

令和元年5月24日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08621

研究課題名(和文)オートファジー・リソソーム機能異常を標的とした大腸癌幹細胞標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of colorectal cancer stem cell targeted therapy targeting autophagy and lysosomal dysfunction

研究代表者

原口 直紹 (HARAGUCHI, NAOTSUGU)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30528609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌幹細胞集団ではリソソーム活性が亢進しており、単一細胞からのsphere形成能、造腫瘍能や抗癌剤抵抗性が高く保持されていた。ケミカルスクリーニングを行い、リソソーム阻害剤としてメフロキンを同定した。メフロキン投与により、癌幹細胞集団が消失すること、オキサリプラチンやイリノテカンと相乗的に抗腫瘍効果をもつこと、ヒト大腸癌担癌マウスにおいて腫瘍がほぼ完全に消失することを見出した。アレイ解析とタンパク結合解析を行うことで、メフロキンがリソソーム経路制御因子であるRAB 5/7を標的としており、ミトコンドリア代謝異常の蓄積とマイトファジーの障害を誘導していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌幹細胞の維持機構にリソソーム活性が密接に関与しており、RAB 5/7を標的とすることでリソソーム活性を特徴的に阻害する化合物であるメフロキンを同定した。抗マラリア薬メフロキンの大腸癌へのリポジショニングは、リソソーム経路を阻害することで癌幹細胞を治療標的とする従来にない薬理作用により、癌幹細胞ヒエラルキーを包括的に標的とする革新的な治療法になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Endo-lysosomal activity was enhanced in the colorectal cancer stem cell (CSC) population, and sphere formation ability from single cells, tumorigenicity and anticancer drug resistance were highly retained. Chemical screening was performed to identify mefloquine as an endo-lysosome maturation inhibitor. Treatment of colorectal cancer cells with mefloquine efficiently eliminated CSC population. Mefloquine showed a synergistic antitumor effect with oxaliplatin and irinotecan, and that the tumor engrafted in mice almost completely disappeared by mefloquine treatment. Microarray analysis and protein binding analysis showed that mefloquine targets the lysosomal pathway regulator, RAB 5/7. Pathway analysis showed that mefloquine impair the mitochondrial metabolism and induce mitochondria induced cell apoptosis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 癌幹細胞 リソソーム ドラッグリポジショニング

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌の罹患数と死亡者数は年々増加しており、抗 EGFR 抗体薬や抗 VEGFR 阻害薬、マルチキナーゼ阻害薬や免疫チェックポイント阻害剤の登場により予後は大きく改善してはいるものの、依然として大腸癌の根治薬の開発には至っていない。癌幹細胞は、高い自己複製能、造腫瘍能と抗癌剤抵抗性を有するため、癌治療における最大の障壁となっている。そのため、癌の根治を目指すためには、癌幹細胞を標的化する治療が求められる。われわれは活性酸素種 (ROS) の発現が低い細胞では治療抵抗性を持ち、高い幹細胞性を有することを報告してきた。本研究を推進し、大腸癌細胞で網羅的抗体アレイを行うことにより、低 ROS 活性細胞で LAMP1 (リソソーム関連膜タンパク) が高発現していることを見出し、このことから癌幹細胞においてはリソソーム活性が亢進しているのではないかと考えるに至った。オートファジー活性が幹細胞の維持機構に重要な役割を果たしていることはいくつかの研究報告がなされているが、オートファジー経路の一部を担うリソソームと癌幹細胞との関連性を示した報告は未だなされていない。またリソソーム活性に焦点をあてた癌幹細胞標的治療薬の報告も認めない。そのため、大腸癌においてリソソーム活性と幹細胞性との関係を明確にし、リソソーム活性阻害による大腸癌幹細胞標的の開発、さらにはその臨床応用を目指した基礎的データの集積を目指した研究が必要である。

## 2. 研究の目的

癌幹細胞は、癌細胞の供給源である己を抗癌剤や放射線に対する治療抵抗性により防御して癌組織を維持しているのみでなく、高い造腫瘍性により癌の転移にも深く関与している。故に、癌の治療抵抗性を克服し、癌の根治を目指す治療法の開発のためには癌幹細胞の特性に応じた戦略を立てる必要がある。われわれは、大腸癌の幹細胞様分画においてリソソーム・オートファジー経路が亢進しており、治療抵抗性に深く関与していることを見出した。本研究では、癌幹細胞におけるリソソーム・オートファジー経路に着目し、これらの機構がどのように癌幹細胞に治療抵抗性を付与し、癌幹細胞の維持を行っているのか、さらには、癌幹細胞と間質細胞の相互作用ネットワークにどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とする。さらには、癌幹細胞特異的なリソソーム・オートファジー経路を解明し、それらを制御可能とすることで、包括的な癌治療法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

大腸癌細胞株を用いて、リソソーム (LysoTracker) とオートファジー (LC3B) の蛍光トレーシング化を行い、癌幹細胞とリソソームならびにオートファジー活性の関係を明確にするため、大腸癌幹細胞マーカーである CD133 と CD44variant 9 発現との相関を検討した。幹細胞性の評価として、細胞周期解析、抗癌剤感受性解析、sphere formation assay、single cell sphere formation assay、limiting dilution assay、serial transplantation assay を行った。また、抗マラリア薬を中心としたケミカルスクリーニングを行い、リソソーム阻害剤の同定を行った。ケミカルスクリーニングを行った薬剤による癌幹細胞集団割合の変化の検討、大腸癌のキードラッグであるオキサリプラチンやイリノテカンとの併用効果の isobologram assay による検討を行った。さらに、ヒト大腸癌担癌マウスにおける治療効果の確認、各治療群における網羅的遺伝子解析を行った。アレイ解析よりリソソーム経路制御因子である RAB 5/7 を同定し、タンパク結合解析、ミトコンドリア誘導性アポトーシス、マイトファジーとの関連を検討した。ヒト大腸癌同所移植マウスモデルと腹膜播種モデルを作成し、抗腫瘍効果、副作用評価 (血液検査や主要臓器の病理学的検討、体重減少や異常行動) の評価を行った。

## 4. 研究成果

大腸癌では高リソソーム活性細胞 (CD44v9+/LysoTracker+) が高い抗癌剤抵抗性を有し G0/G1 期の割合が多いこと、また、単一細胞からのスフェア形成能が高いこと、さらに、limiting dilution assay ならびに serial transplantation assay にて自己複製能が高く保持されていることを見出した。さらに、ケミカルスクリーニングを行い、抗マラリア薬であるメフロキン投与により癌幹細胞分画が消失することを見出した。同効果は、クロロキン (CQ) やヒドロクロロキン (HQ) に比べメフロキンで強力であり、オキサリプラチン (L-OHP) やイリノテカン (SN-38) と併用することで、癌幹細胞が完全に消失することが見出された (図 1)。大腸癌臨床検体を移植したマウスモデル (Patient-derived tumor xenograft : PDX) を L-OHP、CQ、MQ、CQ+L-OHP、メフロキンとオキサリプラチン (MQ+L-OHP) で 21 日間治療した場合、メフロキンは単剤投与であっても L-OHP と同等以上の抗腫瘍効果を示し、さらに、L-OHP 併用により腫瘍がほぼ完全に消退することが確認された (図 2)。また、同治療過程において、体重減少や腫瘍臓器に病理学的変化などの副作用が生じないことが確認された。メフロキン治療後のマウス腫瘍の免疫組織化学染色においても、RAB5/7、癌幹細胞マーカーである CD44v9 やリソソーム関連膜タンパクである LAMP1/2 の発現が低下していた。メフロキンは mTOR を阻害することが近年報告されたが (Can J Physiol Pharmacol. 2017)、その薬理作用は依然として解明されていない点が多く、故に癌に対するリポジショニングに対するハードルが高いのが現状であった。これを受けて、われわれは、PDX 治療モデルのアレイ解析とパスウェイ解析、タンパク結合解析を行うことで、メフロキンがエンドリ

ソーム Rab5/Rab7 に結合し、Rab5/Rab7 の抑制によりミトファジーが抑制されること、その結果、膨化した異常ミトコンドリアの集積が誘導され(図2)ミトコンドリア誘導性のアポトーシスが誘導されることを解明報告した(Cancer Res. 2019)。RAB 5/7 を knockdown することで、メフロキンと同様に癌幹細胞分画が消失し、sphere 形成能が抑制されていることを示した。さらに、メフロキンは、RAS 変異に依存せず抗腫瘍効果を発揮すること、オキサリプラチンとイリノテカンに相乗効果を有することが確認された。

以上の研究により、大腸癌幹細胞の維持機構にリソソーム活性が密接に関与しており、RAB 5/7 を標的とすることでリソソーム活性を特徴的に阻害する化合物であるメフロキンを同定した。抗マラリア薬メフロキンの大腸癌へのリポジショニングは、リソソーム経路を阻害することで癌幹細胞を治療標的とする従来にない薬理作用により、癌幹細胞ヒエラルキーを包括的に標的とする革新的な治療法になると期待された。

図1. メフロキンの癌幹細胞消失効果

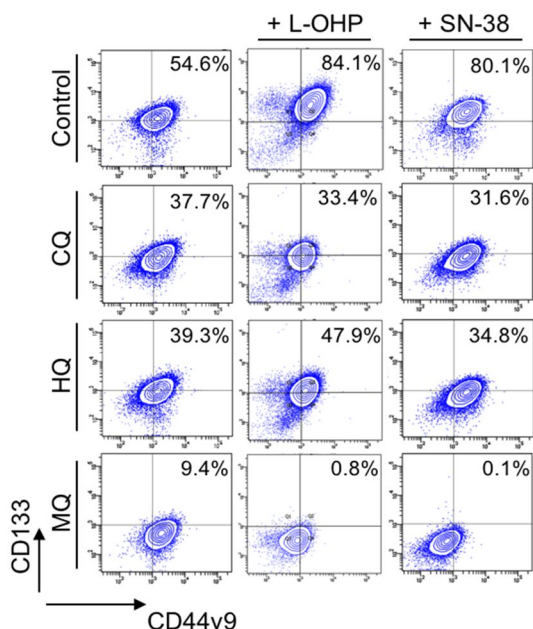
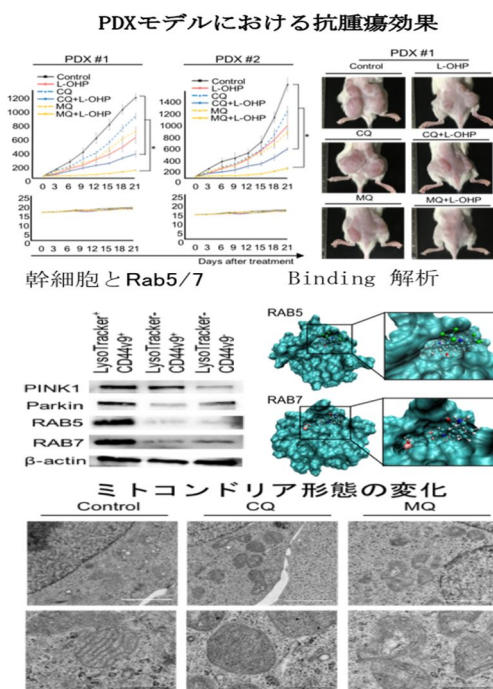


図2. メフロキンの抗腫瘍効果と作用機序



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. Takeda M, Koseki J, Takahashi H, Miyoshi N, Nishida N, Nishimura J, Hata T, Matsuda C, Mizushima T, Yamamoto H, Ishii H, Doki Y, Mori M, Haraguchi N. Disruption of Endolysosomal RAB5/7 Efficiently Eliminates Colorectal Cancer Stem Cells. Cancer Res. 2019 Feb 14 (in Press) (査読あり).

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 竹田 充伸、原口 直紹、高橋 秀和、三吉 範克、西田 尚弘、畑 泰司、松田 宙、水島 恒和、山本 浩文、土岐 祐一郎、森 正樹 抗マラリア薬のリプロファイリングによる大腸癌幹細胞新規標的化治療の開発(Reprofiling of Antimalarial Drug is a Novel Therapeutic Target for Colon Cancer Stem Cell) 日本癌学会学術総会 第77回・大阪 2018
2. 竹田 充伸、原口 直紹、高橋 秀和、三吉 範克、西田 尚弘、畑 泰司、松田 宙、水島 恒和、山本 浩文、土岐 祐一郎、森 正樹 抗マラリア薬のドラッグ・リポジショニングは大腸癌の新規治療薬となりうる 日本大腸肛門病学会学術集会 第73回・東京 2018
3. 原口 直紹、竹田 充伸、高橋 秀和、三吉 範克、畑 泰司、松田 宙、山本 浩文、水島 恒和、土岐 祐一郎、森 正樹 大腸癌幹細胞を標的とした次世代型大腸癌治療法の開発 日本癌治療学会学術総会 第56回・横浜 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://www2.med.osaka-u.ac.jp/gesurg/study/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：