

アセトゲニン誘導体 JCI-20679 による
膠芽腫細胞に対する増殖抑制機構の解明

2022 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】臨床腫瘍学分野

安藤 翔太

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

1. Shota Ando, Naoto Kojima, Chiami Moyama, Mitsugu Fujita, Kaito Ohta, Hiromi Ii, Susumu Nakata. JCI 20679 suppresses the proliferation of glioblastoma stem cells by activating AMPK and decreasing NFATc2 expression levels. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238. [第 1 章]
2. Shota Ando, Chiami Moyama, Naoto Kojima, Mitsugu Fujita, Kaito Ohta, Yukina Kohno, Hiromi Ii, Susumu Nakata. JCI-20679 suppresses autophagy and enhances temozolomide-mediated growth inhibition of glioblastoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, 591, 62-67. [第 2 章]

課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程
氏名 (英字名) : 安藤翔太 (Shota Ando)
学位論文題目 : アセトゲニン誘導体 JCI-20679 による膠芽腫細胞に対する増殖抑制機構の
解明

序章 (はじめに)

膠芽腫は、成人発症の原発性悪性脳腫瘍の中で最も頻度が高く予後が不良な疾患である。外科療法、放射線療法、化学療法などの標準的な治療が可能な患者における生存期間中央値は 14.6 ヶ月前後であり、新たな治療戦略の開発が必要である。膠芽腫の予後が不良な原因の 1 つに、標準治療薬テモゾロミドに対する抵抗性が報告されており、これを克服する手法の確立が必要である。近年、新しい作用機序の抗悪性腫瘍薬として、ミトコンドリア阻害剤の報告がなされている。天然物由来アセトゲニン類から合成展開された JCI-20679 は、ミトコンドリア複合体 I の阻害活性を有し、抗腫瘍効果を発揮することが報告されているが、膠芽腫細胞に対する有効性は検証されておらず、その増殖抑制機構に関しても不明な点が多い。本研究では、JCI-20679 による膠芽腫細胞に対する増殖抑制効果について評価し、そのメカニズムを明らかにするとともに、テモゾロミドとの併用による有効性に関して検討を行った。

第 1 章 膠芽腫幹細胞に対する JCI-20679 の増殖抑制効果と作用機序の解明

本章では、種々の条件で膠芽腫細胞および膠芽腫幹細胞に、JCI-20679 を作用させ増殖抑制効果を評価した。その結果、単一のマウスモデル膠芽腫組織から樹立した、血清負荷により分化を誘導した接着系培養で維持した膠芽腫細胞 (IC₅₀ 421.7 nM) と比較して、ニューロスフェア法で維持した膠芽腫幹細胞 (IC₅₀ 47.3 nM) に対して、より低濃度で増殖抑制効果を示すことを明らかにした。JCI-20679 を膠芽腫幹細胞に作用させると、酸化的リン酸化を含むミトコンドリア機能の阻害によるエネルギー代謝ストレスの指標となる AMP/ATP 比の上昇と、AMPK のリン酸化による活性化が誘導されることをみいだした。ミトコンドリア機能阻害の下流因子について探索したところ、膠芽腫の浸潤や転移に関与することが報告されている NFATc2 の発現量を、JCI-20679 処理が低下させることをみいだした。AMPK をノックダウンすると、JCI-20679 による増殖抑制効果と NFATc2 の mRNA 発現量の低下が一部回復したことから、AMPK の活性化が JCI-20679 の作用機序に関与することを示した。さらに NFATc2 の強制発現により JCI-20679 による増殖抑制効果が有意に回復することを明らかにし、NFATc2 の発現低下が JCI-20679 の作用機序に関与することを示した。最後に、膠芽腫幹細胞の同所性移植膠芽腫モデルマウスにおいて、JCI-20679 の腹腔内投与は、生体内イメージングによる luciferase 活性の評価において有意な抗腫瘍効果と生存期間の延長効果 (P < 0.01) を示した。

第 2 章 JCI-20679 とテモゾロミドの併用による増殖抑制効果と作用機序の解析

本章では、膠芽腫細胞のテモゾロミドに対する抵抗性を克服する手法の確立をめざし、前章で明らかにしたテモゾロミドとは異なる作用機序をもつ JCI-20679 を併用することによる、

抗腫瘍効果の評価と作用増強メカニズムの解析を行なった。JCI-20679 とテモゾロミドを併用すると、種々の膠芽腫細胞に対して増殖抑制効果の増強効果を示した。Isobologram 解析を用いて併用効果を検証したところ、75% effective doses (ED75) の濃度において JCI-20679 とテモゾロミドの併用は、ヒト膠芽腫細胞およびマウス由来膠芽腫細胞に対する増殖抑制効果において有意な相乗効果を示した (combination index 0.549-0.570)。過去の報告において、膠芽腫細胞のテモゾロミドに対する抵抗性には、細胞保護的なオートファジーの誘導が関与することが報告されていた。そこで JCI-20679 のオートファジーに対する影響を解析したところ、オートファジーのマーカーである LC3-II タンパク質の発現量が低下することを明らかにした。また、テモゾロミドを処理することで増加する LC3-II タンパク質の発現量が、JCI-20679 の併用により低下することを実証した。さらに、テモゾロミド抵抗性を伴うオートファジー誘導に依存して細胞内 ATP が増加することが報告されていたが、JCI-20679 を併用することにより、この効果が打ち消されることを明らかにした。これらの結果は、JCI-20679 がテモゾロミドにより誘導される細胞生存を促進するオートファジーを阻害して、その増殖抑制効果を増強することを示唆している。最後に、ヒト膠芽腫 U87MG 細胞を同所性移植し作成した膠芽腫モデルマウスに JCI-20679 とテモゾロミドを投与したところ、それぞれ単独では抗腫瘍効果を示さない投与量を併用することにより、生体内イメージングによる luciferase 活性の評価において有意な抗腫瘍効果を示すことを実証した。これらの結果から、JCI-20679 は、テモゾロミドの膠芽腫に対する治療効果を増強し、その抵抗性克服に有用である可能性が示唆された。

総括 (結論)

本研究では、JCI-20679 が膠芽腫細胞に対してミトコンドリア機能の阻害作用を発揮し、増殖抑制効果を示すことを明らかにした。またその作用機序として AMPK の活性化および NFATc2 の発現量の低下が関与していることを明らかにした。さらに JCI-20679 は生体内膠芽腫モデルに対して抗腫瘍効果を発揮することを示した。JCI-20679 は、既存の抗がん剤であるテモゾロミドとの併用により、膠芽腫細胞に対する増殖抑制効果を増強し、それぞれ ED75 の濃度において有意な相乗効果を示すことを明らかにした。この効果増強のメカニズムとして、テモゾロミドの治療抵抗性を惹起するオートファジーの誘導を、JCI-20679 が阻害することにより増殖抑制効果が増強されている可能性が示唆された。また生体内膠芽腫モデルにおいても JCI-20679 の併用は、テモゾロミドの抗腫瘍効果を増強した。これらの本研究の成果は、アセトゲニン誘導体 JCI-20679 が、膠芽腫の治療およびそのテモゾロミドの治療抵抗性の克服に有用であり、膠芽腫の治療成績の向上に寄与する可能性があることを示している。

目次

序論.....	1
第1章 膠芽腫幹細胞に対する JCI-20679 の増殖抑制効果と作用機序の解明	
1-1. 緒言.....	9
1-2. 実験方法.....	11
1-2-1. 試薬.....	11
1-2-2. 細胞培養.....	11
1-2-3. トリパンブルー色素排出試験.....	11
1-2-4. Brd-U 免疫蛍光染色による細胞周期解析.....	11
1-2-5. ミトコンドリア膜電位測定.....	12
1-2-6. 酸素消費速度測定.....	12
1-2-7. ミトコンドリア局在 ROS 測定.....	12
1-2-8. ウェスタンブロット解析.....	12
1-2-9. 細胞内 AMP/ATP 比測定.....	13
1-2-10. 細胞質タンパク質・核タンパク質分画.....	13
1-2-11. CaN ホスファターゼ活性測定.....	14
1-2-12. 定量的リアルタイム PCR 解析.....	14
1-2-13. AMPK ノックダウン.....	15
1-2-14. NFATc2 強制発現.....	15
1-2-15. 膠芽腫モデルマウスを用いた抗腫瘍評価.....	16
1-2-16. 統計解析.....	16
1-3. 実験成績.....	17
1-3-1. 種々の膠芽腫細胞に対する JCI-20679 による増殖抑制.....	17
1-3-2. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 による細胞周期進行の抑制.....	19
1-3-3. JCI-20679 による膠芽腫細胞に対するミトコンドリア機能の阻害作用.....	22
1-3-4. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 による AMPK の活性化.....	25
1-3-5. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 による細胞内 AMP/ATP 比上昇効果.....	26
1-3-6. AMPK 阻害剤による JCI-20679 のマウス由来膠芽腫幹細胞とヒト膠芽腫細胞培養株 U251 に対する増殖抑制効果の回復.....	27
1-3-7. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 によるリン酸化 CAMKII タンパク発現量に与える影響.....	29
1-3-8. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 による CaN ホスファターゼの酵素活性と NFATc2 発現量に与える影響.....	30
1-3-9. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 による NFATc2 の mRNA 発現量に与える影響.....	32
1-3-10. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 による NFATc2 mRNA 発現減少効果に対して AMPK 発現量が与える影響.....	33

1-3-11. マウス由来膠芽腫細胞における JCI-20679 による NFATc2 の発現量低下の意義の 検証.....	35
1-3-12. 生体内膠芽腫マウスモデルに対する JCI-20679 による抗腫瘍効果.....	37
1-4. 考察.....	39
第2章 JCI-20679 とテモゾロミドの併用による増殖抑制効果と作用機序の解析	
2-1. 緒言.....	42
2-2. 実験方法.....	44
2-2-1. 試薬.....	44
2-2-2. 細胞培養.....	44
2-2-3. トリパンプルー色素排出試験.....	44
2-2-4. ウェスタンブロット解析.....	45
2-2-5. 細胞内 AMP/ATP 比測定.....	45
2-2-6. 膠芽腫モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の評価.....	46
2-2-7. 統計解析処理.....	46
2-3. 実験成績.....	47
2-3-1. JCI-20679 によるテモゾロミドの膠芽腫に対する増殖抑制効果の増強.....	47
2-3-2. 膠芽腫細胞における JCI-20679 とテモゾロミドの併用処理による相乗効果および 相加効果.....	49
2-3-3. テモゾロミド処理が膠芽腫において誘導するオートファジーの JCI-20679 による 抑制効果.....	51
2-3-4. JCI-20679 によるテモゾロミドにより減少した AMP/ATP 比の増加.....	53
2-3-5. JCI-20679 による生体内膠芽腫モデルマウスに対するテモゾロミドの抗腫瘍効果の 増強効果.....	55
2-4. 考察.....	57
総括.....	59
謝辞.....	61
引用文献.....	62

【略語表】

AMP	Adenosine mono-phosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANOVA	analysis of variance
ATP	Adenosine tri-phosphate
BrdU	Bromodeoxyuridine
CAMKII	calmodulin-dependent protein kinase II
CaN	calcineurin
cDNA	complementary DNA
CI	combination index
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
DVL3	dishevelled segment polarity protein 3
ED75	75% effective dose
FITC	fluorescein isothiocyanate
GAPDH	glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase
GRIM-19	genes associated with retinoid-interferon-induced mortality-19
GSCs	glioblastoma stem cell
HHBS	Hank's buffer with hepes
IC50	50% inhibitory concentration
LC3-II	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 II
MOI	multiplicity of infection
ND1	NADH dehydrogenase subunit 1
NFATc2	nuclear factor of activated T-cells 2
p-	phosphorylated-
PBS	phosphate-buffered saline
RNAi	RNA interference
ROS	reactive oxygen species
SD	standard division
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
SOX2	sex determining region Y box 2
TBS	tris-buffered saline
TCF	T-cell factor
TMZ	temozolomide
UKL1	unc-51 like autophagy activating kinase 1

序論

膠芽腫は成人に発症する原発性悪性脳腫瘍のうち、最も頻度が高い疾患である。脳腫瘍の一種である神経膠腫は、WHOによりグレード1、2、3、4の4段階に分類されており、グレードが上がるにつれて、悪性度が高くなる。この分類において、膠芽腫はグレード4に指定されており、最も悪性度が高い脳腫瘍である(1)。膠芽腫は10万人あたり5~8人の発生率であり、予後は非常に悪く生存期間中央値は約14.6ヶ月前後、5年生存率は10%未満であると言われている(2,3)。医療が飛躍的に進歩し数多くの新薬が登場している現代においても、膠芽腫はあらゆる悪性腫瘍の中でも最も予後の悪い難治性疾患の1つである(4,5)。膠芽腫の治療法は外科的治療、放射線治療、薬物治療を組み合わせた集学的治療が行われる。現在の膠芽腫に対する有効な治療薬は2006年に承認されたアルキル化剤であるテモゾロミドである。しかし、その有効性は十分なものとはいえず、膠芽腫細胞のテモゾロミドに対する抵抗性が大きな臨床上の問題となっている(6,7)。また、脳浮腫の改善による、膠芽腫の周辺症状の緩和を目的として、抗VGEF抗体であるベバシズマブが2014年に承認された(8)。しかし、ベバシズマブによる予後の改善効果は認められず、テモゾロミドが承認されてから、15年以上にわたり、標準療法の治療成績は明らかな進歩を遂げていない。

膠芽腫の極めて不良な予後は臨床的に大きな問題となっており、新たな治療戦略の開発が必要とされている。膠芽腫の治療成績が不良である原因の1つに、既存の治療法に対する治療抵抗性があげられる。治療抵抗性を示す原因のうち本論文では膠芽腫幹細胞、オートファジー、ミトコンドリア機能の3つの要因に着目した。

まず、膠芽腫幹細胞に着目した。膠芽腫細胞が示す治療抵抗性を説明するメカニズムの1つとして、膠芽腫組織中の一部の集団が幹細胞に類似した特性を保持し、高い治療抵抗性を発揮する可能性が指摘されている。これは、周囲に存在する幹細胞以外の細胞と比較して、高い腫瘍形成能を保持する細胞亜集団が治療抵抗性の原因となっているという仮説であり、がん幹細胞仮説と呼ばれている(9-11)。放射線療法に対する治療抵抗性も大きな課題であり、この治療抵抗性に膠芽腫幹細胞が関与している可能性が報告されている(12,13)。がん幹細胞は持続的な自己複製能をもち、発がんおよび再発の起点となり、近年では浸潤や免疫回避に関与していることが指摘されている。膠芽腫の特徴として、構成する腫瘍細胞の高い不均一性により、治療抵抗性を示すことがあげられ、その結果、術後に再発する頻度が非常に高く、ひとたび再発した膠芽腫患者は、一般的に治療に対する反応性は低い(14)。従って膠芽腫幹細胞に対する有効な新規薬剤を創出することにより、膠芽腫の治療成績の改善に有用である可能性が期待される(15)。

次に、オートファジーに着目した。オートファジーが抗がん剤や放射線療法に対する治療抵抗性に関与する可能性が報告されている(16,17)。オートファジーとは、タンパク質や細胞内小器官をオートファゴソーム内に包含し、リソソーム/液胞と融合する過程を経て分解する自己消化プロセスである(18)。すなわちオートファジーは、細胞内構成成分がリサイクルされる異化プロセスであり、腫瘍形成の初期段階では、がんの発生と進行を抑制する一方で、進行したがんにおいては、オートファジーにより最終的にATPが産生され、浸潤や転移のため

のエネルギーを供給することで治療抵抗性に寄与することが知られている (19)。このオートファジーのプロセスに関与する重要な因子の 1 つに AMPK タンパク質がある。AMPK はオートファジーの開始に必要とされている ULK1 を直接リン酸化し ULK1 を活性化する。さらにオートファジーの抑制に関与している mTORC1 複合体の構成因子 Raptor をリン酸化することで mTORC1 の活性を抑制し、オートファジーの促進に関与することも報告されている (20)。一方で AMPK の活性化が ULK1 依存的なオートファジーを阻害するという報告もされている (21)。AMPK によるオートファジーの制御は現在も研究がなされている領域であるが、これらの知見から AMPK はオートファジーの活性化と抑制の両方に関与する重要なタンパク質であると考えられる。膠芽腫細胞のテモゾロミドに対する抵抗性を獲得するメカニズムには、細胞保護的なオートファジーの誘導が一因となりうる可能性が報告されている。ヒト膠芽腫細胞に対して、テモゾロミド処理を行うと、細胞生存促進性のオートファジーが誘導され、このオートファジーに依存的にミトコンドリアでの酸化的リン酸化が促進される。その結果、ATP 産生が亢進することで、細胞の生存に有利に働き、テモゾロミドに対する抵抗性を獲得するメカニズムが報告されている (22)。また、別の報告では、膠芽腫幹細胞においてオートファジーを阻害すると、テモゾロミドによる抗腫瘍効果が増強することが報告されている。従って、既存の治療法により誘導されるオートファジーの抑制は、治療抵抗性の改善につながる可能性が示唆されている。これらの知見は、膠芽腫幹細胞を標的とし、治療により誘導されるオートファジーの抑制が膠芽腫の治療成績を改善することに繋がることを示している (23-25)。

さらに、がんにおけるミトコンドリア機能に着目した。近年、がんに対する新規作用機序としてミトコンドリア機能の阻害が注目されている。ミトコンドリアは ATP を産生する細胞内小器官であり、真核生物にとって不可欠な細胞内小器官の 1 つである。独自の DNA を持つものの、ミトコンドリアタンパク質の大部分は核ゲノムにコードされている。ミトコンドリアは重要な代謝経路に関与しており、多様な細胞機能を調節する細胞内シグナル伝達経路に関与している。ミトコンドリアの欠陥や制御の異常は老化やがん、神経変性疾患などに関与している (26)。腫瘍形成にも重要な役割を果たし、生物学的には生合成、代謝回転、細胞核の分裂および融合、アポトーシスを含む細胞死、酸化ストレス、シグナル伝達など様々な生体機能に関与している。エネルギーの産生だけでなく、発がん過程、がんの進展、転移やがん細胞の生存に影響を与える複雑な細胞内小器官である。ミトコンドリアは化学療法やがんの標的治療においてがん細胞が生存できるような環境を作り出すことが報告されている。従ってがんの治療抵抗性を改善し、治療成績を向上させる為にミトコンドリアによる治療抵抗を防ぐことが新たな治療戦略になると提唱されている (27)。膠芽腫に対する現在の標準的な放射線治療法を行なった際、放射線抵抗性が生じることが問題となっている (28)。その治療抵抗性を惹起するメカニズムの 1 つとしてミトコンドリアの関与が報告されており、ミトコンドリア呼吸鎖複合体全体での遺伝子発現量の増加、ミトコンドリア数の増加、クリステの増大、ミトコンドリア DNA のコピー数の増加が認められている。また放射線抵抗性を示す膠芽腫細胞にミトコンドリア複合体 I の阻害剤であるロテノン作用させることで放射線の感受性が回復することが報告されている (29)。近年、ミトコンドリア機能の阻害をその作用機序とするミトコンドリア標的剤が、がん治療の分野で応用され、臨床試験等も実施されており、

そのうちの1つであるグルタチオン抱合体構造をもつヒ素化合物、ダリナパルシンの第2相臨床試験が実施され、2022年6月に末梢性T細胞リンパ腫を適応とし、がんに対するミトコンドリア標的剤として世界に先駆けて本邦にて承認された(30-34)。この事実は、がん治療におけるミトコンドリア阻害という治療戦略の有効性と可能性を示していると考えられる。しかしながら、ダリナパルシンのミトコンドリア阻害メカニズムの詳細や、分子メカニズムには不明な点も多く、他のがん種に対する有効性なども含め、今後の研究成果が待たれるところである。ミトコンドリアはATPの産生を行う細胞内小器官であるが、 Ca^{2+} の貯蔵と放出を行っており、ミトコンドリア機能の一部は Ca^{2+} により制御を受けており、いわゆる Ca^{2+} シグナルを構成する(35)。この Ca^{2+} シグナルの活性化によりカルモジュリン/CaN系が活性化される。すなわち、細胞内の Ca^{2+} の濃度が上昇するとカルモジュリンとCaNが複合体を形成し活性化する。CaNはホスファターゼであり、様々な基質を脱リン酸化することが知られている。CaNの基質として最も研究されているのはNuclear factor of activated T-cells (NFAT) familyである(36)。NFAT familyは5つのアイソフォームが存在しており、主に細胞質において高度リン酸化状態で存在している。CaNによりNFATが脱リン酸化され核内へと移行することで活性化する転写因子として機能するタンパク質である(37, 38)。NFATc2は膠芽腫において高発現することが報告されており、膠芽腫細胞の浸潤や転移の促進に関与していることが報告されている(39)。またNFATc2は膠芽腫細胞と比較し、膠芽腫幹細胞においてより高発現していることも報告されている(40)。従ってNFATc2を標的とした薬剤は膠芽腫幹細胞の増殖を特異的に阻害する可能性が期待される。

これまでの報告により、アフリカツメガエルの胚を用いた研究において、ミトコンドリア複合体Iの構成成分であるGRIM-19タンパク質をノックダウンすることによりミトコンドリア複合体Iを介した酸化的リン酸化による電子伝達系を阻害した際に、NFATc2の発現が低下することが報告されている(41)。また心筋細胞を用いた研究において、レスベラトロールによるAMPKの活性化により、NFATc2の発現が低下することが報告されている(42)。これらの知見を総合し、ミトコンドリア機能の阻害による Ca^{2+} シグナルの抑制およびAMPKの活性化を介したNFATc2の発現抑制は膠芽腫の新規治療戦略として有効な作用機序となる可能性が期待できるという仮説を立てた。

一方で、テモゾロミドに対する治療の抵抗性も問題となっている。糖尿病治療薬であるメトホルミンの併用によりテモゾロミド抵抗性が部分的に回復することが報告されている。またメトホルミンはテモゾロミドの感受性を回復するだけでなく、メトホルミン単独でも抗腫瘍効果を示す。その際、膠芽腫細胞の遊走能と浸潤能を低下させ神経幹細胞マーカーであるSOX2の発現量を低下させた(43)。SOX2は膠芽腫幹細胞における増殖や自己複製能に重要な役割を果たしており、膠芽腫の治療標的として有効である可能性が報告されている(44)。従ってSOX2の発現の低下はがんの幹細胞性を低下させることを示唆しており、メトホルミンががん治療に有効である可能性が考えられている。メトホルミンはミトコンドリア機能を阻害し、糖新生を抑制することで血糖降下作用を示す2型糖尿病治療薬であり、世界的に広く使用されている(45)。コホート研究により、メトホルミンの服用により膠芽腫患者の生存期間が改善したと報告されている(46)。膠芽腫の他に子宮内膜がん、子宮頸部がん、卵巣が

ん、大腸がん、膵臓がんなど様々ながんに対して有効である可能性が示唆されている (47-50)。メトホルミンはヒトのがん細胞において、ミトコンドリアに蓄積し、ミトコンドリア複合体 I の活性と細胞呼吸を阻害していることが明らかとなっている。またマウスへの投与でヒトがん細胞の増殖阻害効果が見られ、ミトコンドリア複合体 I 構成因子である ND1 の過剰発現により抗腫瘍効果の抵抗が見られた。これらの結果から、がん細胞においてミトコンドリア複合体 I の阻害作用を介して、メトホルミンはがん細胞の増殖阻害効果を示したと考えられている (51)。ミトコンドリア機能が阻害され酸化的リン酸化が阻害されると AMP/ATP 比が上昇する。エネルギー代謝ストレスにより AMP/ATP 比が上昇するとストレスを感知し AMPK が活性化される。AMPK は触媒サブユニットである α サブユニット、制御性サブユニットである β サブユニット及び γ サブユニットからなる 3 量体であり Thr172 がリン酸化されると活性化される (52)。メトホルミンによるがん細胞の増殖抑制効果には AMPK の活性化が関与していると考えられている (53)。メトホルミンを作用させたがん細胞において、実際に p-AMPK の上昇が確認されており、さらに mRNA レベル、タンパクレベルにおいて β カテニンの発現量の減少が起こることが報告されている。活性化した AMPK は β カテニンをリン酸化し、TCF との相互作用を介した Wnt 経路の抑制作用を示す。 β カテニンの発現上昇に関与している因子として DLV3 があり AMPK の活性化により DVL3 の発現低下、 β カテニンの発現低下が起こることが報告されている。これらの知見から AMPK の活性化により DVL3 の発現が低下することで β カテニンの発現が低下し、Wnt 経路の阻害を介して、がん細胞の増殖阻害に関与している可能性が考えられる (48, 54, 55)。またメトホルミンによる Wnt 経路の阻害は AMPK 阻害剤である compound-C の併用により回復が起きなかった報告もあり、AMPK 非依存的に起こる可能性も示唆されている (56)。従ってメトホルミンは Wnt 経路を阻害する可能性がある。その詳細な作用機序については明らかになっていないが、ミトコンドリア機能の阻害及び AMPK の活性化が幹細胞の増殖を阻害する可能性が示唆されており、これらの知見から有用な新規治療戦略と考えられる。実際にメトホルミンを併用した臨床試験も行われている (57)。しかしこれらの報告がされた論文で行われている実験では、メトホルミンが高濃度で使用されている。従って、ミトコンドリア機能の阻害という新たな作用機序をもち、メトホルミンと比較しより効果的にミトコンドリア機能を阻害することのできる化合物を見出す必要がある。

近年、ミトコンドリア機能を阻害する新たな化合物としてアセトゲニン類が注目されている。アセトゲニン類とは熱帯・亜熱帯地方に生息するバンレイシ科植物に含まれるポリケチド類である。ほとんどのアセトゲニンは長鎖脂肪酸の誘導体でありテトラヒドロフランもしくはテトラヒドロピランを有している (Fig.1)。

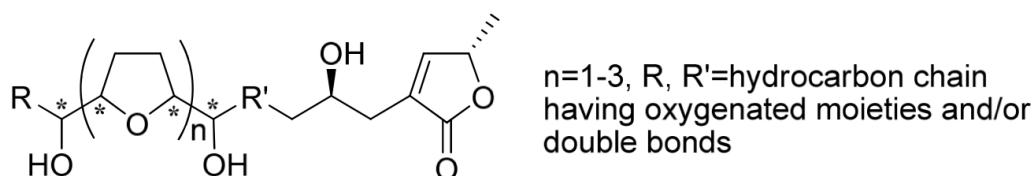


Figure 1. Representative structure of the *Annonaceous acetogenins*.

This Figure was cited from Figure. 1 in Kojima et al. *Molecules*. **2009**, 14, 3621-3661.

アセトゲニンの多くは種子に多く含まれており、抗腫瘍性、抗寄生虫性、細胞毒性、免疫抑制性、神経毒性、殺虫性など幅広い生物学的特性を示す。またアセトゲニン類の作用機序としてミトコンドリア複合体 I の阻害効果が考えられており、特殊な化学構造と広範囲な生物活性を持つことから注目を集めている化合物である (58, 59)。ミトコンドリア複合体 I の阻害活性を持つアセトゲニン類を元に様々な化合物が合成された。その中で thiophene-3-carboxamide を有する天然物由来の化合物である solamin をリード化合物とした化合物が強い抗腫瘍活性を持っていた (60)。その中の 1 つである JCI-20679 は solamin 以上の抗腫瘍活性をもち、ヒト肺がん NCI-H23 細胞をマウスに異種移植したモデルに JCI-20679 を投与した際、重篤な副作用を示さずに抗腫瘍効果を示した化合物であった (61)。JCI-20679 とは (N-((R)-11-Hydroxy-11-((2R,5R)-5-[(R)-1-hydroxytridecyl]tetrahydrofuran-2-yl)undecyl)thiophene-3-carboxamide) の構造を持つ化合物であり (Fig.2)、これまでの報告で様々な癌細胞に対し増殖抑制効果が示されている (62-64)。

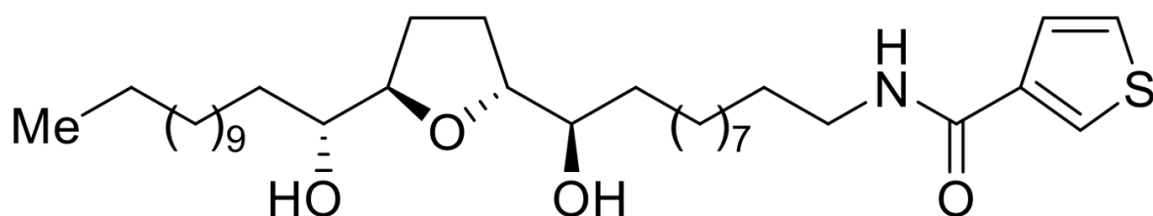


Figure 2. The structure of JCI-20679.

過去の報告において、JCI-20679 の作用機序は、39 種類にもおよぶ多数のヒトがん細胞培養株に対する感受性を、既知の化合物に対する感受性のパターンと比較対比させて統計学的に解析することにより得られる、フィンガープリント法と呼ばれる化合物の作用機序を推定する研究手法により研究されてきた。その解析の結果、フェンフォルミンをはじめとする、ミトコンドリア複合体 I の阻害剤と、最も強い相関を示したため、JCI-20679 はミトコンドリア複合体 I 阻害剤としての活性が検証されてきた (Table 1)。

Rank	<i>r</i>	Chemical name	Known mode of action
1	0.704	Phenformin hydrochloride	Mitochondrial complex I inhibitor
2	0.695	(-)-Deguelin	Mitochondrial complex I inhibitor
3	0.649	Buformin	Mitochondrial complex I inhibitor
4	0.642	Pyruvium pamoate	AKT inhibitor
5	0.620	SIRT1 inhibitor III	SIRT1 inhibitor
6	0.616	Solamin	Mitochondrial complex I inhibitor
7	0.605	Gamma-secretase inhibitor VI	Gamma-secretase inhibitor
8	0.593	FGIN-1-27	PBR (peripheral benzodiazepine receptor) agonist
9	0.592	SB505124	ALK4 (activin receptor like kinase 4) inhibitor
10	0.566	Victoria blau B	Mitochondria-related

Table 1. The top 10 compounds (out of 1466 compounds), which have high Pearson correlation coefficient *r* values (n = 39) with JCI-20679 are shown in the table.

This Table was cited from Table 1 in Akatsuka et al. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2016**, 4, e00246.

JCI-20679 は、ウシ心臓のミトコンドリアを用いた NADH の NAD⁺への酸化を指標とした実験により、ミトコンドリア複合体 I 阻害剤としての活性を有することが示されている。また、JCI-20679 は、ヒト肝臓がん培養細胞株において、ミトコンドリアに集積する一方で、小胞体、リソソーム、ゴルジ体など他の細胞内小器官には集積しないことが報告されている (65)。従って、JCI-20679 が特異的なミトコンドリア複合体 I 阻害剤という新しい作用機序を有する新規がん治療薬になる可能性が考えられる。しかしながら、これまでに JCI-20679 の膠芽腫細胞に対する有効性は検証されておらず、がん細胞に対するその増殖抑制メカニズムにおいて、ミトコンドリア複合体 I の阻害が実際にどのような表現型をがん細胞に誘導するのかについて不明な点が数多く残されている。また、膠芽腫幹細胞集団に対する JCI-20679 による抗腫瘍効果に関しては検証されておらず、全く不明である。

そこで本研究では、膠芽腫の治療成績の向上を目的とし、治療抵抗性の要因である膠芽腫幹細胞を標的とした新たな治療戦略の開発を試みた。ミトコンドリア機能阻害作用を持つ新規化合物 JCI-20679 による膠芽腫細胞に対する増殖抑制効果について評価し、そのメカニズムを解明することを目的とした。また、現状では膠芽腫に対して標準的に用いられる既存の抗がん剤であるテモゾロミドに対する抵抗性を克服する手法の確立をめざし、JCI-20679 が既

存の抗がん剤とは全く異なる作用機序によりがん細胞の増殖を抑制することに着目した。そこで、種々の膠芽腫細胞に対して、テモゾロミドと JCI-20679 を併用することによる、効果を増強する作用について検証した。さらに、テモゾロミドに対する抵抗性を惹起する重要なメカニズムとして報告されている、細胞生存を促進するオートファジーの誘導に対する、JCI-20679 が与える影響について解析することにより、これらの併用効果が生じるメカニズムについて検証した。加えて、膠芽腫のマウスモデルを用い、生体内腫瘍に対する併用治療の有効性について解析を行った。

第1章 膠芽腫幹細胞に対する JCI-20679 の増殖抑制効果と作用機序の解明

1-1. 緒言

膠芽腫は成人発症の悪性脳腫瘍のうち最も頻度が高く、急速に進行する悪性度の高い腫瘍である。現在の膠芽腫の治療方法は外科療法、放射線療法、化学療法を用いた集学的治療が行われている。標準化学療法としてテモゾロミドが使用されているが、膠芽腫患者の生存期間中央値は約 14.6 ヶ月であり、5 年生存率は 10%未滿と非常に予後が悪い (7,66)。近年、分子標的薬であるベバシズマブを併用した治療が開始されたが、脳浮腫の軽減などの周辺症状の改善効果に留まり、全生存期間の延長はできていない (8)。従って膠芽腫の治療成績の改善のために新たな治療法の開発が望まれている。

膠芽腫の治療抵抗性の要因として膠芽腫幹細胞の存在が関与している可能性があげられる。膠芽腫の組織中で神経幹細胞に類似した特徴を保持し、治療に対して高い抵抗性を示す集団が存在する。この集団は周辺の細胞と比較し高い腫瘍形成能を持ち、治療抵抗性と再発の起点となっていると考えられており、がん幹細胞仮説と呼ばれている(10, 11)。従って膠芽腫幹細胞の増殖を特異的に阻害することが膠芽腫の治療成績の改善に繋がると考えられている (15)。

近年、がんの病態におけるミトコンドリアの重要性が注目されている (67)。ミトコンドリア複合体 I の阻害作用を持つメトホルミンが、膠芽腫におけるテモゾロミドに対する治療の抵抗性を低下させることが報告されている (43)。また放射線療法の治療抵抗性にミトコンドリア機能の亢進が関与していることも報告されている (29)。従って、膠芽腫の治療抵抗性を改善するため、ミトコンドリア機能を阻害することが新たな治療戦略になる可能性がある。

ミトコンドリア複合体 I の阻害活性を持つ新規化合物の 1 つに JCI-20679 がある。JCI-20679 はバンレイシ科植物に含まれる天然物由来アセトゲニン類である solamin の構造を元に構造展開された化合物である (68)。JCI-20679 は、様々ながん細胞に対して増殖抑制効果を示し、幅広いヒトがん培養細胞株のパネルに対する IC50 のスペクトラムのパターンから作用機序を推定するフィンガープリント法にてミトコンドリア複合体 I 阻害剤であることが推定され、実際、ヒト肝細胞がん培養株において、ミトコンドリアに集積することが報告されている。さらに、ウシ心臓から純化したミトコンドリアを用いた試験管内での実験で、ミトコンドリア複合体 I の阻害活性を発揮することが示されている。またヒト肺がん細胞 NCI-H23 を皮下移植したマウスモデルに対して重篤な副作用を示すことなく、抗腫瘍効果を示すことも報告されている (61-65)。

本章では、まず JCI-20679 の膠芽腫幹細胞に対する増殖抑制活性について、種々の条件において検討を行った。次に、主に膠芽腫幹細胞を用いて、JCI-20679 によるミトコンドリア機能の阻害が、増殖抑制効果につながっているのかについて検討を行った。またミトコンドリア

機能阻害の結果引き起こされうる表現型の解析と、影響を受けるシグナル伝達系におけるタンパク質の発現量の変化を解析した。さらに JCI-20679 の作用により発現量が上昇したリン酸化による活性化 AMPK による、転写因子タンパク質 NFATc2 発現量の低下を検討した。さらに、JCI-20679 の生体内膠芽腫に対する治療効果を評価する目的で、膠芽腫幹細胞を同所性に移植し作成したモデルマウスに、JCI-20679 を腹腔内投与による全身投与を行い、抗腫瘍効果の評価を行った。

1-2. 実験方法

1-2-1. 試薬

JCI-20679、rotenone (R8875, Sigma-Aldrich)、compound-C (044-33751, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)、cyclosporin A (031-24931, Wako Pure Chemical Industries) は DMSO (13445-45, Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) に溶解した。Inosine (I4125, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) は DMEM に溶解した。

1-2-2. 細胞培養

膠芽腫幹細胞は *Sleeping-Beauty* トランスポゾンシステムを用いて作成された。新生仔マウスを低体温麻酔下で定位置固定装置に固定し、30 ゲージの針のついた 10 μ L ハミルトンシリンジを用いて、ポリエチレンイミン-DNA 複合体をブレグマラムダから +1.5 AP, 0.7 ML, -1.5 DV の位置に 1 μ L/min の速さで 2 分間注入した。In-vivo JetPEI を使用し PT2/C-Luc//PGK-SB13 (0.2 μ g, 20207, Addgene, Watertown, MA, USA), PT/Caggs-NRASV12 (0.4 μ g, 20205, Addgene), PT3.5/CMV-EGFRvIII (0.4 μ g, 20280, Addgene), PT2-shP53 (0.4 μ g, 124261, Addgene) を使用することで自発膠芽腫モデルを作成した。1-3 ヶ月後に腫瘍形成を確認するため、IVIS Lumina XR imaging system (Summit Pharmaceuticals International, Tokyo, Japan) を用い D-ルシフェリンを腹腔内投与した 10 分後に発光強度を測定した。腫瘍形成したマウスから膠芽腫組織を摘出し、ニューロスフェア法を用いて膠芽腫幹細胞を培養した。また同一個体から摘出した膠芽腫組織をウシ胎児血清負荷により接着系に分化誘導を行い、マウス接着培養系膠芽腫細胞を培養した。ヒト膠芽腫細胞である A172 細胞と U251 細胞は理研 BRC より購入し、10% FBS の DMEM 培地で培養した。全ての細胞は 37°C、5% CO₂ 条件下で培養を行った。

1-2-3. トリパンプルー色素排出試験

6 well plate にマウス膠芽腫幹細胞を 1×10^5 cells/well で播種し、DMSO、JCI-20679 10 nM、JCI-20679 25 nM、JCI-20679 50 nM、JCI-20679 100 nM、JCI-20679 500 nM、もしくは JCI-20679 1 μ M を添加した。2 日後もしくは 3 日後に Accutase 処理にて細胞懸濁液を調整し、細胞懸濁液 10 μ L と同量の 0.4% トリパンプルー (Wako) を混合した懸濁液を作成した。これを 10 μ L 用いて血球計算盤もしくは Countess II automated cell counter (Thermo Fisher Scientific) を使用し細胞数を計測した。トリパンプルー色素を排出した透明な細胞を生細胞、トリパンプルーによって青色に染色された細胞を死細胞としてカウントした。

6 well plate にマウス膠芽腫細胞を 2×10^4 cells/well で播種し、24 時間後に DMSO、JCI-20679 25 nM、JCI-20679 50 nM、JCI-20679 100 nM、もしくは JCI-20679 500 nM を添加した。薬剤添加後 3 日目にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調製し、同様に計数した。

1-2-4. BrdU 免疫蛍光染色による細胞周期解析

6 well plate にマウス膠芽腫幹細胞を 1×10^5 cells/well で播種し、DMSO、JCI-20679 100 nM もしくは JCI-20679 1 μ M を添加した。3 日後に Accutase 処理にて細胞懸濁液を調整し、APC BrdU flow kit (552598, BD Biosciences, San Diego, CA, USA) を使用し、免疫蛍光染色を行った。

BD LSRFortessa X-20 cell analyzer (BD bioscience) を使用し解析を行い、BrdU 陽性細胞を S 期に存在する細胞と判断した。

1-2-5. ミトコンドリア膜電位測定

6 well plate にマウス膠芽腫細胞もしくは A172 細胞を 1×10^5 cells/well で播種し、翌日に DMSO、JCI-20679 500 nM、JCI-20679 1 μ M もしくは CCCP 50 μ M を添加した。薬剤添加後 3 日目に JC-1 試薬 2 μ M を 1 時間作用させ、トリプシン処理にて細胞懸濁液を調製した。JC-1 MitoMP Detection kit (MT09, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) と BD LSRFortessa X-20 cell analyzer (BD bioscience) を使用し解析を行い、JC-1 凝集を示す赤色は PE、JC-1 単体を示す緑は FITC を用いて検出した。ミトコンドリア膜電位は PE/FITC のシグナル強度比率を用いて検出し評価を行った。

1-2-6. 酸素消費速度測定

6 cm dish に膠芽腫幹細胞を播種し、DMSO、JCI-20679 1 μ M もしくは rotenone 1 μ M を添加した。1 日後に細胞を回収し Accutase 処理にて細胞懸濁液を調整し細胞数を計数した。PBS で洗浄し各サンプルの細胞数を揃えた後、Extracellular oxygen consumption assay (ab197243, Abcam, Cambridge, UK) を使用し、96 well plate を用い 1 分毎に 1 時間測定した。各サンプルは少なくとも 700,000 細胞になるようにし、サンプルのタンパク質濃度を定量した後、各サンプルの濃度で計測値の補正を行なった。

1-2-7. ミトコンドリア局在 ROS 測定

6 well plate にマウス膠芽腫細胞を 1×10^5 cells/well で播種し、翌日に JCI-20679 を 100 nM, 250 nM, 500 nM, 750 nM の濃度で添加し 1 日作用させた。その後 MitoRos 580 dye optimized for detecting ROS in mitochondria (16052, AAT Bioquest, Sunnyvale, CA, USA) を使用し 30 分間反応させ、HHBS で洗浄した。洗浄した細胞をトリプシン処理により細胞懸濁液とし、PBS に懸濁した。その後 BD LSRFortessa X-20 cell analyzer (BD bioscience) を使用し解析を行った。

1-2-8. ウェスタンブロット解析

培養細胞を PBS で洗浄した後、細胞を SDS-Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl, 1% SDS) にプロテアーゼ阻害剤 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) と Phostop (Roche, USA) を加えたもので溶解し、氷冷しながら超音波破碎した。溶解液を 4°C、 $20,000 \times g$ で 45 分遠心分離し、上清に含まれる可溶性タンパク質を回収した。タンパク質溶解液の濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) を用いて測定した。タンパク質を溶解した溶媒で希釈し、タンパク濃度を均一にしたサンプル 20 μ l に Sample Buffer (125 mM Tris-HCL, 4% SDS, 20% グリセロール、10% 2-メルカプトエタノール、0.04% ブロモフェノールブルー) を加え、95°C で 5 分間熱変性を行った。10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 法を用いて分離し Semidry 式転写装置 (170 mA/gel, 90 分) もしくは Wet 式転写装置 (350 mA/gel, 60 分) を用いて PVDF メンブレン (Millipore, Burlington, MA, USA) にタンパク質を転写した。作成したメンブレンは Tris 緩衝液 (TBS; 50 mM Tris, 2.68 mM KCl, 137 mM NaCl, PH 7.4) に 0.05% Tween20 を加え

たもの (TBS-T) を溶媒とし作成した 3-5%のスキムミルク溶液もしくは 5%の BSA 溶液、または Blocking One-P (Nacalai Tesque) でブロッキングした。抗体は以下の物を使用した。

p-AMPK α (1:1000; 2535, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), AMPK α (1:1000; 5832, Cell Signaling Technology), GAPDH (1:1000; 016-25523, Wako Pure Chemical Industries), p-CAMKII (1:1000; 12716, Cell Signaling Technology), CAMKII (1:1000; 4436, Cell Signaling Technology), NFATc2 (1:1000; 5861, Cell Signaling Technology), Vinculin (1:2000; 66305-1-Ig, Proteintech), Lamin A/C (1:1000; 2032, Cell Signaling Technology), horseradish peroxidase-conjugated horse anti-mouse IgG (1:2000; PI-2000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:2000; 7074, Cell Signaling Technology).

抗体を反応させた後、TBS-T で 3 回洗浄し TBS で 2 回洗浄した。洗浄後、Clarity Western ECL substrate (170-5060, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) もしくは ChemiLumi One Super substrate (02230-30, Nacalai Tesque) を反応させ、ChemiDoc XRS Plus system (Bio-Rad) を用いてタンパク質の検出を行なった。

1-2-9. 細胞内 AMP/ATP 比測定

6 well plate にマウス膠芽腫幹細胞を 1×10^5 cells/well で播種し DMSO もしくは JCI-20679 1 μ M を添加し 2 日作用させた。細胞を回収し Accutase 処理にて細胞懸濁液を調整し細胞数を計数した。各サンプルの細胞数を揃え sample とした後、発光測定用白色 96 well plate に 100 μ L ずつ sample を加え、CellTiter-Glo luminescent cell viability assay kit (G7570, Promega, Madison, WI, USA) を 100 μ L ずつ加えた。96 well plate をシェイカーで 1 分振盪した後、10 分間遮光して静置しプレートリーダーを用い発光強度を測定し ATP 濃度を測定した。Sample を PBS で洗浄し Cell pellet にした後、Cell Lytic M 100 μ L で溶解し 1.5 mL チューブに回収した。1400 rpm、4°C で 15 分間振盪した後、4°C、15,000 \times g で 15 分間遠心分離し上清を回収した。この溶液を 25 μ L ずつ発光測定用白色 96 well plate に加え、AMP-Glo assay kit (V5011, Promega, Madison, WI, USA) の AMP-Glo Reagent 1 を 25 μ L ずつ加えた。シェイカーで 1 分振盪した後、1 時間遮光して静置した。その後 AMP-Glo Reagent 2 と Kinase-Glo one solution を 1:100 で混合した溶液を 50 μ L ずつ加えシェイカーで 1 分振盪した後、1 時間遮光して静置し、プレートリーダーを用い発光強度を測定し AMP 濃度を測定した。測定された ATP 濃度および AMP 濃度は DMSO 処理した際に 1 とし相対値で評価を行なった。またその際の AMP/ATP の比率の評価を行なった。

1-2-10. 細胞質タンパク質・核タンパク質分画

マウス膠芽腫幹細胞をそれぞれ 5 枚の 10 cm dish に 1×10^6 cells/dish で播種し、DMSO もしくは JCI-20679 500 nM を添加した。2 日後に LysoPure Nuclear and Cytoplasmic Extractor Kit (295-73901, Wako) を用い、以下のようなプロトコールに従い、細胞質と核のタンパク質を分画した。

PBS で洗浄した後の細胞ペレットに 100 μ L の Nuclear Fractionation Buffer を加え、最大速度で 10 秒間ボルテックスし、氷上で 10 分間静置した。その後、最大速度で 10 秒間ボルテックスし、2,500 \times g、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を新しい 1.5 mL チューブへ移し、15,000

× g、4°Cで 10 分間遠心分離することにより、上清に細胞質画分を得た。500 μL の Nuclear Extraction Buffer を前述のステップで得られたペレットに加え、15,000 × g、4°Cで 10 分間遠心分離し、上清を取り除いた。SDS Lysis Buffer を 50 μL 加え、最大速度で 10 秒間ボルテックスし、超音波処理によってペレットを破砕した。15,000 × g、4°Cで 10 分間遠心分離することにより、上清に核画分を得た。得られたサンプルを前述のウェスタンブロット解析法で解析し、細胞質画分、核画分に存在する NFATc2 タンパク質および内因性コントロールタンパク質の定量解析を行った。

1-2-11. CaN ホスファターゼ活性測定

マウス膠芽腫細胞を 10 cm dish に 1×10^5 cells/dish で播種し、DMSO もしくは JCI-20679 500 nM を添加した。72 時間後に TBS で洗浄した細胞を回収し calcineurin cellular activity assay kit (BML-AK816, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA) に付属している Buffer で溶解した。ポジティブコントロールのデータを取得するため、マウス膠芽腫細胞を 6 well plate に 1×10^5 cells/well で播種し、翌日に DMSO もしくは cyclosporin A 50 μM を添加した。72 時間後に TBS で洗浄した細胞を回収し kit に付属している Buffer で溶解しサンプルとした。遊離リン酸の有無を Biomol green を用い確認し色調の変化が見られたサンプルは脱塩カラムを通し、再度色調の変化を確認し、色調の変化が見られないことを確認した。得られたサンプルのタンパク濃度を定量し、遊離リン酸量を補正した。遊離リン酸量は DMSO を 1 とした時の相対値として CaN ホスファターゼ活性の評価を行った。

1-2-12. 定量的リアルタイム PCR 解析

6 well plate にマウス膠芽腫幹細胞を 1×10^5 cells/well で播種し、DMSO もしくは JCI-20679 1 μM を添加し、翌日に細胞を回収した。細胞懸濁液をそれぞれ 500 μL の TRIzol (Thermo Fisher Scientific) に溶解し、RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて以下のように全 RNA 抽出物を精製した。溶解物に 100 μL のクロロホルム (Wako) を加え、激しく振盪した。室温で 2 分間静置した後、12,000 × g、4°Cで 15 分間遠心分離し上清を回収し、同量の 100% エタノール (Wako) を加えて激しく振盪した。この混合液を RNeasy スピンカラムに移しかえ、12,000 × g、室温で 15 秒間遠心分離した。下層を廃棄し、Buffer RW1 を 700 μL 添加し 12,000 × g、室温で 15 秒間遠心分離した。下層を廃棄し、Buffer RPE を 500 μL 添加し 12,000 × g、室温で 15 秒間遠心分離した。下層を廃棄し、もう一度 Buffer RPE を 500 μL 添加し 12,000 × g、室温で 2 分間遠心分離した。下層チューブを新たなチューブと交換し、15,000 × g、室温で 1 分間遠心分離した。下層チューブを新たな 1.5 mL チューブと交換し、上層カラムに RNase free の滅菌蒸留水 20 μL を添加し、12,000 × g、室温で 1 分間遠心分離することにより、下層に細胞全 RNA 溶液を得た。得られた全 RNA 100-500 ng から、ReverTra Ace qPCR RT master mix (FSQ-301, TOYOBO, , Osaka, Japan) を用いて以下のように逆転写反応を行い、cDNA を合成した。RNA 溶液に滅菌蒸留水を加えて 6 μL とし、65°Cで 5 分間加熱した。gDNA Remover を加えた 4 × DN Master Mix を 2 μL 添加し、37°Cで 5 分間加熱した。5 × RT Master Mix II を 2 μL 添加し、37°Cで 15 分、50°Cで 5 分、98°Cで 5 分間インキュベートした。得られた cDNA に THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (QPS-201, TOYOBO) を加え、Light Cycler 96 system (Roche

Diagnostics) を用いて、cycle 1 : 95°Cで 60 秒、cycle 2 (× 40) : 95°Cで 15 秒、60°Cで 60 秒の条件で RT-qPCR を行った。遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子 mGAPDH の mRNA 発現量を内部標準として 2- $\Delta\Delta C_t$ 法を用いて算出した。Primer は Eurofins Genomics (Tokyo, Japan) より購入した。使用した Primer の配列は以下の通りである。

mNFATc2 primer #1 (F: GTGCAGCTCCACGGCTACAT, R: GCGGCTTAAGGATCCTCTCA),
mNFATc2 primer #2 (F: GAGAAGACTACAGATGGGCAG, R: ACTGGGTGGTAGGTAAAGTG),
mGAPDH (F: GGTGTGAACGGATTTGGCCGTATTG, R: CCGTTGAATTTGCCGTGAGTGGAGT).

1-2-13. AMPK ノックダウン

p-AMPK のタンパク発現量の低下を目的とし、AMPK β を標的とした RNAi クローンを Sigma-Aldrich から入手した。使用した配列は以下の通りである。

non-targeting shRNA (SHC016,

Sequence:CCGGGCGCGATAGCGCTAATAATTTCTCGAGAAATTATTAGCGCTATCGCGCTTTT
T),

shRNA targeting AMPK β (sh-AMPK β) #1 (TRCN000025105,

Sequence:CCGGCCCTCCTCTACAAGCCGATATCTCGAGATATCGGCTTGTAGAGGAGGGTTT
TT),

sh-AMPK β #2 (TRCN0000274638,

Sequence:CCGGCCATGATCCTTCTGAGCCAATCTCGAGATTGGCTCAGAAGGATCATGGTTT
TT)。

6 well plate にマウス膠芽腫細胞を 1×10^5 cells/well で播種し、上述の配列を持つ shRNA を含むレンチウイルスを MOI 10 で添加した。24 時間後に導入された細胞をセレクションするために puromycin 0.75 μ g/ml (164-23154, Wako Pure Chemical Industries) を含む培地で培養し、AMPK β がノックダウンされた細胞を培養した。ノックダウンの確認は 1 週間後に細胞を Lysis Buffer で溶解し前述のウェスタンブロット解析法を用いて p-AMPK タンパク発現量を解析した。

1-2-14. NFATc2 強制発現

NFATc2 遺伝子 (MR209524, Origene Technology, Rockville, USA) もしくは empty vector (PS100001, Origene) を、mouse neural stem-cell nucleofactor kit (VPG-1004; Lonza, Tokyo, Japan) を使用し、エレクトロポレーション法を用い導入した。マウス膠芽腫幹細胞及びマウス膠芽腫細胞を 5×10^6 cells/sample で用意し Cell pellet にした後、kit に付属している Nucleofactor Solution 82 μ L と Supplement 18 μ L を混ぜた溶液で懸濁した。この細胞懸濁液に empty vector もしくは NFATc2 遺伝子の cDNA を 2 μ g 加え、付属のキュベットに細胞懸濁液を移した。nucleofactor 2b device (AAB-1001, Lonza) を使用しマウス膠芽腫幹細胞に最適な A-033 のプログラムで遺伝子導入を行なった。遺伝子導入を行なった後、細胞懸濁液を 6 well plate に移し培養した。翌日培地の交換を行い遺伝子導入後 3 日目に 1×10^5 cells/dish となるように 6 cm dish に播種し G418 (09380-86, Nacalai Tesque) を 50-250 μ g/ml の濃度で 2 週間作用させることによりセレクションを行なった。強制発現の確認は細胞を Lysis Buffer で溶解し前述のウェス

タンブロット解析法を用いて解析した。

1-2-15. 膠芽腫モデルマウスを用いた抗腫瘍評価

マウス膠芽腫幹細胞を PBS (166-23555, Wako Pure Chemical Industries) 2 μ L 中に 1×10^3 個となるように細胞懸濁液を作成し、オスの C57BL/6 マウスもしくはメスの BALB/c マウスに移植を行なった。マウスは麻酔下で移植を行なった。infusion system (Legato 130) を使用し、細胞懸濁液を 1 μ L/min の速さで右大脳のブレグマから外側に 2 mm、腹側に 3 mm の位置に注入した。全生存期間の評価を行なった実験では 10 匹ずつのオス C57BL/6 マウスに移植後 3 日目から DMSO もしくは JCI-20679 20 mg/kg を週 3 回腹腔内投与した。腫瘍形成の評価を行なった実験は 7 匹ずつのメス BALB/c マウスに移植後腫瘍の形成を確認した後、DMSO もしくは JCI-20679 20 mg/kg を週 3 回投与した。移植後 1 週間毎にルシフェリンを用い発光強度を測定し腫瘍の大きさを評価した。D-luciferin (126-05116, Wako) を腹腔内に投与し 10 分後に IVIS Lumina XR imaging system を用いて検出を行なった。 1×10^4 - 5×10^5 photons/sec で腫瘍が形成されたと判断し薬剤の投与を開始した。また腫瘍形成により動きの鈍化や姿勢の変調が見られた場合、頸椎脱臼法を用い安楽死を行なった。

1-2-16. 統計解析

細胞の実験では Excel software を用い Two-tailed unpaired Student's t-test, two-tailed Welch's t-test, one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test or two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test を行い、P 値を算出した。マウスを用いた実験では Excel software を用い Log-rank test もしくは Wilcoxon rank sum test を行い、P 値を算出した。得られた P 値が 0.05 未満で有意差があると判断した。全ての実験は独立した実験を少なくとも 3 回行った。グラフは平均値 \pm SD を表している。

1-3 実験成績

1-3-1.種々の膠芽腫細胞に対する JCI-20679 による増殖抑制

Sleeping-Beauty トランスポゾンシステムを用いて作成された自発発症型膠芽腫マウスモデル腫瘍組織から樹立されたマウス膠芽腫幹細胞に対し、JCI-20679 を種々の濃度で、48 時間および 96 時間作用させたところ、JCI-20679 は、膠芽腫幹細胞に対して濃度依存的に増殖抑制効果を示した (Fig. 3)。続いて、マウス膠芽腫幹細胞 (GSCs) と、同一個体腫瘍から並行して樹立された、ウシ胎児血清負荷により分化を誘導した接着系培養で維持した膠芽腫細胞 (Differentiated) (Fig. 4A) を用い、JCI-20679 による増殖抑制効果を評価、比較した。その結果、JCI-20679 は膠芽腫幹細胞および接着培養細胞の増殖を有意に抑制 ($P < 0.001$) し、特に膠芽腫幹細胞に対してより低濃度で増殖抑制効果を示した (Fig. 4B)。その際の、IC50 を計算したところ、膠芽腫幹細胞において、47.3 nM、分化誘導した接着系膠芽腫細胞で、421.7 nM であった。

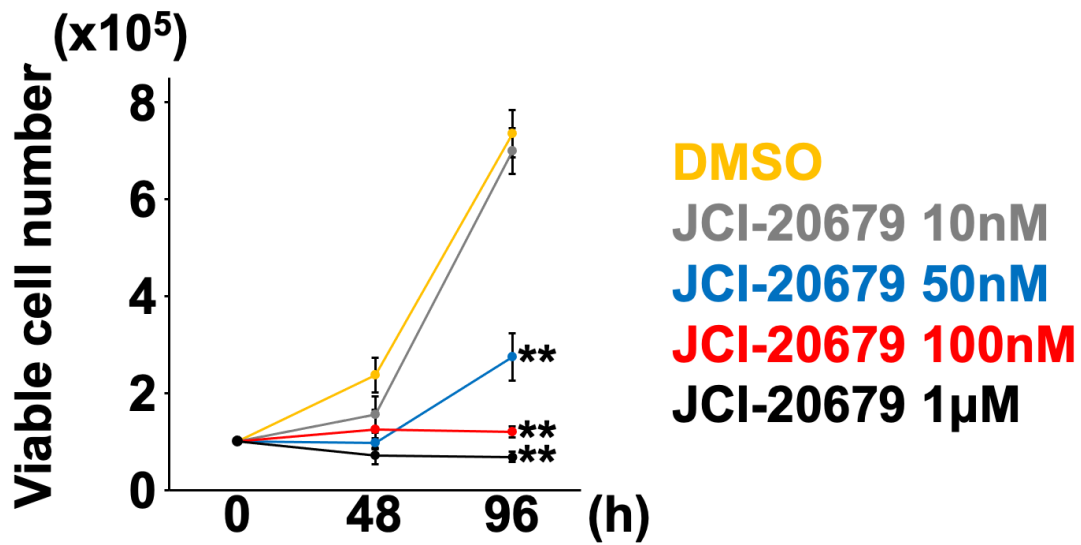


Figure 3. JCI-20679 suppresses the proliferation of the glioblastoma stem cells dependent manner.

Number of viable GSCs after treatment with JCI-20679 at the indicated concentrations (n=4). The number of viable cells was counted by trypan blue staining. **P<0.01 by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. All data are presented as mean ± SD.

This figure was cited from Figure 1 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

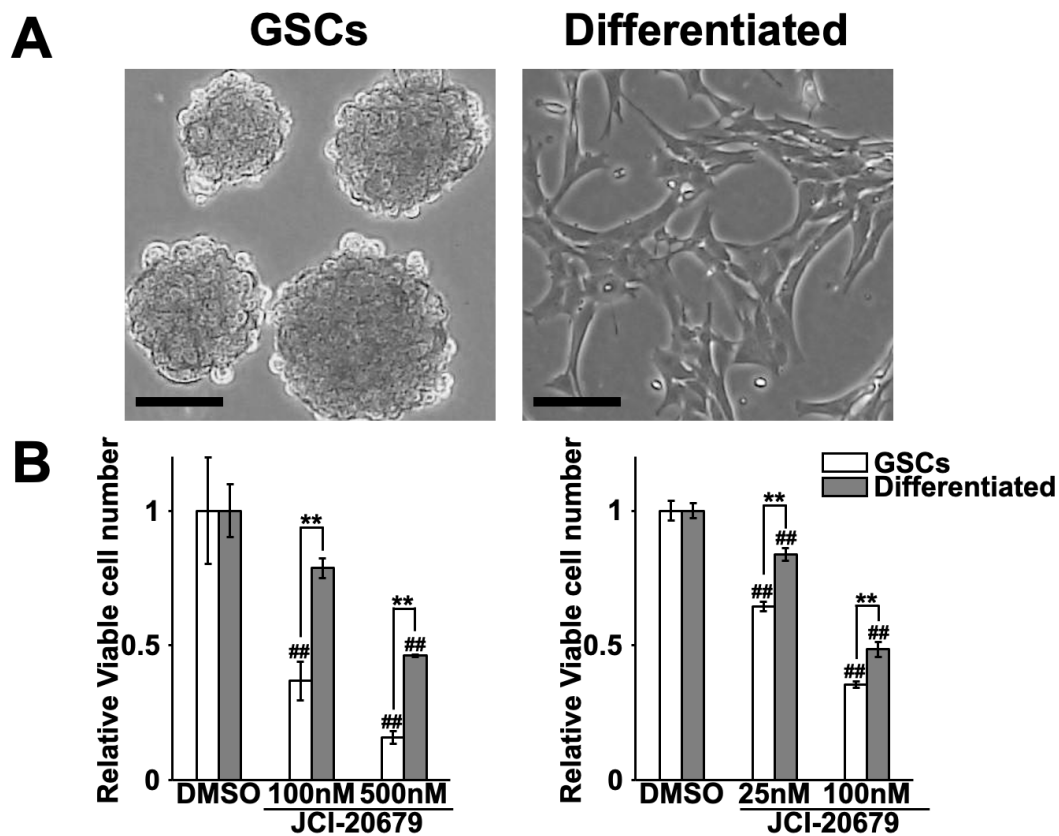


Figure 4. JCI-20679 suppresses the proliferation of glioblastoma stem cells more effectively than differentiated glioblastoma cells.

(A) Representative images of GSCs maintained as neurospheres and differentiation-induced cells maintained in adherent culture (scale bar, 100 μ m). (B) Relative number of viable GSCs and differentiated glioblastoma cells after treatment with JCI-20679 for 72 h in two independent lines of GSCs (GSCs in the left panel, n=4; GSCs in the right panel and differentiated glioblastoma cells in the both panels, n=3). The number of viable cells was counted using trypan blue staining. The number of viable cells was normalized with the results of each DMSO-treated control. **P<0.01 as indicated; ##P<0.01 vs. DMSO by two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. All data are presented as mean \pm SD.

These figures were cited from Figure 1 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

1-3-2. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 による細胞周期進行の抑制

マウス由来膠芽腫幹細胞において、JCI-20679 による細胞周期の進行に与える影響について解析を行った。マウス膠芽腫幹細胞に 100 nM あるいは 1 μ M で JCI-20679 を 24 時間作用させ、フローサイトメトリー法を用いて BrdU を取り込んだ細胞の割合を解析した。その結果、複数のマウス由来膠芽腫幹細胞において、BrdU 陽性細胞の細胞周期の DNA 合成期にエンターリーした細胞の割合の有意な減少 ($P < 0.001$) が認められた (Fig. 5A,5B)。これらの結果は、単位時間あたりに DNA 合成期である S 期にエンターリーした膠芽腫幹細胞の割合が減少していることを示しており、JCI-20679 が、濃度依存性に、膠芽腫幹細胞の細胞周期の進行を抑制していることを示している。

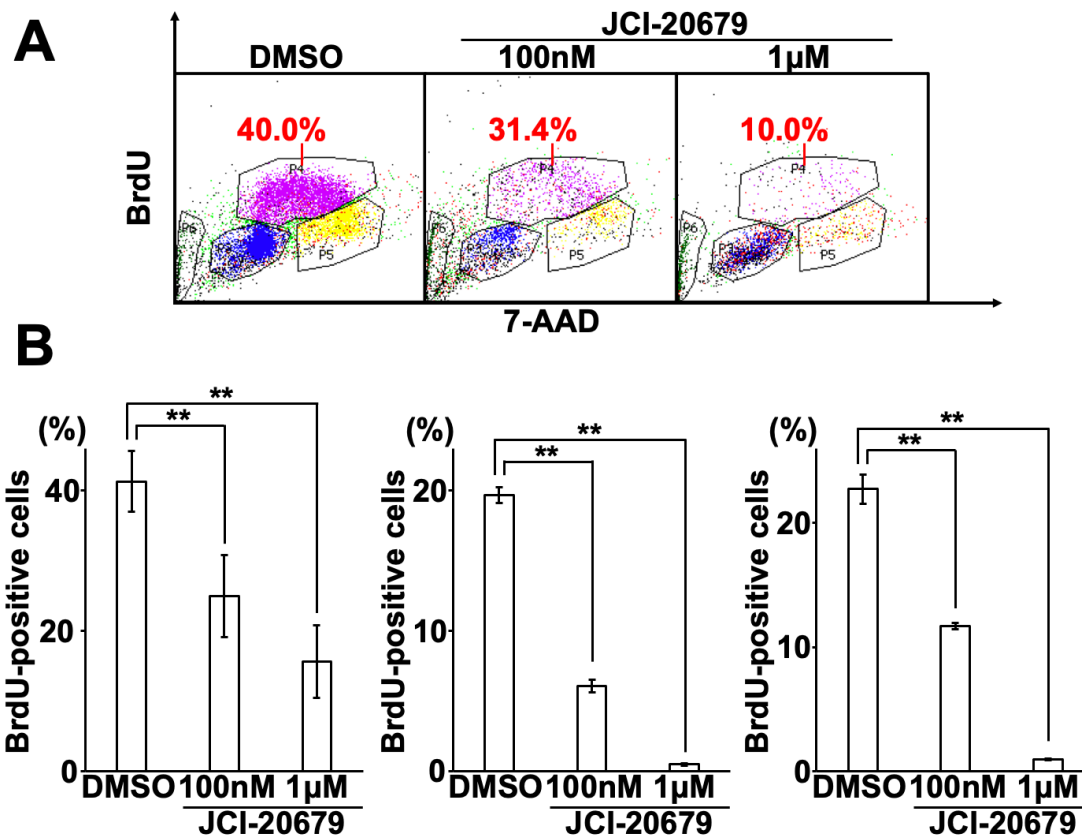


Figure 5. JCI-20679 suppresses the proliferation of the glioblastoma stem cells with cell-cycle arrest.

(1) Percentage of cells in the DNA synthesis phase as evaluated by BrdU incorporation. The proportions of BrdU-positive S-phase cells were described. (B) Quantitative analysis of the proportion of BrdU-positive S-phase cells in three different GSC lines (n=3, respectively). **P<0.01 by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. All data are presented as mean ± SD.

These figures were cited from Figure 1 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

1-3-3. JCI-20679 による膠芽腫細胞に対するミトコンドリア機能の阻害作用

これまでの研究で、JCI-20679 は、ウシ心臓から純化したミトコンドリアを用いた試験管内での実験により、ミトコンドリア複合体 I の阻害活性を発揮することが報告されている (65)。そこで、JCI-20679 による、膠芽腫細胞に対する増殖抑制効果を発揮する条件においても、同様の作用を発揮するのかについて検討した。マウス膠芽腫細胞及びヒト膠芽腫培養株 A172 細胞に JCI-20679 を作用させて、フローサイトメトリー法を用いてミトコンドリア膜電位を解析したところ、JCI-20679 によるミトコンドリア膜電位の低下 (left panel; $P=0.0016$, right panel; $P=0.0096$) が見られた (Fig. 6A, 6B)。また、同様に、マウス膠芽腫幹細胞に JCI-20679 を作用させると、細胞内酸素消費速度が低下 ($P<0.001$) することを見出した。さらに、JCI-20679 は、濃度依存性に、ミトコンドリア局在スーパーオキシド、すなわち、ミトコンドリア活性酸素種 (ROS) を上昇させた (Fig. 7A, 7B)。これらの結果は JCI-20679 が膠芽腫細胞においてもミトコンドリア機能を阻害していることを示唆している。

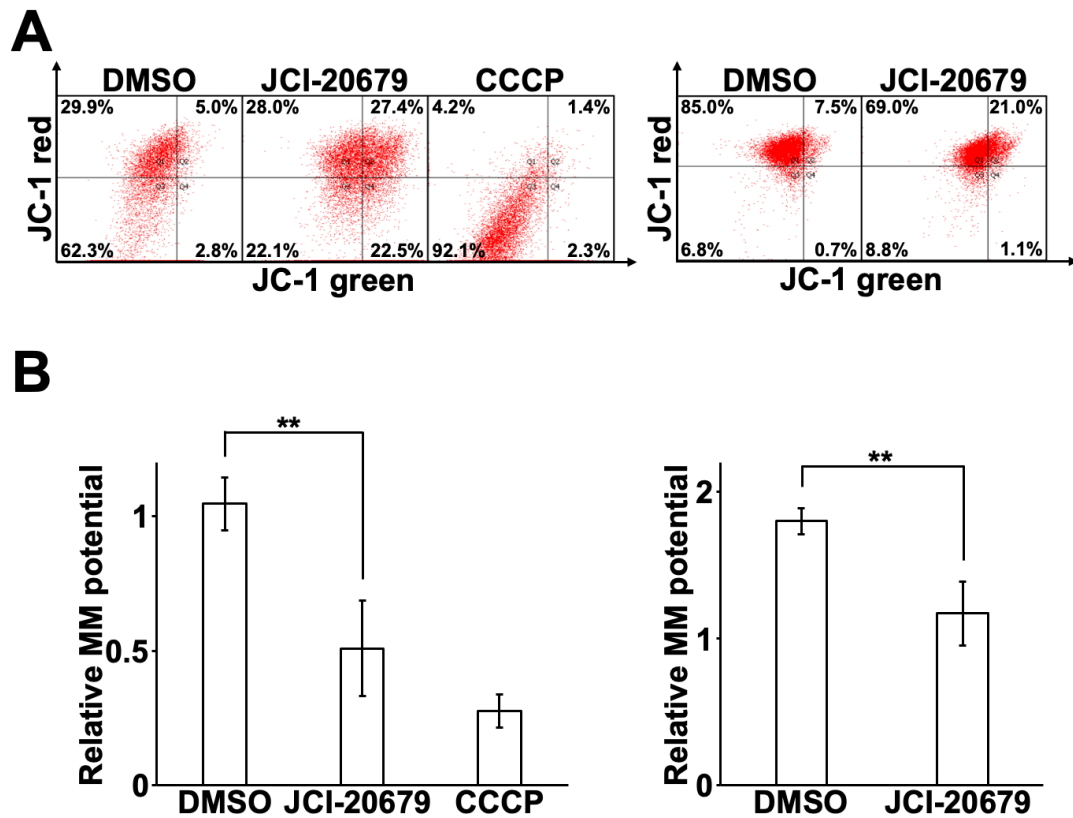


Figure 6. JCI-20679 decreases the mitochondrial membrane potential.

(A) Representative FCM plots detecting the mitochondrial membrane potential in the differentiated glioblastoma cells (left panel) and human glioblastoma A172 cells (right panel). (B) mitochondrial membrane potential in the differentiated glioblastoma cells (left panel) and human glioblastoma A172 cells (right panel) treated with 500 nM or 1 μ M JCI-20679 or 50 μ M CCCP as a positive control for 72 h (n=3, respectively). **P<0.01 by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test (left panel) or two-tailed unpaired Student's t-test (right panel). All graphs represent mean \pm SD.

These figures were cited from Figure S1 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

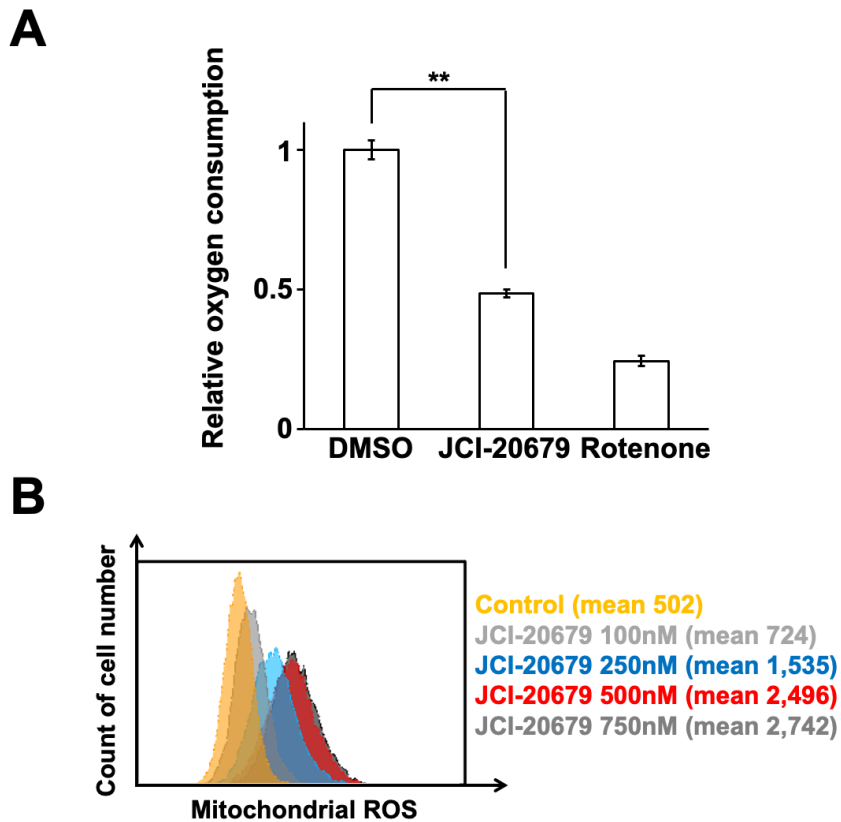


Figure 7. JCI-20679 inhibits mitochondrial functions.

(A) Relative oxygen consumption in GSCs pretreated with 1 μ M JCI-20679 or 1 μ M rotenone as a positive control for 24 h (n=3). Data are presented as mean \pm SD. **P<0.01 by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test. (B) Mitochondrial ROS generation in the differentiated glioblastoma cells treated with the indicated concentrations of JCI-20679.

These figures were cited from Figure 2 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

1-3-4. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 による AMPK の活性化

ミトコンドリア機能が阻害されると、エネルギー代謝ストレスセンサー分子である AMPK タンパク質の Thr172 が、リン酸化されることにより活性化することが報告されている (52)。そこで、膠芽腫幹細胞に対して JCI-20679 を作用させた際に、これらの現象が引き起こされているのかについて、リン酸化 AMPK タンパク質に特異的に結合する抗体を用いたウェスタンブロット解析法にて検証した。その結果、JCI-20679 処理により、濃度依存的にリン酸化 AMPK タンパク質の発現量が増加し、JCI-20679 を 1 μ M を作用させた際、コントロールと比較し p-AMPK タンパク発現量が約 2 倍になることをみいだした (Fig. 8)。

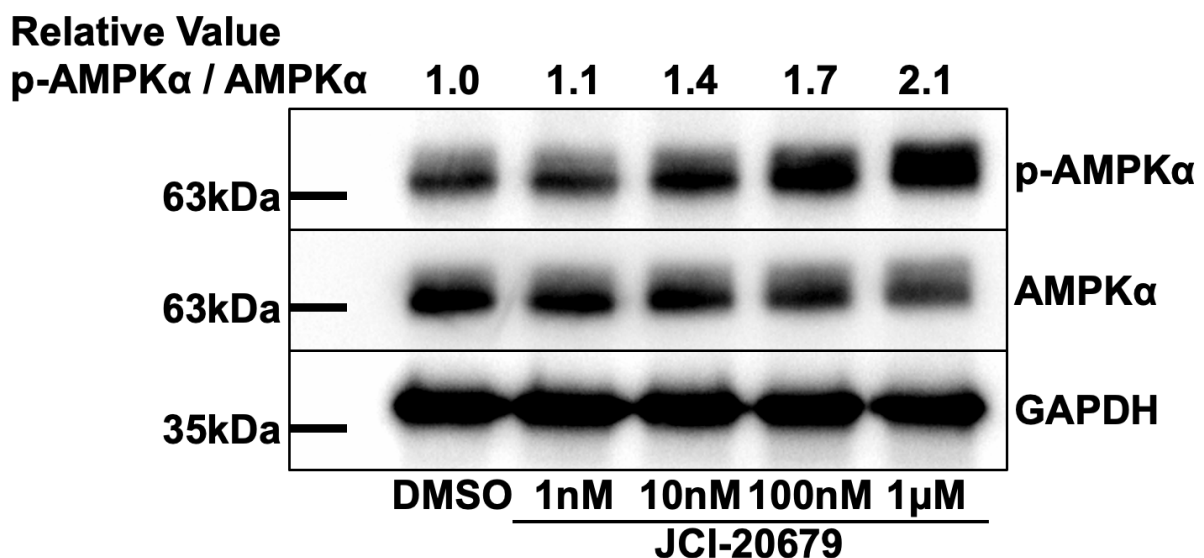


Figure 8. JCI-20679 activates AMPK.

Expression levels of p-AMPKα proteins in GSCs treated with JCI-20679 at the indicated concentrations for 24 h. Protein expression was evaluated using Western blot analysis.

This figure was cited from Figure 3 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

1-3-5. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 による細胞内 AMP/ATP 比上昇効果

ミトコンドリア機能が阻害されると、原料である AMP からの ATP 生合成が障害され、相対的に、細胞内 AMP/ATP 比が上昇することが知られている。この細胞内 AMP/ATP 比の上昇は、ミトコンドリア機能障害による細胞内エネルギー代謝ストレスの本態であり、AMPK タンパク質はこの細胞内 AMP/ATP 比の上昇を検知してリン酸化されることが知られている。そこで、膠芽腫幹細胞に対して JCI-20679 を作用させ、細胞内の AMP および細胞内の ATP を測定し、AMP/ATP 比を算出した。その結果、JCI-20679 処理により細胞内 AMP の有意な増加 ($P < 0.001$)、細胞内 ATP の有意な減少 ($P < 0.001$)、および細胞内 AMP/ATP 比の有意な上昇 ($P < 0.001$) が引き起こされることをみいだした (Fig. 9A-9C)。

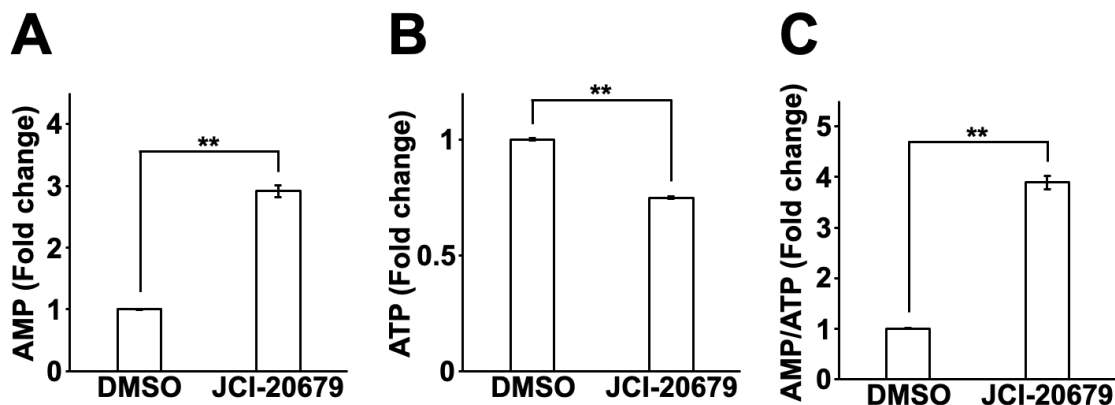


Figure 9. JCI-20679 increases the AMP/ATP ratio.

Intracellular (A) AMP and (B) ATP levels in GSCs treated with 1 μ M JCI-20679 for 24 h ($n=4$, respectively). (C) AMP/ATP ratio calculated from the measured AMP and ATP levels ($n=4$). ** $P < 0.01$ as indicated by (A and C) two-tailed Welch's t-test, (B) two-tailed unpaired Student's t-test All graphs represent mean \pm SD.

These figures were cited from Figure 3 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

1-3-6. AMPK 阻害剤による JCI-20679 のマウス由来膠芽腫幹細胞とヒト膠芽腫細胞培養株 U251 に対する増殖抑制効果の回復

JCI-20679 処理により、細胞内 AMP/ATP 比の有意な上昇が引き起こされ、それに伴って、リン酸化 AMPK タンパク質の発現量が増加することをみいだしたため、JCI-20679 による増殖抑制効果の作用メカニズムに、AMPK を介したシグナルが関与しているという仮説を立てた。この仮説を検証するため、AMPK 阻害剤である compound-C および inosine を、JCI-20679 処理に併用した際の、増殖抑制効果の評価を行った。その結果、AMPK 阻害剤 compound-C および inosine を併用することで、JCI-20679 による細胞増殖抑制効果が有意に回復 (Fig. 10A; $P < 0.001$, Fig. 10B; $P = 0.018$) した (Fig. 10A, 10B)。これらの結果は、JCI-20679 の作用機序には、少なくとも部分的には、AMPK の活性化が関与していることを示唆している。

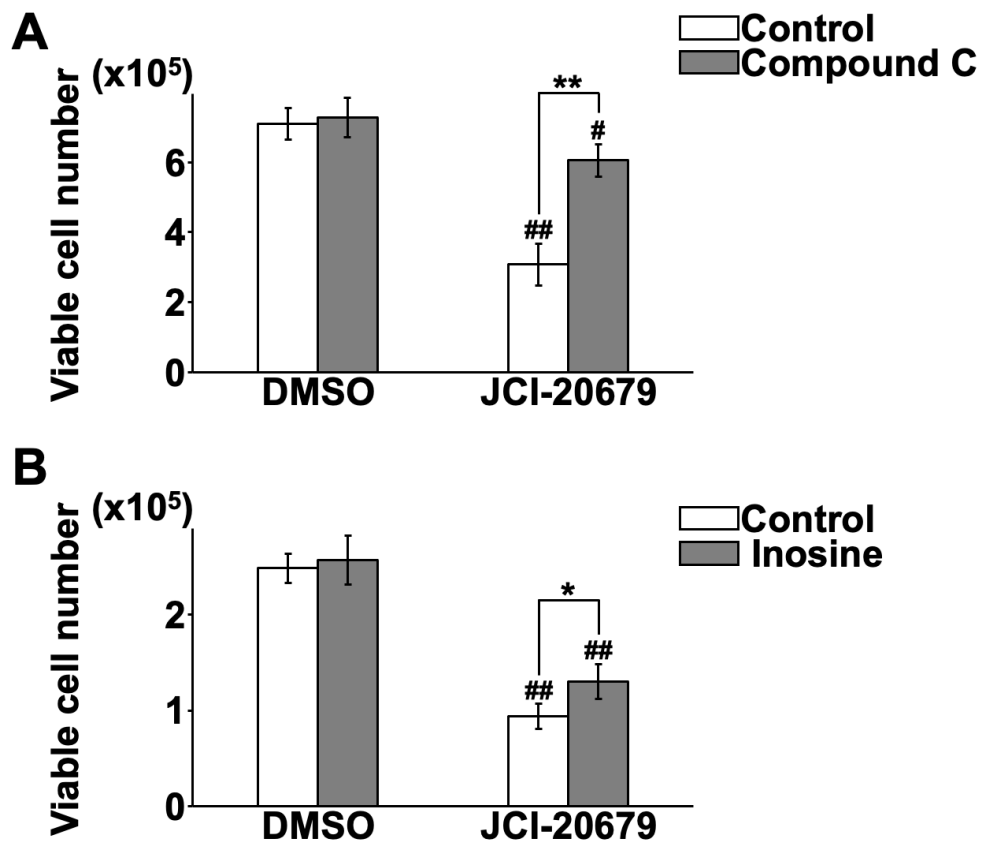


Figure 10. AMPK inhibitors recover the suppressed glioblastoma proliferation by JCI-20679.

(A) Viable cell numbers of GSCs treated with or without 50 nM JCI-20679 and with or without 75 nM compound C for 72 h (n=3). The number of viable cells was counted using trypan blue staining. (B) Viable cell numbers of U251 human glioblastoma cells treated with or without 500 nM JCI-20679 and with or without 500 μM inosine for 6 days (n=4). The number of viable cells were counted using trypan blue staining. *P<0.05, **P<0.01 as indicated; #P<0.05, ##P<0.01 vs. DMSO by two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. All graphs represent mean ± SD.

These figures were cited from Figure 3 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

1-3-7. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 によるリン酸化 CAMKII タンパク発現量に与える影響

ミトコンドリア機能の阻害はカルシウムシグナルに影響を及ぼすことが報告されている (69)。そこで、膠芽腫幹細胞に JCI-20679 を作用させた際の、リン酸化 CAMKII タンパク発現量と NFATc2 のタンパク発現量を、ウェスタンブロット解析法にて検証した。その結果、リン酸化 AMPK タンパク質の発現量を増加させる条件で JCI-20679 を作用させることによって、これらのカルシウムシグナルの伝達系因子のタンパク質発現が低下することをみいだした (Fig. 11A, 11B)。

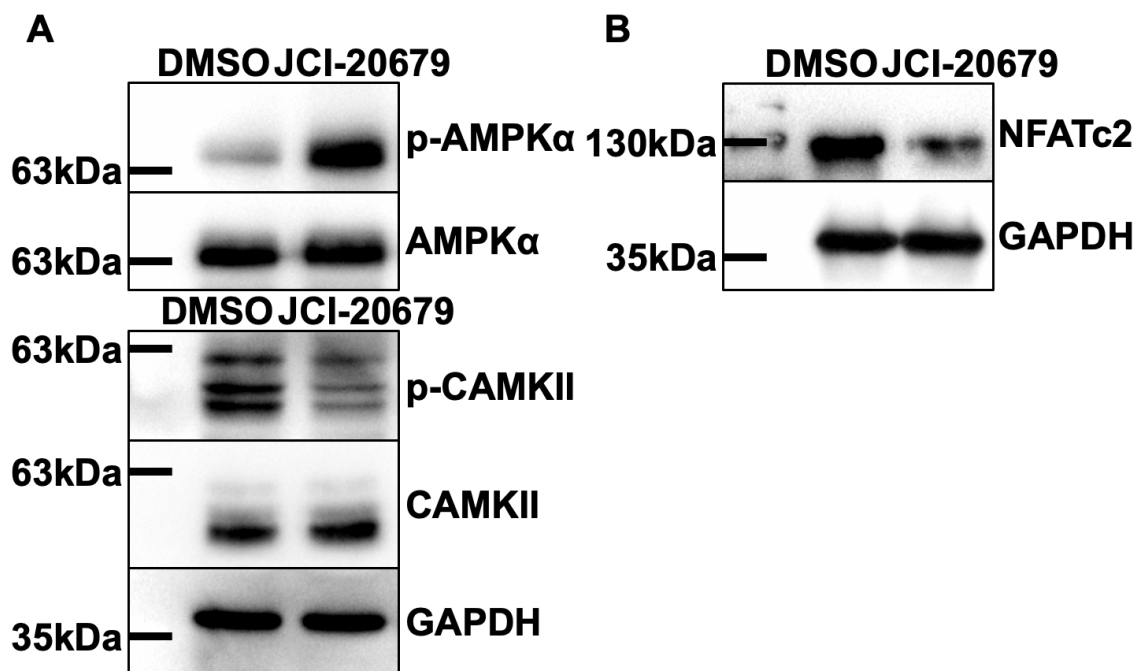


Figure 11. JCI-20679 decrease p-CAMKII and NFATc2 protein expression levels.

(A) Expression levels of p-AMPK α and p-CAMKII proteins in GSCs treated with 100 nM JCI-20679 for 48 h. (B) Expression levels of NFATc2 proteins in GSCs treated with 500 nM JCI-20679 for 72 h. Protein levels were detected using Western blot analysis.

These figures were cited from Figure 4 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

1-3-8. マウス由来膠芽腫細胞における JCI-20679 による CaN ホスファターゼの酵素活性と NFATc2 発現量に与える影響

過去の文献上、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化が、カルシウムシグナルおよび転写因子 NFATc2 タンパク質の活性に影響を及ぼしうることが、アフリカツメガエルの発生学的研究で示されていた (41)。そこで、JCI-20679 を作用させた際の、膠芽腫幹細胞のタンパク質抽出液を、核タンパク質画分と細胞質タンパク質画分に分離し、NFATc2 のタンパク質発現量を解析した。まず、核タンパク質画分と細胞質タンパク質画分に効率よく分離できているかどうかを、細胞質タンパク質 Vinculin および核タンパク質 Lamin A/C のウェスタンブロット解析法を用い確認した (Fig. 12A)。次に、NFATc2 のタンパク質発現量を解析したところ、細胞質タンパク質画分と核タンパク質画分の双方において、NFATc2 タンパク質の発現量の低下が観察された (Fig. 12B)。さらにマウス由来接着培養膠芽腫細胞において CaN ホスファターゼの酵素活性を測定したところ、JCI-20679 の作用により活性の有意な低下 ($P < 0.001$) が見られた (Fig. 12C)。これらの結果は JCI-20679 がカルシウムシグナルに影響を及ぼしていることを示唆している。

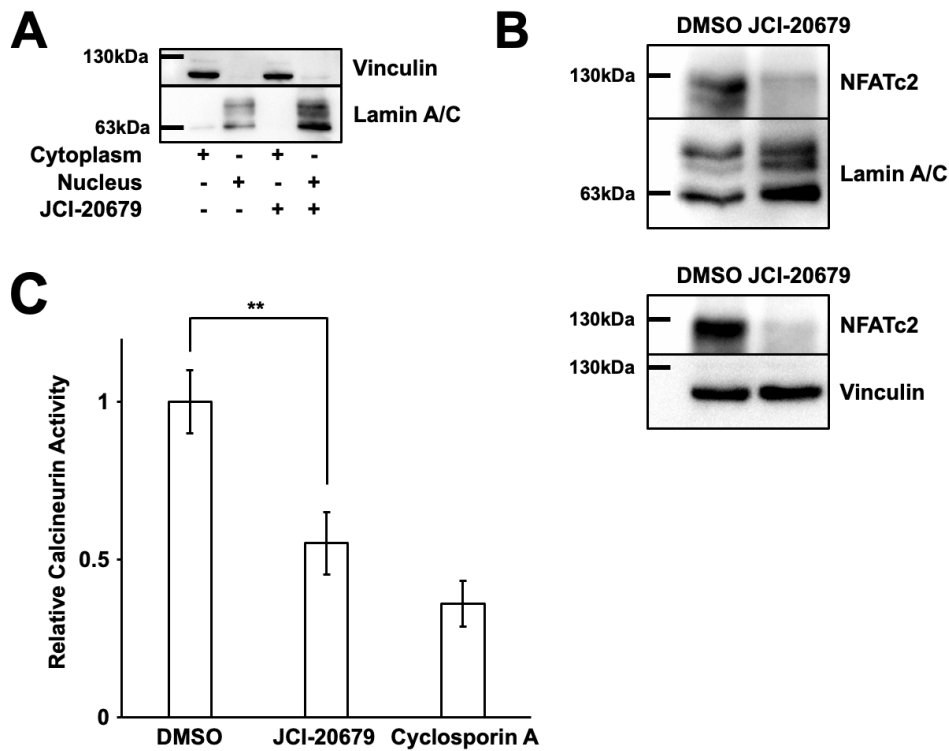


Figure 12. JCI-20679 suppresses calcium signaling.

(A) Quality of the cellular fractionations in the nucleus and cytoplasm were assessed using Western blot analysis. These are same samples as used in Fig. 12B. (B) Expression levels of NFATc2 proteins in the nucleus (upper panel) and cytoplasm (bottom panel) of GSCs treated with 500 nM JCI-20679 for 48 h. Protein levels were detected using Western blot analysis. (C) Calcineurin phosphatase activity in the differentiated glioblastoma cells treated with 500 nM JCI-20679 or 10 μ M cyclosporin A for 72 h (DMSO, n=12; JCI-20679, n=6; cyclosporin A, n=6). Data are presented as mean \pm SD. **P<0.01 by one-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test.

These figures were cited from Figure S1 and Figure 4 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

1-3-9. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 による NFATc2 の mRNA 発現量に与える影響

JCI-20679 により NFATc2 タンパク質の発現量の低下が観察されたため、mRNA レベルでの NFATc2 の発現量の解析を行った。JCI-20679 は mRNA レベルでも NFATc2 の発現量を有意に低下 (left panel; $P < 0.001$, right panel; $P < 0.001$) させた (Fig.13)。これらの結果は JCI-20679 による NFATc2 発現量低下には、NFATc2 タンパク質レベルでの調節のみならず、mRNA レベルでの発現調節が関与していることを示唆している。

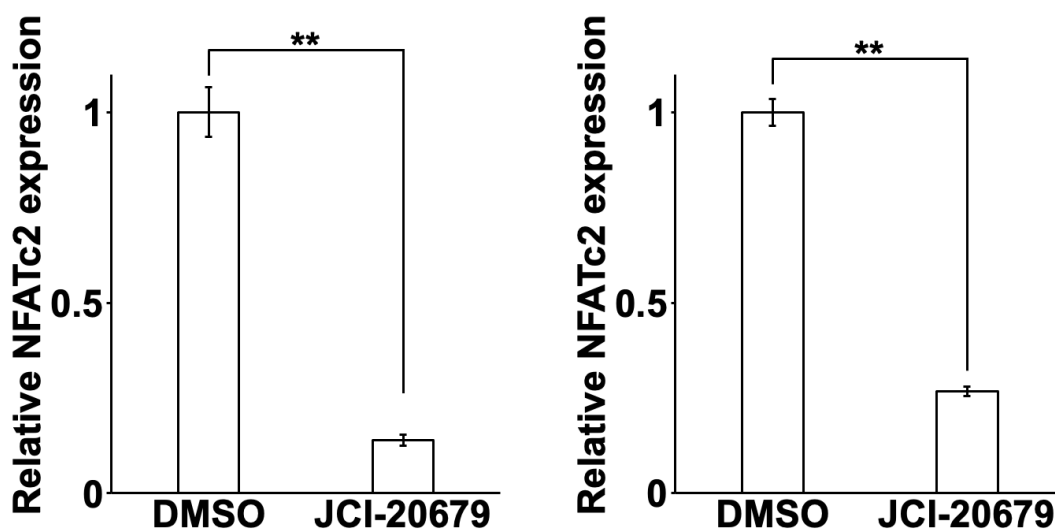


Figure 13. JCI-20679 decreases the NFATc2 mRNA expression levels.

(A, B) NFATc2 mRNA levels in two different GSCs were treated with 1 μ M JCI-20679 for 72 h. NFATc2 mRNA levels were analyzed using real-time PCR (n=3 respectively). ** $P < 0.01$ by two-tailed unpaired Student's t-test.

These figures were cited from Figure 5 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

1-3-10. マウス由来膠芽腫幹細胞における JCI-20679 による NFATc2 mRNA 発現減少効果に対して AMPK 発現量が与える影響

次に、AMPK の活性化と NFATc2 発現量の低下の関係性を検証するため AMPK β をノックダウンし、活性化 AMPK のタンパク発現量を低下させた際の NFATc2 の発現量の解析を行った。活性化 AMPK の発現量はウェスタンブロット解析法を用い、高い効率で発現が低下していることを確認した (Fig. 14A)。その結果、活性化 AMPK の発現低下は、JCI-20679 による NFATc2 の mRNA 発現量の低下を一部回復 (Fig. 14B; $P = 0.0017$, Fig. 14C; $P < 0.001$) させた。この結果は 2 種類のプライマー及び 2 種類の shRNA で確認された (Fig. 14B, 14C)。また活性化 AMPK の発現低下は JCI-20679 による増殖抑制効果を部分的に回復 ($P < 0.001$) させた (Fig. 14D)。これらの結果は JCI-20679 による mRNA レベルにおける NFATc2 発現量低下に、AMPK の活性化が、少なくとも一部は関与していることを示唆している。

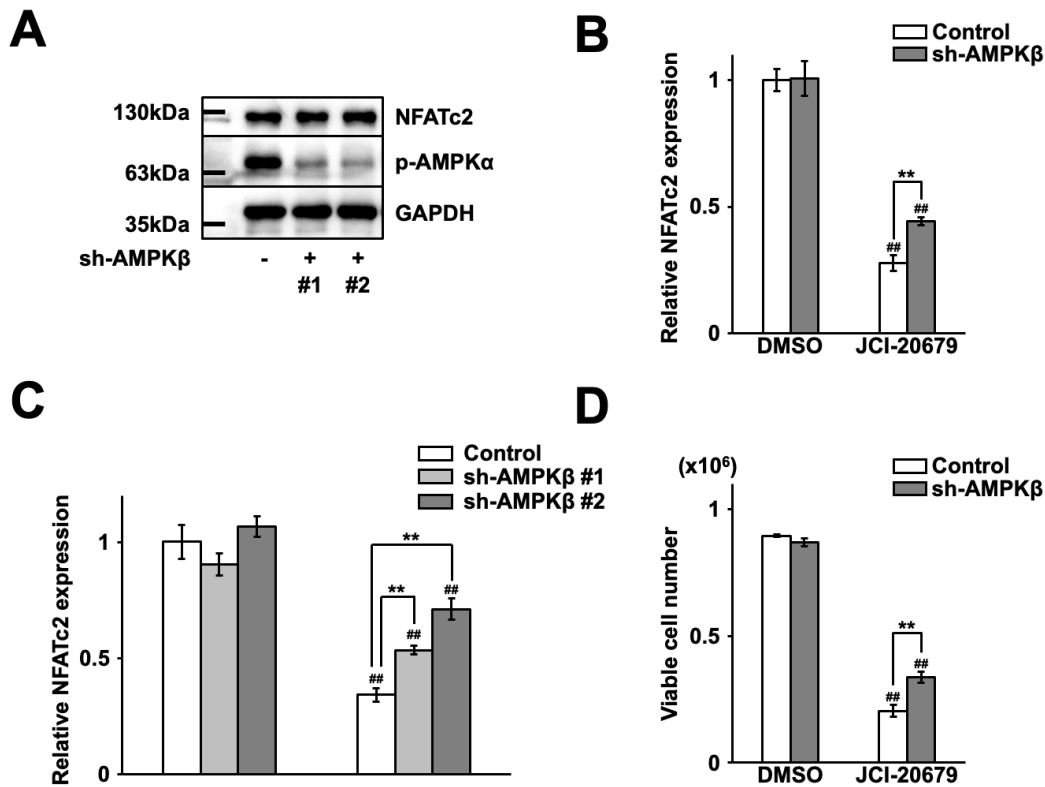


Figure 14. AMPK knocked down recovers the suppressed NFAT mRNA expression levels and glioblastoma proliferation by JCI-20679.

(A) Decrease of p-AMPK α expression and the effects on NFATc2 expression in AMPK β -depleted (sh-AMPK β) GSCs were assessed using Western blot analysis. (B) NFATc2 mRNA levels in AMPK β -depleted (sh-AMPK β) or control GSCs treated with 1 μ M JCI-20679 for 24 h. NFATc2 mRNA levels were analyzed using real-time PCR (n=3). (C) Relative NFATc2 expression in AMPK β -depleted (sh-AMPK β) or control glioblastoma stem cells treated with 1 μ M JCI-20679 for 24 h. NFATc2 mRNA levels were analyzed using real-time PCR. The mNFATc2 primer #2 was used. Two shRNAs with different sequences were used for AMPK β knockdown (n=3). (D) Number of viable GSCs AMPK β -depleted (sh-AMPK β) or control after treatment with 100 nM JCI-20679 for 72 h (n=3). The number of viable cells were counted using trypan blue staining. **P<0.01 as indicated, ###P<0.01 vs. DMSO by two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. Data are presented as mean \pm SD.

These figures were cited from Figure S1 and Figure 5 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

1-3-11 マウス由来膠芽腫細胞における JCI-20679 による NFATc2 の発現量低下の意義の検証

マウス由来膠芽腫幹細胞及びマウス由来接着培養膠芽腫細胞において、JCI-20679 による NFATc2 の発現量低下の意義を検証する目的で NFATc2 を強制的に発現させた膠芽腫幹細胞及び接着培養膠芽腫細胞に、JCI-20679 を作用させた。NFATc2 の強制発現は、ウェスタンブロット解析法を用い確認した (Fig. 15A)。NFATc2 の強制発現により、JCI-20679 による増殖抑制効果が有意に現弱 (left panel; $P = 0.017$, center panel; $P = 0.0061$, right panel; $P < 0.001$) した (Fig. 15B)。これらの結果は JCI-20679 の作用機序に対する NFATc2 の発現低下の意義を示している。

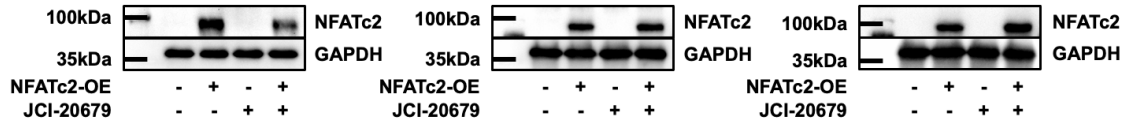
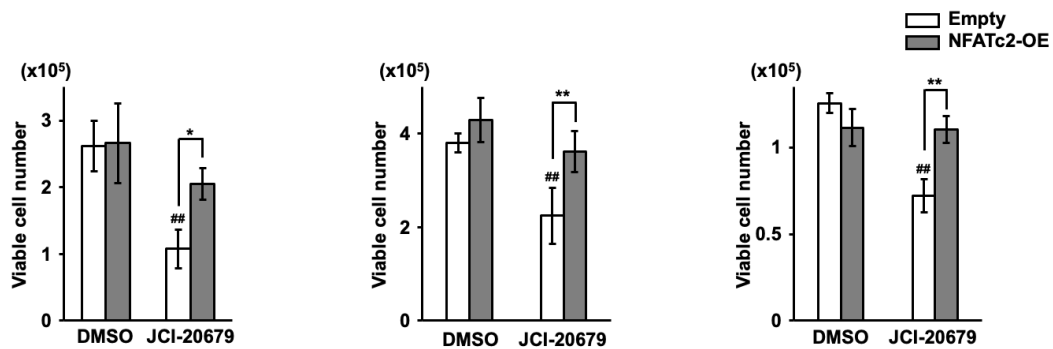
A**B**

Figure 15. NFATc2 overexpression recover the suppressed glioblastoma proliferation by JCI-20679.

(A) NFATc2 expression was assessed using Western blot analysis in GSCs (left and center panels) and differentiated glioblastoma cells (right panel) after treatment with JCI-20679 for 72 h; cells expressed either an empty vector (empty) or an NFATc2 overexpression vector (NFATc2-OE). (B) Number of viable GSCs (left and center panels) and differentiated glioblastoma cells (right panel) after treatment with JCI-20679 for 72 h. Cells expressed either an empty vector (empty) or an NFATc2 overexpression vector (NFATc2-OE) (n=3, respectively). The number of viable cells were counted using trypan blue staining. *P<0.05, **P<0.01 as indicated; ###P<0.01 vs. DMSO by two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test. Data are presented as mean ± SD.

These figures were cited from Figure 5 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

1-3-12. 生体内膠芽腫マウスモデルに対する JCI-20679 による抗腫瘍効果

生体内膠芽腫マウスモデルにおいて、JCI-20679 が抗腫瘍効果を発揮するか検証するために、膠芽腫幹細胞をマウス大脳に同所性移植し、移植膠芽腫モデルマウスを作成した。JCI-20679 を、20 mg/kg の用量で週 3 回の腹腔内投与することにより、マウスの生存期間が有意に延長 ($P < 0.001$) することを実証した (Fig. 16A)。また腫瘍のサイズを反映する luciferase 発光強度を測定することにより、腫瘍の進展を評価したところ、JCI-20679 の投与開始から 3 週間後の時点で、腫瘍による luciferase 発光シグナルを有意に低下 ($P < 0.05$) させる効果を示した (Fig. 16B, 16C)。これらの結果から、JCI-20679 は生体内膠芽腫マウスモデルにおいても、抗腫瘍効果を発揮することが示された。

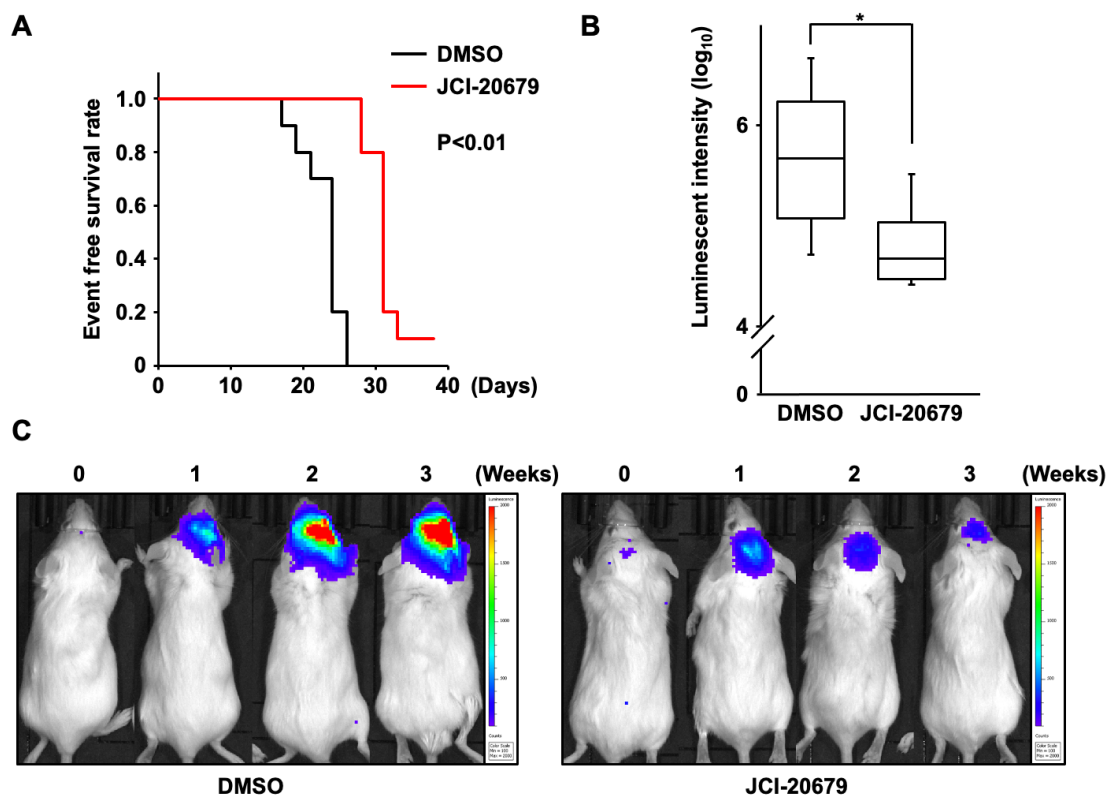


Figure 16. JCI-20679 extends overall event-free survival.

(A) Event-free survival rate in mice orthotopically transplanted with GSCs intraperitoneally treated with either DMSO or JCI-20679 (20 mg/kg; n=10 in each treatment group). The event-free survival rate was analyzed using the Kaplan-Meier method. $P < 0.01$ by log-rank tests. (B) Glioblastoma size assessed using bioluminescence intensity in mice orthotopically transplanted with a different GSC line and intraperitoneally treated with DMSO or JCI-20679 (20 mg/kg; n=7 for each treatment group). The luminescence values (log₁₀) after 3 weeks of treatment are shown. $*P < 0.05$ by Wilcoxon rank sum test. (C) Representative images of the mice treated with DMSO or JCI-20679 are presented.

These figures were cited from Figure 6 in Ando et al. *Mol. Med. Rep.* **2022**, 26, 238.

1-4. 考察

本章では、JCI-20679 による膠芽腫細胞に対する増殖抑制効果とその作用機序について解析を行った。さらに膠芽腫幹細胞を移植し作成した生体マウスモデルにおいて JCI-20679 が抗腫瘍効果を持つことを示した。

JCI-20679 は膠芽腫幹細胞に対し濃度依存的な増殖抑制効果を示した (Fig. 3)。また、膠芽腫幹細胞および分化を誘導した膠芽腫細胞に対して増殖抑制効果を示し、特に膠芽腫幹細胞に対して、より低濃度で増殖抑制効果を示した (Fig. 4A, 4B)。この増殖抑制効果を示した条件で、BrdU の取り込みを評価した結果、単位時間あたりに DNA 合成期にエントリーした BrdU 陽性細胞の割合が有意に減少した (Fig. 5A, 5B) ことから、JCI-20679 は膠芽腫幹細胞に対して細胞周期進行の抑制を伴う増殖抑制効果を示すと考えられた。

JCI-20679 を膠芽腫細胞に作用させることにより、ミトコンドリア膜電位の低下 (Fig. 6A, 6B)、酸素消費速度の低下 (Fig. 7A) およびミトコンドリア ROS の上昇 (Fig. 7B) を示した。これらの結果はいずれも、JCI-20679 が、膠芽腫に対してミトコンドリア複合体 I の阻害作用を発揮した結果を反映している生化学的知見として矛盾しない結果である。

ミトコンドリア機能が阻害され、酸化リン酸化が障害されると、AMP/ATP 比が上昇する。このエネルギー代謝ストレスのセンサー分子が AMPK であり、ストレスを感知するとリン酸化されることが報告されている (70)。JCI-20679 を膠芽腫幹細胞に作用させると、リン酸化 AMPK のタンパク発現量が上昇し (Fig. 8)、AMP/ATP が上昇した (Fig. 9C)。さらに AMPK 阻害剤 compound-C および inosine の併用により増殖抑制効果が一部回復した (Fig. 10A, 10B) ことから、JCI-20679 はミトコンドリア機能を阻害し AMPK を活性化させることで膠芽腫幹細胞の増殖を抑制すると考えられる。

膠芽腫幹細胞に対して、JCI-20679 はリン酸化 CAMKII のタンパク発現量と NFATc2 タンパク発現量の低下を引き起こした (Fig. 11A, 11B)。さらに JCI-20679 は CaN の酵素活性を抑制した (12C)。NFATc2 はカルモジュリン/CaN 系に制御されていることが報告されており (38)、GRIM-19 サブユニットのノックダウンによるミトコンドリア複合体 I の阻害は NFATc2 の発現量を低下させることが報告されている (41)。NFATc2 は膠芽腫組織に高発現しており浸潤や転移に関与することが報告されており (39)、CaN 阻害剤である Cyclosporin A により膠芽腫細胞の増殖が抑制されることが報告されている (71)。また NFATc2 は接着培養系膠芽腫細胞と比較し膠芽腫幹細胞において発現量が高いことが報告されている (40)。さらに Calcineurin-NFAT 経路の阻害剤は膠芽腫移植マウスモデルにおいて抗腫瘍効果を示している (72)。近年 NFAT が、がんの新たな標的になる可能性が考えられており (73)、これらの知見から、JCI-20679 の作用による NFATc2 の発現抑制効果は、膠芽腫の新しい治療戦略として有望であると考えられる。

膠芽腫幹細胞において、JCI-20679は mRNA レベルでも NFATc2 の発現量を低下させた (Fig. 13)。この発現低下メカニズムを検討したところ AMPK β のノックダウンにより、mRNA レベルでの NFATc2 発現量低下と JCI-20679 による増殖抑制効果が一部回復した (Fig. 14B-14D)。すなわち、JCI-20679 による NFATc2 の低下は AMPK 活性化に依存していると考えられる。文献上、心肥大モデルにおいてレスベラトロール処理により AMPK が活性化され NFATc2 の発現量が低下することが報告されている (42)。さらに NFATc2 の強制発現により JCI-20679 の増殖抑制効果は回復した (Fig. 15A-15C)。これらの結果から JCI-20679 の作用機序はミトコンドリア機能阻害により AMPK が活性化し、NFATc2 の発現低下が関与していると考えられる。また AMPK はミトコンドリア ROS によって活性化されることも報告されている (74)。従って膠芽腫幹細胞において JCI-20679 によるミトコンドリア ROS の増加も AMPK の活性化に関与している可能性が考えられる。

膠芽腫の治療抵抗性に膠芽腫幹細胞およびミトコンドリア機能の活性化の関与が報告されており、膠芽腫幹細胞およびミトコンドリア機能阻害は有用な治療標的になりうる。JCI-20679 は膠芽腫細胞と比較し膠芽腫幹細胞に対しより効果的な増殖抑制効果を発揮した。膠芽腫幹細胞は腫瘍の再発や転移に関与し、治療抵抗性に関与することが報告されている (9)。また膠芽腫の浸潤や転移に関与する NFATc2 は膠芽腫細胞と比較し膠芽腫幹細胞により高発現しており (40)、JCI-20679 による増殖抑制効果には NFATc2 の発現低下が考えられたため、JCI-20679 は膠芽腫幹細胞に対しより効果的な増殖抑制効果を示した可能性がある。また JCI-20679 が再発や転移に関与する膠芽腫幹細胞の増殖を効果的に抑制していたことから、JCI-20679 が膠芽腫の治療抵抗性を克服するための新たな治療薬になる可能性があると考えられる。

近年、ミトコンドリア機能の阻害は神経膠芽腫を含むがんの新規治療戦略として有力視されている (75, 76)。ミトコンドリア複合体 I の阻害作用を持つメトホルミンと神経膠芽腫に対する治療薬であるテモゾロミドを併用した臨床試験も行われており、結果が待たれる (57)。またメトホルミンによる抗腫瘍効果に AMPK の活性化が重要な役割を果たすことが報告されている (77)。しかしメトホルミンによる抗腫瘍効果を得るには非常に高濃度のメトホルミンを作用させる必要があり、多くの研究では *in vitro* の実験において、数 mM から数十 mM の濃度で用いられており、実際の臨床現場において到達することは困難である濃度と考えられる。膠芽腫幹細胞において JCI-20679 は数十から数百 nM 前後の濃度で 50%以上の増殖抑制効果を示しており、メトホルミンと比較して低濃度において抗腫瘍効果を示した。

そこで、生体内においても JCI-20679 が膠芽腫治療薬として有効性を示すかを検討するために、膠芽腫幹細胞をマウス脳に移植した同所性移植モデルを用いた検討で、JCI-20679 による治療効果を検証した。その結果、20 mg/kg の用量で JCI-20679 を週 3 回の腹腔内投与することにより、マウスの生存期間が有意に延長し (Fig. 16A)、腫瘍による luciferase 発光シグナルが有意に低下することを実証した (Fig. 16B, 16C)。この結果は、JCI-20679 の生体内における安定性と、良好な脳移行性を示唆するものであり、膠芽腫に対する治療薬として有望で

ある可能性を示唆している。治療有効用量において、有意な体重減少はみられず、安全に投与可能であったことから、がんのミトコンドリア代謝を標的した治療戦略は実現しうる可能性を示唆した。

文献上、ミトコンドリア複合体 I の強力な阻害剤である Rotenone は、齧歯類においてパーキンソン病の症状を呈することが報告されている (78)。したがって、JCI-20679 による副作用としてパーキンソン病の可能性が推察される。今回の実験の条件においては、明らかな神経学的症状は観察されず、活動性にも変化を認めなかったため、パーキンソン病を発症した可能性は低いと考えるが、今後、黒質線状体の病理学的検索も含めた検討が必要であると考えられる。また、メトホルミンにおいては、乳酸アシドーシスが臨床上問題となるため、JCI-20679 による乳酸アシドーシスの発症の危険性がないかについても、今後、糖代謝に対する影響に関する分析も含め、十分な検討が必要であると考えている。加えて、NFATc2 は CaN により脱リン酸化され核内へと移行し機能を発揮することで免疫系における T 細胞の活性化が起こる (36)。JCI-20679 によりこれらの反応が抑制されうると考えられるため、JCI-20679 が免疫抑制に対しどのような影響を与えるか今後検証を行う必要があると考える。本研究では JCI-20679 の作用機序として AMPK の活性化を介した NFATc2 の発現低下が関与していることを示したが、JCI-20679 による CaN 酵素活性の阻害が NFATc2 に対しどの程度影響を及ぼしているか検証していないため、今後の研究課題である。また生体モデルにおいて JCI-20679 は良好な脳への分布をしていると考えられたが、実際にどの程度の濃度で到達しているのか、また具体的にはどのようなタンパク質に結合しているのかについては今後の研究課題である。

以上の実験成績から、JCI-20679 が膠芽腫幹細胞に対して、抗腫瘍効果を発揮することが示され、その作用機序にはミトコンドリア機能の阻害作用による AMPK の活性化と NFATc2 の発現低下が関与していることが示唆された。さらに、JCI-20679 は生体内膠芽腫マウスモデルにおいても、抗腫瘍効果を発揮することが示された。これらの結果は、JCI-20679 が極めて予後不良な難治性悪性疾患の代表である膠芽腫に対する新しい治療薬の候補として有望である可能性を示唆している。

第2章 JCI-20679 とテモゾロミドの併用による増殖抑制効果と作用機序の解析

2-1. 緒言

膠芽腫は成人発症の悪性脳腫瘍のうち最も頻度が高く、急速に進行する極めて悪性度の高い腫瘍である。現在の膠芽腫の治療方法として、外科療法、放射線療法、化学療法を用いた集学的治療が行われている。化学療法としては、アルキル化剤テモゾロミドが標準治療薬として使用されるが、膠芽腫患者の生存期間中央値は約 14.6 ヶ月であり、5 年生存率は 10%未満と非常に予後が不良であり、その効果は十分ではない (7)。この膠芽腫細胞が発揮するテモゾロミドに対する高い抵抗性の発現は、極めて深刻な臨床的課題となっている (66)。従って、新しい手法を確立し、テモゾロミドの抵抗性を克服することで、膠芽腫の臨床的予後を改善する新たな治療戦略を創出することが必要とされている。

過去の研究において、膠芽腫細胞が発揮する、テモゾロミドに対する抵抗性を説明するメカニズムとして、テモゾロミド処理によって誘導されるオートファジーによって、ミトコンドリアの酸化的リン酸化亢進により ATP の産生が亢進し、細胞生存を促進することが報告されている (22)。JCI-20679 はミトコンドリア複合体 I の阻害活性を有する化合物であり、テモゾロミドによるオートファジーを介した ATP 産生亢進作用と拮抗しうる可能性が期待される。そこでテモゾロミドの抵抗性の原因であるオートファジー依存的なミトコンドリアの酸化的リン酸化の亢進を、JCI-20679 が阻害することにより、テモゾロミドの治療抵抗性の改善につながると仮説を立てた。

本章では、膠芽腫の治療薬であるテモゾロミドと JCI-20679 を併用したときの抗腫瘍効果と作用メカニズムについて解析を行った。ヒト膠芽腫培養細胞である U87MG 細胞、U251 細胞、A172 細胞、および特にテモゾロミド抵抗性を示すヒト膠芽腫 T98 細胞を用いて、テモゾロミドと JCI-20679 を単独または併用で作用させた際の、増殖抑制効果について、*in vitro* にて解析を行った。自発発症型膠芽腫マウスモデルから独自に樹立した、マウス膠芽腫細胞に対しても、テモゾロミドと JCI-20679 を単独および併用で作用させた際の増殖抑制効果について評価を行った。このテモゾロミドと JCI-20679 の併用効果について、Isobologram 解析および Combination Index (CI 値) 解析により、統計学的な検証を実施した。

次に、膠芽腫細胞においてテモゾロミドにより誘導されるオートファジー対し、JCI-20679 があたえる影響について、LC3-II タンパク質のウェスタンブロット解析による評価を行った。テモゾロミドの治療抵抗性に寄与するオートファジー誘導について、LC3-II タンパク質のウェスタンブロット解析による評価を行い、JCI-20679 の併用処理が、テモゾロミドが誘導する細胞生存促進性のオートファジーに対して与える影響について、bafilomycin A1 を用いて、オートファゴソームによるタンパク質分解を抑制させる系で検証を行った。また、テモゾロミドに対する抵抗性を惹起するオートファジー依存性に ATP 産生が亢進する現象に対して (22)、JCI-20679 が与える影響の評価を行い、JCI-20679 が上昇させることを明らかにしている、細

胞内 AMP/ATP 比において、これらの単剤あるいは併用処理が与える影響について解析を行った。

最後に、生体内腫瘍モデルにおいて、テモゾロミドおよび JCI-20679 の併用治療が、膠芽腫に対する効果を発揮するかについて検証を行った。すなわち、ヒト膠芽腫細胞 U87MG を大脳に移植し作成した膠芽腫モデルマウスに対して、テモゾロミドおよび JCI-20679 を全身性に投与し、単独治療における至適用量未満の用量で併用させることによる、抗腫瘍効果について検証を行った。

2-2. 実験方法

2-2-1. 試薬

JCI-20679、temozolomide (T2577, Sigma-Aldrich)、bafilomycin A1 (B1793, Merck, Darmstadt, Germany) は DMSO に溶解した。

2-2-2. 細胞培養

ヒト膠芽腫細胞である U87MG 細胞、U251 細胞、A172 細胞、T98 細胞は American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA) から購入した。マウス膠芽腫細胞とマウス膠芽腫幹細胞は 1 章に記載した方法で樹立し細胞培養を行なった。Luciferase が発現した U87MG 細胞は pBLIV713PA-1 (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) を導入し、puromycin を 125 ng/mL の濃度で添加した培地で培養することによりセレクションを行ない樹立した。

2-2-3. トリパンブルー色素排出試験

6 well plate にマウス膠芽腫細胞を 2×10^4 cells/well で播種し、DMSO、JCI-20679 100 nM、TMZ 50 μ M もしくは JCI-20679 100 nM と TMZ 50 μ M の両方を添加した。3 日後にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調整し、細胞懸濁液 10 μ L と同量の 0.4% トリパンブルー (Wako) を混合した懸濁液を作成した。これを 10 μ L 用いて Countess II automated cell counter (Thermo Fisher Scientific) を使用し細胞数を計測した。トリパンブルー色素を排出した透明な細胞を生細胞、トリパンブルーによって青色に染色された細胞を死細胞としてカウントした。

6 well plate にヒト膠芽腫細胞 U251 細胞を 2.5×10^3 cells/well で播種し、翌日に DMSO、JCI-20679 150 nM、TMZ 12.5 μ M もしくは JCI-20679 150 nM と TMZ 12.5 μ M の両方を添加した。薬剤添加から 3 日後に培地を交換し同じ条件の薬剤を添加した。さらに 3 日後にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調整し、細胞懸濁液 10 μ L と同量の 0.4% トリパンブルー (Wako) を混合した懸濁液を作成した。これを 10 μ L 用いて Countess II automated cell counter (Thermo Fisher Scientific) を使用し細胞数を計測した。トリパンブルー色素を排出した透明な細胞を生細胞、トリパンブルーによって青色に染色された細胞を死細胞としてカウントした。

6 well plate にヒト膠芽腫細胞 T98 細胞を 2×10^4 cells/well で播種し、DMSO、JCI-20679 100 nM、TMZ 200 μ M もしくは JCI-20679 100 nM と TMZ 200 μ M の両方を添加した。6 日後にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調整し、細胞懸濁液 10 μ L と同量の 0.4% トリパンブルー (Wako) を混合した懸濁液を作成した。これを 10 μ L 用いて Countess II automated cell counter (Thermo Fisher Scientific) を使用し細胞数を計測した。トリパンブルー色素を排出した透明な細胞を生細胞、トリパンブルーによって青色に染色された細胞を死細胞としてカウントした。

6 well plate にヒト膠芽腫細胞 A172 細胞を 2.5×10^4 cells/well で播種し、DMSO、JCI-20679 400 nM、TMZ 10 μ M もしくは JCI-20679 400 nM と TMZ 10 μ M の両方を添加した。6 日後にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調整し、細胞懸濁液 10 μ L と同量の 0.4% トリパンブルー (Wako) を混合した懸濁液を作成した。これを 10 μ L 用いて Countess II automated cell counter (Thermo Fisher Scientific) を使用し細胞数を計測した。トリパンブルー色素を排出した透明な細胞を生細胞、トリパンブルーによって青色に染色された細胞を死細胞としてカウントした。

6 well plate にヒト膠芽腫細胞 U87MG 細胞を 5×10^3 cells/well で播種し、翌日に DMSO もしくは JCI-20679 $4 \mu\text{M}$ を添加した。薬剤添加から 3 日後培地を交換し DMSO、JCI-20679 $4 \mu\text{M}$ 、TMZ $40 \mu\text{M}$ もしくは JCI-20679 $4 \mu\text{M}$ と TMZ $40 \mu\text{M}$ の両方を添加した。3 日後にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調整し、細胞懸濁液 $10 \mu\text{L}$ と同量の 0.4% トリパンプルー (Wako) を混合した懸濁液を作成した。これを $10 \mu\text{L}$ 用いて Countess II automated cell counter (Thermo Fisher Scientific) を使用し細胞数を計測した。トリパンプルー色素を排出した透明な細胞を生細胞、トリパンプルーによって青色に染色された細胞を死細胞としてカウントした。

2-2-4. ウェスタンブロット解析

培養細胞を PBS で洗浄した後、細胞を SDS-Lysis Buffer (50 mM Tris-HCl, 1% SDS) にプロテアーゼ阻害剤 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) と Phostop (Roche, USA) を加えたもので溶解し、氷冷しながら超音波破碎した。溶解液を 4°C 、 $20,000 \times g$ で 45 分遠心分離し、上清に含まれる可溶性タンパク質を回収した。タンパク質溶解液の濃度を Pierce BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher)を用いて測定した。タンパク質を溶解した溶媒で希釈し、タンパク濃度を均一にしたサンプル $20 \mu\text{L}$ に Sample Buffer (125 mM Tris-HCL, 4% SDS, 20% グリセロール、10% 2-メルカプトエタノール、0.04% ブロモフェノールブルー) を加え、 95°C で 5 分間熱変性を行った。15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 法を用いて分離し Semidry 式転写装置 (170 mA/gel , 90 分) もしくは Wet 式転写装置 (350 mA/gel , 60 分) を用いて PVDF メンブレン (Millipore, Burlington, MA, USA) にタンパク質を転写した。作成したメンブレンは Tris 緩衝液 (TBS; 50 mM Tris, 2.68 mM KCl, 137 mM NaCl, PH 7.4) に 0.05% Tween20 を加えたもの (TBS-T) を溶媒とし作成した 3%のスキムミルク溶液もしくは 5%の BSA 溶液でブロッキングした。抗体は以下の物を使用した。

LC3 (1:1000, M186-3, MBL, Nagoya, Japan), p62 (1:1000, 5114, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), GAPDH (1:1000, 016-25523, Wako), and β -actin (1:1000, 3700, Cell Signaling Technology)。

抗体を反応させた後、TBS-T で 3 回洗浄し TBS で 2 回洗浄した。洗浄後、Clarity Western ECL substrate (170-5060, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を反応させ、ChemiDoc XRS Plus system (Bio-Rad) を用いてタンパク質の検出を行なった。

2-2-5. 細胞内 AMP/ATP 比測定

6 well plate にマウス膠芽腫細胞を 1×10^5 cells/well で播種し DMSO、JCI-20679 100 nM 、TMZ $50 \mu\text{M}$ もしくは JCI-20679 100 nM と TMZ $50 \mu\text{M}$ の両方を添加した。2 日後細胞を回収しトリプシン処理にて細胞懸濁液を調整し細胞数を計数した。各サンプルの細胞数を揃え sample とした後、発光測定用白色 96 well plate に $100 \mu\text{L}$ ずつ sample を加え、CellTiter-Glo luminescent cell viability assay kit (G7570, Promega, Madison, WI, USA) を $100 \mu\text{L}$ ずつ加えた。96 well plate をシェイカーで 1 分振盪した後、10 分間遮光して静置しプレートリーダーを用い発光強度を測定し ATP 濃度を測定した。Sample を PBS で洗浄し Cell pellet にした後、Cell Lytic M $100 \mu\text{L}$ で溶解し 1.5 mL チューブに回収した。 1400 rpm 、 4°C で 15 分間振盪した後、 4°C 、 $15,000 \times g$ で 15 分間遠心分離し上清を回収した。この溶液を $25 \mu\text{L}$ ずつ発光測定用白色 96 well plate に

加え、AMP-Glo assay kit (V5011, Promega, Madison, WI, USA) の AMP-Glo Reagent 1 を 25 μ L ずつ加えた。シェイカーで 1 分振盪した後、1 時間遮光して静置した。その後 AMP-Glo Reagent 2 と Kinase-Glo one solution を 1:100 で混合した溶液を 50 μ L ずつ加えシェイカーで 1 分振盪した後、1 時間遮光して静置し、プレートリーダーを用い発光強度を測定し AMP 濃度を測定した。測定された ATP 濃度および AMP 濃度は DMSO 処理した際に 1 とし相対値で評価を行った。またその際の AMP/ATP の比率の評価を行った。

2-2-6. 膠芽腫モデルマウスを用いた抗腫瘍効果の評価

Luc-U87MG 細胞を PBS (166-23555, Wako Pure Chemical Industries) 2 μ L 中に 0.5×10^5 個となるように細胞懸濁液を作成し、6-8 週齢の CB17SCID マウスに移植を行った。マウスは麻酔下で移植を行った。infusion system (Legato 130) を使用し、細胞懸濁液を 1 μ L/min の速さで右大脳のブレグマから外側に 2 mm、腹側に 3 mm の位置に注入した。移植後 3 日目から DMSO、JCI-20679 20 mg/kg、TZM 3 mg/kg もしくは JCI-20679 20 mg/kg と TZM 3 mg/kg の両方を投与した。JCI-20679 は週に 3 回、TMZ は週に 2 回腹腔内投与を行った。移植後 1 週間毎にルシフェリンを用いて発光強度を測定し腫瘍の大きさを評価した。D-luciferin (126-05116, Wako) を腹腔内に投与し 10 分後に IVIS Lumina XR imaging system を用いて検出を行った。

2-2-7. 統計解析処理

BellCurve for Excel (Social Survey Research Information Co., Ltd. Tokyo, Japan) を用いて解析を行い、細胞の実験では two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison test を行い、P 値を算出した。マウスを用いた実験では Steel's multiple-comparisons test を行い、P 値を算出した。得られた P 値が 0.05 未満で有意差があると判断した。併用効果は JCI-20679 12.5 nM-4 μ M と TMZ 10-200 μ M において、それぞれを単独処理および併用処理した結果に基づき、CalcuSyn 2.11 software (Biosoft, Cambridge, UK) を用いた Combination index (CI) により評価した。CI < 0.9、 $0.9 \leq CI \leq 1.1$ 、 $1.1 < CI$ をそれぞれ相乗効果、相加効果、拮抗効果とみなした。

2-3. 実験成績

2-3-1. JCI-20679 によるテモゾロミドの膠芽腫に対する増殖抑制効果の増強

膠芽腫に対して標準的に用いられる既存のアルキル化薬であるテモゾロミドの効果を、JCI-20679 が増強するかについて検証するため、マウス由来膠芽腫細胞および種々のヒト膠芽腫細胞培養株を用いて、JCI-20679 とテモゾロミドの併用処理による細胞増殖抑制効果の評価を行った。マウス由来膠芽腫細胞およびヒト膠芽腫細胞培養株 U251、T98 においては、単剤のテモゾロミドが十分な増殖抑制効果を引き起こさない条件で、JCI-20679 を併用すると、作用の増強効果を認めた。特に、テモゾロミドに抵抗性があるとして知られている T98 においても、JCI-20679 による作用増強効果が観察された。A172、U87MG ヒト膠芽腫細胞培養株においては、IC50 付近の濃度のテモゾロミドおよび JCI-20679 の両者の併用は、増殖抑制効果の増強を引き起こした。これらの結果は、JCI-20679 は、テモゾロミドによる増殖抑制効果をマウス膠芽腫細胞、ヒト膠芽腫細胞 U87MG 細胞、U251 細胞、A172 細胞、T98 細胞の 5 つの細胞において増強することを示している (Fig. 17A-17E)。

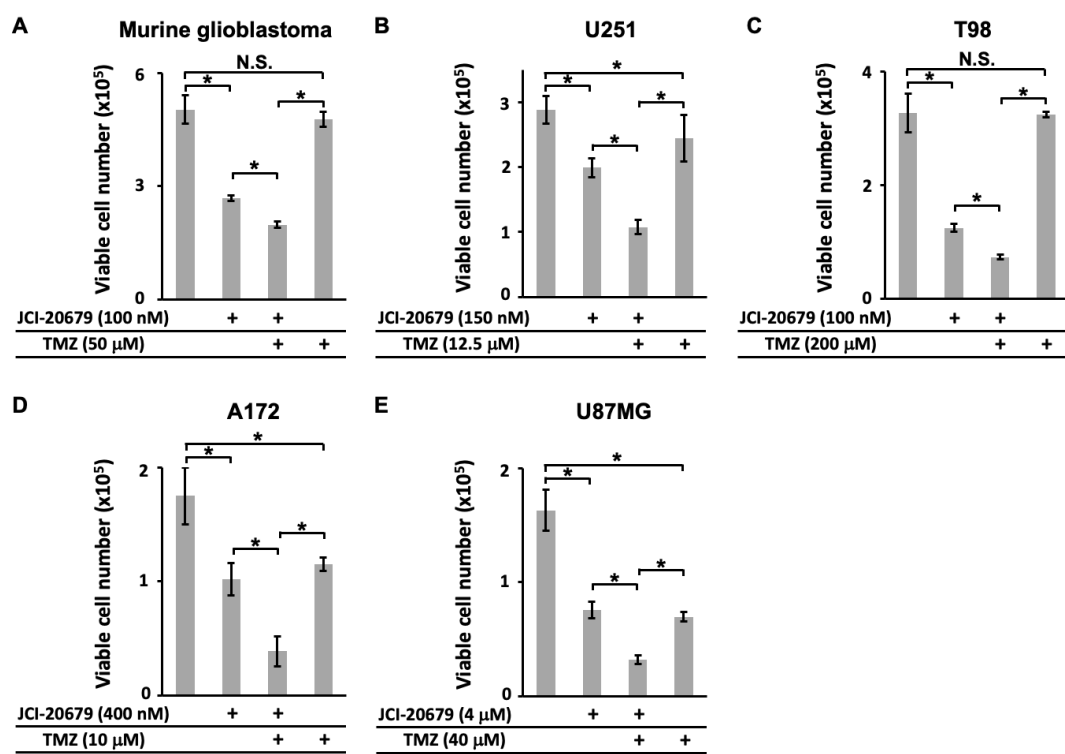


Figure 17. JCI-20679 enhances the effects of suboptimal concentrations of temozolomide in glioblastoma cells.

(A) Primary murine glioblastoma cells, (B) U251 cells, (C) T98 cells, (D) A172 cells, and (E) U87MG cells were treated with JCI-20679 and/or temozolomide (TMZ) at the indicated concentrations and cell proliferation was assessed as described in the Materials and Methods section. $*p < 0.05$.

These figures were cited from Figure 1 in Ando et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, 591, 62-67.

2-3-2. 膠芽腫細胞における JCI-20679 とテモゾロミドの併用処理による相乗効果および相加効果

マウス由来膠芽腫細胞および種々のヒト膠芽腫細胞培養株に対する、JCI-20679 による、テモゾロミドの併用効果を統計学的に詳細に評価するため、JCI-20679 とテモゾロミドを一定比率で増加させた種々の濃度で相互に組み合わせて膠芽腫細胞に作用させ、増殖抑制効果を *in vitro* で Isobologram 解析および Combination Index (CI 値) 解析を行った。Isobologram 解析は作用させた濃度のプロットを直線で結び、併用した際のプロットが直線より原点側 ($CI < 0.9$) であれば相乗効果、直線上 ($0.9 \leq CI \leq 1.1$) であれば相加効果、直線より外側 ($1.1 < CI$) であれば拮抗効果を示している。JCI-20679 とテモゾロミドを ED50 で併用した際のプロットは直線上に存在し、相加効果が見られた。また、JCI-20679 とテモゾロミドを ED75 で併用した際のプロットは直線より原点側に存在し、有意な相乗効果が見られた。ED75 における CI 値は U87MG 細胞で 0.570、U251 細胞で 0.549、マウス膠芽腫細胞で 0.553 であり、統計学的に有意な相乗効果が示された (Fig. 18A-18C)。これらの結果は、*in vitro* において、JCI-20679 がテモゾロミドのマウス由来膠芽腫細胞および種々のヒト膠芽腫細胞培養株に対する増殖抑制効果を有意に増強することを示している。

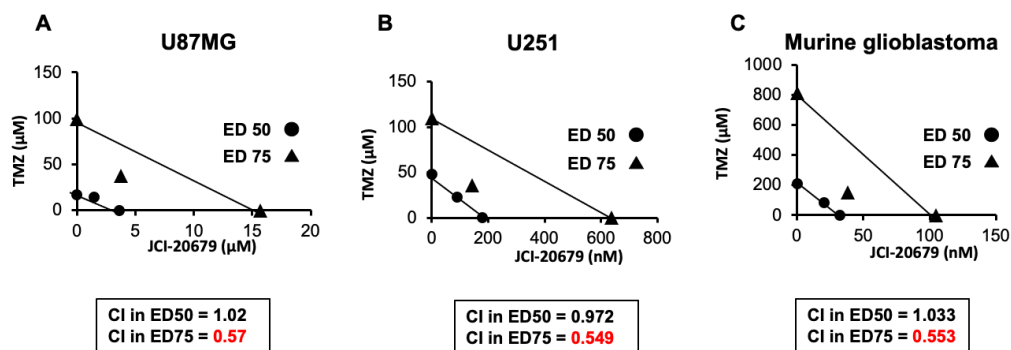


Figure 18. JCI-20679 and temozolomide act synergistically in glioblastoma cells.

(A) U87MG cells, (B) U251 cells, and (C) primary murine glioblastoma sphere-forming cells were treated with JCI-20679 and/or temozolomide (TMZ) at the indicated concentrations and cell proliferation was assessed as described in the Materials and Methods section. Isobologram analysis of JCI-20679 and temozolomide at ED50 and ED75 concentrations is shown.

These figures were cited from Figure 2 in Ando et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, 591, 62-67.

2-3-3. テモゾロミド処理が膠芽腫において誘導するオートファジーの JCI-20679 による抑制効果

JCI-20679 によるテモゾロミドの膠芽腫細胞増殖抑制効果の増強が起こる機序について明らかにするために、テモゾロミドに対する抵抗性に関与していることが報告されているオートファジーに着目し (22)、解析を行った。JCI-20679 はオートファジーのマーカーである LC3-II タンパク発現量を濃度依存性に減少させた (Fig. 19A)。これは JCI-20679 が基底レベルでオートファジーを抑制していることを示唆している。そこで、次に、bafilomycin A1 処理を用い、オートファゴソームにおけるタンパク質分解を阻害した場合の、オートファジー関連因子タンパク質の発現量の変動に関する解析を行った。その結果、テモゾロミドによる処理は、LC3-II タンパク質および p62 タンパク質発現量を増加させた (Fig. 19B, lane 1 vs lane 7)。この結果は、テモゾロミドにより、細胞生存促進性の抵抗性を惹起するオートファジーが誘導されるという過去の研究結果に合致していた。さらに、テモゾロミドに bafilomycin A1 を併用することにより、さらに顕著に LC3-II タンパク質および p62 タンパク質発現量を増加させた (Fig. 19B, lane 7 vs lane 8)。この結果は、テモゾロミドによるオートファジー誘導を支持するものである。JCI-20679 の併用は、bafilomycin A1 処理をした場合にも、テモゾロミド処理による LC3-II タンパク質および p62 タンパク質発現量の増加を阻害した (Fig. 19B, lane 8 vs lane 6)。これらの結果は JCI-20679 が、テモゾロミドにより誘導されるオートファジーを阻害していることを示唆している。

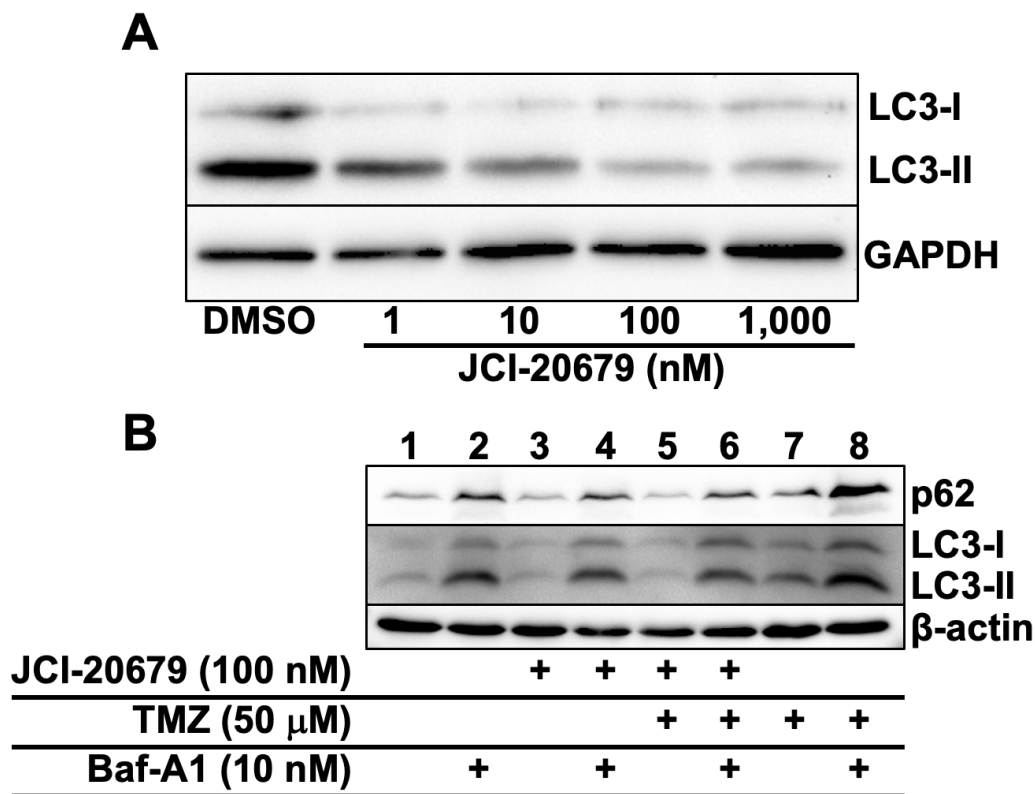


Figure 19. JCI-20679 inhibits temozolomide-mediated autophagy in glioblastoma cells.

(A) Primary murine glioblastoma sphere-forming cells were treated with JCI-20679 for 2 days and (B) primary mouse glioblastoma cells were treated with JCI-20679, temozolomide (TMZ), and/or bafilomycin A1 (Baf-A1) as described in the Materials and Methods section. Western blot analyses of LC3, p62, GAPDH, and β -actin expression are shown.

These figures were cited from Figure 3 in Ando et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, 591, 62-67.

2-3-4. JCI-20679 によるテモゾロミドにより減少した AMP/ATP 比の増加

過去の文献上、膠芽腫細胞において、テモゾロミドの処理により、抵抗性を惹起する細胞生存促進性オートファジーが誘導されると、オートファジー依存的に ATP が増加することが報告されている (22)。そこで次に、JCI-20679 とテモゾロミドを、単剤もしくは併用して作用させ、細胞内 AMP および細胞内 ATP 量を測定し、AMP/ATP 比の評価を行った。その結果、膠芽腫細胞にテモゾロミドを作用させると、確かに ATP が有意に増加 ($P < 0.001$) することを確認した。JCI-20679 を単剤で作用させると ATP が有意に減少 ($P < 0.001$) することが観察された。さらに、JCI-20679 とテモゾロミドを併用すると、テモゾロミドによる AMP の減少と ATP の増加を引き起こす影響に対して、JCI-20679 による阻害効果 ($P < 0.001$) が観察された (Fig. 20A, 20B)。AMP/ATP 比を算出したところ JCI-20679 の作用により AMP/ATP 比は有意に増加 ($P < 0.001$) し、テモゾロミドを作用させると有意に低下 ($P < 0.001$) した。また JCI-20679 とテモゾロミドを併用すると、テモゾロミドによる AMP/ATP 比の低下が有意に阻害 ($P < 0.001$) された (Fig. 20C)。これらの結果は、テモゾロミドが誘導したオートファジーによる ATP の産生を JCI-20679 が阻害していること示唆しており、テモゾロミドによる細胞生存促進性のオートファジーを JCI-20679 が抑制し、増殖抑制効果を増強している可能性を示している。

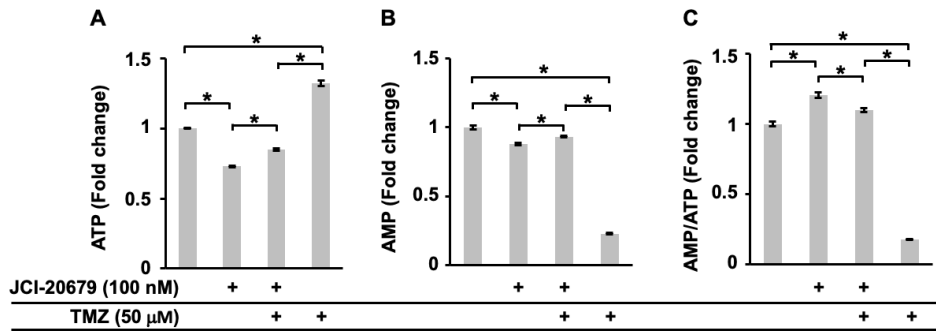


Figure 20. JCI-20679 inhibits temozolomide-mediated increases in ATP levels in glioblastoma cells.

(A-C) Primary murine glioblastoma cells were treated with JCI-20679 and/or temozolomide (TMZ) for 2 days. (A) The relative ATP levels, (B) AMP levels, and (C) the calculated AMP/ATP ratio are shown. *p<0.001.

These figures were cited from Figure 3 in Ando et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, 591, 62-67.

2-3-5. JCI-20679 による生体内膠芽腫モデルマウスに対するテモゾロミドの抗腫瘍効果の増強効果

JCI-20679 が *in vitro* の解析において、有意なテモゾロミドの作用を増強する効果を発揮したため、生体内においても、テモゾロミドによる抗腫瘍効果を増強するか検証を行った。ヒト膠芽腫由来培養細胞株 U87MG 細胞をマウス大脳内に移植して膠芽腫モデルマウスを作成した。JCI-20679 及びテモゾロミドを単独で投与した際に有意な抗腫瘍効果を示さない用量において、JCI-20679 とテモゾロミドを併用したところ、有意な腫瘍の進展を抑制する効果 ($P = 0.012$) が観察された (Fig. 21)。これらの結果は、JCI-20679 が生体モデルにおいても、テモゾロミドによる抗腫瘍効果を増強することを示唆している。

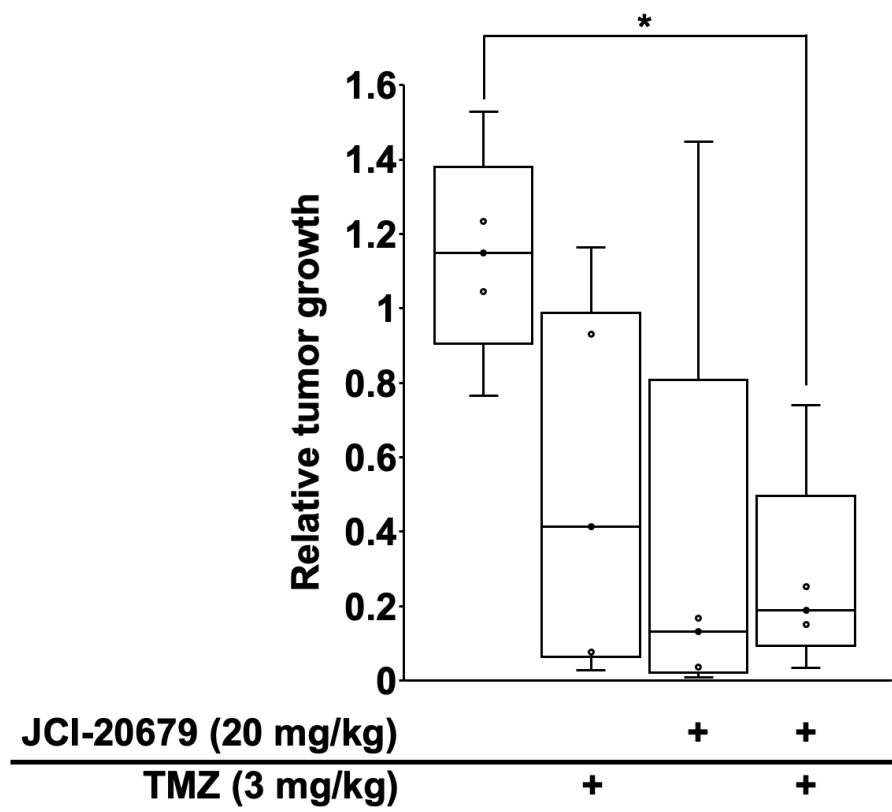


Figure 21. JCI-20679 enhances the anticancer effects of temozolomide in vivo.

Glioblastoma size was assessed by bioluminescence intensity in mice orthotopically transplanted with Luc-U87MG cells and intraperitoneally treated with DMSO (n=5), JCI-20679 (20 mg/kg; n=6), temozolomide (TMZ) (3 mg/kg; n=5), or JCI-20679 (20 mg/kg) plus TMZ (3 mg/kg) (n=5). The relative luminescence values after 4 weeks of treatment are shown. *p<0.05.

This figure was cited from Figure 4 in Ando et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2022**, 591, 62-67.

2-4. 考察

本章では、ヒト膠芽腫細胞培養細胞株と、マウス膠芽腫細胞株をモデルに用いて、JCI-20679 がテモゾロミドによる細胞増殖抑制効果を有意に増強することを示し、生体内においても、U87MG 細胞移植マウスモデルにおいて有意にテモゾロミドの抗腫瘍効果を JCI-20679 が増強することを示した。

自発発症型膠芽腫マウスモデルから独自に樹立したマウス膠芽腫細胞および複数のヒト膠芽腫細胞培養株 (U87MG 細胞、U251 細胞、A172 細胞、T98 細胞) に対して JCI-20679 は、細胞増殖抑制効果を示した。また、これらの細胞に対する、テモゾロミドによる増殖抑制効果を、JCI-20679 が増強したことを示した。特に、T98 細胞はテモゾロミドに対する抵抗性を示すことが報告されている (79)。臨床現場でヒトに投与した際、テモゾロミドの血中濃度は 50 μM 前後まで到達しうることが報告されているが (80)、T98 細胞に対してテモゾロミドを 200 μM という高濃度で作用させた際にも、有意な増殖抑制効果は見られなかった。しかし JCI-20679 を併用することにより、増殖抑制効果の増強効果が観察された (Fig. 17A-17E)。

マウス膠芽腫細胞及びヒト膠芽腫 U87MG 細胞と U251 細胞において JCI-20679 とテモゾロミドの併用効果について Isobologram 解析を用いて検討したところ、ED75 において Combination Index (CI) 値が 0.9 未満を示した (18A-18C)。CI 値は 0.9 未満で相乗効果を示すと判断されるため、JCI-20679 とテモゾロミドを ED75 の濃度で作用させた際に、統計学的に有意な相乗効果を示した。この結果より、将来的な臨床応用を想定した場合、比較的高用量の JCI-20679 をテモゾロミドと併用した際においては、投与量の低減につながり副作用発現の抑制が期待されるものと考えられる。

次に、JCI-20679 とテモゾロミドを併用した際にどのようなメカニズムで増殖抑制効果の増強を示すのかについて検討した。化学療法において治療抵抗性を示すメカニズムとして、細胞保護作用のあるオートファジーの誘導が引き起こされることが報告されている (81)。また、膠芽腫細胞において、テモゾロミドやエトポシドなどの抗がん剤を作用させた際、オートファジーを誘導し、このオートファジー依存性に細胞内 ATP 濃度の上昇が起これ、細胞生存に有利に作用することが報告されている (22)。従って、テモゾロミドにより誘導される細胞保護的なオートファジーの阻害が膠芽腫の治療抵抗性の改善につながると考えられる。そこで、テモゾロミドにより誘導されるオートファジーに対し、JCI-20679 が与える影響について解析した。その結果、JCI-20679 は基底状態において、オートファジーのマーカーである LC3-II タンパク質の発現量を低下させることを明らかにした (Fig. 19A)。テモゾロミドを作用させた際に上昇した p62 タンパク質および LC3-II タンパク質の発現量は、JCI-20679 の併用により発現量の低下が見られた (Fig. 19B)。さらに、テモゾロミドにより引き起こされた ATP 濃度の上昇が JCI-20679 の併用により低下が見られた (Fig. 20C)。これらの結果は、テモゾロミドにより引き起こされるオートファジーが JCI-20679 により阻害されていることを示唆しており、テモゾロミドによる治療抵抗性の獲得と拮抗し、細胞増殖抑制効果を増強している可能

性を示唆している。

ヒト膠芽腫 U87MG 細胞を大脳に移植したマウスモデルを用いて、生体内においても JCI-20679 とテモゾロミドの併用効果が発揮されるのかについて解析した。JCI-20679 とテモゾロミドのそれぞれ単剤では治療効果を示さない最適用量未満の用量において、両者を併用したところ、有意な腫瘍進展の抑制効果を示した (Fig. 21)。これらの結果は、生体内においても、JCI-20679 がテモゾロミドによる抗腫瘍効果を増強していることを示唆している。

近年、既存のミトコンドリア複合体 I の阻害作用を持つフェンフォルミンが PD-1 遮断により抗腫瘍効果を増強させることが報告されている (82)。従って JCI-20679 はテモゾロミドだけでなく他の抗がん剤との併用においても作用増強効果が見られる可能性がある。他の薬剤との併用効果の検証を行うことは今後の検討課題である。またミトコンドリア複合体 I 阻害剤であるインターベノリンが細胞内外の酸性化を引き起こし、タンパク合成に関与している S6K1 の活性を低下させることが報告されている (83)。JCI-20679 による S6K1 の発現量に対する影響やタンパク質新生における翻訳の過程に対する抑制効果などのメカニズムの解析は今後の検討課題である。テモゾロミドの作用機序は細胞周期の停止に伴うアポトーシスの誘導であることが報告されているが (79)、JCI-20679 によるオートファジーの抑制がテモゾロミドによるアポトーシスの誘導にどのような影響を与えているかの検証は今後の研究課題である。また、JCI-20679 のオートファジーの抑制機構として AMPK の関与が考えられたが、その下流因子の特定とメカニズムの詳細については今後の研究課題である。加えて、臨床においては IDH や MGMT の変異の有無が膠芽腫の治療成績に影響を与えることが報告されているが (3)、本研究で使用した細胞においてこれらの遺伝子の変異が JCI-20679 に対する感受性にどのような影響を及ぼすかの検証は行っていない。従って各種遺伝子の変異が JCI-20679 に対してどのような影響を及ぼすかの検証は今後の研究課題である。さらに、近年、末梢性 T 細胞性リンパ腫を対象としてダリナパルシンが、がん治療を目的としたミトコンドリア阻害剤として世界に先駆けて我が国で承認された。ダリナパルシンのミトコンドリア阻害の分子メカニズムの詳細は明らかにされておらず、JCI-20679 との比較は、現時点では困難であるが、JCI-20679 の末梢性 T 細胞性リンパ腫に対する有効性は今後の検討課題であると考えられる。

以上の知見を総合すると、JCI-20679 は、テモゾロミドにより引き起こされるオートファジーの誘導を阻害し、JCI-20679 とテモゾロミドとの併用は、*in vitro* および *in vivo* において、相乗的あるいは相加的な抗腫瘍効果の増強作用を示すことが明らかになった。

総括

膠芽腫は既存の標準治療薬テモゾロミドに対する高い治療抵抗性を示し、その予後は極めて不良である。そのため、新たな治療法、とりわけ、テモゾロミドに対する抵抗性を克服する手法の創出が必要である。近年、膠芽腫の高い治療抵抗性を説明しうる膠芽腫幹細胞仮説が注目されており、この膠芽腫幹細胞集団の阻害による治療抵抗性の改善が期待されている。アセトゲニン誘導体化合物 JCI-20679 は、ミトコンドリア複合体 I 阻害活性を有することが示されている抗腫瘍性化合物であるが、JCI-20679 による種々のがん細胞に対する増殖抑制効果が、実際にミトコンドリア複合体 I 阻害を介した作用であるか、またその下流の分子メカニズムおよび表現型については不明であった。また、膠芽腫に対する効果は検討されておらず、さらに膠芽腫幹細胞に対する阻害効果は全く不明であった。そこで本研究では、膠芽腫細胞および膠芽腫幹細胞に対する JCI-20679 の増殖抑制効果の作用メカニズムを解析し、また、テモゾロミドとの併用処理の効果を検討することにより、JCI-20679 がテモゾロミド抵抗性に与える影響について解析した。

第 1 章では JCI-20679 が、分化誘導した接着系膠芽腫細胞と比較して、膠芽腫幹細胞に対して、より低濃度で効果を発揮することを明らかにした。この増殖抑制効果には、細胞周期の停止が伴っていることを示した。JCI-20679 が膠芽腫細胞の増殖抑制効果を発揮する際において、細胞内 AMP/ATP 比の上昇、代謝ストレスセンサー分子 AMPK のリン酸化による活性化、ミトコンドリア膜電位の低下等を含む、ミトコンドリア複合体 I 阻害の結果であることを示す現象を引き起こしていることを明らかにした。また AMPK の活性化に引き続いて NFATc2 の発現量の低下を引き起こすことで、JCI-20679 は膠芽腫幹細胞の増殖を抑制していることを示した。さらに、JCI-20679 は生体内膠芽腫モデルの進展を抑制し、全生存期間を延長させることを示した。

第 2 章では、JCI-20679 によるテモゾロミドの抗腫瘍効果を増強させる作用を明らかにした。JCI-20679 はヒト膠芽腫細胞およびマウス膠芽腫細胞においてテモゾロミドの増殖抑制効果を増強した。特に、それぞれ 75% effective doses (ED75) の濃度での併用により、統計学的に有意な相乗効果を示した。JCI-20679 はテモゾロミドにより誘導される細胞生存促進性のオートファジーを、抑制する効果を示した。ヒト膠芽腫 U87MG 細胞を大脳に移植したマウスモデルにおいて、それぞれ単剤では効果を示さない用量で両者を併用すると、有意な腫瘍進展の抑制効果を認めた。すなわち JCI-20679 はテモゾロミドによって惹起される細胞生存促進性のオートファジーを抑制し、テモゾロミドの作用を増強させることで膠芽腫の進展抑制効果を示すと考えられた。

本研究は、JCI-20679 が、膠芽腫細胞に対してミトコンドリア複合体 I 阻害活性を発揮して細胞周期の停止を伴う増殖抑制効果を示すことを明らかにした。また JCI-20679 の作用メカニズムには、AMPK のリン酸化による活性化と、それに引き続いて生じる NFATc2 転写因子の発現量の低下が関与していることを明らかにした。また JCI-20679 は、膠芽腫細胞のオート

ファジーを介したテモゾロミドに対する抵抗性を克服するために有用である可能性を示した。本研究の成果は、既存の治療法では極めて難治性である膠芽腫の治療成績の向上に寄与する可能性を示すものとする。

謝辞

本研究を遂行し本稿をまとめるにあたり、御懇篤なる御指導と御助言を賜りました京都薬科大学 臨床腫瘍学分野 中田 晋 准教授に深甚なる謝意を表します。実験技術に始まり論文作成に至るまでの研究に必要なスキルの習得のため、研究の基礎から細部にわたり御指導、御鞭撻を頂戴いたしましたこと、深く感謝し心から御礼申し上げます。

本論文の査読ならびに御指導賜りました京都薬科大学 臨床薬理学分野 中田 徹男 教授、臨床薬学分野 西口 工司 教授に篤く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり JCI-20679 をご提供いただいた京都薬科大学 薬品製造学分野 小島 直人 准教授、大学院生 大田 海斗 学士に心から御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり御助言ならびに円滑な研究室運営を賜りました京都薬科大学 臨床腫瘍学分野 飯居 宏美 助教に心より御礼申し上げます。

博士課程進学以前より現在に至るまで実験技術のみならず様々な場面で御指導及び御助言を賜りました京都薬科大学 臨床腫瘍学分野 大学院博士課程修了生 松村 健吾 博士、谷口 恵香 博士、高木 寛子 博士に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行に協力していただいた京都薬科大学 臨床腫瘍学分野 大学院生 茂山 千愛美 学士、野瀬 梢 学士ならびに京都薬科大学 臨床腫瘍学分野 卒業生 河野 雪那 学士をはじめとした京都薬科大学 臨床腫瘍学分野の学部学生ならびに卒業生の方々に心より御礼申し上げます。

最後に、日々の生活を支えていただいた家族に心から感謝を申し上げますと共に、大学院生活を送るうえで様々な支援をして下さった皆様に深く感謝いたします。

引用文献

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta. Neuropathol.* **2016**, 131, 803-20.
2. Ostrom QT, Gittleman H, Liao P, Vecchione-Koval T, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2010-2014. *Neuro. Oncol.* **2017**, v1-v88.
3. Ostrom QT, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2014-2018. *Neuro. Oncol.* **2021**, 23, iii1-iii105.
4. Perry JR, Laperriere N, O'Callaghan CJ, Brandes AA, Menten J, Phillips C, Fay M, Nishikawa R, Cairncross JG, Roa W, Osoba D, Rossiter JP, Sahgal A, Hirte H, Laigle-Donadey F, Franceschi E, Chinot O, Golfopoulos V, Fariselli L, Wick A, Feuvret L, Back M, Tills M, Winch C, Baumert BG, Wick W, Ding K, Mason WP; Trial Investigators. Short-Course Radiation plus Temozolomide in Elderly Patients with Glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2017**, 376, 1027-1037.
5. Chaichana KL, Chaichana KK, Olivi A, Weingart JD, Bennett R, Brem H, Quiñones-Hinojosa A. Surgical outcomes for older patients with glioblastoma multiforme: preoperative factors associated with decreased survival. Clinical article. *J. Neurosurg.* **2011**, 114, 587-94.
6. Friedman HS, Kerby T, Calvert H. Temozolomide and treatment of malignant glioma. *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 2585-97.
7. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO; European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups; National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2005**, 352, 987-96.
8. Chinot OL, Wick W, Mason W, Henriksson R, Saran F, Nishikawa R, Carpentier AF, Hoang-Xuan K, Kavan P, Cernea D, Brandes AA, Hilton M, Abrey L, Cloughesy T. Bevacizumab plus radiotherapy-temozolomide for newly diagnosed glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **2014**, 370, 709-22.
9. Lathia JD, Mack SC, Mulkearns-Hubert EE, Valentim CL, Rich JN. Cancer stem cells in

- glioblastoma. *Genes. Dev.* **2015**, 29, 1203-17.
10. Sancho P, Barneda D, Heesch C. Hallmarks of cancer stem cell metabolism. *Br. J. Cancer.* **2016**, 114, 1305-12.
 11. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, Henkelman RM, Cusimano MD, Dirks PB. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* **2004**, 432, 396-401.
 12. Kelley K, Knisely J, Symons M, Ruggieri R. Radioresistance of Brain Tumors. *Cancers. (Basel).* **2016**, 8, 42.
 13. Rycaj K, Tang DG. Cancer stem cells and radioresistance. *Int. J. Radiat. Biol.* **2014**, 90, 615-21.
 14. Wilson TA, Karajannis MA, Harter DH. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg. Neurol. Int.* **2014**, 5, 64.
 15. Schonberg DL, Lubelski D, Miller TE, Rich JN. Brain tumor stem cells: Molecular characteristics and their impact on therapy. *Mol. Aspects. Med.* **2014**, 39, 82-101.
 16. Thorburn A, Thamm DH, Gustafson DL. Autophagy and cancer therapy. *Mol. Pharmacol.* **2014**, 85, 830-8.
 17. Rebecca VW, Amaravadi RK. Emerging strategies to effectively target autophagy in cancer. *Oncogene.* **2016**, 35, 1-11.
 18. Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, Harper JW. Network organization of the human autophagy system. *Nature.* **2010**, 466, 68-76.
 19. Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer. *Mol. Cancer.* **2020**, 19, 12.
 20. Zachari M, Ganley IG. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays. Biochem.* **2017**, 61, 585-596.
 21. Nwadike C, Williamson LE, Gallagher LE, Guan JL, Chan EYW. AMPK Inhibits ULK1-Dependent Autophagosome Formation and Lysosomal Acidification via Distinct Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **2018**, 38, e00023-18.
 22. Katayama M, Kawaguchi T, Berger MS, Pieper RO. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell. Death.*

Differ. **2007**, 14, 548-58.

23. Ryskalin L, Gaglione A, Limanaqi F, Biagioni F, Familiari P, Frati A, Esposito V, Fornai F. The Autophagy Status of Cancer Stem Cells in Glioblastoma Multiforme: From Cancer Promotion to Therapeutic Strategies. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, 20, 3824.
24. Golden EB, Cho HY, Jahanian A, Hofman FM, Louie SG, Schönthal AH, Chen TC. Chloroquine enhances temozolomide cytotoxicity in malignant gliomas by blocking autophagy. *Neurosurg. Focus.* **2014**, 37, E12.
25. Dolma S, Selvadurai HJ, Lan X, Lee L, Kushida M, Voisin V, Whetstone H, So M, Aviv T, Park N, Zhu X, Xu C, Head R, Rowland KJ, Bernstein M, Clarke ID, Bader G, Harrington L, Brumell JH, Tyers M, Dirks PB. Inhibition of Dopamine Receptor D4 Impedes Autophagic Flux, Proliferation, and Survival of Glioblastoma Stem Cells. *Cancer. Cell.* **2016**, 29, 859-873.
26. Annesley SJ, Fisher PR. Mitochondria in Health and Disease. *Cells.* **2019**, 8, 680.
27. Vyas S, Zaganjor E, Haigis MC. Mitochondria and Cancer. *Cell.* **2016**, 166, 555-566.
28. Nguyen HS, Shabani S, Awad AJ, Kaushal M, Doan N. Molecular Markers of Therapy-Resistant Glioblastoma and Potential Strategy to Combat Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, 1765.
29. Gao X, Yang Y, Wang J, Zhang L, Sun C, Wang Y, Zhang J, Dong H, Zhang H, Gao C, Zhang B, Feng B, Mao W. Inhibition of mitochondria NADH-Ubiquinone oxidoreductase (complex I) sensitizes the radioresistant glioma U87MG cells to radiation. *Biomed. Pharmacother.* **2020**, 129, 110460.
30. Ogura M, Kim WS, Uchida T, Uike N, Suehiro Y, Ishizawa K, Nagai H, Nagahama F, Sonehara Y, Tobinai K. Phase I studies of darinaparsin in patients with relapsed or refractory peripheral T-cell lymphoma: a pooled analysis of two phase I studies conducted in Japan and Korea. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2021**, 51, 218-227.
31. Skwarski M, McGowan DR, Belcher E, Di Chiara F, Stavroulias D, McCole M, Derham JL, Chu KY, Teoh E, Chauhan J, O'Reilly D, Harris BHL, Macklin PS, Bull JA, Green M, Rodriguez-Berriguete G, Prevo R, Folkes LK, Campo L, Ferencz P, Croal PL, Flight H, Qi C, Holmes J, O'Connor JPB, Gleeson FV, McKenna WG, Harris AL, Bulte D, Buffa FM, Macpherson RE, Higgins GS. Mitochondrial Inhibitor Atovaquone Increases Tumor Oxygenation and Inhibits Hypoxic Gene Expression in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer. Res.* **2021**, 27, 2459-2469.

32. Vashisht Gopal YN, Gammon S, Prasad R, Knighton B, Pisaneschi F, Roszik J, Feng N, Johnson S, Pramanik S, Sudderth J, Sui D, Hudgens C, Fischer GM, Deng W, Reuben A, Peng W, Wang J, McQuade JL, Tetzlaff MT, Di Francesco ME, Marszalek J, Piwnica-Worms D, DeBerardinis RJ, Davies MA. A Novel Mitochondrial Inhibitor Blocks MAPK Pathway and Overcomes MAPK Inhibitor Resistance in Melanoma. *Clin. Cancer. Res.* **2019**, 25, 6429-6442.
33. Tsoli M, Liu J, Franshaw L, Shen H, Cheng C, Jung M, Joshi S, Ehteda A, Khan A, Montero-Carcabosso A, Dilda PJ, Hogg P, Ziegler DS. Dual targeting of mitochondrial function and mTOR pathway as a therapeutic strategy for diffuse intrinsic pontine glioma. *Oncotarget.* **2018**, 9, 7541-7556.
34. Diamond JR, Goff B, Forster MD, Bendell JC, Britten CD, Gordon MS, Gabra H, Waterhouse DM, Poole M, Ross Camidge D, Hamilton E, Moore KM. Phase Ib study of the mitochondrial inhibitor ME-344 plus topotecan in patients with previously treated, locally advanced or metastatic small cell lung, ovarian and cervical cancers. *Invest. New. Drugs.* **2017**, 35, 627-633.
35. Rossi A, Pizzo P, Filadi R. Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Res.* **2019**, 1866, 1068-1078.
36. Creamer TP. Calcineurin. *Cell. Commun. Signal.* **2020**, 18, 137.
37. Luo C, Shaw KT, Raghavan A, Aramburu J, Garcia-Cozar F, Perrino BA, Hogan PG, Rao A. Interaction of calcineurin with a domain of the transcription factor NFAT1 that controls nuclear import. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1996**, 93, 8907-12.
38. Mognol GP, Carneiro FR, Robbs BK, Faget DV, Viola JP. Cell cycle and apoptosis regulation by NFAT transcription factors: new roles for an old player. *Cell. Death. Dis.* **2016**, 7, e2199.
39. Tie X, Han S, Meng L, Wang Y, Wu A. NFAT1 is highly expressed in, and regulates the invasion of, glioblastoma multiforme cells. *PLoS. One.* **2013**, 8, e66008.
40. Jiang Y, Song Y, Wang R, Hu T, Zhang D, Wang Z, Tie X, Wang M, Han S. NFAT1-Mediated Regulation of NDEL1 Promotes Growth and Invasion of Glioma Stem-like Cells. *Cancer. Res.* **2019**, 79, 2593-2603.
41. Chen Y, Yuen WH, Fu J, Huang G, Melendez AJ, Ibrahim FB, Lu H, Cao X. The mitochondrial respiratory chain controls intracellular calcium signaling and NFAT activity essential for heart formation in *Xenopus laevis*. *Mol. Cell. Biol.* **2007**, 27, 6420-32.

42. Chan AY, Dolinsky VW, Soltys CL, Viollet B, Baksh S, Light PE, Dyck JR. Resveratrol inhibits cardiac hypertrophy via AMP-activated protein kinase and Akt. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 24194-201.
43. Yang SH, Li S, Lu G, Xue H, Kim DH, Zhu JJ, Liu Y. Metformin treatment reduces temozolomide resistance of glioblastoma cells. *Oncotarget.* **2016**, 7, 78787-78803.
44. Alonso MM, Diez-Valle R, Manterola L, Rubio A, Liu D, Cortes-Santiago N, Urquiza L, Jauregi P, Lopez de Munain A, Sampron N, Aramburu A, Tejada-Solis S, Vicente C, Odero MD, Bandrés E, García-Foncillas J, Idoate MA, Lang FF, Fueyo J, Gomez-Manzano C. Genetic and epigenetic modifications of Sox2 contribute to the invasive phenotype of malignant gliomas. *PLoS. One.* **2011**, 6, e26740.
45. Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA, Prigaro BJ, Wood JL, Bhanot S, MacDonald MJ, Jurczak MJ, Camporez JP, Lee HY, Cline GW, Samuel VT, Kibbey RG, Shulman GI. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature.* **2014**, 510, 542-6.
46. Seliger C, Lubert C, Gerken M, Schaertl J, Proescholdt M, Riemenschneider MJ, Meier CR, Bogdahn U, Leitzmann MF, Klinkhammer-Schalke M, Hau P. Use of metformin and survival of patients with high-grade glioma. *Int. J. Cancer.* **2019**, 144, 273-280.
47. Shank JJ, Yang K, Ghannam J, Cabrera L, Johnston CJ, Reynolds RK, Buckanovich RJ. Metformin targets ovarian cancer stem cells in vitro and in vivo. *Gynecol. Oncol.* **2012**, 127, 390-7.
48. Park SY, Kim D, Kee SH. Metformin-activated AMPK regulates β -catenin to reduce cell proliferation in colon carcinoma RKO cells. *Oncol. Lett.* **2019**, 17, 2695-2702.
49. Nangia-Makker P, Yu Y, Vasudevan A, Farhana L, Rajendra SG, Levi E, Majumdar AP. Metformin: a potential therapeutic agent for recurrent colon cancer. *PLoS. One.* **2014**, 9, e84369.
50. Eibl G, Rozengurt E. Metformin: review of epidemiology and mechanisms of action in pancreatic cancer. *Cancer. Metastasis. Rev.* **2021**, 40, 865-878.
51. Wheaton WW, Weinberg SE, Hamanaka RB, Soberanes S, Sullivan LB, Anso E, Glasauer A, Dufour E, Mutlu GM, Budigner GS, Chandel NS. Metformin inhibits mitochondrial complex I of cancer cells to reduce tumorigenesis. *Elife.* **2014**, 3, e02242.

52. Garcia D, Shaw RJ. AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance. *Mol. Cell.* **2017**, 66, 789-800.
53. Zhao B, Luo J, Yu T, Zhou L, Lv H, Shang P. Anticancer mechanisms of metformin: A review of the current evidence. *Life. Sci.* **2020**, 254, 117717.
54. Zhao J, Yue W, Zhu MJ, Sreejayan N, Du M. AMP-activated protein kinase (AMPK) cross-talks with canonical Wnt signaling via phosphorylation of beta-catenin at Ser 552. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2010**, 395, 146-51.
55. Kwan HT, Chan DW, Cai PC, Mak CS, Yung MM, Leung TH, Wong OG, Cheung AN, Ngan HY. AMPK activators suppress cervical cancer cell growth through inhibition of DVL3 mediated Wnt/ β -catenin signaling activity. *PLoS. One.* **2013**, 8, e53597.
56. Conza D, Mirra P, Cali G, Insabato L, Fiory F, Beguinot F, Ulianich L. Metformin Dysregulates the Unfolded Protein Response and the WNT/ β -Catenin Pathway in Endometrial Cancer Cells through an AMPK-Independent Mechanism. *Cells.* **2021**, 10, 1067.
57. Maraka S, Groves MD, Mammoser AG, Melguizo-Gavilanes I, Conrad CA, Tremont-Lukats IW, Loghini ME, O'Brien BJ, Puduvalli VK, Sulman EP, Hess KR, Aldape KD, Gilbert MR, de Groot JF, Alfred Yung WK, Penas-Prado M. Phase 1 lead-in to a phase 2 factorial study of temozolomide plus memantine, mefloquine, and metformin as postradiation adjuvant therapy for newly diagnosed glioblastoma. *Cancer.* **2019**, 125, 424-433.
58. Neske A, Ruiz Hidalgo J, Cabedo N, Cortes D. Acetogenins from Annonaceae family. Their potential biological applications. *Phytochemistry.* **2020**, 174, 112332.
59. Kojima N, Tanaka T. Medicinal chemistry of Annonaceous acetogenins: design, synthesis, and biological evaluation of novel analogues. *Molecules.* **2009**, 14, 3621-61.
60. Hattori Y, Furuhashi S, Okajima M, Konno H, Abe M, Miyoshi H, Goto T, Makabe H. Synthesis of pyranicin and its inhibitory action with bovine heart mitochondrial complex I. *Org. Lett.* **2008**, 10, 717-20.
61. Kojima N, Fushimi T, Tatsukawa T, Tanaka T, Okamura M, Akatsuka A, Yamori T, Dan S, Iwasaki H, Yamashita M. Thiophene-3-carboxamide analogue of annonaceous acetogenins as antitumor drug lead. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 86, 684-9.
62. Ohta K, Akatsuka A, Dan S, Iwasaki H, Yamashita M, Kojima N. Structure-Activity Relationships

- of Thiophene Carboxamide Annonaceous Acetogenin Analogs: Shortening the Alkyl Chain in the Tail Part Significantly Affects Their Growth Inhibitory Activity against Human Cancer Cell Lines. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2021**, 69, 1029-1033.
63. Matsumoto T, Akatsuka A, Dan S, Iwasaki H, Yamashita M and Kojima N: Synthesis and cancer cell growth inhibition effects of acetogenin analogs bearing ethylene glycol units for enhancing the water solubility. *Tetrahedron*. **2020**, 76, 131058.
 64. Matsumoto T, Kojima N, Akatsuka A, Yamori T, Dan S, Iwasaki H and Yamashita: Convergent synthesis of stereoisomers of THF ring moiety of acetogenin thiophene analogue and their antiproliferative activities against human cancer cell lines. *Tetrahedron*. **2017**, 73, 2359-2366.
 65. Akatsuka A, Kojima N, Okamura M, Dan S, Yamori T. A novel thiophene-3-carboxamide analog of annonaceous acetogenin exhibits antitumor activity via inhibition of mitochondrial complex I. *Pharmacol. Res. Perspect.* **2016**, 4, e00246.
 66. Marenco-Hillebrand L, Wijesekera O, Suarez-Meade P, Mampre D, Jackson C, Peterson J, Trifiletti D, Hammack J, Ortiz K, Lesser E, Spiegel M, Prevatt C, Hawayek M, Quinones-Hinojosa A, Chaichana KL. Trends in glioblastoma: outcomes over time and type of intervention: a systematic evidence based analysis. *J. Neurooncol.* **2020**, 147, 297-307.
 67. Bueno MJ, Ruiz-Sepulveda JL, Quintela-Fandino M. Mitochondrial Inhibition: a Treatment Strategy in Cancer? *Curr. Oncol. Rep.* **2021**, 23, 49.
 68. Hla Myint S, Cortes D, Laurens A, Hocquemiller R, Lebeuf M, Cavé A, Cotte J and Quéro A-M: Solamin, a cytotoxic mono-tetrahydrofuranic γ -lactone acetogenin from *Annona muricata* seeds. *Phytochemistry*. **1991**, 30, 3335-3338.
 69. Pathak T, Trebak M. Mitochondrial Ca²⁺ signaling. *Pharmacol. Ther.* **2018**, 192, 112-123.
 70. Hardie DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2012**, 13, 251-62.
 71. Mosieniak G, Figiel I, Kaminska B. Cyclosporin A, an immunosuppressive drug, induces programmed cell death in rat C6 glioma cells by a mechanism that involves the AP-1 transcription factor. *J. Neurochem.* **1997**, 68, 1142-9.
 72. Liu Z, Li H, He L, Xiang Y, Tian C, Li C, Tan P, Jing J, Tian Y, Du L, Huang Y, Han L, Li M, Zhou Y. Discovery of Small-Molecule Inhibitors of the HSP90-Calcineurin-NFAT Pathway against

- Glioblastoma. *Cell. Chem. Biol.* **2019**, 26, 352-365.e7.
73. Qin JJ, Nag S, Wang W, Zhou J, Zhang WD, Wang H, Zhang R. NFAT as cancer target: mission possible? *Biochim. Biophys. Acta.* **2014**, 1846, 297-311.
 74. Rabinovitch RC, Samborska B, Faubert B, Ma EH, Gravel SP, Andrzejewski S, Raissi TC, Pause A, St-Pierre J, Jones RG. AMPK Maintains Cellular Metabolic Homeostasis through Regulation of Mitochondrial Reactive Oxygen Species. *Cell. Rep.* **2017**, 21, 1-9.
 75. Ghosh P, Vidal C, Dey S, Zhang L. Mitochondria Targeting as an Effective Strategy for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21, 3363.
 76. Guntuku L, Naidu VG, Yerra VG. Mitochondrial Dysfunction in Gliomas: Pharmacotherapeutic Potential of Natural Compounds. *Curr. Neuropharmacol.* **2016**, 14, 567-83.
 77. Zhao B, Luo J, Yu T, Zhou L, Lv H, Shang P. Anticancer mechanisms of metformin: A review of the current evidence. *Life. Sci.* **2020**, 254, 117717.
 78. Sherer TB, Betarbet R, Testa CM, Seo BB, Richardson JR, Kim JH, Miller GW, Yagi T, Matsuno-Yagi A, Greenamyre JT. Mechanism of toxicity in rotenone models of Parkinson's disease. *J. Neurosci.* **2003**, 23, 10756-64.
 79. Lee SY. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes. Dis.* **2016**, 3, 198-210.
 80. Ostermann S, Csajka C, Buclin T, Leyvraz S, Lejeune F, Decosterd LA, Stupp R. Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients. *Clin. Cancer. Res.* **2004**, 10, 3728-36.
 81. Li YJ, Lei YH, Yao N, Wang CR, Hu N, Ye WC, Zhang DM, Chen ZS. Autophagy and multidrug resistance in cancer. *Chin. J. Cancer.* **2017**, 36, 52.
 82. Kim SH, Li M, Trousil S, Zhang Y, Pasca di Magliano M, Swanson KD, Zheng B. Phenformin Inhibits Myeloid-Derived Suppressor Cells and Enhances the Anti-Tumor Activity of PD-1 Blockade in Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **2017**, 137, 1740-1748.
 83. Yoshida J, Ohishi T, Abe H, Ohba SI, Inoue H, Usami I, Amemiya M, Oriez R, Sakashita C, Dan S, Sugawara M, Kawaguchi T, Ueno J, Asano Y, Ikeda A, Takamatsu M, Amori G, Kondoh Y, Honda K, Osada H, Noda T, Watanabe T, Shimizu T, Shibasaki M, Kawada M. Mitochondrial complex I inhibitors suppress tumor growth through concomitant acidification of the intra- and

extracellular environment. *iScience*. **2021**, 24, 103497.