

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08098

研究課題名(和文) 体内時計機構を利用し乳癌幹細胞の動態を制御する、新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Regulation of dynamics in breast cancer stem cells based on molecular clock.

研究代表者

松永 直哉(門田直哉)(Matsunaga, Naoya)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：10432915

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は“体内時計機構をコントローラーとして乳癌幹細胞の動態を制御し癌治療する”新規治療法の開発を目指した。本研究の結果、乳癌幹細胞のマーカーであるALDH活性に日内リズムが認められ、これらリズムは癌幹細胞以外の細胞から分泌されるWNTタンパク質により転写レベルで制御されていた。これらALDH活性の日内リズムを指標にALDH活性阻害剤を投与すると癌の増殖転移が抑制された。また、癌幹細胞では体内時計機構が破綻しており、その破綻は乳癌幹細胞特異的なマイクロRNA発現のパターンが影響を及ぼしていることが明らかになった。本研究成果は、難治性の乳癌の新たな治療法につながるものと期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed at the development of the new cure that "I controlled the change of the breast cancer stem cell as a controller, and a cancer treated biological clock mechanism". As a result of this study, the rhythm in the day was recognized in the ALDH activity that was the marker of the breast cancer stem cell, and these rhythm was controlled at a transcription level by WNT protein secreted by the cell except the cancer stem cell. The increase metastasis of cancer was controlled when I gave ALDH activity repressor to an index with the rhythm in the day of these ALDH activity. In addition, biological clock mechanism failed with the cancer stem cell, and, As for the failure, it was revealed that a pattern of the breast cancer onset of microRNA which was a stem cell-specific had an influence. I can expect it that these results of research lead to a new cure for intractable breast cancer.

研究分野：時間薬剤 時間薬理 時間治療

キーワード：難治性乳癌 TNBC 体内時計 操作

1. 研究開始当初の背景

本研究は“体内時計機構をコントローラーとして乳癌幹細胞の動態を制御し癌治療する”新規治療法の開発を目指した。本研究の結果、乳癌幹細胞のマーカーである ALDH 活性に日内リズムが認められ、これらリズムは癌幹細胞以外の細胞から分泌される WNT タンパク質により転写レベルで制御されていた。これら ALDH 活性の日内リズムを指標に ALDH 活性阻害剤を投与すると癌の増殖転移が抑制された。また、癌幹細胞では体内時計機構が破綻しており、その破綻は乳癌幹細胞特異的なマイクロ RNA 発現のパターンが影響を及ぼしていることが明らかになった。本研究成果は、難治性の乳癌の新たな治療法につながるものと期待できる。

2. 研究の目的

本研究の特色は、体内時計機構をコントローラーとして乳癌幹細胞の動態を制御し、トリプルネガティブをポジティブに細胞を変容させる乳癌の革新的な治療法開発を行うことである。

これまでの癌治療研究は、細胞増殖を抑制する研究が多くなされ、結果として腫瘍組織を構成する細胞集団の不均一性により根治困難な状況に追い込まれている。本研究の癌治療は、独創的であり、体内時計機構をコントローラーとして癌幹細胞動態を制御し、既存の抗癌剤に対する抵抗性の克服(トリプルネガティブをポジティブに!)また、ステム性を低下させ、腫瘍組織の細胞集団の不均一性を低下させる、シナジー効果を期待できる革新的治療法の開発である。

また本研究の特色は、創薬プラットフォーム事業九大拠点との連携を組み、解明した分子機構を応用した新規の抗癌剤開発に結びつけることである。これまでに癌組織特有の環境を標的とした時間薬物送達方法(chrono-DDS)ならびに新規時間炎症薬の開発を手がけている。本研究結果は、乳癌のみならず、他の癌種に応用できる可能性を秘めているため、医学的、経済的にも波及効果が大きいと予想される。

3. 研究の方法

(平成 27 年度)時計遺伝子過剰発現させた乳癌幹細胞の解析

実験 1-1; 次世代シーケンサーを用いた時計遺伝子過剰発現乳癌幹細胞 (CLOCK-4T1) の網羅的遺伝子発現制御機構の解析 (Chip-シーケンス解析)

これまでに乳癌幹細胞に時計遺伝子を安定過剰発現させた細胞株 (CLOCK-4T1) を作製している。

本細胞株に発現する、CLOCK タンパクには MYC/Flag タグが融合している。ステム性を保持できる培養プレートにコントロール細胞 (pcDNA-4T1) および CLOCK-4T1 細胞に播種し、24 時間後に細胞をホルマリン固定後に回

収する。

ホルマリン固定した細胞を粉碎後、粉碎後の細胞抽出液をソニケーターにかけ、DNA を断片化する。その後 MYC 抗体を用いて免疫沈降法により CLOCK に結合した DNA 断片を回収する。回収した DNA 断片について、次世代シーケンサーにより配列を解読し、CLOCK が癌幹細胞の DNA のどの領域に結合し、転写を調節しているか否かを解明する。また各種細胞から Total RNA を抽出しその後マイクロアレイにより遺伝子解析を行い、CLOCK の DNA への結合との関連性を評価し CLOCK が乳癌幹細胞のステム性低下およびトリプルポジティブに変容させる機構の足がかりとする。

実験 1-2; ステム性低下およびトリプルポジティブに変容させる因子の同定と CLOCK による発現制御機構の解明

実験 1-1 の結果をもとに、ステム性維持に重要な SOX2、Nanog、Oct3/4、トリプルネガティブ因子 (ER、PGR、HER2) のプロモーター領域における CLOCK の結合量の解析をする。コントロール細胞と比較し、CLOCK-4T1 により結合量に有意な変化が認められている場合、各種因子のプロモーターレポーターを対象に、ルシフェラーゼアッセイにより CLOCK による転写制御の確認を行う。

また、コントロール細胞と比較し、CLOCK-4T1 により結合に変化が認められない場合、各種因子のプロモーター領域のシーケンス情報をもとに、コンピューターで解析をし、CLOCK により転写制御される別の転写因子についての影響を検討する。検討方法は、ルシフェラーゼアッセイおよびノックダウン実験により検証する。その後各種 Promoter の deletion および mutation を行い責任配列の同定および、転写因子の各種 promoter への結合を XChip assay により確認する。

(平成 28 年度)乳癌移植モデルマウスを用いた、癌幹細胞の動態制御

実験 2-1; pcDNA-4T1 および CLOCK-4T1 細胞におよぼす各種抗癌剤の影響

研究機関名 九州大学 研究代表者氏名 松永直哉

基盤 C (一般) - 4

研究計画・方法 (つづき)

pcDNA-4T1 および CLOCK-4T1 細胞を培養プレートに播種し、その後各種抗癌剤 (タモキシフェン、メドロキシプロゲステロン酢酸エステル、HER2 抗体) を暴露し、生細胞数を測定する。

実験 2-2; pcDNA-4T1 および CLOCK-4T1 細胞移植モデルマウスの生存数および病理組織解析

pcDNA-4T1 および CLOCK-4T1 細胞をマウスに

移植する。移植後の各種腫瘍サイズの測定および、生存数に及ぼす影響を検討する。さらに、各細胞移植マウスを対象に、実験 2-1 で使用した抗癌剤を投与し pcDNA-4T1 および CLOCK-4T1 腫瘍サイズにおよぼす影響を検討する。
実験 2-1,2 より、In vivo における CLOCK-4T1 細胞の性質と、既存の抗癌剤に対する感受性の変容を確認する。

実験 2-3;4T1 細胞移植マウスを対象とした、明暗周期の変容と明暗周期変容による乳癌幹細胞の動態変化の解析
時計遺伝子 CLOCK は生体リズムの分子機構の中心的因子であり、外的要因特に光刺激により発現が変容し、体内時計を構成している。そこで、4T1 細胞移植マウスを対象に明暗周期(12 時間/12 時間)にリズムを恒暗、恒明条件下で飼育し、移植腫瘍がどのように変容するか否かを検討する。
本結果より、外的要因により癌幹細胞の動態が制御できるか否かを検証する。

(平成 29 年度)乳癌幹細胞の動態を制御する新規抗癌剤のスクリーニングと評価
実験 3-1;乳癌幹細胞の時計遺伝子発現を促進する化合物の探索

これまでに我々は、創薬プラットフォーム事業九大拠点を基盤として、癌や炎症部位に発現する特定分子のリズムを標的とする新規抗癌剤の開発を試みている。本年度は、CLOCK および H27、H28 年度の計画により明らかとした CLOCK 制御因子の発現を強化する新規の化合物を探索する。

化合物の探索方法として、CLOCK 発現を促進する化合物、CLOCK により制御される因子に関しては、各種タンパク質の性質に合わせ、化合物スクリーニング評価系を構築する。化合物は東京大学の創薬プラットフォーム所有の約 20 万化合物を対象にスクリーニングをし、その後のヒット化合物の最適化は、九州大学の最適化チームに依頼し、特許に結びつける。

*既に一連の解析方法は構築済みであり。

実験 3-2;乳癌幹細胞への化合物の送達方法の構築

これまでに我々は、癌や炎症部位に発現する特定の分子リズムを標的とする新規時間薬物送達方法(Chrono-DDS)を確立している。実験 3-1 により明らかとした化合物を癌幹細胞に送達する後術を構築する。癌幹細胞にはマーカーである ALDH が高発現している。そこで、ALDH により分解するペプチド断片を化合物に修飾し、癌幹細胞への標的化を行う。培養細胞に、ペプチド修飾化合物を暴露し、幹細胞に特異的に取り込まれていることを、細胞回収後、セルソーターを用い細胞を分離し LC/MS/MS にて化合物濃度を評価する。また、マウスに 4T1 細胞を移植し、尾静注にて

薬物を投与し、腫瘍への移行量の確認した癌幹細胞への蓄積は、腫瘍塊を分散後にセルソーターを用い、細胞を分離後、LC/MS/MS にて化合物濃度を評価する。

研究が当初計画どおりに進まない時の対応
研究施設に関しては九州大学の関連施設の設備を使用するため特に問題ありません。代表者である松永が研究総括、計画立案、実験および結果解析を行う。研究協力者として、2名の大学院生(平成 26 年 4 月時点:博士 1 年 鶴留、博士 3 年 原)が本プロジェクトに参加し、動物実験および遺伝子解析実験で協力する予定である。
計画の通り進まない場合は、計画を見直し別の手法により各実験を評価し、期間内に実施する。

4. 研究成果

計画に沿って動物の乳がんモデルを用いて、抗がん剤の薬効に及ぼす CLOCK の影響を検証している。検討の結果、難治性乳がんの CLOCK の発現量を変化させることで、既存の抗癌剤の薬効を改善できることが明らかとなった。また、CLOCK が難治性乳がんが発現する機構も、明らかにしている。よってこれら機構を標的とする新規の乳がん治療薬の開発への応用が可能であると考えられる。これまでの実績として、ハイスループットスクリーニングを用いた系を用い、新たな抗炎症薬の候補化合物の同定に成功している(特許申請済み)。ノウハウは十分にあるため、今後の研究の進行はスムーズに展開していける。今後、CLOCK の発現量を変化させる低分子化合物をスクリーニングし、医薬品を開発を現在もなお行っている。

また本研究より、難治性乳癌幹細胞の ALDH 活性には、日内リズムがみとめられ、これらリズムは癌幹細胞以外の細胞から分泌される Wnt タンパク質により制御されることをつきとめた。また、対象となる ALDH 活性の日内リズムを指標に、ALDH 活性阻害剤を投与することで、より効率的に難治性乳癌の増殖転移を抑制できることを証明した。本研究成果は、Cancer research にアクセプトされた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Naoya Matsunaga, Takashi Ogino, Yukinori Hara, Takahiro Tanaka, Satoru Koyanagi, Shigehiro Ohdo. Optimized dosing schedule based on circadian dynamics of mouse breast cancer stem cells improves the anti-tumor effects of aldehyde dehydrogenase. Cancer research 2018 (in press).

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 直哉 (門田 直哉)

(Matsunaga, Naoya)

九州大学・薬学研究院・准教授

研究者番号：10432915

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()