

令和 5 年 4 月 6 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03407

研究課題名(和文) がん幹細胞を標的とした革新的な抗がん剤の創製

研究課題名(英文) Development of anti-cancer drug targeting cancer stem cells

研究代表者

檜井 栄一 (HINOI, Eiichi)

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70360865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：悪性脳腫瘍の膠芽腫(Glioblastoma=GBM)は、あらゆるがんの中でも最も予後不良であり、5年生存率が10%以下の難治性がんである。近年、グリオーマ幹細胞(Glioma-initiating cell=GIC)などの微量の治療抵抗性細胞群がGBMの悪性化進展や抗がん剤に対する抵抗性を担うことが示されている。本研究では、SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 (SMURF2) のリン酸化修飾が、GICの幹細胞性維持や腫瘍形成に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオーマだけでなく急性骨髄性白血病、乳がんや前立腺がんなどにおいても、その病態とがん幹細胞特性に緊密な関連性があることが報告されている。本研究の遂行によって、「GICの幹細胞性調節機構の解明」によりGBMのような難治性がんに対する新規治療標的が明確になるだけでなく、がん幹細胞制御および、がん進展制御への包括的な理解が進み、グリオーマだけでなく、がん幹細胞が関与する様々ながんに対する根本的治療法開発への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma (GBM) is the most common high-grade malignant glioma in adults. Emerging evidence indicates that glioma-initiating cell (GICs) contribute to glioblastoma initiation, progression and recurrence owing to their self-renewal capacity and tumorigenicity. SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 (SMURF2) belongs to the E3 ubiquitin ligase family. We have previously demonstrated that phosphorylation of SMURF2 at Thr249 activates its E3 ubiquitin ligase activity. Here, we show that the importance of SMURF2Thr249 phosphorylation in maintenance of stemness and tumorigenicity of GICs, and a potential target for GIC-directed therapy.

研究分野：薬理学

キーワード：がん幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 (SMURF2) は、E3ユビキチンリガーゼの一種である。SMURF2は、TGF- β シグナルをはじめとする多様なシグナルを厳密に制御することで、細胞の増殖や浸潤、自己複製、遊走などの細胞機能を調節することが知られている。一方、SMURF2のE3ユビキチンリガーゼ活性は、様々なシグナルにより調節されるが、リン酸化などの翻訳後修飾によっても調節される。我々は、SMURF2の新規リン酸化サイト(249番目のスレオニン)を発見し、そのリン酸化状態とE3ユビキチンリガーゼ活性が正の相関性を示すことを見出した。

グリオーマは、原発性悪性脳腫瘍の約80%を占め、WHOの基準により4段階の悪性度(Grade I-IV)に分類される。グリオーマの一種である膠芽腫(Glioblastoma; GBM)は、最も悪性度が高い致死性がんであり、Grade IVに分類される。近年、グリオーマ幹細胞(Glioma-initiating cells=GICs)などの微量の治療抵抗性細胞群が、GBMの悪性化進展や抗がん剤に対する抵抗性を担うことが示されている。すなわち、GICsを標的とし、GICsの根絶を目指す治療戦略は、GBMに対する新規治療法開発に貢献可能であることが示唆される。

2. 研究の目的

SMURF2は、がん関連タンパク質の活性調節も担っていることが知られており、がんの発症・進展における重要性が示唆されている。しかしながら、GICsの幹細胞性維持機構及び腫瘍形成能、グリオーマの病態形成におけるSMURF2およびSMURF2Thr249のリン酸化修飾の役割やその詳細なメカニズムは明らかになっていない。したがって本研究では、SMURF2およびSMURF2Thr249のリン酸化修飾によるグリオーマ進展制御メカニズムの解明、SMURF2Thr249のリン酸化修飾を担う因子とキナーゼの同定、SMURF2Thr249のリン酸化修飾を標的とした新規グリオーマ治療薬の探索を実施し、実臨床への応用に向けた「がん幹細胞を標的とした革新的な抗がん剤開発」の基盤確立を試みた。

3. 研究の方法

(1) レンチウイルスベクターを用いてshSMURF2およびSMURF2T249A変異体をGICsに導入し、細胞の表現型を観察した。幹細胞培地(GlutaMAX、B27 supplement minus vitamin A、EGF、FGFを加えたDMEM/F12)で培養し、tumorshpere formation assayおよびin vitro limiting dilution assayを行い、GICsの幹細胞性を評価した。

(2) 雌性ヌードマウス(BALB/cSlc-nu/nu)を用いてGBMモデルを作製した。マイクロドリルで頭蓋穿孔を開け、硬膜下の深さ3 mmにGICsを 5×10^4 個移植した。モデルマウスを経時的に観察し、体重の20%以上の減少あるいは神経系の症状が認められた時点をエンドポイントとし、マウスの生存期間を観察した。また、摘出した脳を組織学的に解析した。

(3) pSMURF2Thr249ペプチド(RTHLH-Thr(P03H2)-PPDLPEGYC)を基質としたホスファターゼアッセイおよびモリブドリン酸錯体形成による脱リン酸基の呈色反応により、化合物ライブラリーの一次スクリーニングを実施した。化合物ライブラリーは、東京大学創薬機構のValidate compound libraryを用いた。

4. 研究成果

(1) GBM患者由来GICsでshSMURF2によりSMURF2発現を抑制し、GICsの幹細胞性維持機構におけるSMURF2の機能的役割を検討した。SMURF2ノックダウン群ではスフィア数が増加し、GICsの自己複製能が増強した。次にGBMモデルマウスを用いて、SMURF2がGICsの腫瘍形成能に与える影響を検討した。SMURF2をノックダウンしたGICsを移植した群では、コントロール移植群と比較して、生存期間が著明に短縮し、腫瘍体積が増加した。以上の結果から、GICsの自己複製能と腫瘍形成能においてSMURF2が重要役割を示すことが明らかとなった。

(2) SMURF2Thr249のリン酸化修飾が、GICsの幹細胞性維持に関与しているかをin vitroで検討した。249番目のスレオニンをアラニンで置換したリン酸化不活性化体(SMURF2T249A)を作製し、GICsに導入した。その結果、SMURF2T249A群は、スフィア形成能と自己複製能が増強した。次に、GICsの腫瘍形成能におけるSMURF2Thr249のリン酸化の影響をin vivoで検討した。SMURF2T249A群において、GBMモデルマウスの生存期間は著明に短縮し、腫瘍体積の増大が観察された。以上の結果より、SMURF2Thr249のリン酸化修飾は、GICsの自己複製能と腫瘍形成能を制御する可能性が示唆された。

(3) GICsにおけるSMURF2Thr249のリン酸化修飾の下流を探索するため、TGF- β /SMAD経路との関連性を検証した。TGFB receptor1(TGFB R1)とTGFB R2のタンパク質発現量とSMAD2/3のリン酸化はSMURF2T249A群で有意に増加した。次に、GICsにおいてSMURF2Thr249のリン酸化がTGFB R

タンパク質分解を制御しているか検討するため、タンパク質合成阻害剤を GICs に暴露し、TGFBR1 と TGFBR2 のタンパク質発現量を評価した。SMURF2T249A 群では、コントロール群と比較して、TGFBR1 と TGFBR2 のタンパク質分解が有意に抑制された。さらに、内因性の TGFBR1 のコピキチン化は、SMURF2T249A 群では有意に抑制された。すなわち、SMURF2Thr249 のリン酸化により SMURF2 の E3 コピキチンリガーゼ活性が上昇し、TGFBR1 のタンパク質分解が亢進することで、TGF- β SMAD2/3 シグナルが抑制されることが示された。

(4) TGFBR1 の分解抑制による TGF- β シグナルの活性化が、SMURF2Thr249 のリン酸化による GICs の自己複製能と腫瘍形成能の制御に関与するか検討した。GICs における SMURF2Thr249 のリン酸化不活性化によるスフィア形成能の増強が、TGFBR1 ノックダウンにより有意に減弱した。さらに、GICs における TGFBR1 ノックダウンは、SMURF2T249A 群で短縮した GBM モデルマウスの生存期間をレスキューし、有意な延長をもたらした。以上の結果から、GICs の自己複製能と腫瘍形成能を制御する TGFBR1 のタンパク質分解の調節において、SMURF2Thr249 のリン酸化修飾が重要であることが示された。

(5) SMURF2Thr249 のリン酸化修飾を調節する因子とキナーゼの同定を行った。GICs に様々な幹細胞調節因子の組換えタンパク質を添加し、pSMURF2Thr249 抗体を用いて経時的にリン酸化レベルを測定した。その結果、TGF- β が SMURF2Thr249 のリン酸化レベルを著明に低下させることが明らかになった。さらに、*in silico* 解析により、SMURF2Thr249 のリン酸化調節を担う候補キナーゼを探索し、過剰発現系やドミナントネガティブ体導入による絞り込みを行ったところ、特定の CDK キナーゼファミリーが候補因子として同定された。以上の結果から、GICs において TGF- β および CDK ファミリーが SMURF2Thr249 のリン酸化調節因子であることが示された。

(6) SMURF2Thr249 のリン酸化修飾を調節する低分子化合物の探索を行い、同化合物の GICs での薬理学的効果を検証した。東京大学創薬機構の化合物ライブラリーを用いて SMURF2Thr249 の脱リン酸化を阻害する化合物を探索したところ、活性値が 50% を下回る化合物を 7 種類獲得した。さらに SMURF2Thr249 のリン酸化に対する効果および、GICs 幹細胞性に対する効果を指標に、二次スクリーニングと三次スクリーニングを実施したところ、すべての条件をクリアする化合物を 1 種類 (化合物 A) 獲得した。以上の結果から、低分子化合物 A が SMURF2Thr249 の脱リン酸化および幹細胞性の抑制を介した GICs を標的とした GBM 治療薬候補となる可能性が示された。

以上の結果により、SMURF2Thr249 のリン酸化が、GICs の根絶を指向した治療法開発における新規創薬標的となることが期待される。近年、グリオーマだけでなく急性骨髄性白血病、乳がんや前立腺がんなどにおいても、その病態とがん幹細胞特性に緊密な関連性があることが報告されている。本研究の遂行によって、「GIC の幹細胞性調節機構の解明」により GBM のような難治性がんに対する新規治療標的が明確になるだけでなく、がん幹細胞制御および、がん進展制御への包括的な理解が進み、グリオーマだけでなく、がん幹細胞が関与する様々ながんに対する根本的治療法開発への展開が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hiraiwa M, Fukasawa K, Iezaki T, Sabit H, Horie T, Tokumura K, Iwahashi S, Murata M, Kobayashi M, Suzuki A, Park G, Kaneda K, Todo T, Hirao A, Nakada M, Hinoi E.	4. 巻 5
2. 論文標題 SMURF2 phosphorylation at Thr249 modifies glioma stemness and tumorigenicity by regulating TGF-receptor stability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun. Biol.	6. 最初と最後の頁 22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-02950-0	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 Fukasawa K, Kadota T, Horie T, Tokumura K, Terada R, Kitaguchi Y, Park G, Ochiai S, Iwahashi S, Okayama Y, Hiraiwa M, Yamada T, Iezaki T, Kaneda K, Yamamoto M, Kitao T, Shirahase H, Hazawa M, Wong RW, Todo T, Hirao A, Hinoi E.	4. 巻 -
2. 論文標題 CDK8 maintains stemness and tumorigenicity of glioma stem cells by regulating the c-MYC pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncogene	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） 10.1038/s41388-021-01745-1	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4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 紅音、深澤 和也、堀江 哲寛、村田 美怜、小林 正輝、檜井 栄一
2. 発表標題 ERK5はSTAT3シグナルを介してグリオーマ幹細胞の幹細胞性および腫瘍形成能を制御する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鈴木 紅音、深澤 和也、堀江 哲寛、村田 美怜、小林 正輝、檜井 栄一
2. 発表標題 ERK5はSTAT3経路を介してグリオーマ幹細胞の幹細胞性および腫瘍発生能を制御する
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 深澤和也、檜井栄一
2. 発表標題 グリオブラストーマの新規治療標的としてのCDK8/c-MYC経路
3. 学会等名 日本薬学会第141年会(広島)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤和也、檜井栄一
2. 発表標題 CDK8はc-MYCを介してグリオーマ幹細胞の幹細胞性および腫瘍発生能を制御する
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会(札幌)
4. 発表年 2021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