

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03151

研究課題名(和文) がん幹細胞性の維持機構は創薬標的になるか？

研究課題名(英文) Stemness as a target for anti-cancer drug development

研究代表者

大浜 剛 (Ohama, Takashi)

山口大学・共同獣医学部・准教授

研究者番号：50579018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：近年、がんの再発・転移・治療抵抗性の原因として「がん幹細胞」の重要性が明らかになり、これを標的とした創薬が注目されている。本研究では、タンパク質脱リン酸化酵素PP2Aとその阻害タンパク質SETを中心に、がん幹細胞が幹細胞性を維持する分子機構の詳細を明らかにするとともに、SETとPP2Aのタンパク質間結合を標的とした新たな創薬戦略の可能性を解析した。その結果、がんにおいてSET発現が上昇する分子機構の解明や、SETとPP2Aの結合を解離させる低分子化合物の同定などの成果が得られた。一連の研究結果は、プロジェクト期間中に3報の原著論文として発表され、現在2つの研究課題についても発表準備中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、がん幹細胞の幹細胞性維持機構を脱リン酸化酵素の活性阻害機構の解明を通して明らかにするものである。リン酸化酵素キナーゼと比較して脱リン酸化酵素ホスファターゼの研究は遅れており、キナーゼ阻害剤は分子標的抗がん剤として幅広く用いられているが、同じベクトルの作用を示すホスファターゼ活性化剤は、未だに上市されていない。ホスファターゼ活性化薬は、キナーゼ阻害剤との相加・相乗効果や、キナーゼ阻害剤に抵抗性または耐性を獲得した症例に対する効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Recently, the importance of "cancer stem cells" as a cause of cancer recurrence, metastasis, and resistance to treatment has become clear, and drug discovery targeting these cells has attracted attention. In this study, we focused on the protein phosphatase PP2A and its inhibitor protein SET to elucidate the molecular mechanisms by which cancer stem cells maintain their stemness, and to analyze the possibility of novel drug discovery strategies targeting the protein-protein interaction between SET and PP2A. As a result, they elucidated the molecular mechanism by which SET expression is upregulated in cancer and identified small molecule compounds that dissociate the binding between SET and PP2A. A series of research results were published in three original papers during the project period, and two more research projects are currently in preparation for publication.

研究分野：薬理学

キーワード：Protein Phosphatase 2A がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

がんは長らく日本人の死因第一位であるが、外科的切除可能な初期のがんを除いて、未だに根治的な治療は困難である。また、小動物臨床においても、がんは成犬の死因第一位であり、ヒトと比較して早期発見が困難であることから根治的治療法の開発は喫緊の課題である。近年、がんの再発・転移・治療抵抗性の原因として「がん幹細胞」の重要性が明らかになり、がん幹細胞を標的とした創薬が注目されている。がん幹細胞は、正常細胞の幹細胞と同様に自己複製能と多分化能を持つ小集団であり、わずかに生き残ったがん幹細胞であってもがん組織を再構築することが可能である。しかし、がん幹細胞が幹細胞性を維持する分子機構の詳細は明らかになっておらず、創薬標的も同定されていない。

本研究課題開始の前年、申請者は、がんの幹細胞性の維持に関する新たな分子機構を報告していた (Enjoji S et al. Mol. Can. Res. 2018)。すなわち、がん幹細胞ではがん増悪因子 SET が Protein Phosphatase 2A (PP2A) と直接結合して阻害することで、E2F1 タンパク質を安定化し、Nanog 等の幹細胞性維持に関わる転写因子の発現を上昇させている (図 1)。ヒト胃癌患者において、SET 発現が高い群は、低い群に比べて顕著に生存率が低かったことから、SET によるがん幹細胞性の上昇が予後を悪化させると考えられる。

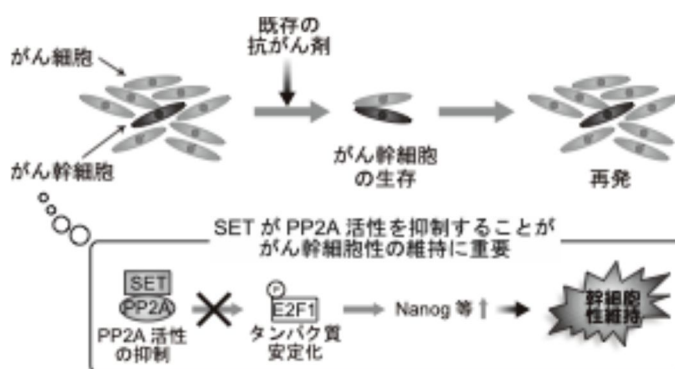


図 1 がん幹細胞が引き起こす治療抵抗性と幹細胞性の維持機構

以上の背景から、SET/PP2A のタンパク質間結合 (PPI) が、がん幹細胞性を低下させる新たな創薬標的となることが期待されるが、創薬へと発展させるためには、SET が PP2A 活性を抑制する分子機構の詳細が明らかになっていない、SET/PP2A の PPI を効率良く阻害する「SET 標的薬」が同定されていない、がん幹細胞性を標的とした薬剤は既存の抗がん剤との併用が必要であると考えられるが、SET 抑制と相加相乗効果を示す抗がん剤を明らかにできていない、などの課題を解決する必要がある。

2. 研究の目的

そこで本研究課題では、「がん幹細胞性の維持機構は創薬標的となるか?」という大きな問いに対して、SET/PP2A 軸に関する 3 つの課題に取り組むことで、答えを得ることを目的として開始された。また、PP2A と同じ type2A タンパク質脱リン酸化酵素ファミリーに属する PP6 についても、がん悪性化との関与を示すデータが得られたことから、研究計画を拡大して解析を行った。具体的には、以下の 4 つの課題に取り組んだ。

課題 1 : SET はどのようにがん幹細胞性の維持に寄与するのか?

申請者は、SET/PP2A/E2F1 軸が、胃癌などのがん幹細胞性の維持に寄与することを明らかにしたが、同時に E2F1 非依存的な機構の存在も報告している。SET がどのように PP2A を阻害するか、E2F1 非依存的な機構はなにかを解析し、がん幹細胞性の維持機構への理解を深める。

課題 2 : SET/PP2A の結合は低分子化合物で阻害できるか?

一般に、タンパク質間結合を低分子化合物で阻害することは困難であるとされている。しかし申請者は、SET と PP2A の結合をアロステリック (酵素活性部位以外に結合して作用する) に阻害する低分子化合物の候補を得ており、この問いへのポジティブな答えを追求する。

課題 3 : がん幹細胞性標的薬はどのような抗がん剤と併用すると効果的か?

がん幹細胞性を標的とした薬剤は、細胞増殖が盛んな細胞には影響を与えない。したがって、既存の抗がん剤との併用が必要であるが、どのような抗がん剤との併用が効果的かは明らかになっていない。

課題4：がんにおいて、PP6 発現はなぜ上昇し、どのような効果をもたらしているのか？
一部のがん種では PP6 発現が上昇していることが知られている。しかし、PP6 発現がなぜ上昇するのか、また増加した PP6 がどのようにがんの発症や悪性化に寄与しているかは明らかになっていない。

3. 研究の方法

課題1：各種がん細胞株において SET 発現を抑制した際のシグナル伝達機構の差を、transcriptome や生化学的手法により解析した。

課題2：生細胞および in vitro で、SET と PP2A の結合・解離を発光的に解析する系（発光 PPI 解析系）を樹立した。化合物スクリーニングで得たヒット化合物について、構造最適化を行った。

課題3：パブリックデータおよび課題1の transcriptome 解析の結果から、SET 発現抑制と相加・相乗効果を発揮すると考えられる阻害剤について、薬理的・生化学的手法で効果を検証した。

4. 研究成果

成果1：がんで SET 発現が上昇する分子機構の一端を解明した。

SET 発現の上昇は様々ながん細胞で報告されているが、なぜ SET 発現が上昇するのかは完全には明らかになっていなかった。タンパク質の分解機構にはおおきくユビキチン・プロテアソーム系とオートファジーの2つの経路が存在する。申請者は、薬理的および遺伝学的にこれらの分解経路を阻害することで、SET タンパク質レベルがオートファジーによって制御されていることを明らかにした。詳細な分子機構を解析したところ、SET 結合タンパク質 SETBP1 の転写が活性化することで発現が上昇した SETBP1 が、SET を選択的オートファジーから保護していることが明らかになった。

一連の研究成果は「The protein level of the tumor-promoting factor SET is regulated by cell density」として2022年にThe Journal of Biochemistryに掲載された。

成果2：SET によるがん幹細胞性維持の新たな分子機構を明らかにした。

申請者はこれまでに、様々ながん細胞株で SET 発現を抑制してシグナル伝達機構への影響を解析してきた。これまで解析したほとんどの細胞株で、SET 発現抑制は c-Myc もしくは E2F1 のタンパク質分解を誘導することで幹細胞性を低下させた。一方で、c-Myc にも E2F1 にも影響せず幹細胞性が低下する細胞株も存在した。そこで、この細胞株で transcriptome 解析を行ったところ、SET 発現抑制はキナーゼ X の下流のシグナルとエピジェネティックな制御に関係するタンパク質 Y の機能を抑制することが明らかになった。SET 発現抑制はタンパク質 Y のタンパク質安定性を低下させたが、興味深いことにこの現象は遺伝子 Z が欠損した細胞株に限定された。本研究結果は、現在論文投稿準備中である。

成果3：SET/PP2A の PPI を阻害する低分子化合物を同定した。

申請者は、発光 PPI 解析系と化合物ライブラリーを用いたスクリーニングから、SET と PP2A を解離させるヒット化合物を得ていた。本研究課題では、化合物の構造最適化を行い、活性と特異性の向上を行った。具体的には、in vitro でのヒット化合物の IC₅₀ は 5 μM 程度であったが、本研究の中で IC₅₀ が 50 nM 程度の化合物を得ることに成功した。この化合物は、血液がん細胞株の増殖関連シグナルを PP2A 依存的に阻害し、抗がん効果を発揮した。

成果4：SET 発現抑制と相乗効果を示す阻害剤を同定した。

膵臓がんにおいて、SET 発現抑制と併用効果を示す阻害剤を同定するため、薬物依存的に SET 発現が低下する膵臓がん細胞株を樹立した。Transcriptome 解析とパブリックデータから、タンパク質 A の関与を予想し、A に対する阻害剤 B と SET 発現抑制の併用効果を検討したところ、相乗効果を示すことが明らかになった。しかし、タンパク質 A の発現を抑制しても同様の効果は認められず、SET 発現抑制との併用効果は阻害剤 B の主作用によるものではないと予測された。現在、阻害剤 B と SET 発現抑制の併用効果の分子機構を解析している。

成果5：PP6 は選択的オートファジーによって分解を受けることを明らかにした。

がんにおいて PP6 発現が上昇する分子機構を明らかにするため、薬理的および遺伝学的にユビキチン・プロテアソーム系およびオートファジーによる分解を阻害したところ、PP6 タンパク質の分解はオートファジーによって制御されていることが明らかになった。詳細な解析の結果、これには p62 依存的な選択的オートファジーが関与していた。胃がん発症マウスでは、正常組織と比べてがん組織ではオートファジー活性が低く、PP6 タンパク質が蓄積していた。正常およびがん組織の tissue microarray を用いた組織学的な解析から、オートファジー活性と PP6 タンパク質量に負の相関関係がある可能性が示された。

一連の研究成果は「Autophagy regulates levels of tumor suppressor enzyme protein phosphatase 6」として2020年にCancer Scienceに掲載された。

成果6：PP6がBeclin1/VPS34複合体を標的としてオートファジー活性を抑制することを明らかにした。

増加したPP6が細胞内シグナルに与える影響を明らかにするため、PP6発現抑制の影響を解析したところ、PP6はオートファジーの活性を抑制することが明らかになった。Beclin1/VPS34複合体はオートファジー誘導において重要な役割を果たす。詳細な解析の結果、PP6はBeclin1と結合して、VPS34との複合体形成を阻害することが明らかになった。興味深いことに、この作用はPP6の脱リン酸化酵素活性に非依存的であった。

一連の研究成果は「Protein phosphatase 6 dissociates the Beclin 1/Vps34 complex and inhibits autophagy」として、2021年にBiochemical and Biophysical Research Communicationsに掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Kohyanagi Naoki, Kitamura Nao, Tanaka Keiko, Mizuno Takuya, Fujiwara Nobuyuki, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 171
2. 論文標題 The protein level of the tumour-promoting factor SET is regulated by cell density	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 295 ~ 303
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab125	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 Fujiwara Nobuyuki, Shibutani Shusaku, Sakai Yusuke, Watanabe Toshio, Kitabayashi Issay, Oshima Hiroko, Oshima Masanobu, Hoshida Hisashi, Akada Rinji, Usui Tatsuya, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 111
2. 論文標題 Autophagy regulates levels of tumor suppressor enzyme protein phosphatase 6	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4371 ~ 4380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14662	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 Fujiwara Nobuyuki, Shibutani Shusaku, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 552
2. 論文標題 Protein phosphatase 6 dissociates the Beclin 1/Vps34 complex and inhibits autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 191 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.136	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Kohyanagi N, Kitamura N, Tanaka K, Mizuno T, Fujiwara N, Ohama T, Sato K
2. 発表標題 High cell density enhances the protein expression level of SET
3. 学会等名 The 6th International Symposium Association of Japan-Indonesia Veterinary Education 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kohyanagi N, Kitamura N, Fujiwara N, Ohama T, Sato K
2. 発表標題 SET/I2PP2A protein is up-regulated at high cell density
3. 学会等名 The 23rd Korea-Japan Joint Seminar on Pharmacology (23rd KJJSP) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 幸柳尚規、北村菜央、田中慶子、藤原信行、大浜剛、佐藤晃一
2. 発表標題 腫瘍促進因子SETのタンパク質発現レベルは細胞密度により制御される
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 幸柳尚規、北村菜央、田中慶子、藤原信行、大浜剛、佐藤晃一
2. 発表標題 細胞密度の上昇によりがん促進因子SETとSETBP1のタンパク質発現量の増加する
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大浜剛
2. 発表標題 The role of PP2A inhibitory protein SET in cancer and its possibility as a drug target.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takashi Ohama
2. 発表標題 The dual role of PME-1: PP2A inhibitory protein and methyl-esterase
3. 学会等名 The 14th International Conference on Protein Phosphatases (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大浜剛
2. 発表標題 PP2A阻害タンパク質SETを標的とした創薬への基盤的研究
3. 学会等名 第94回日本生化学大会 名古屋国際会議場 (招待講演)
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
研究分担者	大松 勉 (Omatsu Tsutomu) (60455392)	東京農工大学・農学部・准教授 (12605)	

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
---------	---------