様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 １８ 日現在

機関番号：８４４０４
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ１８８２１

研究課題名（和文）天然物の作用機構解明に基づく新規がん細胞致死機構の探索

研究課題名（英文）Screening of the novel target for cancer therapy based on the mechanisms of natural compounds

研究代表者
熊添　基文（Kumazoe, Motofumi）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：７０７３７２１２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：緑茶ポリフェノールの一種であるEpigallocatechin-3-O-gallate (EGCG)の抗がん作用機構を解明していく中で、cGMPが癌幹細胞性を阻害する強力なメディエーターであることを発見した。実際にcGMP産生誘導剤 Bay41-2272 は様々なすい臓がん細胞株のスフェロイド形成能を強力に阻害した。これらの結果から、cGMP産生が癌幹細胞性を阻害する新たな標的になりえることを発見した。

研究成果の概要（英文）：Green tea polyphenol Epigallocatechin-3-O-gallate has anti-cancer effect. Several clinical trials show its anti-cancer effect, however, little is known its mechanisms. We previously reported that cGMP mediates anti-cancer effect of EGCG.Because EGCG also have strong suppressing effect on cancer stem cell properties, we hypothesized that cGMP itself has strong inhibitory effect on cancer stem cell properties. Our data shows some kind of cGMP inducer shows strong inhibitory effect on cancer stem cell properties.

研究分野：天然物質の作用機構解明

キーワード：cGMP　Caner　EGCG

１．研究開始当初の背景

我が国において増加傾向が顕著な膵臓癌は、生存期間が6カ月(中央値)と極めて予後不良である。実際に膵臓癌の化学療法において抗癌剤治療の進歩により、一時的に腫瘍を縮退させることに成功するが、ほとんどの場合において再発が生じ、根治は困難であるとされている。

近年の研究において、化学療法によって膵臓癌が根治し得ない原因として抗癌剤に強い耐性を有した癌幹細胞の存在が明らかとなった。癌幹細胞と呼ばれる少数の細胞集団は殆ど分裂を行わないことから既存の抗癌剤に強い抵抗性を有し、抗癌剤治療後も患者の体内に残存することで癌の再発の原因になっていることが報告された。

実際に標準治療薬ゲムシタビンは非癌幹細胞を殺傷する一方、癌幹細胞に対しては効果が無い。これらのことから、膵臓癌の根治には癌幹細胞に有効な抗癌剤の開発が必須である。

近年の研究の研究によりヒアルロン酸に対する受容体である細胞膜タンパク質CD44が癌幹細胞の枢要として報告された。非癌幹細胞に対し CD44 を強制発現させることで癌幹細胞としての性質を獲得する。一方、CD44 を阻害するのみで癌幹細胞としての性質が消失することから、CD44 は癌幹細胞の機能維持に必須である。しかし、CD44発現を担うWnt受容体自体は正常細胞での重要性から標的とするのが困難とされ、現在 CD44 阻害を意図した薬剤は存在しない。ゆえに新たなCD44阻害戦略が求められている。

環状グアノシン一リン酸 (Cyclic guanosine monophosphate; cGMP) はセカンドメッセンジャーの一種であり、血管の弛緩や性的興奮による勃起に関与している。近年、cGMP を分解する酵素であるホスホジエステラーゼ (Phosphodiesterase, PDE) に対する阻害剤は男性の性機能障害である勃起不全症や肺高血圧症に対する治療薬として使われている。また、膜型グアニル酸シクラーゼ (guanylate cyclase-coupled receptor) に対するリガンドである心房性ナトリウム利尿ペプチドや可溶性グアニル酸シクラーゼ (soluble guanylate cyclase; sGC) の活性化剤は様々な疾患に対する治療薬として使われており、cGMPの産生誘導は臨床的に可能な手法である。一方で cGMP が癌幹細胞に対する影響については全く報告がない。

フォークヘッド型転写因子 (Forkhead box 03; FOXO3) は筋委縮や長寿、発がん抑制因子として知られている核内転写因子の一種であり、増殖抑制やたんぱく質の分解、アポトーシスに関与することが知られている。

これまで数多くの文献が FOXO3 の腫瘍成長抑制機構を報告している。実際に FOXO3 は細胞増殖抑制因子の発現を上方制御することが知られており、これまで癌を抑制する因子として考えられてきた。しかしながら、FOXO3 の癌幹細胞における機能については殆ど報告されておらず、その癌幹細胞での発現や機能について分かっていない点が多い。

２．研究の目的

申請者は cGMP 産生を誘導するポリフェノールが癌幹細胞性の高い細胞に強力な抑制作用を有することに着目し、cGMPが癌幹細胞性を阻害するのではないかと予想した。

cGMP産生誘導及び cGMP 分解酵素の阻害は男性の性機能障害である勃起不全症や肺高血圧症の治療において用いられる戦略であり、臨床的に使用可能である。また、cGMPに基づくがんの治療戦略というのは存在しておらず、cGMPによる癌幹細胞抑制機構を解明することができれば、全く新規の治療標的を見出すことが期待できる。

これらのことから、cGMPの癌幹細胞抑制作用に着目し、その分子機構解明を目指した。

また、すい臓がん細胞における cGMP 分解酵素について免疫組織染色について評価を行った。

３．研究の方法

ヒトすい臓がん細胞株 Panc-1 を非接着コーティングされた培養器に播種し、cGMP 産生誘導剤である Bay 41-2272 を添加し、スフェロイド形成能について評価した。また、同様に癌幹細胞性の指標であるコロニー形成能を評価した。さらに、ウエスタンブロット法にて Bay 41-2272 処理時に起きるたんぱく質レベルでの変動を評価した。また、cGMP 産生誘導剤処理時の遺伝子の変動をリアルタイム PCR 法によって評価した。

４．研究成果

その結果、 cGMP 産生誘導剤の一種である Bay41-2272 がヒトすい臓がん細胞株において癌幹細胞性の指標であるコロニー形成能やスフェロイド形成能を顕著に阻害されることを見出した。さらに、cGMP 産生誘導により、癌幹細胞性の指標である CD44 の発現低下や転移性の低下を見出した。

また、作用機構解明の結果から、cGMP は核内転写因子であるフォークヘッド型転写因子 (Forkhead box 03; FOXO3)の発現を抑制することで癌幹細胞性を阻害することを見出した。実際にがん抑制遺伝子として知られている FOXO3 をノックダウンするだけで CD44 の発現が抑制されること、また癌幹細胞性の指標であるスフェロイド形成能が顕著に阻害されることを確認している。

興味深いことに、我々の論文の後に FOXO3 の発現が高いトリプルネガティブ乳がんでは転移が早く予後が悪いという報告や (Rehman *et al. J. Clin. Pathol.*2018; 205052)、血液癌において FOXO3 の発現減少に伴い CD44 の発現が低下することで癌幹細胞性の指標である薬剤排出たんぱく質が減少するという報告がなされており (Sun *et al. Int. J. Clin. Exp. Med.* 2018; 2142-2147)、これまで単純にがん抑制遺伝子として知られてきた FOXO3 が癌の治療のターゲットになりえるという知見が徐々に集まりつつある。

５．主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　6　件）

1. Kumazoe M, Takai M, Bae J, Hiroi S, Huang Y, Takamatsu K, Won Y, Yamashita M, Hidaka S, Yamashita S, Yamada S, Murata M, Tsukamoto S, Tachibana H. FOXO3 is essential for CD44 expression in pancreatic cancer cells. Oncogene (2017), 36, 2643-2654.

2. Kumazoe M, Yamashita M, Nakamura Y, Takamatsu K, Bae J, Yamashita S, Yamada S, Onda H, Nojiri T, Kangawa K, Tachibana H. Green tea polyphenol EGCG upregulates Tollip expression by suppressing Elf-1 expression. J. Immunology (2017), 199, 3261-3269.

3. Kumazoe M, Takai M, Hiroi S, Takeuchi C, Kadomatsu M, Nojiri T, Onda H, Bae J, Huang Y, Takamatsu K, Yamashita S, Kangawa K, Tachibana H. The FOXO3/PGC-1β signaling axis is essential for cancer stem cell properties of pancreatic ductal adenocarcinoma. J. Biol. Chem. (2017), 292, 10813-10823.

4. Kumazoe M, Nakamura Y, Yamashita M, Suzuki T, Takamatsu K, Huang Y, Bae J,

Yamashita S, Murata M, Yamada S, Shinoda Y, Yamaguchi W, Toyoda Y, Tachibana H. Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate suppresses TLR4 expression via upregulation of E3 Ubiquitin-protein Ligase RNF216. J. Biol. Chem. (2017), 292, 4077-4088.

5. Kumazoe M, Takai M, Hiroi S, Takeuchi C, Yamanouchi M, Nojiri T, Onda H, Bae J, Huang Y, Takamatsu K, Yamashita S, Yamada S, Kangawa K, Takahashi T, Tanaka H, Tachibana H. PDE3 inhibitor and EGCG combination treatment suppress cancer stem cell properties in pancreatic ductal adenocarcinoma. Scientific Reports (2017), 7, 1917.

6. Tsukamoto S, Kumazoe M, (Equal contribution) Huang Y, Lesnick C, Kay NE, Shanafelt TD, Tachibana H. SphK1 inhibitor potentiates the anti-cancer effect of EGCG on leukaemia cells. Brit. J. Haematol. (2017), 178, 155-158.

〔学会発表〕（計　3　件）

1. 日本栄養食糧学会

緑茶ポリフェノール EGCG は cGMP 依存的に TLR4 を低下させる

○熊添基文 1, 2)、中村友紀 1)、山下麻衣 1)、高松香菜子 1)、鈴木貴視 1)、野尻崇 2)、立花宏文 1)

1)九大院農院・生機科、2)国循セ・生化学部

2. 国循-産総研バイオメディカル若手会合同セミナー

cGMP の抗がん作用機構の解明

○熊添基文 1, 2) 立花宏文 1)

1)九大院農院・生機科、2)国循セ・生化学部

3. cGMP Conference

cGMP induction suppresses pancreatic cancer stem cell properties

Motofumi Kumazoe1,2,†), Mika Takai 1,†), Chieri Takeuchi1), Mai Kadomatsu1), Shun Hiroi1), Kanako Takamatsu1), Takashi Nojiri2), Kenji Kangawa2), Hirofumi Tachibana1,*)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

６．研究組織

(1)研究代表者

熊添 基文（Kumazoe, Motofumi）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・特任研究員

研究者番号：７０７３７２１２