

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07617

研究課題名(和文) がん特異的ROS制御/中心体チェックポイントの解明と副作用のないがん治療の開発

研究課題名(英文) Development of cancer treatment without side effects through elucidation of cancer-specific ROS control/centrosome checkpoint.

研究代表者

加藤 順也 (Kato, Jun-ya)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授

研究者番号：00273839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：候補化合物PGV-1は、がん細胞でROSレベル上昇、中心体チェックポイント機能阻害によるM期での細胞周期停止とアポトーシスを誘導するが、正常細胞に対しては極めて毒性が低い。本研究では、相互作用因子の解析から得た標的分子を解析し、がん細胞特異的中心体チェックポイントの分子の実態を明らかにする。PGV-1の標的候補分子は中心体に存在し、遺伝子KOはM期で細胞周期を停止させた。また、ヘテロ細胞はin vitroでPGV-1感受性が増加し、in vivoでは腫瘍形成能を失った。従って、PGV-1はこの標的分子を介してがん細胞特異的ROS依存的中心体チェックポイントに作用し、がん抑制能を発揮するとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で対象とする抗がん剤候補低分子化合物PGV-1が標的とする「がん細胞特異的ROS依存的中心体チェックポイント」は、副作用のない抗がん剤を開発するための標的としてかなり有望である。従って、実現した場合、現在の臨床現場での懸念事項(副作用による致死、適用患者の限定、治療中の社会活動からの離脱)から逃れることができる。

研究成果の概要(英文)：The candidate compound PGV-1 induces an increase in ROS levels and cell cycle arrest at the M phase through inhibition of the centrosome checkpoint function, leading to apoptosis in cancer cells. However, it exhibits low proliferation inhibitory effects on normal cells and is extremely low in toxicity. In this study, we analyzed the target molecules obtained from the analysis of interacting factors to elucidate the molecular nature of the cancer cell-specific centrosome checkpoint. The target candidate molecules of PGV-1 were found to be present in the centrosome, and genetic knockout halted the cell cycle at the M phase. Additionally, heterozygous cells exhibited increased sensitivity to PGV-1 in vitro and lost tumor-forming ability in nude mice in vivo. Therefore, we concluded that PGV-1 acts on the cancer cell-specific ROS-dependent centrosome checkpoint through these target candidate molecules, exerting anticancer effects.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん抑制 細胞周期 副作用

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん治療には化学療法が有効であるが副作用の問題が大きい。我々が開発した抗がん剤候補化合物PGV-1は、がん細胞に対しては細胞内活性酸素種 (ROS) のレベル上昇、M期の前中期での細胞周期の停止、分裂期崩壊によるアポトーシスを誘導するが、正常細胞に対する増殖抑制効果は低く、他の抗がん剤と比べて極めて毒性が低い。本研究では、新たに同定した標的分子の解析を通じて、がん細胞特異的中心体チェックポイントの分子の実態を明らかにし、ROSによる制御機構を解明する。PGV-1が標的とする「がん細胞特異的ROS依存的中心体チェックポイント」は、副作用のない抗がん剤を開発するための標的としてかなり有望である。

2. 研究の目的

中心体は、細胞周期のS期で複製されて2倍になり、M期 (前期から前中期) で二つの紡錘体極を形成し染色体分配で中心的役割を果たすほか、G0期で形成される繊毛の基底小体としても働く。中心体を構成する成分の特定や、分子集合過程の解明などが進められているが、こうした研究は正常細胞での機能を探るものがほとんどである。しかし、紡錘体極の多極化による染色体数の増減が細胞がん化に寄与することは明らかであり、がん細胞のほとんどで繊毛形成が阻害されているにも関わらず、がん細胞に特異的な中心体の機能や制御に関する詳しい分子機構の知見は極めて乏しい。本研究では「ROSを介した、がん特異的中心体チェックポイントコントロール」の分子の実態を解き明かすことを目的とする。

3. 研究の方法

PGV-1が標的とする「がん細胞特異的ROS依存的中心体チェックポイント」を解明するために、以下の項目を研究する。

- (1) 標的候補遺伝子をCRISPR-Cas9法によりノックアウトしたり、発現ベクター導入により過剰発現させることにより、細胞周期 (増殖) に与える影響を種々のヒトがん細胞株で検討する。また、H₂O₂を添加しその効果を検証する。その後、xenograftモデルマウス実験系で腫瘍形成に与える影響を調べる。
- (2) 標的候補遺伝子のノックアウトや過剰発現がPGV-1の感受性に与える影響を種々のヒトがん細胞株で検討する。その後、xenograftモデルマウス実験系でPGV-1の腫瘍抑制能に与える影響を調べる。
- (3) 標的候補遺伝子のノックアウトや過剰発現が中心体に与える影響を種々のヒトがん細胞株で検討する。この時、チューブリンだけでなく、他の中心体構成因子や中心体の周囲で機能する因子についても動態の変化を調べる。
- (4) 標的候補遺伝子産物の発現と細胞内局在をウェスタンブロット法と免疫染色法にて解析する。さらにこの動態がPGV-1の添加により変化するかを調べる。また、標的候補遺伝子産物と、中心体構成因子や中心体の周囲で機能する因子との間で、相互作用や機能相関の有無を検証する。
- (5) 標的候補遺伝子の組換えタンパク質を用いたin vitroにおける酵素活性測定系を確立し、これを用いてPGV-1が酵素活性に与える影響を検定する。
- (6) 標的候補遺伝子産物におけるPGV-1の結合部位を分子ドッキング法と欠失変異体を用いたpulldown法にて確定する。この情報を元に、PGV-1と結合できない変異体を作製し、がん細胞に導入し、培養細胞系とxenograftモデルマウス実験系でその効果を調べる。
- (7) 標的タンパク質の発現レベルを種々のがん細胞株やがん組織で調べ、診断バイオマーカーを設定する。
- (8) 以上の研究結果をまとめ、がん細胞特異的中心体チェックポイントの分子の実態についてモデルを考案し、ROSによる制御機構を考察する。

4. 研究成果

- (1) 相互作用因子の解析からPGV-1の標的候補分子を得た。
- (2) PGV-1の標的候補分子は中心体に存在していた (図1)。

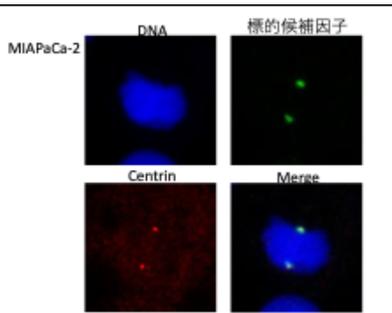


図1 標的候補分子の中心体局在

- (3) PGV-1の標的候補分子をCRISPR-Cas9法により遺伝子ノックアウトすると細胞はM期で増殖を停止した (図2)。

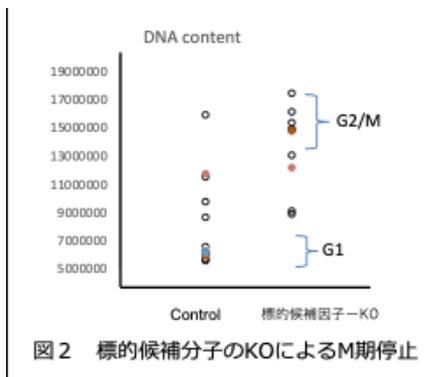


図2 標的候補分子のKOによるM期停止

- (4) ヘテロ細胞はin vitroでPGV-1に対する感受性が増加した。
- (5) ヘテロ細胞はin vivoではノードマウスで腫瘍形成能を失っていた (図3)。

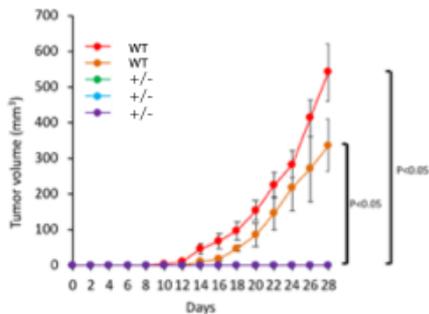


図3 標的候補分子のKOによる腫瘍形成阻害

- (6) 中心体に存在できない標的候補分子の変異体はドミナントネガティブに働き、がん細胞の腫瘍形成能を低下させた。

従って、PGV-1はこの標的候補分子を介してがん細胞特異的ROS依存的中心体チェックポイントに働きかけ、がん抑制の活性を発揮すると考えられる。今後は、この標的候補分子についてより詳細な解析を行なっていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kamitani Naoki, Nakamae Ikuko, Yoneda-Kato Noriko, Kato Jun-ya, Sho Masayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Preclinical evaluation of pentagamavunone-1 as monotherapy and combination therapy for pancreatic cancer in multiple xenograft models	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 22419-22419
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-26863-y	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Jun-ya Kato and Noriko Yoneda-Kato
2. 発表標題 Tumor-specific functions of the fifth component of the COP9 signalosome complex (CSN5)
3. 学会等名 XI-ZOMES国際会議（国際学会、マグデブルグ、ドイツ）（招待講演）（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
研究分担者	加藤 規子 (Kato Noriko) (10252785)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・特任准教授 (14603)	

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

インドネシア	Universitas Gadjah Mada (UGM)			
--------	-------------------------------	--	--	--