

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07618

研究課題名（和文）膠芽腫幹細胞を標的としたtRNAメチル化酵素阻害剤による制がん戦略の構築

研究課題名（英文）Development of epitranscriptome anticancer drugs targeting glioblastoma stem cells

研究代表者

藤村 篤史（Fujimura, Atsushi）

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：10771082

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）：標的酵素が膠芽腫の幹細胞性および造腫瘍能の維持に必須であることを確認した。また、当該酵素に対する阻害剤の初期ヒット化合物が、実際に、膠芽腫モデルマウスの生存期間を有意に延長することを確認した。この初期ヒット化合物の抗がん作用を増強し、生体内薬物動態を改善するために、類縁体を網羅的かつ系統的に合成し、それぞれに対して標的酵素の阻害活性を評価した。第一次、第二次スクリーニングで有望だった類縁体については、膠芽腫モデルマウスに対する投与実験を行った。また、患者層別化が可能な遺伝子パネルについて、機能未知の遺伝子の役割を初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題においては、難治性がんの代表格である膠芽腫に対する革新的な抗がん剤の創薬開発基盤を整えることができた。具体的には、膠芽腫幹細胞特異的な翻訳様式に依存した幹細胞性維持機構を分子的に詳細に解析し、それに対する阻害剤の候補物質または出発物質として、初期ヒット化合物とその類縁体が実際に良好な抗がん作用を発揮することを実証できた。また、これらの化合物に対する感受性を規定する遺伝子パネルのうち、これまで機能未知であった構成要素の複数について、その機能を初めて実証することに成功した。これらのデータは、創薬分野のみならず、分子生物学における重要な発見を表している。

研究成果の概要（英文）：We confirmed that the target enzyme is essential for the maintenance of glioblastoma stemness and tumorigenic potential. We also confirmed that an initial hit compound, an inhibitor of the enzyme, did, in fact, significantly prolong the survival of a mouse model of glioblastoma. To enhance the anticancer activity of this initial hit compound and improve its in vivo pharmacokinetics, we comprehensively and systematically synthesized analogues and evaluated the inhibitory activity of the target enzyme against each. The analogues that showed promise in the first and second screening were tested in a mouse model of glioblastoma. In addition, the role of genes with unknown function was clarified for the first time for a gene panel that allows patient stratification.

研究分野：腫瘍幹細胞、創薬化学、翻訳機構

キーワード：エピトランスクリプトーム創薬 膠芽腫 腫瘍幹細胞 翻訳制御機構

1. 研究開始当初の背景

近年、がん幹細胞性を司る因子の多くが、翻訳レベルで制御されていることが実証され (Sendoel ら, *Nature* 2017)、研究者は「転写と翻訳の乖離=がん遺伝子の選択的翻訳機構」という新たな課題に直面している。我々は、tRNA が翻訳機構の要諦でありかつ多彩な修飾と機能制御を受けることから、がん幹細胞性と関連する tRNA 修飾酵素を標的とすれば、がん幹細胞特異的な翻訳様式を制御することが可能であると考え、その候補として特定の酵素に着目し、主に乳がんを対象として研究を行ってきた。当該酵素は膠芽腫を含む様々ながん種において予後・病勢の不良因子であり、当該酵素が高発現の患者群においては、がん幹細胞関連遺伝子群が高発現していることを発見した。この分子機構として、当該酵素が特定の tRNA を修飾することで対応するコドンを多く含む mRNA (例: がん幹細胞性中核因子である転写調節因子など) の翻訳を促進することを実証した。実際に膠芽腫幹細胞において、当該酵素のノックダウンによって自己複製能や未分化維持能が著しく減弱することを確認している。

これらの知見は、当該酵素が膠芽腫幹細胞の維持にとって重要であることを表しており、当該酵素に対する阻害剤が膠芽腫治療において革新的な抗がん剤となりうることを示唆している。そこで我々は、当該酵素の活性を間接的に評価できるルシフェラーゼアッセイ系を確立し、およそ 3000 個の低分子化合物をピックアップし、スクリーニングを行ったところ、非常に強力な酵素阻害作用と抗がん作用を有する化合物群を同定することに成功した。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、集学的治療を以ってしても未だに劇的な予後の改善が実現できていない膠芽腫に対する革新的な制がん戦略を構築することである。予備実験において、本研究で着目している酵素が膠芽腫の幹細胞性を維持するのに必須であることを実証しているため、我々が現在主に乳がんを対象として開発している当該酵素に対する阻害剤は、膠芽腫においても有効である可能性が高い。本課題の完遂により、膠芽腫において「当該酵素の阻害剤は創薬標的が明確で患者層別化が可能な分子標的薬である」という非臨床 POC を確立したいと切望している。

本研究課題は、tRNA 修飾酵素を標的としてがん特異的な翻訳様式を制御することを目指す「tRNA エピトランスクリプトーム創薬」の概念を、世界に先駆けて膠芽腫で実現するという、独自性と創造性に富んだ極めて挑戦的な課題である。

3. 研究の方法

上記の目的を達成するために、我々は下記の課題に取り組んだ。本項ではまず、それぞれの課題解決に際する研究手法について概説する。

【Target Validation の実施】

本研究課題で標的としている酵素が、実際に膠芽腫幹細胞の維持に必須であることを多角的に検証する。具体的には、膠芽腫幹細胞の幹細胞性を司る転写因子群に関して、標的酵素に依存した翻訳様式がその発現を制御することを確認した上で、これが膠芽腫幹細胞の増殖や腫瘍形成能に影響を与える否かを分子生物学および腫瘍生物学的に検証する。

【非臨床 POC の確立】

膠芽腫の担がんモデルマウスを用いて、標的酵素に対する阻害剤の薬効を確認する。用いる腫瘍細胞としては、患者由来の膠芽腫幹細胞を用いた。

【患者層別化の検証】

すでに得られている遺伝子パネルを用いて、標的酵素に対する阻害剤が実際に抗がん作用を発揮する細胞と抵抗性を示す細胞とを区別することが可能であることを検証する。また、実際に、感受性を与える遺伝子を、抵抗性を示す細胞に過剰発現させることで、当該細胞に対して感受性を付与することが可能であるか否かを検討する。

【リード化合物の創製】

これまでに得られている標的酵素の情報に基づき、初期ヒット化合物の類縁体を網羅的かつ系統的に合成する。それぞれの酵素阻害活性をルシフェラーゼベースのアッセイ系で評価し、有望なものは膠芽腫幹細胞を用いた生物学的な評価を実施する。

4. 研究成果

前述の各課題に関して、実際に得られた知見を概説する。

【Target Validationの実施】

本研究課題の標的酵素に対して、shRNA を発現するレンチウイルスを作成し、複数の膠芽腫幹細胞株に感染させて、自己複製能や未分化状態維持能等の評価を行った。また、同時に、ウェスタンブロットング法にて、膠芽腫幹細胞の幹細胞性を司る転写因子群の評価を行った。いずれの検証においても、標的酵素をノックダウンした細胞系株においては、自己複製能等の幹細胞性が著しく低下していることを確認した。重要なこととして、膠芽腫幹細胞の幹細胞性を司る転写因子群のうち一つの転写因子の翻訳が、標的酵素をノックダウンすることで著しく減弱することを確認した。この詳細な分子メカニズムとして、当該転写因子は、アミノ末端領域付近に標的酵素依存的な翻訳様式が必要となる領域があったためであることが判明した。また、標的酵素をノックダウンした系株は、免疫不全マウスを用いた xenograft モデルにおいて、造腫瘍能が著しく減弱していることも明らかとなった。これらの結果は、標的酵素が確かに抗がん剤の創薬標的として妥当であることを強く表している。

【非臨床 POC の確立】

前項の通り、標的酵素は膠芽腫の幹細胞性の維持に必須であることが判明している。そこで、我々はすでに得られていた標的酵素に対する初期ヒット化合物の抗がん作用を、膠芽腫 xenograft モデルマウスで検証した。非治療群 (DMSO 群) に比べて、初期ヒット化合物を投与した群においては、有意に生存期間が延長したことが明らかとなった。このことは、標的酵素に対する阻害剤が膠芽腫の治療薬として有望であることを示唆している。

【患者層別化の検証】

すでに得られている遺伝子パネルのうち、標的酵素に対する阻害剤に対する感受性を示す遺伝子の機能解析を行った。そのうち、2つの機能未知の遺伝子について、それぞれの分子生物学的な役割を新たに発見した。とりわけ、前者は細胞内の修飾基ドナーの濃度制御に深く関与している因子であり、本研究課題で標的としている酵素の活性制御に直接的に関与していることが判明した。これらの結果は、我々が創薬標的に定めている酵素に関して、その関連因子が当初の想定以上に広く、様々な生物学的作用を発揮していることを示唆している。

【リード化合物の創製】

研究分担者より創製された化合物類縁体を、第一次スクリーニングとして、標的酵素の活性をモニタリングすることが可能なルシフェラーゼベースのアッセイ系で評価した。複数の有望な候補化合物について、さらに、膠芽腫幹細胞に対する自己複製能阻害作用を確認し、そのうち特に見込みのある化合物について、患者由来膠芽腫幹細胞を用いた同所性 xenograft マウスモデルに対してその抗がん作用を評価した。初期ヒット化合物およびその類縁体のいずれもが陰性対照群よりは生存期間を延長したものの、類縁体が初期ヒット化合物に比べて有意に生存期間を延長することはなかった。この要因として、血液脳関門のために薬効成分が十分に腫瘍組織に送達されていなかった可能性を第一に考えた。別の考えられる理由として、膠芽腫幹細胞によって得られた同所性 xenograft モデルにおいては組織内の不均一性が高いことが知られているが、我々の化合物が特定の性質を持つ細胞集団によく効いた一方で、また別の性質を有する細胞集団に対しては抗がん作用が減弱されてしまったのかもしれない。今後の方針としては、引き続き、生体内薬物動態に優れた類縁体のデザインを続ける一方で、上記の膠芽腫の不均一性に対応できるようにするために、我々の開発している化合物と既存の抗がん剤との併用などのプロトコルの可能性を検討する必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Huang R, Fujimura A, Nakata E, Takihira S, Inoue H, Yoshikawa S, Hiyama T, Ozaki T, Kamiya A.	4. 巻 557
2. 論文標題 Adrenergic signaling promotes the expansion of cancer stem-like cells of malignant peripheral nerve sheath tumors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 199-205
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.172.	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 Castellan M, Guarnieri A, Fujimura A, Zanconato F, Battilana G, Panciera T, Sladitschek HL, Contessotto P, Citron A, Grilli A, Romano O, Bicciato S, Fassan M, Porcu, E, Rosato A, Cordenonsi M, Piccolo S.	4. 巻 2
2. 論文標題 Single-cell analyses reveal YAP/TAZ as regulators of stemness and cell plasticity in Glioblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Cancer	6. 最初と最後の頁 174-188
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s43018-020-00150-z.	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 該当する
1. 著者名 Uneda A, Kurozumi K, Fujimura A, Fujii K, Ishida J, Shimazu Y, Otani Y, Tomita Y, Hattori Y, Matsumoto Y, Tsuboi N, Makino K, Hirano S, Kamiya A, Date I.	4. 巻 9
2. 論文標題 Differentiated glioblastoma cells accelerate tumor progression by shaping the tumor microenvironment via CCN1-mediated macrophage infiltration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-021-01124-7.	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 Fujimura A, Pei H, Zhang H, Sladitschek HL, Chang L.	4. 巻 10
2. 論文標題 Editorial: The Role of Epigenetic Modifications in Cancer Progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Oncol.	6. 最初と最後の頁 617178
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fonc.2020.617178.	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 該当する

1. 著者名 Michiue H, Kitamatsu M, Fukunaga A, Tsuboi N, Fujimura A, Matsushita H, Igawa K, Kasai T, Kondo N, Matsui H, Furuya S.	4. 巻 330
2. 論文標題 Self-assembling A6K peptide nanotubes as a mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) delivery system for boron neutron capture therapy (BNCT)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Control Release.	6. 最初と最後の頁 788-796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jconrel.2020.11.001.	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 Fujimura A, Yasui S, Igawa K, Ueda A, Watanabe K, Hanafusa T, Ichikawa Y, Yoshihashi S, Tsuchida K, Kamiya A, Furuya S.	4. 巻 9
2. 論文標題 In Vitro Studies to Define the Cell-Surface and Intracellular Targets of Polyarginine-Conjugated Sodium Borocaptate as a Potential Delivery Agent for Boron Neutron Capture Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9102149.	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 Kamiya A, Hiyama T, Fujimura A, Yoshikawa S.	4. 巻 31
2. 論文標題 Sympathetic and parasympathetic innervation in cancer: therapeutic implications	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Auton Res.	6. 最初と最後の頁 165-178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10286-020-00724-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 -

1. 著者名 Huang Rongsheng, Yamamoto Takahiro, Nakata Eiji, Ozaki Toshifumi, Kurozumi Kazuhiko, Wei Fanyan, Tomizawa Kazuhito, Fujimura Atsushi	4. 巻 10
2. 論文標題 CDKAL1 Drives the Maintenance of Cancer Stem Like Cells by Assembling the eIF4F Translation Initiation Complex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advanced Science	6. 最初と最後の頁 2206542-2206542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/advs.202206542	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Atsushi Fujimura
2. 発表標題 Adrenoceptor switching is required to maintain the cellular plasticity of glioblastoma.
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Otani, Atsushi Fujimura et al.
2. 発表標題 Dedifferentiated Schwann cells that maintain the adrenergic microenvironment contributes to chemotherapy resistance in lung cancer patient.
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Haruyoshi Katayama, Atsushi Fujimura et al.
2. 発表標題 Presence of catecholamine synthases and the role in maintaining cancer stem-like cells in malignant peripheral nerve sheath tumors.
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 RNAメチルトランスフェラーゼ阻害剤、そのスクリーニング方法、抗がん剤有効性判定マーカー、及びFTSJ1阻害剤の有効性予測のためのキット	発明者 藤村篤史ら	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2020/032130	出願年 2020年	国内・外国の別 外国
産業財産権の名称 がん治療のための剤、及び、その有効成分のスクリーニング方法	発明者 藤村篤史	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2020-204100	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	石川 吉伸 (Ishikawa Yoshinobu) (00305004)	湘南医療大学・薬学部医療薬学科・教授 (32728)	
研究分担者	黒住 和彦 (Kurozumi Kazuhiko) (20509608)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	
研究分担者	富澤 一仁 (Tomizawa Kazuhito) (40274287)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	安藤 隆幸 (Ando Takayuki) (40402226)	静岡県環境衛生科学研究所・医薬食品部・主査 (83805)	
研究分担者	増本 年男 (Masumoto Toshio) (40715083)	鳥取大学・医学部・助教 (15101)	
研究分担者	中村 仁 (Nakamura Hitoshi) (50828407)	静岡県環境衛生科学研究所・医薬食品部・主任 (83805)	
研究分担者	魏 范研 (Wei Fanyan) (90555773)	東北大学・加齢医学研究所・教授 (11301)	

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	工藤 晃大 (Kudo Akihiro) (40911433)	静岡県環境衛生科学研究所・医薬食品部・主任 (83805)	

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