

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H05655

研究課題名(和文) 微小環境変動に対する細胞応答に着目した治癒をめざした抗腫瘍療法

研究課題名(英文) Anti-cancer therapies aiming for cure through inhibiting tumor-specific responses to environmental fluctuation

研究代表者

石川 冬木 (Ishikawa, Fuyuki)

京都大学・生命科学研究科・名誉教授

研究者番号：30184493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 128,100,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍細胞は非致死性ではあるものの常なる環境変化を経験しつつ、episodicに起こる強い低酸素・低栄養状態や抗がん治療などの致死的なストレスに曝されている。本研究は、がん組織が環境変化による弱いストレスが獲得耐性を介して治療抵抗性などの強いストレスに対する耐性を誘導している可能性を検討するものである。我々は、分裂酵母において獲得耐性誘導に必要な遺伝子として同定したRACK1が、哺乳類細胞において引き続いて負荷した強いストレス負荷後のバルクな翻訳反応の再開を早める効果をもち、このことが獲得耐性誘導に必要であることを明らかにした。今後、このRACK1経路を介した新規がん治療薬の開発が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医学領域において心臓や脳における先行する軽微な虚血が後続する重篤な虚血による梗塞を軽減させることが長らく知られており(コンディショニング)、虚血性疾患の治療に応用されてきたが、その分子基盤は不明なままであった。本研究は、この生体反応を獲得耐性として理解し、その発現に必要な蛋白質を同定した上で、悪性腫瘍の治療に役立つようとするものであり独創性が高い。これまでのがん治療はがん細胞殺細胞効果を介するものがほとんどであり正常細胞に対する毒性を免れることが難しかった。本研究が完成すれば、がん組織はなぜ宿主や治療による腫瘍抑制作用に抵抗し、患者を死に至らせるのかを理解する重要な視点が得られると期待される。

研究成果の概要(英文)：Tumor cells experience everlasting microenvironmental changes, including hypoxia, low nutrients and high tissue pressure. We hypothesize that such low-dose stresses render tumors resistant to lethal stresses, including anti-cancer treatments, via the acquired tolerance (AT). We suppose that the mechanism comprise the heart of drug resistance acquired by tumors. However, the molecular mechanism of AT remains unknown. Previously we reported that the cpc2 gene is required to induce AT in fission yeast. In this study, we first have demonstrated that RACK1, the mammalian cpc2 homologue, is also required for AT. Further detailed analyses have elucidated that RACK1 contributes to AT through restarting general protein translation earlier after lethal stresses than in the absence of the priming low-dose stress. These results suggest that the RACK1 pathway is a candidate target to develop novel anti-cancer therapies.

研究分野：がん生物学

キーワード：ストレス 獲得耐性 転写 翻訳 RACK1 HIRA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がんのドライバー変異産物を特異的に阻害する分子標的療法は個々の患者に最適の治療をする合理性と高い奏功性をもたらしたが、依然として再発が多い。これは、がん細胞は遺伝的不安定性を特徴とするために、当初阻害した標的とは異なる標的遺伝子に変異を獲得することで治療を無効にするためと考えられる。

### 2. 研究の目的

分子標的療法はいわばミクロの治療であるが、がん細胞に共通して備わるシステムの特徴を利用したマクロな治療を組み合わせることでより多くの症例で治療が可能な新しい治療法となる可能性を追求する。個体の発生とともに発達した正常組織はさまざまな個体ホメオスタシスによって常に環境が一定に保たれているが、がん細胞はその恩恵を受けず、常に細胞内・細胞外微小環境の変動を受けている。このような定常的におこる環境変化はがん細胞にとって弱いストレスとして感知・応答されると考えられ、その応答機構を阻害することでがん細胞の生存を危うくすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 研究方法

弱いストレスへの細胞応答として、1) 獲得耐性と、2) 我々が独自に見出した弱いストレス特異的な細胞応答、を研究の柱とし、最終的にそれぞれを阻害する薬剤の開発に資する基礎的知見を得る。二つの柱共に、先ず、分裂酵母を用いた順遺伝学的スクリーニングでこれらの現象に必要な遺伝子を同定する。次に、それらの遺伝子の哺乳類ホモログが同様な役割を果たすことを確認し、誘導性遺伝子ノックアウトマウスを作成する。分担研究者の若林雄一博士(千葉県がんセンター研究所)によって皮膚発がん実験を行い、当該経路の失活が腫瘍細胞の生存・増殖・悪性化の遮断につながるかを明らかにする。抗腫瘍作用を示した場合には、当該経路を阻害するために適した分子標的を同定し、薬剤スクリーニングの道筋をつける。

#### (2) 研究を遂行する上で生じた問題点及びその解決方法

上記二つの柱のうち、「獲得耐性」については当初目標通りの研究成果を得ることができたが、「弱いストレス特異的な細胞応答」については、計画通りの進展を得ることはできなかった。いずれの柱においても、分裂酵母のランダム変異株ライブラリーから順遺伝学的に検討している表現型を示さない変異体を取得、NGS等によって変異遺伝子を取得後、同定された遺伝子機能を先ず分裂酵母で詳しく解析し、次に同様の生物学的意義を哺乳類細胞でも有するかを検討してきた。これらの解析のためには、分裂酵母における遺伝子破壊株作成などの遺伝学的技術が重要な役割を果たすが、「弱いストレス特異的な細胞応答」は、栄養要求性など用いる分裂酵母株の遺伝学的バックグラウンドに影響を受けやすいことが明らかになった。この問題を回避するために、解析においては同一の遺伝子バックグラウンドをもつ細胞を基本に、栄養要求性を用いない Crispr-Cas9 変異導入法や抗生剤耐性遺伝子を用いて解析を行ってきたが、本研究の期間内には十分な成果を得ることはできなかった。

一方、研究期間中に、新型コロナウイルス感染症が流行し研究実施機関の研究活動指針によって研究活動に制限が生じたこと、並びに研究協力者の事情、さらには想定外の学問的進展があったことによって、研究が計画より遅延し、R1, R2, R3 および R4 年度実施予定分に必要な経費をそれぞれ次年度に繰り越して使用し、計画通りの実験を行った。

#### (3) 当初に予定していた研究経費の使用計画を変更して行った研究計画・研究方法

R2, R3 年度に計画していたゲノム解析委託費を含めたオミックス解析をそれぞれ次年度に変更して実施した。当初想定していなかった RACK1 遺伝子に関する新知見をさらに深めるために R5 年度に引き続いて研究を実施した。

#### (4) 中間評価で受けた指導事項に対する対応状況

該当なし

#### 4. 研究成果

##### (1) 本研究課題による研究成果

###### 柱1 獲得耐性

哺乳類 RACK1 の獲得耐性における役割 (担当: 石川)

RACK1 はリボソームによる蛋白質翻訳制御に関わり、軽微なストレスは同一 mRNA 分子を翻訳している複数のリボソームの翻訳速度の低下、さらにはリボソーム同士の衝突を引き起こすことが知られている (リボソームストレス)。そこで、リボソームストレスが RACK1 依存的獲得耐性経路の主要な因子である可能性があり、これを直接的に検討するために、ヒト正常線維芽細胞および HeLa 腫瘍細胞株に priming として熱ストレスの代わりにリボソームのペプチジル基転移活性を阻害するアニソマイシン (以下、ANS) を用い、lethal ストレスとしては 47°C、35 分の熱ストレスを与えたところ、500 ng/ml ANS、2 時間の priming 処理が致死熱ストレスに対する獲得耐性を誘導することを明らかにした。

哺乳類細胞が 40°C 以上の熱ストレスを受けると、ほとんどの mRNA 翻訳反応が停止する。これは熱ストレスによって多用されるシャペロン蛋白質が更なる翻訳産物によって枯渇されることを防ぐ適応反応と考えられている。熱ストレス解除後、しばらくすると細胞は翻訳反応を再開する。我々は、47°C、35 分熱ストレス負荷後のバルクな翻訳反応の再開が 500 ng/ml ANS、2 時間のプライミング処理によって有意に早まることを明らかにした。さらに、ANS 前処理群の早期の翻訳再開を翻訳阻害剤で処理することで遅延させると獲得耐性として見られた ANS 非処理群に比した高い細胞生存率が認められなくなることから、熱処理後のバルクな翻訳反応の再開が ANS 処理による獲得耐性に必要であることを明らかにした (論文準備中)。ヒストン H3.3 シャペロン HIRA による弱い熱ストレスによって誘導される獲得耐性は、熱ショックタンパク質の転写レベルでの発現促進が必要であることを報告した。本研究は、哺乳類細胞では獲得耐性誘導に、遺伝子転写および翻訳の二つの生物学的に基本的な階層における制御が重要であることを示しており、新規抗がん治療法を設計する上で興味深い。

哺乳類 RACK1 ノックアウトマウスを用いた発がん実験 (担当: 若林)

RACK1<sup>flox/flox</sup> マウスは、石川と八尾良司博士 (がん研究所) との共同研究によって既に作出されていた。若林は、このマウスと上皮細胞特異的に発現するケラチン 14 (K14) プロモーター下で Cre-ER を発現する K14Cre<sup>ER</sup> マウスを掛け合わせ、マウス皮膚にタノキシフェン (tmx) を塗布することで RACK1 欠損を誘導できる RACK1<sup>flox/flox</sup> K14Cre<sup>ER</sup> マウスを作成し DMPA/TPA による皮膚発がん実験を行った。その結果、RACK1 はパピローマの成立と悪性腫瘍へのプログレッションに重要な役割を果たしていることが明らかになった。この点において RACK1 が果たす役割と同経路上の蛋白質リン酸化酵素のような druggable な因子を同定することで、新規抗がん剤の開発の標的を与える可能性がある。

###### 柱2 弱いストレス特異的反応

弱い熱ストレス特異的感受性を示す変異株を同定するための遺伝学的スクリーニングによって得られた変異株については、戻し交配により単一遺伝子変異によることが明らかとなった。そこで、戻し交配で得られた四分子 (胞子) に由来する複数の F1 コロニーの表現型を確認して F1 変異株を同定し、それらから得たゲノム DNA を混じたサンプルと親細胞 F0 由来ゲノム DNA サンプルを別々に次世代シーケンサーによって解読し、飯田哲史博士 (東大・定量研) が開発したオンラインソフトウェア MUDI (Mutation discovery, Genes & Cells, 19: 517-527, 2014) を用いて責任遺伝子候補を決定した。これまでに複数の候補責任遺伝子が同定されたが、それらが本当に弱い熱ストレス応答に関与するか否かは、上記「研究を遂行する上で生じた問題点」で記載した理由によっていまだ結論を得ていない。

##### (2) 当初に予見していなかった新たな展開等によって得られた研究成果

上述の通り、500 ng/ml ANS、2 時間のプライミング処理は引き続いて負荷した 47°C、35 分熱ストレスによる生存率低下を回復させることができ、それは熱ストレス後の早期にバルクな蛋白質翻訳反応が開始されることによることを示した。翻訳再開された蛋白質のうち、特に獲得耐性に重要なものがあるのかどうかを明らかにする目的で、翻訳再開されたばかりの新規ペプチド鎖をピューロマイシンで標識後、これを精製して質量分析によって蛋白質を同定した。その結果、獲得耐性誘導に関わると考えられる複数の蛋白質候補を得ることができ、今後、その機能を詳細に検討したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 15件）

1. 著者名 Nagagaki Y, Kozakura Y, Mahandaran T, Fumoto Y, Nakato R, Shirahige K, Ishikawa F	4. 巻 29
2. 論文標題 Histone H3.3 chaperone HIRA renders stress-responsive genes poised for prospective lethal stresses in acquired tolerance	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mizumoto A, Yokoyama Y, Miyoshi T, Takikawa M, Ishikawa F, Sadaie M.	4. 巻 28
2. 論文標題 DHX36 maintains genomic integrity by unwinding G-quadruplexes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 694-708
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Hara T, Nakaoka H, Miyoshi T, Ishikawa F	4. 巻 18
2. 論文標題 The CST complex facilitates cell survival under oxidative genotoxic stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0289304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0289304	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Luqman-Fatah A, Watanabe Y, Uno K, Ishikawa F, Moran JV, Miyoshi T.	4. 巻 14
2. 論文標題 The interferon stimulated gene-encoded protein HEL22 inhibits human LINE-1 retrotransposition and LINE-1 RNA-mediated type I interferon induction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-35757-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa S, Ishikawa F.	4. 巻 19
2. 論文標題 Proteostasis failure and cellular senescence in long-term cultured postmitotic rat neurons	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 e13071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ace1.13071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Io Yamamoto, Hidenori Nakaoka, Masahiro Takikawa, Sanki Tashiro, Junko Kanoh, Tomoichiro Miyoshi, and Fuyuki Ishikawa	4. 巻 49
2. 論文標題 Fission yeast Stn1 maintains stability of repetitive DNA at subtelomere and ribosomal DNA regions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 10465-10476
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab767	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuhiro Okumura, Megumi Saito, Eriko Isogai, and Yuichi Wakabayashi	4. 巻 13
2. 論文標題 The Japanese Wild-Derived Inbred Mouse Strain, MSM/Ms in Cancer Research	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13051026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuhiro Okumura, Megumi Saito, and Yuichi Wakabayashi	4. 巻 70
2. 論文標題 A wild-derived inbred mouse strain, MSM/Ms, provides insights into novel skin tumor susceptibility genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 272-283
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1538/expanim.21-0017	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kaoru Yamawaki, Yutaro Mori, Hiroaki Sakai, Yusuke Kanda, Daisuke Shiokawa, Haruka Ueda, Tatsuya Ishiguro, Kosuke Yoshihara, Kazunori Nagasaka, Takashi Onda, Tomoyasu Kato, Tadashi Kondo, Takayuki Enomoto, and Koji Okamoto	4. 巻 521
2. 論文標題 Integrative analyses of gene expression and chemosensitivity of patient-derived ovarian cancer spheroids link G6PD-driven redox metabolism to cisplatin chemoresistance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letter	6. 最初と最後の頁 29-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2021.08.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Katsushi Kagaya, Naoto Noma-Takayasu, Io Yamamoto, Sanki Tashiro, Fuyuki Ishikawa, and Makoto T Hayashi	4. 巻 26
2. 論文標題 Chromosome instability induced by a single defined sister chromatid fusion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lsa.202000911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazuhiro Okumura, Megumi Saito, Yasuhiro Yoshizawa, Yuki Ito, Eriko Isogai, Kimi Araki, and Yuichi Wakabayashi	4. 巻 39
2. 論文標題 Pak1 maintains epidermal stem cells by regulating Langerhans cells and is required for skin carcinogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4756-4769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-1323-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Megumi Saito, Naoko Kagawa, Kazuhiro Okumura, Haruka Munakata, Eriko Isogai, Tatsuo Fukagawa, and Yuichi Wakabayashi	4. 巻 111
2. 論文標題 CENP-50 is required for papilloma development in the two-stage skin carcinogenesis model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2850-2860.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kagaya, K., Noma-Takayasu, N., Yamamoto, I., Tashiro, S., Ishikawa, F., and Hayashi, M.T.	4. 巻 3
2. 論文標題 Chromosome instability induced by a single defined sister chromatid fusion.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito, M., Kagawa, N., Okumura, K., Munakata, H., Isogai, E., Fukagawa, T., and Wakabayashi, Y.	4. 巻 111
2. 論文標題 CENP-50 is required for papilloma development in the two-stage skin carcinogenesis model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2850-2860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14533	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okumura, K., Saito, M., Yoshizawa, Y., Ito, Y., Isogai, E., Araki, K., and Wakabayashi, Y.	4. 巻 39
2. 論文標題 Pak1 maintains epidermal stem cells by regulating Langerhans cells and is required for skin carcinogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4756-4769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-1323-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito, M., Okumura, K., Isogai, E., Araki, K., Tanikawa, C., Matsuda, K., Kamijo, T., Kominami, R., and Wakabayashi, Y.	4. 巻 139
2. 論文標題 A Polymorphic Variant in p19Arf Confers Resistance to Chemically Induced Skin Tumors by Activating the p53 Pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1459-1469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.12.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 10件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 石川冬木
2. 発表標題 弱いストレスへの細胞応答
3. 学会等名 染色体研究のこれから（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 石川冬木
2. 発表標題 真核生物染色体末端テロメアの機能解明/ Elucidating the biological role of telomeres
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川冬木
2. 発表標題 腫瘍細胞の生体内環境適応
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川冬木
2. 発表標題 刻々変化する腫瘍環境を標的とした抗腫瘍療法
3. 学会等名 JSCO/ JCA/JSMO Joint Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川冬木
2. 発表標題 How to cure cancer
3. 学会等名 NTU-KU-UT mini virtual symposium on Cancer Biology & Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fuyuki Ishikawa
2. 発表標題 How to cure cancer
3. 学会等名 NTU-KU-UT mini virtual symposium on Cancer Biology & Medicine (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fuyuki Ishikawa
2. 発表標題 Targeting Ever-changing Niches
3. 学会等名 第58回日本癌治療学会学術総会 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川冬木
2. 発表標題 Cureを得るためには
3. 学会等名 第1回日本癌学会若手の会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Fuyuki Ishikawa
2. 発表標題 Power of Environmental Fluctuation
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（石川冬木学術総会長）（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fuyuki Ishikawa
2. 発表標題 Power of Environmental Fluctuation
3. 学会等名 Amgen Scholars Asia Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Shoma Ishikawa, and Fuyuki Ishikawa	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Nature Springer	5. 総ページ数 439
3. 書名 Aging Mechanisms II - Longevity, Metabolism, and Brain Aging	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	若林 雄一  (Wakabayashi Yuichi)  (40303119)	千葉県がんセンター（研究所）・がんゲノムセンター 実験 動物研究部・部長   (82504)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	岡本 康司  (Okamoto Koji)  (80342913)	帝京大学・先端総合研究機構・教授    (82606)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関