

令和元年6月25日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16541

研究課題名(和文)オートリソソームを介した癌幹細胞維持機構の阻害による大腸癌新規根治的療法の開発

研究課題名(英文)Development of colon cancer stem cell target therapy by inhibiting autolysosome activity

研究代表者

竹田 充伸 (Takeda, Mitsunobu)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90768962

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)：癌幹細胞は、癌の治療抵抗性獲得に重要な役割を担っている。癌の根治を目指すためには、癌幹細胞を標的化する治療が求められる。われわれは、大腸癌幹細胞集団ではリソソーム活性が亢進しており、リソソーム活性が亢進している細胞集団は、高いsphere形成能や造腫瘍性を有することを示した。リソソーム経路を阻害する薬剤スクリーニングを施行し、抗マラリア薬であるメフロキンを同定した。メフロキンにより癌幹細胞集団は消失した。またメフロキンはRAB5/7を標的化してリソソーム経路を阻害していることを見出した。最後に、in vivoにおいても、メフロキンと抗癌剤併用療法は高い抗腫瘍効果を持つことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本で使用可能な抗マラリア薬のメフロキンを大腸癌にリポジショニングすることにより、リソソーム経路を阻害することで癌幹細胞を治療標的にすることが可能になれば、抗癌剤に不応・不耐な難治性再発大腸癌においても根治を目指すことが出来る新規治療薬開発につながると考えられる。メフロキンは、抗癌剤と比べて重篤な副作用の発現がなく、イリノテカンやオキサリプラチンに相乗的に働き、K-ras変異に依存せずに高い抗腫瘍効果をもつ。メフロキンの大腸癌への臨床応用は、癌幹細胞を治療標的とする従来にはない薬理作用をもつ革新的な治療法になりうる。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) are deeply involved in resistance to treatment and are the most important target cells in cancer treatment. We focused on autophagy and lysosomal activity of CSCs and colon CSC targeting by drug repositioning. Autophagy and lysosome were labeled by LC3B imaging vector and LysoTracker respectively. LysoTracker+/CD44v9+ cells showed high sphere formation and tumorigenic activities. During the process of screening of antimalarial drugs, anti-lysosomal effect of mefloquine was identified. Mefloquine treatment significantly decreased CD44v9+/CD133+ cell number. Mefloquine demonstrated the synergic effect on oxaliplatin. In the patient-derived xenografted (PDX) mice, combined treatment of mefloquine with oxaliplatin drastically abrogated the tumorigenic activity of cancer cells.

Repositioning of mefloquine to colon cancer will be a promising strategy for cure of colon cancer.

研究分野：大腸癌幹細胞

キーワード：癌幹細胞 リソソーム オートファジー 抗マラリア薬 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

癌幹細胞は、癌の多様性形成や治療抵抗性獲得に重要な役割を担っている。癌の根治を目指すためには、癌幹細胞を標的化する治療が求められる。以前、われわれは癌幹細胞が活性酸素種 (ROS) の発現が低く抑えられており、低 ROS 活性細胞ではリソソーム関連膜タンパクが高発現していることを見出した。このことから、癌幹細胞においてリソソーム活性が亢進しているのではないかと考えるに至った。リソソームは、オートファジー経路の一部を担っている。オートファジーは幹細胞を維持する機構としても重要な役割を果たしていることが知られているが、リソソーム活性と癌幹細胞性に関して報告された論文報告はなく、分子生物学的な制御機構ならびに治療標的化を含めていまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

大腸癌において、リソソーム経路の幹細胞性との関係を明確にし、リソソーム阻害による大腸癌幹細胞標的治療の開発、さらにはその臨床応用を目指す。

3. 研究の方法

大腸癌細胞株を用いて、Autophagy(LC3B Sensor)並びに Lysosome(LysoTracker)の蛍光トレーシング、大腸癌幹細胞マーカー (CD133 並びに CD44v9) との関連を解析した。各細胞集団における増殖試験、抗癌剤感受性試験並びに造腫瘍性を検討した。

さらに Autophagy・Lysosome 阻害薬のスクリーニングを行い、同定した薬剤の癌幹細胞分画の変化、既存の抗癌剤との併用による抗腫瘍効果、in vivo における抗腫瘍効果を検討した。最後に、同定した薬剤のメカニズムを解明し、臨床応用につなげようと試みた。

4. 研究成果

大腸癌に限らず全ての癌において治療の最大の障壁となるのが癌の治療抵抗性である。癌幹細胞は癌ヒエラルキーの基盤細胞であり、高い治療抵抗性、自己複製能や造腫瘍能を有するため、癌幹細胞の治療標的化 (癌に幹細胞性を付与する機構ならびに維持機構の標的化) は、癌の根治に向けて必須の課題である。

一方、医薬品開発に関わるコストや時間、医療費高騰などの問題を背景として、既に臨床応用されている薬剤に潜在的な薬効を見出し、適応拡大を目指すドラッグリポジショニングが積極的に研究されるようになってきた (Nat Rev Drug Discov. 2004)。この利点は、安全性や副作用情報が既に確立しており、臨床試験の導入を行いやすい点にある。

われわれは、大腸癌で高リソソーム活性細胞 (CD107a+/LysoTracker+) では、活性酸素種の発現

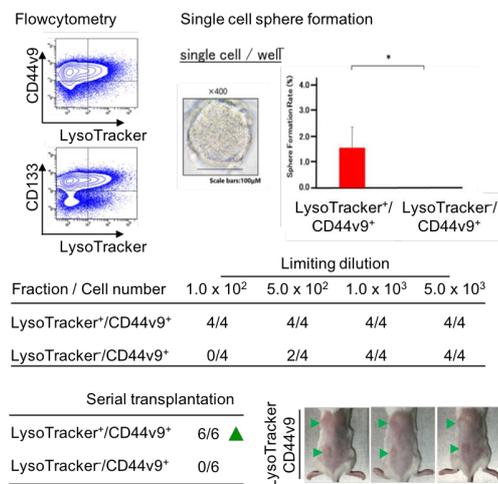


図 1. エンドリソソーム活性と幹細胞性

が低く保たれており、抗癌剤抵抗性や単一細胞からのスフェア形成能が高いこと、さらに、limiting dilution assay ならびに serial transplantation assay にて自己複製能を高く保持しており癌幹細胞の性質を有することを見出した (図 1)。さらに、ケミカルスクリーニングを行い、

エンドリソソーム阻害剤として、抗マラリア薬であるメフロキン

(Mefloquine: MQ) を同定し、メフロキン投与により癌幹細胞分画が消失することを見出した。海外で悪性黒色腫などに臨床試験がすでに行われているオートファジー阻害剤であるク

ロロキン (Chloroquine: CQ) やヒドロクロロキン (Hydroxychloroquine: HQ) に比べて、メフロキンは強力にエンドリソソーム経路を阻害し (図 2)、癌幹細胞分画を消失させた。そして、抗

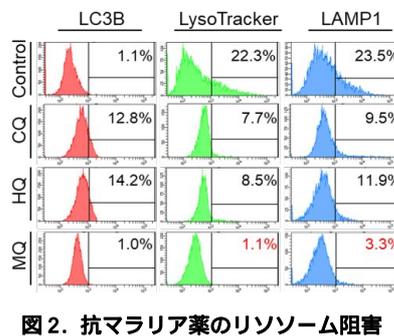


図 2. 抗マラリア薬のリソソーム阻害

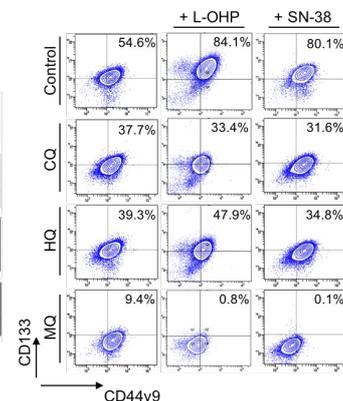


図 3. 癌幹細胞へのメフロキン単剤および抗癌剤併用の効果

癌剤であるオキサリプラチン (L-OHP) やイリノテカン (SN-38) と併用することで、癌幹細胞が完全に消失することが見出された (図 3)。また、大腸癌臨床検体を移植したマウスモデル (Patient-derived tumor xenograft: PDX) を L-OHP、CQ、MQ、CQ+L-OHP、MQ+L-OHP で 21 日間治療した場合、メフロキンは単剤投与であっても L-OHP と同等の抗腫瘍効果を示し、さらに、L-OHP 併用により腫瘍がほぼ完全に消退することが確認された (図 4)。また、同治療過程において、体重減少や腫瘍臓器に病理学的変化などの副作用が生じないことが確認された。実際、メフロキンはマラリアに対する予防薬として使用され、主な副作用が軽度眩暈のみであり、その他のマラリア治療薬である CQ や HQ と比較して副作用が少ないといわれている。

近年、メフロキンは mTOR を阻害することが報告されたが (Can J Physiol Pharmacol. 2017)、その薬理作用は依然として解明されていない点が多い。われわれは、メフロキンの抗腫瘍効果における薬理作用解明のために、PDX 治療モデルのアレイ解析とパスウェイ解析、タンパク結合解析を行うことで、メフロキンの標的分子として Rab5/Rab7 を同定した (図 5)。メフロキンはエンドリソソーム経路調節因子 Rab5/7 に結合し、Rab5/Rab7 の抑制によりミトファジー (ミトコンドリア選択的オートファジー) が抑制されること、その結果、膨化した異常ミトコンドリアの集積が誘導され (図 6)、ミトコンドリア誘導性のアポトーシスが誘導される (図 7) ことを解明した (Cancer Research under revision)。クロロキンは網膜毒性を有することから本邦では臨床承認が得られていないが、メフロキンは抗マラリア薬として、すでに臨床応用が行われている薬剤であり、安全性が高く本薬剤を癌治療にリポジショニングを行うことの意義は極めて高いと考えられ、現在第一相臨床試験の計画を進めている。

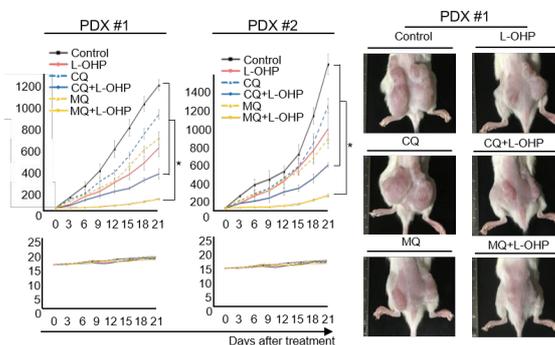


図 4. PDX モデルにおける抗腫瘍効果

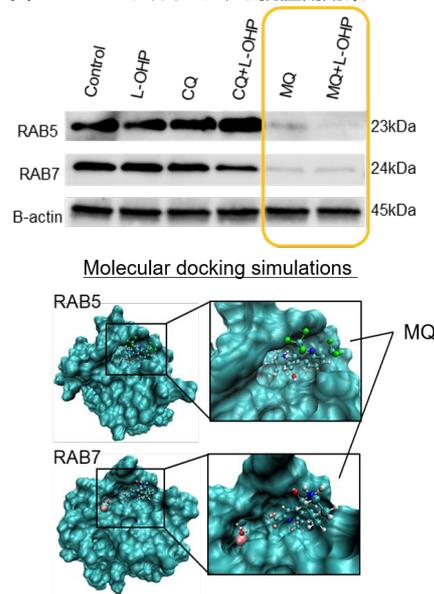


図 5. メフロキンによる Rab5/7 標的化

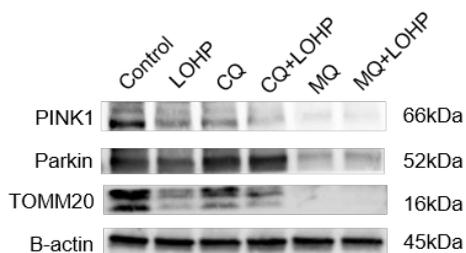


図 6. メフロキンによるミトファジー阻害

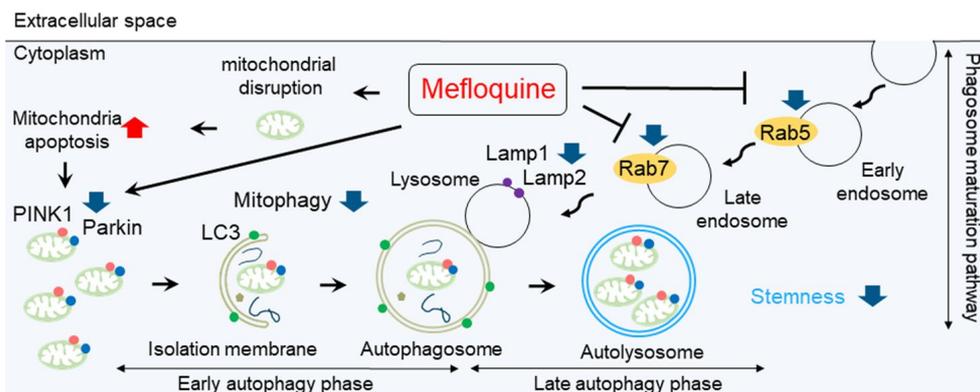
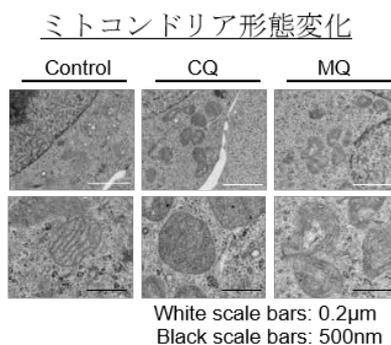


図 7. メフロキンの薬理作用

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件) (査読有)

Takeda M, Haraguchi N, Koseki J, Takahashi H, Miyoshi N, Nishida N, Nishimura J, Hata T, Matsuda C, Mizushima T, Yamamoto H, Ishii H, Doki Y, Mori M. Disruption of endolysosomal RAB5/7 efficiently eliminates colorectal cancer stem cells. *Cancer Res* 2019. Apr 1;79(7):1426-1437. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2192. Epub 2019 Feb 14.

〔学会発表〕(計 4 件)

Mefloquine disrupts cancer stem cells by inhibiting lysosomal RAB5/7

第 77 回 日本癌学会学術総会 2018 年 9 月 29 日

竹田充伸、原口直紹、高橋秀和、三吉範克、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹

Reprofiling of Antimalarial Drug is a Novel Therapeutic Target for Colon Cancer Stem Cell

Society of Surgical Oncology (国際学会) 2018 年 3 月 23 日

Mitsunobu Takeda, Naotsugu Haraguchi, Hidekazu Takahashi, Norikatsu Miyoshi, Junichi Nishimura, Taishi Hata, Chu Matsuda, Tsunekazu Mizushima, Hirofumi Yamamoto, Yuichiro Doki, and Masaki Mori

Development of colon cancer stem cell target therapy by inhibiting autophagic activity

第 28 回日本消化器癌発生学会総会 2017 年 11 月 17 日

竹田充伸、原口直紹、高橋秀和、三吉範克、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹

大腸癌幹細胞における Autophagy・Lysosome 活性の動態の解析と新規標的治療薬の開発

第 117 回日本外科学会定期学術集会 2017 年 4 月 28 日

竹田充伸、原口直紹、高橋秀和、西村潤一、畑泰司、松田宙、水島恒和、山本浩文、土岐祐一郎、森正樹

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：なし

所属研究機関名：なし

部局名：なし

職名：なし

研究者番号(8桁)：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：原口 直紹、高橋 秀和、三吉 範克、畑 泰司、松田 宙、
水島 恒和、山本 浩文、土岐 祐一郎、森 正樹

ローマ字氏名：Naotsugu Haraguchi, Hidekazu Takahashi, Norikatsu Miyoshi, Taishi Hata,
Chu Matsuda, Tsunekazu Mizushima, Hirofumi Yamamoto, Yuichiro Doki, Masaki Mori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。