

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16824

研究課題名(和文)抗酸化物質の微小管作用メカニズムの解明と新たな臨床応用

研究課題名(英文)Elucidation of the Mechanism of Microtubule Action by Antioxidants and New Clinical Applications

研究代表者

高田 護 (Takada, Mamoru)

千葉大学・総合安全衛生管理機構・助教

研究者番号：90800392

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)：微小管阻害剤は未だに抗がん剤の主役の一つである。近年の免疫チェックポイント阻害剤の臨床試験の結果から、その併用薬として最も有用な薬剤は微小管阻害剤であることが明らかとなってきたが、新たな微小管阻害剤開発は進んでいない。本研究で注目するCMPD1の微小管阻害作用はTaxolの阻害効果の数百倍の強さがあり、動物実験においては有害事象が圧倒的に少ないこと、そのメカニズムとして、がん細胞においてはより強い染色体不安定性を誘導すること、休薬によるwash outが可能な薬剤であることに加えてがん細胞よりも正常細胞においてwash outされやすいことなどがわかってきた。今後臨床応用を目指していきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤である微小管阻害剤は最も歴史の古い薬剤のうちの一つであるが未だに抗がん剤の主役の一つである。近年の免疫チェックポイント阻害剤の臨床試験の結果から、微小管阻害剤はその併用薬として最も有用な薬剤であることがわかり、その重要性はますます高まっているにもかかわらず、新たな微小管阻害剤開発は進んでいない。本研究において、CMPD1は実臨床で最も広く使用されているTaxolと比較しても非常に有望な新たな微小管阻害剤であること、そしてCMPD1のがん細胞および正常細胞への作用メカニズムがわかってきた。臨床応用に向けて、今最も注目されている微小管阻害剤が及ぼす免疫への作用を明らかにし、開発を目指したい

研究成果の概要(英文)：Microtubule inhibitors are still one of the mainstays of anticancer drugs. Although the results of recent clinical trials of immune checkpoint inhibitors have revealed that microtubule inhibitors are the most useful agents for their combination, no new microtubule inhibitors have been developed. The microtubule inhibitory effect of CMPD1, which is the focus of this study, is several hundred times stronger than that of Taxol, has far fewer adverse events in animal experiments, induces stronger chromosomal instability in cancer cells as its mechanism, and is a drug that can be washed out by drug withdrawal. In addition, the drug is more likely to be washed out in normal cells than in cancer cells. We will aim for clinical application in the future.

研究分野：乳腺外科学

キーワード：微小管阻害 乳癌 抗酸化物質

1. 研究開始当初の背景

乳癌の臨床において微小管阻害剤はキードラッグであり、術前術後療法、進行再発乳癌治療においても微小管阻害剤なしには成立しない。また、食物から摂取する薬効成分による癌の生育が阻害されるという報告もみられるが、詳細なメカニズムに迫った報告は稀であり、いずれも臨床応用には至っていない。申請者は赤ワインなどに含まれる抗酸化物質レスベラトロールアナログである CMPD1 に細胞周期を止める作用があることを見出したことから本研究は開始された。CMPD1 には分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ2(MK2)阻害効果があるという報告がある一方、これを否定する報告もあり、まだ結論は出ていなかった。またそれ以上詳細なメカニズムを示した報告はなく、乳がんへの有効性を示した報告もなかった。

2. 研究の目的

本研究を通して CMPD1 がもたらす乳癌への影響を評価し、乳癌での臨床応用を目指すことを目的とした。乳がん診療を含む多くの子頸がんでも広く使用されている Taxol と比較し、CMPD1 の持つ特徴を明らかにすることで、微小管阻害効果がもたらす癌への影響を探ることも目的とした。

3. 研究の方法

CMPD1 を処理した細胞で微小管阻害以外の MK2 活性を測定する。また、放射性同位体を用いた in vitro アッセイで MK2 のリン酸化状態を CMPD1 暴露の有無で測定比較する。CMPD1 が直接微小管阻害をもたらしている場合、微小管とは直接結合するのか、結合する場合どの領域と結合するのかを評価する。

Soft agar Assay、Invasion Assay を行い、CMPD1 の非足場性増殖、転移能獲得についての表現系を評価する。低容量の CMPD1 を短時間、長時間暴露することで、乳癌細胞株の表現系がどのように変化するのかを評価する。

マウス乳がんモデルを用いて CMPD1 暴露が乳がんの発癌、浸潤の過程でどのような変化をもたらすのかを検討する。また組織免疫染色を用いて、Taxol と CMPD1 のもたらすがん細胞への影響の違いを検証する。

4. 研究成果

現在癌患者の予後の大幅な改善をもたらすと期待されている様々な分子標的薬剤は単剤で有効性を示すものは非常に限られており、細胞傷害性抗がん剤の有効性と大きな差がもたらされていないことが知られている。(Lancet Oncol. 2015 Oct;16(13):1324-34) 2020 年に進行再発トリプルネガティブ乳癌における免疫チェックポイント阻害剤の有効性が報告されたが、その中で微小管阻害剤のみが有意差を持って PFS を延長する薬剤であることが複数の臨床試験において示された (Pembrolizumab plus chemotherapy versus placebo plus chemotherapy for previously untreated locally recurrent inoperable

or metastatic triple-negative breast cancer (KEYNOTE-355): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 3 clinical trial. *Lancet*. 2020 Dec 5;396(10265):1817-1828. Atezolizumab plus nab-paclitaxel as first-line treatment for unresectable, locally advanced or metastatic triple-negative breast cancer (IMpassion130): updated efficacy results from a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2020 Jan;21(1):44-59.)

また、術前化学療法、術後補助化学療法の setting においても免疫チェックポイント阻害剤の併用薬として微小管阻害剤が最も良好な治療成績を示しており、臨床における微小管阻害剤の重要性はその登場以来最も高まっていると言っても過言ではない(Neoadjuvant atezolizumab in combination with sequential nab-paclitaxel and anthracycline-based chemotherapy versus placebo and chemotherapy in patients with early-stage triple-negative breast cancer (IMpassion031): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet*. 2020 Oct 10;396(10257):1090-1100. Pembrolizumab for Early Triple-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2020 Feb 27;382(9):810-821.)

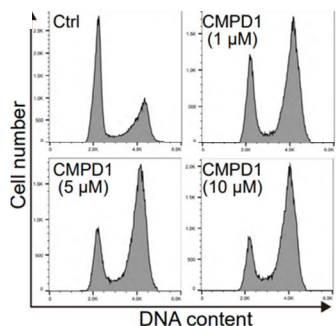
しかし薬剤開発はその Strategy が大きく変化し、新たな微小管阻害剤は Eribulin を最後に開発が停止している。

また腫瘍特異性が十分でないため、微小管阻害剤は主に化学療法誘発性末梢神経障害 (chemotherapy-induced peripheral neuropathy)を誘発する。がんサバイバーが増加している現状において、微小管阻害剤の正常細胞への傷害性は患者の quality of life(QOL)に大きく影響するだけでなく、ときに化学療法の減量や休薬、中止をもたらし、原疾患の治療の障害となっている。(Hershman DL et al., Association between patient reported outcomes and quantitative sensory tests for measuring long-term neurotoxicity in breast cancer survivors treated with adjuvant paclitaxel chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat* 2011;125:767-774.)

本研究では、CMPD1 が細胞種によらず SAC の活性化を通じて顕著なプロメタフェーズ停止を誘導することを明らかにした。また、CMPD1 が微小管の脱重合を引き起こすことを、高時空解像度ライブセルイメージングにより明らかにした。マウス異種移植モデルを用いて、CMPD1 が一般的な臨床化学療法薬であるタキソールよりも有意に高い腫瘍増殖抑制効果を示すことを明らかにした。さらに、CMPD1 は、in vitro および in vivo の両方で、がん細胞の移動と浸潤を抑制することができることを見いだした。さらに、がん細胞は正常細胞と比較して、CMPD1 に対して有意に感受性が高いことも明らかにした。このように、本研究の発見は、CMPD1 が新規の強力な抗がん剤となる可能性を示している。

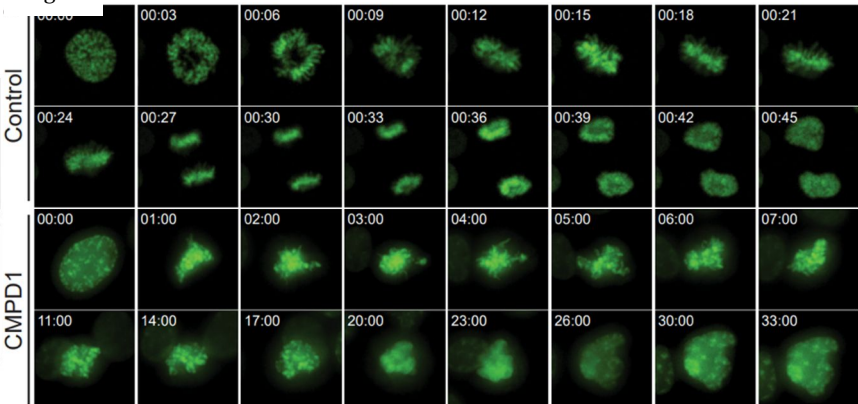
CMPD1 は、グリオブラストーマや胃がん細胞株で G2/M arrest を誘導することが報告されている^{33,34}。CMPD1 による

Fig.1 G2/M arrest が特定のがん



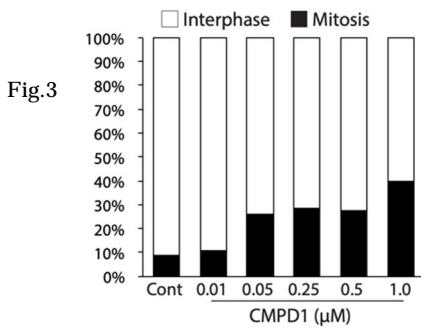
細胞種でのみ起こるかどう

Fig.2



かを検証するため、非形質転換網膜上皮細胞株 RPE1 を 1、5、10 μM の CMPD1 で 24 時間処理し、

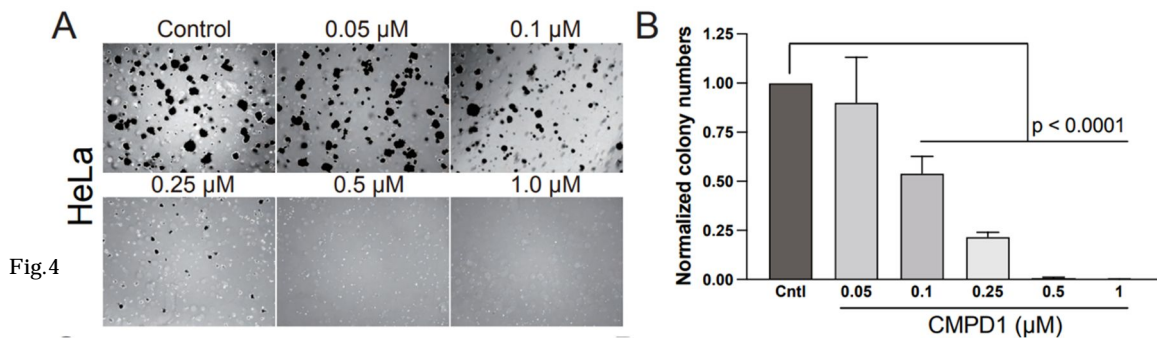
蛍光活性化セルソーティング (FACS) 分析を行った。FACS 解析の結果、RPE1 細胞は CMPD1 処理により G2/M 期に停止しており、グリオプラストーマや胃がん細胞におけるこれまでの結果と一致していた (Fig. 1)



CMPD1 によって細胞が G2/M 期内のどの細胞周期段階に停止したかをさらに明らかにするために、H2B-EGFP を安定発現させた RPE1 細胞の CMPD1 処理後の細胞周期進行を観察するために、長時間ライブセル・イメージングを実施した。その結果、CMPD1 存在下で細胞は有糸分裂に入ることができ、CMPD1 が G2 期やプロフェーズでの細胞周期停止を誘導しないことがわかった。次に、CMPD1 処理細胞

とコントロール (モック処理) 細胞について、それぞれ有糸分裂の継続時間を測定した。核膜崩壊 (NEBD) からアナフェーズ開始 (コントロール) または有糸分裂終了 (細胞が核および細胞質分裂せずに有糸分裂を終了する不完全な有糸分裂, mitotic slippery を示した場合) までの時間を有糸分裂期間と定義した。その結果、CMPD1 処理により、重度のプロメタフェーズ停止が引き起こされることがわかった。0.5-10 μM CMPD1 存在下では、平均有糸分裂持続時間は 9 時間以上であったが、対照細胞では 25 分であった (Fig. 2)。並行して、2 μM CMPD1 処理後 12 時間で固定した RPE1 細胞を用いて、有糸分裂指数も測定した。ライブセルイメージングの結果と同様に、CMPD1 処理細胞の有糸分裂指数は、対照細胞よりも有意に高かった (Fig.3)。このことから、CMPD1 は低用量でも十分に有糸分裂の停止を誘導できることが示唆された。

CMPD1 は微小管を脱重合することから、CMPD1 が癌細胞の増殖を抑制する可能性が考えられた。この仮説を検証するために、まず、HeLa 細胞と MDA-MB-231 細胞の両方を異なる濃度の CMPD1 で処



理し、固定に依存しない増殖能を評価した。CMPD1 で処理すると、ゲル内の細胞のコロニー数が用量依存的に減少し、500 nM の CMPD1 で両癌細胞株のコロニー形成を完全に阻害することができた。 (Fig. 4A,4B)

次に、CMPD1 が in vivo で腫瘍の成長を阻害する能力があるかどうかを検討した。この疑問に答えるため、本研究では MDA-MB-231 異種移植マウスモデルを使用した。つまり、SCID マウスに 1×10^6 個の MDA-MB-231 細胞を移植し、そして腫瘍移植後 30 日から 2 日ごとに、control、CMPD1、またはタキソールを投与した。

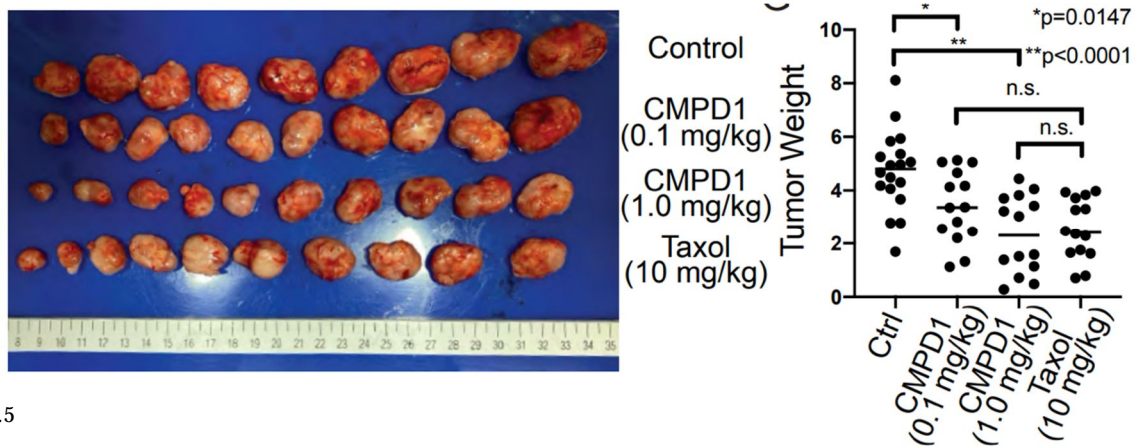


Fig.5

腫瘍の体積は、2 日ごとに追跡した。57 日目に腫瘍を摘出し、その重量を測定した。CMPD1 投与は、腫瘍の大きさを有意に減少させた (Fig. 5)。驚くべきことに、タキソールによる治療とタキソールと比較してきわめて低用量の CMPD1 による治療の間で、腫瘍の大きさに有意差は見られなかった。このことは、CMPD1 が腫瘍縮小を促進する高い効力を有する可能性を示唆している。また、タキソールを投与した 2 匹のマウスは実験中に死亡したが、CMPD1 を投与したマウスは全て生存していた。以上のことから、CMPD1 は in vitro と in vivo の両方で腫瘍の成長を抑制する能力があり、がん治療の標準的な臨床薬の一つであるタキソールよりも高い効力を持つ可能性があることがわかった。

今後は CMPD1 が正常細胞に与える影響と腫瘍細胞に与える作用の違いを追求し、臨床応用を目指していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sugiura Kensuke, Mishima Takashi, Takano Shigetsugu, Yoshitomi Hideyuki, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takada Mamoru, Miyazaki Masaru, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 189
2. 論文標題 The Expression of Yes-Associated Protein (YAP) Maintains Putative Cancer Stemness and Is Associated with Poor Prognosis in Intrahepatic Cholangiocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 1863 ~ 1877
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2019.05.014	査読の有無 無
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 Zurlo Giada, Liu Xijuan, Takada Mamoru, Fan Cheng, Simon Jeremy M., Ptacek Travis S., Rodriguez Javier, von Kriegsheim Alex, Liu Juan, Locasale Jason W., Robinson Adam, Zhang Jing, Holler Jessica M., Kim Baek, Zik?nov? Marie, Bierau J?rgen, Xie Ling, Chen Xian, Li Mingjie, Perou Charles M., Zhang Qing	4. 巻 10
2. 論文標題 Prolyl hydroxylase substrate adenylosuccinate lyase is an oncogenic driver in triple negative breast cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13168-4	査読の有無 無
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 Nakagawa Ayako, Fujimoto Hiroshi, Nagashima Takeshi, Sangai Takafumi, Takada Mamoru, Masuda Takahito, Teranaka Ryotaro, Ota Satoshi, Matsushima Jun, Akita Shinsuke, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 27
2. 論文標題 Histological features of skin and subcutaneous tissue in patients with breast cancer who have received neoadjuvant chemotherapy and their relationship to post-treatment edema	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 77 ~ 84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12282-019-00996-x	査読の有無 無
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 Fujimoto Hiroshi, Shiina Nobumitsu, Nagashima Takeshi, Sangai Takafumi, Sakakibara Junta, Takada Mamoru, Teranaka Ryotaro, Takishima Haduki, Kawasaki Yohei, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 121
2. 論文標題 Oncoplastic breast conserving surgery using chest wall perforator flaps: Three dimensional quantitative analysis of the percentage of breast volume excised and changes over time in flap volume	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 216 ~ 223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jso.25809	査読の有無 無
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 Masuda Takahito, Fujimoto Hiroshi, Teranaka Ryotaro, Kuroda Masayuki, Aoyagi Yasuyuki, Nagashima Takeshi, Sangai Takafumi, Takada Mamoru, Nakagawa Ayako, Kubota Yoshitaka, Yokote Koutaro, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 180
2. 論文標題 Anti-HER2 antibody therapy using gene-transduced adipocytes for HER2-positive breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breast Cancer Research and Treatment	6. 最初と最後の頁 625 ~ 634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10549-020-05581-x	査読の有無 無
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 Liao Chengheng, Zhang Yang, Fan Cheng, Herring Laura E., Liu Juan, Locasale Jason W., Takada Mamoru, Zhou Jin, Zurlo Giada, Hu Lianxin, Simon Jeremy M., Ptacek Travis S., Andrianov Victor G., Loza Einars, Peng Yan, Yang Huanghe, Perou Charles M., Zhang Qing	4. 巻 10
2. 論文標題 Identification of BBOX1 as a Therapeutic Target in Triple-Negative Breast Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 1706 ~ 1721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2159-8290.CD-20-0288	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 高田護
2. 発表標題 Discovery of novel chemotherapeutic agents and identification of new mechanisms of action
3. 学会等名 日本癌学会 (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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			
米国	ウィスコンシン大学	ノースダコタ大学		