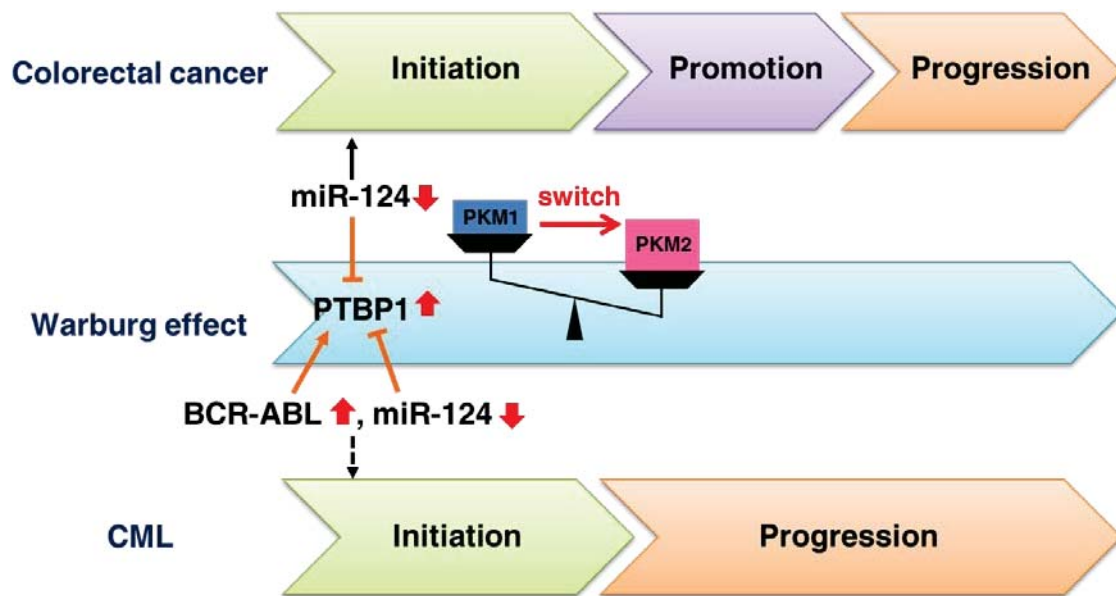


Fig. 22 Schematic diagram of association with Warburg effect and cancer development.

第6章 総括

CMLはt(9;22)転座により生じるPh染色体を特徴とし、この転座染色体上に形成されるキメラ遺伝子*BCR-ABL*をドライバー遺伝子とする造血器腫瘍である。CML治療の第一選択薬として使用されるTKIは、*BCR-ABL*のチロシンキナーゼ活性に関わるATP binding siteをターゲットとする分子標的治療薬であり、従来の化学療法、IFN療法と比較して優れた治療成績を収めてきた。しかしながら、ATP binding siteの点突然変異や白血病幹細胞の残存などによる耐性の獲得が報告されており、これらの耐性はTKIの断薬により頻度が増加することからCML患者はTKIを服用し続けなければならないのが現状である。分子標的治療薬は経済的な負担が大きいことから、比較的安価に提供することができ、TKIに対し耐性を獲得した細胞にも有効な新規治療薬の開発が望まれている。

本研究では、中鎖脂肪酸誘導体AIC-47の作用メカニズムの解明と既存薬との差別化を行い、CMLに対する新規治療薬の創薬シーズとしての有用性を検討した。これまでの研究ではヒトにおける中鎖脂肪酸の生理活性がほとんど明らかにされておらず、抗がん活性に関してはローヤルゼリーに含まれるデセン酸によるものがマウスモデルで報告されているのみであった。デセン酸に関しても抗がん作用のメカニズムが不明であり、医薬品のリードとしては全く注目されてこなかった。

そこで本論文ではまず、中鎖脂肪酸誘導体による抗がん活性の評価と作用メカニズムの解明を行った。AIC-47はヒトCML細胞株に対して1 μ M以上の濃度で有意な増殖抑制作用を示し、その細胞死の形態がオートファジー細胞死であることを明らかにした(第3章第2節、第3節)。中鎖脂肪酸誘導体は、これまでに抗がん作用の報告がある短鎖・長鎖脂肪酸と比較してより強い抗がん活性

を示すことが明らかとなった。パルミチン酸は STAT3 に結合することでオートファジーを誘導することも報告されているが、AIC-47 は STAT3 との結合親和性が低く、パルミチン酸とは標的分子が異なっていることが示唆された。AIC-47 の標的分子としては PPAR γ が最も可能性の高い分子の 1 つであることが示唆された (第 3 章第 6 節) が、標的分子の同定には今後詳細な検討が必要である。さらにオートファジー細胞死に至るメカニズムとして、CML のドライバー遺伝子である *BCR-ABL* の転写抑制と、がん細胞特異的なエネルギー代謝機構である Warburg 効果の破綻が関与していることを見出した (第 3 章第 4 節、第 5 節)。AIC-47 はこれらのがん細胞特異的に発現している機構を作用点とすることで、がん細胞のみを選択的に傷害していると考えられた (第 3 章第 2 節)。また、AIC-47 は *BCR-ABL* の発現を転写レベルで抑制し、ATP binding site の構造に依存しない作用機序を有することから、点突然変異による TKI 耐性の克服にも期待できる薬剤であると推察された。

続いて、中鎖脂肪酸誘導體と既存薬であるイマチニブの作用の差別化を試みた。イマチニブは CML 細胞に対しアポトーシスを誘導し、強い殺細胞効果を示すことが知られているが、エネルギー代謝との関連性はほとんど明らかにされておらず、細胞内へのグルコースの取り込みを制御する GLUT-1 の発現を低下させることのみが報告されている。そこで本研究では AIC-47 とイマチニブとの作用の違いをエネルギー代謝という観点から比較した。その結果、両薬剤がともに Warburg 効果の成立に関与する PTBP1/PKM カスケードを破綻させ、がん細胞の主要なエネルギー獲得機構である解糖系を阻害する作用があることを見出した (第 4 章第 3 節)。この Warburg 効果の破綻の度合いは、PTBP1 を標的とする miR-124 の発現の変化量と相関しており (第 5 章第 3 節、第 5 節)、CML 細胞においても Warburg 効果の獲得と miR-124 の発現に関連性があると考えられた。

また、イマチニブによる強力な殺細胞効果の一因として Warburg 効果の破綻が関与している可能性が示唆された。さらに、イマチニブによる Warburg 効果の破綻が代償的な脂肪酸酸化の活性化を誘導するのに対し、AIC-47 は Warburg 効果と独立した機構で脂肪酸酸化の活性化を抑制することを明らかにした (第 4 章第 4 節)。

これまでに細胞周期の静止により TKI 非感受性を示すことが知られていた白血病幹細胞において、脂肪酸酸化の活性化も耐性獲得に寄与していることが明らかになり、解糖系と共に脂肪酸酸化を阻害する治療法が有効である可能性が示唆された (第 4 章第 5 節)。脂肪酸酸化はエネルギー産生のみならず NADPH の供給源としても機能する。白血病細胞において脂肪酸酸化から生じた NADPH が細胞内の ROS を捕捉し、細胞の生存維持に働くことが報告されている。AIC-47 は過度の ROS を発生させることで細胞死を誘導することを明らかにした (第 3 章第 5 節) が、その原因の 1 つとして解糖系と共に脂肪酸酸化を阻害することで細胞内の NADPH が減少し、TCA サイクルから発生する ROS の除去が不十分になっていることが考えられた。

また、本研究ではこれまでに報告のない新たな知見として、大腸がんにおいて *PTBP1* を標的とする miR-124 が発がん初期に低下していること (第 5 章第 4 節)、CML の原因遺伝子である BCR-ABL が PTBP1/PKM カスケードの活性化に関与していること (第 3 章第 5 節) を明らかにした。これらの知見から、がん細胞の主要なエネルギー獲得経路である Warburg 効果のがん化の初期に成立し、がんの進展や悪性度に関わらず維持される機構であることが示された。Warburg 効果の獲得はエネルギーの産生のみならずがん細胞の生存・増殖に非常に密接に関わっていることから、今後がん細胞のエネルギー代謝をターゲットとした薬剤がさらに重要視されることが示唆された。

本研究で新たに見出した中鎖脂肪酸誘導体 AIC-47 の抗がん活性は、CML のドライバー遺伝子 *BCR-ABL* の転写抑制とエネルギー代謝機構の破綻に起因するものであり、既存薬である TKI とは全く異なる作用点を有していることが明らかとなった (Fig. 23)。これらの作用点からのアプローチにより、現在の CML 治療で問題となっている耐性の獲得や白血病幹細胞による再発を克服できる可能性を有しており、中鎖脂肪酸誘導体が CML に対する新規治療薬の有用な創薬シーズとなることを実証した。

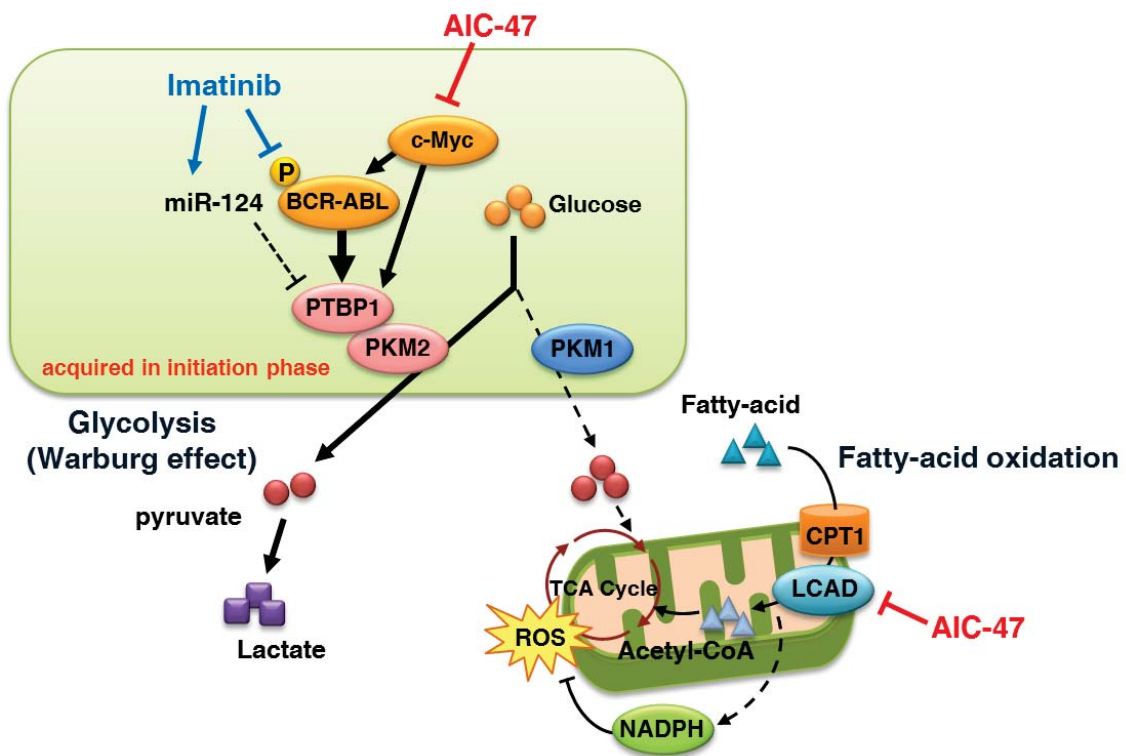


Fig. 23 Schematic diagram of the effects of AIC-47 revealed in this study.

結語

1. 中鎖脂肪酸誘導体はヒト CML 細胞に対する強い抗がん活性を有し、その作用機序が CML のドライバー遺伝子である *BCR-ABL* の転写阻害と、がん細胞特異的なエネルギー代謝機構である Warburg 効果の破綻による ROS の発生を介したものであることを明らかにした。
2. 現在の CML 治療における第一選択薬であるイマチニブは Warburg 効果を強力に破綻させ、その代償性機構として脂肪酸酸化を活性化させることを見出し、白血病幹細胞におけるイマチニブ非感受性の獲得には脂肪酸酸化の活性化が関与していることを明らかにした。一方、中鎖脂肪酸誘導体は Warburg 効果と同時に脂肪酸酸化を阻害し、白血病幹細胞に対しても有効であることを示した。
3. がんの発症過程において、Warburg 効果の獲得に関与する miR-124 の発現変化ががん化の初期段階において生じていることを明らかにした。また、CML のドライバー遺伝子である *BCR-ABL* も Warburg 効果の維持に寄与していることを見出し、エネルギー代謝機構の変化が発がんと密接に関わっている可能性が示唆された。

謝 辞

本研究の遂行および論文の作成にあたり、終始ご懇篤なるご指導、ご鞭撻を賜りました岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 赤尾 幸博 教授に心より感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、多大なご協力とご助言をいただきました国立病院機構名古屋医療センター 直江 知樹 院長、神戸大学 南 陽介 講師、名古屋大学 早川 文彦 講師、大阪医科大学 大槻 勝紀 学長、内山 和久 教授、伊藤 裕子 准教授、岐阜薬科大学 宇野 文二 教授、藤田保健衛生大学 中川 義仁 講師に厚くお礼申し上げます。

また、本論文の作成に際し、ご助言およびご校閲を賜りました岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科 北出 幸夫 教授、稲垣 直樹 教授、上田 浩 准教授に深く感謝いたします。

本研究の遂行にあたり、研究活動を共にしてきた岐阜大学大学院連合創薬医療情報研究科赤尾研究室の皆様にご心よりお礼申し上げます。

最後に、終始私の研生活の励みとなった家族に感謝します。

本研究が慢性骨髄性白血病の患者さんとそのご家族への支援の一助となることを願い謝辞といたします。

実験の部

1. AIC-47 の合成

0.1 mol の 3-decenoic acid (D1186; Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) を 25 mL の thionyl chloride (207-01116; Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) に加え、室温で 2 時間反応させた後、90°C の水浴上で 1 時間加熱還流した。過剰な thionyl chloride は減圧下に留去し、酸塩化物である 3-decenoic chloride を得た。得られた 3-decenoic chloride (5 mmol) を 15 mL の tetrahydrofuran (THF) に溶解し、heptamethylenimine (5 mmol; H0546; Tokyo Chemical Industry) と pyridine (400 mg) を含む THF 溶液を加え、90°C の水浴上で 3 時間加熱還流した。THF を減圧下に留去し、水および酢酸エチルを加えて液-液分配を行った。酢酸エチル層を水洗後濃縮し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー (展開溶媒: クロロホルム) で精製して (*E*)-1-(azocan-1-yl) dec-3-en-1-one (AIC-47) を得た。

得られた化合物の構造は MS および ¹H-NMR で確認した。スペクトルデータは以下の通りである。¹H-NMR の化学シフトは δ 値 (ppm) で示した。また、次の略語を用いた。d, doublet; t, triplet; br, broad; m, unresolved multiplet

HR-ESIMS (m/z): M+H⁺ calcd. for C₁₉H₃₆NO, 294.2791; found, 294.2756;

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 0.88 (t, 3H, J=6.9 Hz), 1.05 (m, 1H), 1.11 (m, 1H), 1.17 (d, 3H, J=6.9 Hz), 1.22-1.38 (m, 10H), 1.47-1.84 (m, 8H), 2.03 (br d, 2H, J=5.8Hz), 3.04 (m, 2H), 3.46 (m, 1H), 3.96 (m, 1H), 5.51 (m, 1H), 5.56 (m, 1H)

AIC-47 は dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して実験に使用した。

2. 細胞培養

ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 および KCL-22、ヒト大腸がん細胞株 DLD-1 および WiDr は Japanese Collection Research Bioresources Cell Bank (Osaka, Japan) より購入した。細胞は購入後 6 カ月以内もしくは MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (LT07-118; Lonza, Rockland, ME, USA) で管理したものを使用した。K562 および DLD-1、WiDr は 10%FBS 含有 RPMI-1640 medium (189-02025; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)、KCL-22 は 20%FBS 含有 RPMI-1640 中で 5% CO₂、37°C の条件下で培養した。

生細胞数は、トリパンブルー色素排除試験法により評価した。培養後の細胞溶液をトリパンブルーと等量混合し、血球計算盤にて生細胞数を計数した。コントロール細胞に対する生細胞数 (%) を細胞生存率とした。

3. ウェスタンブロット解析

3-1 タンパク質抽出

タンパク質抽出液には、Protein lysis buffer (10 mM Tris-HCl、0.1% SDS、1% NP-40、0.1% デオキシコール酸ナトリウム、150 mM NaCl、1 mM EDTA) に 1% Protease inhibitor cocktail、Phosphatase inhibitor cocktail II および III を混合して用いた。タンパク質抽出液に回収した細胞を懸濁させ、20 分間氷中に静置させた。その後、13,000 rpm、4°C、20 分間遠心分離した。遠心分離した上清を回収し、タンパク質サンプルとした。核および細胞質のタンパク質の分画抽出には CellLytic nuclear Extraction Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を使用した。タンパク質定量は、DC Protein assay kit (Biorad, Hercules, CA, USA) を用いて行った。定量したタンパク質を SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl、2% SDS、10%グリセロール、50 mM DTT、0.01%ブロモフェノールブルー) と混和して 50 µg/µL に調整し、98°C で 5

分間煮沸処理した後、氷上で5分間静置した。

3-2 電気泳動および転写

電気泳動には、イージーセパレーター (Wako) および Super Sep Ace (Wako) を用いた。泳動後、ゲルを blotting buffer (25 mM Tris、0.2 M グリシン、20% メタノール) に5分間浸した。PVDF メンブレン (PerkinElmer Life Sciences, Boston, MA, USA) はメタノールに3分間浸し、超純水に5分間浸した。その後、blotting buffer に5分間浸した。陽極側から、blotting buffer に浸したろ紙、PVDF メンブレン、ゲル、ろ紙の順に重ね、15 V、370 mA で40分間転写した。

3-3 ウェスタンブロッティング

転写後、0.1% Tween 20 含有 50 mM Tris-HCl buffer (TBST) で洗浄し、5% スキムミルク溶液に浸して1時間ブロッキングした。TBST で洗浄し、抗体希釈液 (2% BSA、0.01% アジ化ナトリウム、TBST) で希釈した一次抗体に浸して4°Cで一晩反応させた。TBST で洗浄した後、5% スキムミルク溶液で希釈した二次抗体に浸して室温で1時間静置させた。その後再び TBST で洗浄し、Luminata Forte Western HRP Substrate (WBLUF0500; Millipore) で発光させた後に、Luminescent image analyzer LAS-4000 UV mini (Fujifilm, Tokyo, Japan) を用いて検出した。コントロールには anti- β -actin antibody (A5316; Sigma-Aldrich) を使用した。

4. 電子顕微鏡解析

4-1 固定

1×10^6 cells/mL の細胞を回収し、1,500 rpm、10分間遠心分離した後、上清を除

去した。細胞に前固定液 (2%パラホルムアルデヒド、2.5%グルタルアルデヒド、0.2 M PBS) を 1 mL 加えて細胞を軽く分散させ、室温で 2 時間固定した。固定後、1,500 rpm、10 分で遠心分離を行い、上清を除去した。さらに PBS で 1 回洗浄し、1,500 rpm、10 分間遠心分離した。上清を除去し、後固定液 (2% 四酸化オスミウム水溶液、0.2M PBS) を 1 mL 加えた後、4°C で 2 時間固定した。固定後、1,500 rpm、10 分で遠心分離を行い、上清を除去した。PBS を 1 mL 加え、4°C で一晩静置した。

4-2 脱水

細胞に 30%エタノールを加え、攪拌した後 5 分間静置した。1,500 rpm、5 分間遠心分離を行い、上清を除去した。同様に、エタノール濃度を 50、70%とし、細胞と混和した後、5 分間静置、1,500 rpm、5 分間遠心分離を行った。続いて、エタノール濃度を 90、100%とし、細胞を混和した後、10 分間静置、1,500 rpm、5 分間遠心分離する操作を計 4 回繰り返した。

4-3 アルコール置換および樹脂透徹

100%エタノールの半量を除去し、QY-1 (Nissin EM, Tokyo, Japan) をエタノールと等量加えた。室温で 15 分間静置し、2,500 rpm、3 分間遠沈した後、上清を除去し、QY-1 を加えて同様に静置、遠沈した。上清を除去し、QY-1 および Epon 812 (TAAB Laboratories Equipment) の 1:1 混和液を加えた。室温で 1 時間静置した後、2,500 rpm、3 分間遠沈した。上清を除去し、QY-1 および Epon 812 の 1:4 混和液を加え、同様に静置、遠沈した。上清を除去し、Epon 812 を加え、同様に静置、遠沈した。

4-4 包埋および観察

上清を除去し、細胞に Epon 812 を加えた後、2,500 rpm、3 分間遠沈した。60°C で 24 時間インキュベートし、樹脂を重合させた。包埋後の試料ブロックを 70 nm の厚さに薄切し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛電子染色を行った後、透過電子顕微鏡 (TEM) Hitachi-7650 (Hitachi, Tokyo, Japan) を用いて観察した。

5. Real-time PCR

5-1 RNA 抽出

細胞および組織中の RNA は NucleoSpin miRNA kit (TaKaRa, Otsu, Japan) を使用し抽出した。RNA 量は UV spectrophotometry にて定量した。

5-2 mRNA の定量

PrimeScript RT reagent kit (TaKaRa) を使用し、37°C 15 分、85°C 5 秒、4°C で RNA サンプルの逆転写反応を行い、鋳型 cDNA を合成した。Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) 反応には Universal SYBR select Master Mix (Applied Biosystems, Forester City, CA) および **Table 4** のプライマーセットを使用した。GAPDH の mRNA 量を内部コントロールとした。95°C 30 秒で初期変性を行った後、95°C 5 秒の変性反応および 60°C 60 秒のアニーリング・伸長反応を 40 サイクル行い、95°C 15 秒、60°C 30 秒、95°C 15 秒のステップで融解曲線を分析した。各サンプルの反応は 3 回ずつ行い、 $\Delta\Delta C_t$ 法にて mRNA 量を計算した。

Primers	Sequences
<i>BCR-ABL</i> forward	5'-TTCAGAAGCTTCTCCCTGACAT-3'
<i>BCR-ABL</i> reverse	5'-TGTTGACTGGCGTGATGTAGTTGCTTGG-3'
<i>PKM1</i> forward	5'-CGAGCCTCAAGTCACTCCAC-3'
<i>PKM1</i> reverse	5'-GTGAGCAGACCTGCCAGACT-3'
<i>PKM2</i> forward	5'-ATTATTTGAGGAACTCCGCCGCCT-3'
<i>PKM2</i> reverse	5'-ATTCCGGGTCACAGCAATGATGG-3'
<i>GAPDH</i> forward	5'-CAACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3'
<i>GAPDH</i> reverse	5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCACC-3'

Table 4. Sequences of primers using in this study

5-3 miRNA の定量

miRNA の定量には TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems) を使用した。まず、TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems)、stem-loop RT primer (Applied Biosystems) および RNA サンプルを混合し、16°C で 30 分、42°C で 30 分、85°C で 5 分、4°C で 10 分の順で RT 反応を行った。qRT-PCR には TaqMan MicroRNA Assays 内の PCR primer (Applied Biosystems) および THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO, Osaka, Japan) を使用した。95°C 30 秒で変性させた後、95°C 5 秒、60°C 60 秒の反応を 40 サイクル行い、 $\Delta\Delta C_t$ 法にて miRNA 量を計算した。*RNU6B* を内部コントロールとし、各サンプルの反応は 3 回ずつ行った。

6. 遺伝子導入実験

各細胞は 0.5×10^5 cells/mL の細胞密度で 6 ウェルプレートに播種した。DLD-1 および WiDr はトランスフェクションを行う 24 時間前に播種し、プレートに接

着させた。本研究に使用した siRNA (Invitrogen) の配列は **Table 5** に示した。miRNA は、mirVana™ miRNA mimic (Ambion) および mirVana™ miRNA inhibitor (Ambion) を使用した。Control となる非特異 RNA は Hokkaido System Sciences (Sapporo, Japan) より購入した。各 siRNA および miRNA は Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を使用してカチオン性リポソームを形成させ、細胞内に導入した。遺伝子導入を行った細胞は 72 時間後に回収し、各アッセイに使用した。

Gene	Sequences
<i>c-Myc</i>	5'-UUUGUGUUUCAACUGUUCUCGUCGU-3'
<i>PTBP1</i>	5'-AUCUCUGGUCUGCUAAGGUCACUUC-3'
<i>BCR-ABL</i>	5'-GCAGAGUUCAAAAGCCCUU-3'
<i>β-catenin</i>	5'-UAAAGAUGGCCAGUAAGCCCUCACG-3'
Control (non-specific RNA)	5'-GGCCUUUCACUACUCCUCA-3'

Table 5. Sequences of siRNAs using in this study

7. 統計学的解析

各実験は 3 回ずつ行った。実験回数の異なるものは各項目に記載した通りである。実験成績は平均値 ± 標準偏差で示し、統計学的な比較は Student's *t* test により行った。危険率 5% 未満を有意差ありとした。各グラフの有意差は * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ で示している。

第3章に関する実験

1. 試薬

第3章でのウェスタンブロッティングに用いた抗体 LC3B (#3868)、Akt (#9272)、phospho-Akt (Ser473; #4060)、mTOR (#2983)、Beclin-1 (#3495)、PTBP1 (#8776)、 β -catenin (#2698)、Histone H3 (#9715) は Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA) より、Bcl-2 (sc-509)、c-Abl (sc-131)、CrkL (sc-319)、c-Myc (sc-40) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) より、PKM1 (NBP2-14833SS) および PKM2 (NBP1-48308SS) は Novus Biologicals (Littleton, CO, USA) より購入した。

2. 毒性試験

遠沈管に Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) を加え、その上にヒト末梢血の全血を等量重層した後、室温で 3,000 rpm、30 分間遠心分離した。リンパ球を含む中間層の 0.5 cm 上までの上層を除去し、中間層のみを別の遠沈管に取り出した。取り出した中間層を PBS で洗浄し、室温で 1,500 rpm、10 分間遠心分離した。上清を除去し、沈査を PBS で再懸濁させた後、再び室温、1,500 rpm で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、5% FBS を含む RPMI-1640 に再懸濁させたリンパ球を試験に用いた。細胞分裂促進剤として Concanavalin A (Wako) を 75 μ g/mL 添加した。AIC-47 を 2、5、10 μ M の濃度で添加し細胞生存率をトリパンブルー色素排除試験法により計数した。

3. 阻害剤実験

オートファジーの阻害には 3-methyladenine (3-MA; Calbiochem, San Diego, CA, USA) および Bafilomycin A1 (Sigma-Aldrich) を用いた。3-MA および Bafilomycin

A1はDMSOにて溶解した。細胞培養液中に各阻害剤を添加し、8時間後にAIC-47を添加した。培地中のDMSOは終濃度が0.3%以下となるようにした。細胞内のフリーラジカル捕捉剤としては*N*-acetylcysteine (NAC; Sigma-Aldrich)を使用した。NACは滅菌超純水にて溶解した。AIC-47添加4時間前にNACを添加した。各阻害剤は細胞の増殖および分化に影響を与えない濃度で使用した。

4. ChIP アッセイ

K562 および KCL-22 に AIC-47 を添加し、5% CO₂、37°C で 72 時間培養した。ChIP アッセイには ChIP-IT Express Enzymatic (53009; Active Motif, Carlsbad, CA, USA) および c-Myc antibody (#9402; Cell Signaling Technology) を用いた。また、ポジティブコントロールとして Antibody against Suz12 (39357; Active Motif)、ネガティブコントロールとして rabbit IgG (53025; Active Motif) を使用した。免疫沈降反応で回収した DNA は Real-time PCR にて増幅し、Input DNA の全体量に対する増幅率を求めた。

5. L-lactate アッセイ

K562 および KCL-22 に対し、AIC-47 を 5 μM 添加、もしくは siR-*BCR-ABL*、siR-*c-Myc*、siR-*PTBP1* を 5 nM トランスフェクションし、5% CO₂、37°C で 72 時間培養した。細胞を回収し、L-Lactate Assay kit (700510; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) を用いて細胞内の L-lactate を抽出および測定を行った。測定値は各サンプルの生細胞数で補正し、細胞内乳酸産生量とした。各サンプルに対する実験は 4 回ずつ行った。

6. 電子スピン共鳴法 (Electron Spin Resonance; ESR)

K562 細胞に AIC-47 (5 μ M) を添加し、5% CO₂、37°C で 8 時間培養した。細胞を回収し、5, 5-dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO; D2362; Tokyo Chemical Industry) で溶解して細胞内の酸素ラジカルを捕捉した。ESR スペクトルは石英セル (i. d. 0.75 mm, JES-LC01) を用い、室温下で JEOL JES-FR30EX free-radical monitor (JEOL Ltd., Akishima Japan) により測定した。測定条件は以下の通りである。magnetic field: 336.000 \pm 5.000 mT、power: 8.98 mW、sweep time: 4 min、modulation: 100 kHz、0.08 mT、amplitude: 4000、time constant: 0.3s 測定したピーク長を測定し、シグナル強度とした。なお、酸素ラジカルを捕捉した細胞液中に DMSO を加えたときの ESR スペクトルには変化がなく、本研究で測定した酸素ラジカル中に OH ラジカルが含まれないことを確認した。

7. ドッキング・シミュレーション

STAT3 (PDB code 3CWG)⁹⁴⁾ および PPAR γ (PDB code 2ZK0)⁹⁵⁾ のタンパク質結晶構造と AIC-47 とのドッキング・シミュレーションは AutoDock4 を用いて行った⁹⁶⁾。100 回のシミュレーション結果を基に結合エネルギーを計算し、最小の結合エネルギーとなる配置を可視化した。

第4章に関する実験

1. 試薬

メシル酸イマチニブ (I0936; Tokyo Chemical Industry) およびクロロキン (Sigma-Aldrich) は DMSO に溶解した。クロロキン (1 μM) は AIC-47 (5 μM) およびイマチニブ (K562: 0.25 μM , KCL-22: 0.1 μM) 添加の4時間前に細胞培養液中に添加し、オートファジーの阻害に使用した。Etomoxir (Sigma-Aldrich) は滅菌超純水に溶解し、脂肪酸酸化阻害剤として AIC-47 (5 μM) およびイマチニブ (K562: 0.25 μM , KCL-22: 0.1 μM) と同時に、終濃度 100 μM となるように添加した。培地中の DMSO は終濃度が 0.3% 以下となるようにし、各阻害剤は細胞の増殖および分化に影響を与えない濃度で使用した。

第4章でのウェスタンブロッティングに用いた抗体 PARP-1 (#9542)、p62 (#5114)、Phospho-Abl (#2861)、mTOR (#2983)、PTBP1 (#8776)、PKM1 (#7067)、PKM2 (#4053)、Phospho-PKM2 (#3827) は Cell Signaling Technology より、c-Abl (sc-131)、CPT1C (sc-139480) は Santa Cruz Biotechnology より購入した。

2. 免疫蛍光染色

免疫蛍光染色は Cell Signaling Technology のプロトコールに従った。K562 に AIC-47 (5 μM) またはイマチニブ (K562: 0.25 μM , KCL-22: 0.1 μM) を添加し、48時間後の細胞を回収した。Smear Gell (SG-01; GenoStaff, Tokyo, Japan) を用いてスライドガラス上に細胞を付着させ、4%ホルムアルデヒドに浸して室温で15分間細胞を固定した。PBSにて細胞を洗浄し、ブロッキングバッファー (1 \times PBS、5%正常ヤギ血清、0.3% TritonTM X-100) で60分間ブロッキングした。その後、ブロッキングバッファーを吸引除去し、一次抗体をアプライして4 $^{\circ}\text{C}$ で一晩イ

ンキュベートした。一次抗体には、Cell Signaling Technology より購入した PKM1 (#7067)、PKM2 (#4053) を使用した。PBS で洗浄した後、蛍光標識二次抗体を加えて暗所、室温で2時間インキュベートした。二次抗体には Anti-Rabbit IgG (H+L), F(ab')₂ Fragment Alexa Fluor 488 Conjugate (#4412; Cell Signaling Technology) を用いた。また、細胞核の染色に Hoechst33342、細胞骨格の染色に fluorescent F-actin probe Rhodamine Phalloidin (Cytoskeleton, Denver, CO, USA) を使用し、二次抗体と同時にインキュベートした。再度洗浄を行い、封入剤を添加したものを BIORIVO fluorescence microscope (Keyence, Osaka, Japan) にて観察した。

3. L-lactate アッセイ

K562 および KCL-22 に AIC-47 (5 μ M) またはイマチニブ (K562: 0.25 μ M, KCL-22: 0.1 μ M) を添加し、5% CO₂、37°C で培養した。48 時間後に細胞を回収し、L-Lactate Assay kit (700510; Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA) を用いて細胞内の L-lactate を抽出した。Lactate Colorimetric/Fluorometric Assay kit (#607-100; Biovision, Milpitas, CA, USA) を用いて測定した。測定値は各サンプルの生細胞数で補正し、細胞内乳酸産生量とした。

4. ATP アッセイ

K562 および KCL-22 に AIC-47 (5 μ M) またはイマチニブ (K562: 0.25 μ M, KCL-22: 0.1 μ M) を添加し、5% CO₂、37°C で培養した。プログラム細胞死による ATP の消費を防ぐために、培養6時間後に細胞を回収し、ATP Determination Kit (A22066; Invitrogen) にて ATP レベルを測定した。測定値は各サンプルの生細胞数で補正した。

培地は以下の組み合わせで組成を変更した。グルコースが存在する培地

(Glucose +) には、RPMI-1640 medium (189-02025; Invitrogen)、グルコースを除いた培地 (Glucose -) には Glucose-free RPMI-1640 (185-02865; Invitrogen) を使用した。脂肪酸が存在する培地 (Fatty-acid +) には fatty-acid-free albumin solution (017-22231; Wako) に Lipid mixture (L-0288; Sigma-Aldrich) を添加し、脂肪酸を含まない培地 (Fatty-acid -) には fatty-acid-free albumin solution のみを添加して使用した。

5. 脂肪酸分析

K562 に AIC-47 を添加し、5% CO₂、37°C で 48 時間培養した。細胞内の脂肪酸抽出およびガスクロマトグラフィーによる遊離脂肪酸分析は Toray Research Center (Tokyo, Japan) に委託した。

6. 酵素活性の評価

Long-chain acyl-CoA dehydrogenase (LCAD) の酵素活性は、脱水素反応と同時に補酵素 FAD が FADH₂ に変換される還元反応を利用し、測定した。50 mM KPi (pH 7.6)、1 μM FAD、36 μM 2,6-dichlorophenolindophenol (Cl₂PIP)、0.3 mM N-ethylmaleimide、30 pg human recombinant LCAD、myristoyl-CoA を混合した反応液を調製し、1.5 mM phenazine methosulfate を加えて反応を開始させた。Cl₂PIP の青色が還元されて無色になる反応を 600 nm の吸光度として測定し、AIC-47 (10 nM) 存在下と非存在下で比較した。V_{max}、K_m、K_i の計算および得られた直線の有意差検定には GraphPad Prism 6.0 を用いた。

7. 白血病幹細胞の樹立と分取

Ph⁺ ALL モデルマウスの樹立および CD34⁺分画の分取は名古屋大学医学部血

液内科で行ったものを分譲していただいた^{32,97)}。免疫不全 NOD/SCID/IL2 γ ^{null} (NOG) マウスに Ph⁺ ALL 患者の細胞を移植し、Ph⁺ ALL モデルマウスを樹立した。8~10 週後に脾臓の細胞を回収し、erythrocyte lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて赤血球を除いた。白血病細胞の CD34⁺分画は MACS CD34⁺ MicroBead Kit (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA) を用いて分取した。播種する際には、10%FBS 含有 RPMI-1640 medium (189-02025) を使用した。

第 5 章に関する実験

1. 試薬

第 5 章でのウェスタンブロッティングに用いた抗体 PTBP1 (#8776)、PKM1 (#7067)、PKM2 (#4053) は Cell Signaling Technology より購入した。DLD-1 および WiDr の PKM1 (NBP2-14833SS) および PKM2 (NBP1-48308SS) の検出には Novus Biologicals より購入したものを使用した。

2. 臨床検体

すべての臨床検体は藤田保健衛生大学病院、大阪医科大学附属病院、大阪府済生会茨木病院にて、生体組織検査もしくは外科手術の際に採取した。臨床検体の使用に関しては、各組織の倫理審査委員会に承認を得た。すべての患者にインフォームド・コンセントをとり、同意書をいただいた。治療を受ける前の大腸がん (cancer) 患者 33 名および良性腺腫 (adenoma) 患者 22 名について、腫瘍部と腫瘍化していない粘膜組織を同一患者より採取した。

3. Luciferase reporter assay

Target Scan database で示された 2 か所の miR-124 結合領域 2109-2116 (site 1) および 2731-2737 (site 2) を含む Luciferase レポーターベクターを作製した。site 1 は 1803-2134 を、site 2 は 2587-2898 をそれぞれクローニングし、pMIR-REPORT Luciferase miRNA Expression Reporter Vector (Applied Biosystems) に組み込んだ (wild type vector)。PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (TaKaRa) を用い、wild type ベクターの miR-124 結合配列の一部 (TGCCTTA) に変異 (TCGGTTA) を導入した (mutant type vector)。詳細な配列は第 5 章第 5 節 **Fig. 21C** に示した。作製した

各ベクター (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と、miR-124 (20 nM) もしくは Control miRNA (Dharmacon, Tokyo, Japan) を K562 にコトランスフェクションし、Luciferase 活性を Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA) を使用して測定した。Firefly の Luciferase 活性を Renilla の Luciferase 活性で補正し、データとした。各実験は 4 回ずつ行った。

参考文献

- 1 Cilloni, D.,Saglio, G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin Cancer Res* **18**, 930-937 (2012).
- 2 Groffen, J. *et al.* Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell* **36**, 93-99 (1984).
- 3 Melo, J. V.,Barnes, D. J. Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 441-453 (2007).
- 4 Daley, G. Q., Van Etten, R. A.,Baltimore, D. Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Science* **247**, 824-830 (1990).
- 5 Deininger, M. W., Goldman, J. M.,Melo, J. V. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* **96**, 3343-3356 (2000).
- 6 McWhirter, J. R., Galasso, D. L.,Wang, J. Y. A coiled-coil oligomerization domain of Bcr is essential for the transforming function of Bcr-Abl oncoproteins. *Mol Cell Biol* **13**, 7587-7595 (1993).
- 7 Pendergast, A. M., Muller, A. J., Havlik, M. H., Maru, Y.,Witte, O. N. BCR sequences essential for transformation by the BCR-ABL oncogene bind to the ABL SH2 regulatory domain in a non-phosphotyrosine-dependent manner. *Cell* **66**, 161-171 (1991).
- 8 Pendergast, A. M. *et al.* BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. *Cell* **75**, 175-185 (1993).
- 9 Vardiman, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937-951 (2009).
- 10 Baccarani, M., Castagnetti, F., Gugliotta, G.,Rosti, G. A review of the European LeukemiaNet recommendations for the management of CML. *Ann Hematol* **94 Suppl 2**, S141-147 (2015).
- 11 Long-Term Follow-Up of the Italian Trial of Interferon-alpha \square Versus Conventional Chemotherapy in Chronic Myeloid Leukemia. *Blood* **92**, 1541-1548 (1998).
- 12 Druker, B. J. *et al.* Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* **355**, 2408-2417 (2006).
- 13 Druker, B. J. *et al.* Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase

- on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* **2**, 561-566 (1996).
- 14 Fang, G. *et al.* CGP57148B (STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood* **96**, 2246-2253 (2000).
- 15 Nimmanapalli, R., Bhalla, K. Novel targeted therapies for Bcr-Abl positive acute leukemias: beyond STI571. *Oncogene* **21**, 8584-8590 (2002).
- 16 Shah, N. P. *et al.* Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* **2**, 117-125 (2002).
- 17 O'Hare, T., Zabriskie, M. S., Eiring, A. M., Deininger, M. W. Pushing the limits of targeted therapy in chronic myeloid leukaemia. *Nat Rev Cancer* **12**, 513-526 (2012).
- 18 Gorre, M. E. *et al.* Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* **293**, 876-880 (2001).
- 19 Lee, T. S. *et al.* BCR-ABL alternative splicing as a common mechanism for imatinib resistance: evidence from molecular dynamics simulations. *Mol Cancer Ther* **7**, 3834-3841 (2008).
- 20 Corbin, A. S. *et al.* Human chronic myeloid leukemia stem cells are insensitive to imatinib despite inhibition of BCR-ABL activity. *J Clin Invest* **121**, 396-409 (2011).
- 21 Minami, Y. *et al.* Retention of CD34+ CML stem/progenitor cells during imatinib treatment and rapid decline after treatment with second-generation BCR-ABL inhibitors. *Leukemia* **26**, 2142-2143 (2012).
- 22 Gambacorti-Passerini, C. *et al.* Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1641-1650 (2000).
- 23 Gambacorti-Passerini, C. *et al.* Alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* **9**, 625-632 (2003).
- 24 Mahon, F. X. *et al.* Evidence that resistance to nilotinib may be due to BCR-ABL, Pgp, or Src kinase overexpression. *Cancer Res* **68**, 9809-9816 (2008).
- 25 Ng, K. P. *et al.* A common BIM deletion polymorphism mediates intrinsic resistance and inferior responses to tyrosine kinase inhibitors in cancer. *Nat Med* **18**, 521-528 (2012).

- 26 Ito, T., Tanaka, H., Kimura, A. Establishment and characterization of a novel imatinib-sensitive chronic myeloid leukemia cell line MYL, and an imatinib-resistant subline MYL-R showing overexpression of Lyn. *Eur J Haematol* **78**, 417-431 (2007).
- 27 Branford, S. *et al.* Detection of BCR-ABL mutations in patients with CML treated with imatinib is virtually always accompanied by clinical resistance, and mutations in the ATP phosphate-binding loop (P-loop) are associated with a poor prognosis. *Blood* **102**, 276-283 (2003).
- 28 Graham, S. M. *et al.* Primitive, quiescent, Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. *Blood* **99**, 319-325 (2002).
- 29 Mahon, F. X. *et al.* Discontinuation of imatinib in patients with chronic myeloid leukaemia who have maintained complete molecular remission for at least 2 years: the prospective, multicentre Stop Imatinib (STIM) trial. *Lancet Oncol* **11**, 1029-1035 (2010).
- 30 Dusetzina, S. B., Winn, A. N., Abel, G. A., Huskamp, H. A., Keating, N. L. Cost sharing and adherence to tyrosine kinase inhibitors for patients with chronic myeloid leukemia. *J Clin Oncol* **32**, 306-311 (2014).
- 31 Mancini, M., Petta, S., Martinelli, G., Barbieri, E., Santucci, M. A. RAD 001 (everolimus) prevents mTOR and Akt late re-activation in response to imatinib in chronic myeloid leukemia. *J Cell Biochem* **109**, 320-328 (2010).
- 32 Kuwatsuka, Y. *et al.* The mTOR inhibitor, everolimus (RAD001), overcomes resistance to imatinib in quiescent Ph-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood Cancer J* **1**, e17 (2011).
- 33 Reavie, L. *et al.* Regulation of c-Myc ubiquitination controls chronic myelogenous leukemia initiation and progression. *Cancer Cell* **23**, 362-375 (2013).
- 34 Naka, K. *et al.* Dipeptide species regulate p38MAPK-Smad3 signalling to maintain chronic myelogenous leukaemia stem cells. *Nat Commun* **6**, 8039 (2015).
- 35 Zhao, Y., Butler, E. B., Tan, M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. *Cell Death Dis* **4**, e532 (2013).
- 36 Hanahan, D., Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646-674 (2011).
- 37 Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309-314 (1956).
- 38 Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., Thompson, C. B. Understanding the

- Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029-1033 (2009).
- 39 Christofk, H. R. *et al.* The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* **452**, 230-233 (2008).
- 40 Chen, M., Zhang, J., Manley, J. L. Turning on a fuel switch of cancer: hnRNP proteins regulate alternative splicing of pyruvate kinase mRNA. *Cancer Res* **70**, 8977-8980 (2010).
- 41 Gupta, V., Bamezai, R. N. Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein. *Protein Sci* **19**, 2031-2044 (2010).
- 42 Noguchi, T., Inoue, H., Tanaka, T. The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. *J Biol Chem* **261**, 13807-13812 (1986).
- 43 Clower, C. V. *et al.* The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1894-1899 (2010).
- 44 David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P., Manley, J. L. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. *Nature* **463**, 364-368 (2010).
- 45 Taniguchi, K. *et al.* Organ-specific PTB1-associated microRNAs determine expression of pyruvate kinase isoforms. *Sci Rep* **5**, 8647 (2015).
- 46 Koppenol, W. H., Bounds, P. L., Dang, C. V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nat Rev Cancer* **11**, 325-337 (2011).
- 47 Macintyre, A. N., Rathmell, J. C. Activated lymphocytes as a metabolic model for carcinogenesis. *Cancer Metab* **1**, 5 (2013).
- 48 Hsu, P. P., Sabatini, D. M. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* **134**, 703-707 (2008).
- 49 Scherz-Shouval, R., Elazar, Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy. *Trends Cell Biol* **17**, 422-427 (2007).
- 50 Hitosugi, T. *et al.* Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth. *Sci Signal* **2**, ra73 (2009).
- 51 Sun, Q. *et al.* Mammalian target of rapamycin up-regulation of pyruvate kinase isoenzyme type M2 is critical for aerobic glycolysis and tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 4129-4134 (2011).
- 52 Lee, Y. S., Dutta, A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* **4**, 199-227 (2009).
- 53 Finch, M. L., Marquardt, J. U., Yeoh, G. C., Callus, B. A. Regulation of

- microRNAs and their role in liver development, regeneration and disease. *Int J Biochem Cell Biol* **54**, 288-303 (2014).
- 54 Lynam-Lennon, N., Maher, S. G., Reynolds, J. V. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. *Biol Rev Camb Philos Soc* **84**, 55-71 (2009).
- 55 Makeyev, E. V., Zhang, J., Carrasco, M. A., Maniatis, T. The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **27**, 435-448 (2007).
- 56 Hiyoshi, Y. *et al.* MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* **15**, 1915-1922 (2009).
- 57 Esquela-Kerscher, A., Slack, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 259-269 (2006).
- 58 Buzzai, M. *et al.* The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. *Oncogene* **24**, 4165-4173 (2005).
- 59 Schafer, Z. T. *et al.* Antioxidant and oncogene rescue of metabolic defects caused by loss of matrix attachment. *Nature* **461**, 109-113 (2009).
- 60 Bonnefont, J. P. *et al.* Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med* **25**, 495-520 (2004).
- 61 Zaugg, K. *et al.* Carnitine palmitoyltransferase 1C promotes cell survival and tumor growth under conditions of metabolic stress. *Genes Dev* **25**, 1041-1051 (2011).
- 62 Barger, J. F. *et al.* S6K1 determines the metabolic requirements for BCR-ABL survival. *Oncogene* **32**, 453-461 (2013).
- 63 Kroumova, A. B., Xie, Z., Wagner, G. J. A pathway for the biosynthesis of straight and branched, odd- and even-length, medium-chain fatty acids in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 11437-11441 (1994).
- 64 Akazawa, Y. *et al.* Palmitoleate attenuates palmitate-induced Bim and PUMA up-regulation and hepatocyte lipoapoptosis. *J Hepatol* **52**, 586-593 (2010).
- 65 McLennan, P. L. Cardiac physiology and clinical efficacy of dietary fish oil clarified through cellular mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Eur J Appl Physiol* **114**, 1333-1356 (2014).
- 66 Mahaffey, K. R. *et al.* Balancing the benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids and the risks of methylmercury exposure from fish consumption. *Nutr Rev* **69**, 493-508 (2011).
- 67 Avivi-Green, C., Polak-Charcon, S., Madar, Z., Schwartz, B. Different

- molecular events account for butyrate-induced apoptosis in two human colon cancer cell lines. *J Nutr* **132**, 1812-1818 (2002).
- 68 Furusawa, Y. *et al.* Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature* **504**, 446-450 (2013).
- 69 Gerhold, K. A.,Bautista, D. M. Molecular and cellular mechanisms of trigeminal chemosensation. *Ann N Y Acad Sci* **1170**, 184-189 (2009).
- 70 Wanner, K. W. *et al.* A honey bee odorant receptor for the queen substance 9-oxo-2-decenoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14383-14388 (2007).
- 71 Shinohara, H. *et al.* 3-Decenoic acid derivatives induce autophagic cell death through the down-regulation of E2F1. *Journal of Toxicology Research* **3**, 29-34 (2013).
- 72 Townsend, G. F., Brown, W. H., Felauer, E. E.,Hazlett, B. Studies on the in vitro antitumor activity of fatty acids. IV. The esters of acids closely related to 10-hydroxy-2-decenoic acids from royal jelly against transplantable mouse leukemia. *Can J Biochem Physiol* **39**, 1765-1770 (1961).
- 73 Green, D. R.,Llambi, F. Cell Death Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7** (2015).
- 74 Tan, S. H. *et al.* Induction of autophagy by palmitic acid via protein kinase C-mediated signaling pathway independent of mTOR (mammalian target of rapamycin). *J Biol Chem* **287**, 14364-14376 (2012).
- 75 Baehrecke, E. H. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 505-510 (2005).
- 76 Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**, 445-544 (2012).
- 77 Yang, Z.,Klionsky, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 124-131 (2010).
- 78 Shen, S. *et al.* Cytoplasmic STAT3 represses autophagy by inhibiting PKR activity. *Mol Cell* **48**, 667-680 (2012).
- 79 Kliewer, S. A. *et al.* Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4318-4323 (1997).
- 80 Apsel Winger, B.,Shah, N. P. PPARgamma: Welcoming the New Kid on the CML Stem Cell Block. *Cancer Cell* **28**, 409-411 (2015).
- 81 Zurlo, D., Assante, G., Moricca, S., Colantuoni, V.,Lupo, A. Cladosporol A, a new peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) ligand, inhibits colorectal cancer cells proliferation through

- beta-catenin/TCF pathway inactivation. *Biochim Biophys Acta* **1840**, 2361-2372 (2014).
- 82 He, T. C. *et al.* Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**, 1509-1512 (1998).
- 83 Malhi, H., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Gores, G. J. Free fatty acids induce JNK-dependent hepatocyte lipoapoptosis. *J Biol Chem* **281**, 12093-12101 (2006).
- 84 Gottschalk, S., Anderson, N., Hainz, C., Eckhardt, S. G., Serkova, N. J. Imatinib (STI571)-mediated changes in glucose metabolism in human leukemia BCR-ABL-positive cells. *Clin Cancer Res* **10**, 6661-6668 (2004).
- 85 Barnes, K. *et al.* Chronic myeloid leukaemia: an investigation into the role of Bcr-Abl-induced abnormalities in glucose transport regulation. *Oncogene* **24**, 3257-3267 (2005).
- 86 Samudio, I. *et al.* Pharmacologic inhibition of fatty acid oxidation sensitizes human leukemia cells to apoptosis induction. *J Clin Invest* **120**, 142-156 (2010).
- 87 Carracedo, A., Cantley, L. C., Pandolfi, P. P. Cancer metabolism: fatty acid oxidation in the limelight. *Nat Rev Cancer* **13**, 227-232 (2013).
- 88 Jeon, S. M., Chandel, N. S., Hay, N. AMPK regulates NADPH homeostasis to promote tumour cell survival during energy stress. *Nature* **485**, 661-665 (2012).
- 89 Hosokawa, K. *et al.* Function of oxidative stress in the regulation of hematopoietic stem cell-niche interaction. *Biochem Biophys Res Commun* **363**, 578-583 (2007).
- 90 Ito, K. *et al.* Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* **431**, 997-1002 (2004).
- 91 Sun, Y., Zhao, X., Zhou, Y., Hu, Y. miR-124, miR-137 and miR-340 regulate colorectal cancer growth via inhibition of the Warburg effect. *Oncol Rep* **28**, 1346-1352 (2012).
- 92 Zhang, J. *et al.* MiR-124 suppresses growth of human colorectal cancer by inhibiting STAT3. *PLoS One* **8**, e70300 (2013).
- 93 Xia, J. *et al.* miR-124 inhibits cell proliferation in gastric cancer through down-regulation of SPHK1. *J Pathol* **227**, 470-480 (2012).
- 94 Ren, Z. *et al.* Crystal structure of unphosphorylated STAT3 core fragment. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 1-5 (2008).
- 95 Waku, T. *et al.* Structural insight into PPARgamma activation through

- covalent modification with endogenous fatty acids. *J Mol Biol* **385**, 188-199 (2009).
- 96 Morris, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **30**, 2785-2791 (2009).
- 97 Tanizaki, R. *et al.* Irrespective of CD34 expression, lineage-committed cell fraction reconstitutes and re-establishes transformed Philadelphia chromosome-positive leukemia in NOD/SCID/IL-2R γ mac $^{-/-}$ mice. *Cancer Sci* **101**, 631-638 (2010).

研究業績目録

学位論文の基となる論文

- (1) Perturbation of energy metabolism by fatty-acid derivative AIC-47 and imatinib in BCR-ABL-harboring leukemic cells.
Haruka Shinohara, Minami Kumazaki, Yosuke Minami, Yuko Ito, Nobuhiko Sugito, Yuki Kuranaga, Kohei Taniguchi, Nami Yamada, Yoshinori Otsuki, Tomoki Naoe, Yukihiro Akao.
Cancer Letters; **371** (1): 1-11 (2016).
- (2) Anti-cancer fatty-acid derivative induces autophagic cell death through modulation of PKM isoform expression profile mediated by bcr-abl in chronic myeloid leukemia.
Haruka Shinohara, Kohei Taniguchi, Minami Kumazaki, Nami Yamada, Yuko Ito, Yoshinori Otsuki, Bunji Uno, Fumihiko Hayakawa, Yosuke Minami, Tomoki Naoe, Yukihiro Akao.
Cancer Letters; **360** (1): 28-38 (2015)
- (3) MicroRNA-124 inhibits cancer cell growth through PTB1/PKM1/PKM2 feedback cascade in colorectal cancer.
Kohei Taniguchi, Nobuhiko Sugito, Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Nami Yamada, Yoshihito Nakagawa, Yuko Ito, Yoshinori Otsuki, Bunji Uno, Kazuhisa Uchiyama, Yukihiro Akao.
Cancer Letters; **363** (1) 17-27 (2015)

その他の論文

- (1) Propolis cinnamic acid derivatives induce apoptosis through both extrinsic and intrinsic apoptosis signaling pathways and modulate of miRNA expression.
Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Kohei Taniguchi, Nami Yamada, Shozo Ohta, Kenji Ichihara, Yukihiro Akao.
Phytomedicine. ; **21** (8-9): 1070-1077 (2014).
- (2) Colorectal cancer cell-derived microvesicles containing microRNA-1246 promote angiogenesis by activating Smad 1/5/8 signaling elicited by PML down-regulation in endothelial cells.
Nami Yamada, Nonoka Tsujimura, Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Kohei

Taniguchi, Yoshihito Nakagawa, Tomoki Naoe, Yukihiro Akao.
Biochim Biophys Acta.; **1839** (11): 1256-1272 (2014).

- (3) Organ-specific PTB1-associated microRNAs determine expression of pyruvate kinase isoforms.

Kohei Taniguchi, Yuko Ito, Nobuhiko Sugito, Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Nami Yamada, Yoshihito Nakagawa, Tarou Sugiyama, Manabu Futamura, Yoshinori Otsuki, Kazuhiro Yoshida, Kazuhisa Uchiyama, Yukihiro Akao.
Sci Rep.; **5**: 8647(2015).

- (4) Positive feedback of DDX6/c-Myc/PTB1 regulated by miR-124 contributes to maintenance of the Warburg effect in colon cancer cells.

Kohei Taniguchi, Nobuhiko Sugito, Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Nami Yamada, Nobuhisa Matsushashi, Manabu Futamura, Yuko Ito, Yoshinori Otsuki, Kazuhiro Yoshida, Kazuhisa Uchiyama, Yukihiro Akao.
Biochim Biophys Acta.; **1852** (9): 1971-1980 (201).

- (5) Understanding of tolerance in TRAIL-induced apoptosis and cancelation of its machinery by α -mangostin, a xanthone derivative.

Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Kohei Taniguchi, Hiroshi Ueda, Mayuko Nishi, Akihida Ryo, Yukihiro Akao.
Oncotarget.; **6** (28): 25828-25842 (2015).

- (6) Anti-Oncogenic gem-Dihydroperoxides Induce Apoptosis in Cancer Cells by Trapping Reactive Oxygen Species.

Kuranaga Yuki, Nami Yamada, Maiko Kashiwaya, Moeko Nakamura, Lei Cui, Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Nobuhiko Sugito, Kohei Taniguchi, Yuko Ito, Tatsushi Nakayama, Bunji Uno, Akichika Itoh, Yukihiro Akao.
Int. J. Mol. Sci.; **17** (1): 71 (2016).

- (7) Cololectal cancer cell-derived extracellular vesicle induce phenotypic alteration of T cells into tumor-growth supporting cells with transforming growth factor- β 1-mediated suppression.

Nami Yamada, Kuranaga Yuki, Minami Kumazaki, Haruka Shinohara, Kohei Taniguchi, Yukihiro Akao.
Oncotarget.; *in press.*

学会発表

1. 第 18 回日本がん分子標的治療学会 2014 年 6 月
「3-デセン酸誘導体による bcr-abl キメラ遺伝子/Warburg 効果の脱制御を介したオートファジー細胞死の誘導」

2. 第 73 回日本癌学会 2014 年 9 月
「3-デセン酸誘導体による bcr-abl 融合遺伝子の転写阻害とエネルギー代謝脱制御」

3. 第 135 回日本薬学会 2015 年 3 月
「慢性骨髄性白血病キメラ遺伝子 bcr-abl を標的とした新規抗がん剤の開発」

4. 第 19 回日本がん分子標的治療学会 2015 年 6 月
「Ph 陽性白血病に対する AIC-47 の bcr-abl 転写抑制とイマチニブの併用効果」

5. 第 19 回日本がん免疫学会 (がん免疫療法・マクロファージ国際会議 2015)
2015 年 7 月
「The regulated polarization of tumor-associated macrophages by secretions from cancer cells」

6. 第 3 回がんと代謝研究会 2015 年 7 月
「イマチニブによるエネルギー代謝制御と脂肪酸誘導体 AIC-47 による相乗効果」

7. 第 74 回日本癌学会 2015 年 10 月

「TKI 非感受性株に対する AIC-47 の抗がん作用」

8. 第 53 回日本癌治療学会 2015 年 10 月

「イマチニブ非感受性白血病に対する新規脂肪酸誘導体 AIC-47 の
増殖抑制作用」