

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07160

研究課題名(和文) ドラッグリポジショニングを活用した新規癌幹細胞標的治療法確立の試み

研究課題名(英文) Trial to establish new cancer stem cell targeting therapy utilizing drug repositioning

研究代表者

岡田 雅司 (Okada, Masashi)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：70512614

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトに対する安全情報を持つJNK阻害薬CEP1347がグリオーマ・膵癌・卵巣がんの各種がん幹細胞に対して、がん幹細胞性を抑制するとともに分化を亢進すること、さらに、自己複製能、腫瘍形成能を抑制することを明らかにした。また、*in vivo*におけるCEP1347処理は腫瘍発生能をもったがん幹細胞数を減少させることを連続移植実験にて明らかにした。さらに、CEP1347の*in vivo*投与はグリオーマ幹細胞同所性移植モデルにおいて、生存期間を有意に延長可能であることを明らかにした。このことはCEP1347ががん幹細胞標的治療薬として非常に有望であることを強く示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍の発生及び維持には癌幹細胞の関与が指摘されており、様々な治療標的候補が報告されつつあるが、その克服は未だ困難である。本研究によりヒトに対して安全情報を持つMLK-JNK経路阻害薬CEP1347によって神経膠芽腫、膵癌、卵巣がんのがん幹細胞の制御が可能であることを明らかにした。これは、MLK-JNK経路ががん幹細胞の新たな治療標的として有望であることを示している。また、臨床試験済みの薬剤であり、ヒトに即座に応用可能なCEP1347が癌幹細胞標的薬として有効であることが示されたことも社会的にも意義あるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined that the anti-cancer stem cell (CSC) activity of CEP1347, an MLK-JNK inhibitor which has a safety profile in humans. *In vitro*, CEP1347 induced differentiation and suppressed self-renewal and tumor initiation capacities of CSCs from glioblastoma, ovarian, and pancreatic cancer. *In vivo*, systemic administration of CEP1347 decreased tumor-initiating CSCs in established tumors in mice. Furthermore, the CEP1347 administration extended the survival of the glioblastoma orthotopic transplanted mice. Our findings suggest that CEP1347 is a promising candidate for cancer stem cell-targeting therapy.

研究分野：腫瘍細胞生物学

キーワード：がん幹細胞 ドラッグリポジショニング 適応拡大 JNK xenograft 腫瘍発生 幹細胞性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 癌幹細胞は腫瘍中のごく一部に相当する小集団であるが、治療抵抗性と腫瘍形成能を併せ持つため癌治療を阻む最難関と考えられている。それ故に癌の根治を目指す上で癌幹細胞の制御はその鍵を握るものと期待されている。これまでに我々を含めていくつかの独立したグループが、癌幹細胞に特徴的な自己複製能・腫瘍形成能を維持する上で JNK 活性が必須な役割を果たす事を報告している。

(2) また我々は、特に膵癌において、膵癌で高頻度に見られる変異 Kras 依存的に JNK が活性化されることで癌幹細胞性が維持され、JNK 阻害薬によって幹細胞性を失わせることを動物モデルを用いた前臨床研究にて、さらに JNK 阻害薬で膵癌幹細胞の幹細胞性を失わせた後に膵癌の標準治療として標準的に使用される 5-FU やゲムシタピンで処理すると治療効果が増幅することを報告しており、種々の癌種で癌幹細胞標的治療薬として JNK 阻害薬が有用である事を示してきた。

(3) しかしながら、がん幹細胞中で JNK がどのような機構で活性化状態を保っているのか、がほとんど不明であり、また、ヒトに対して安全かつ有効に臨床応用可能な JNK 阻害薬が当初存在しなかったことから、臨床応用を現実的に見据える事が難しいという大きな課題が残っていた。

(4) 我々は、既存の承認薬、ないしは臨床試験で安全性は確認できたものの有効性を確認できなかった薬剤について、別の適応疾患・病態を見出すドラッグリポジショニングという手法に着目し、初めパーキンソン治療薬として第三相臨床試験まで行われたが、パーキンソン病に対する有効性が証明されるに至らなかった JNK 経路の上流で JNK を活性化する因子の一つである MLK3 を直接阻害する薬剤である CEP1347 に着目し、研究に着手した。

2. 研究の目的

腫瘍の発生及び維持には癌幹細胞の関与が指摘されており、様々な治療標的候補が報告されつつあるが、その克服は未だ困難である。我々はこれまでに c-Jun N-terminal kinase (JNK) 活性が種々の癌種において癌幹細胞の維持に関わることを報告してきたが、ヒトでの安全性が確認された JNK 阻害薬が存在しなかったことから臨床応用可能な癌幹細胞制御法の確立には未だ至っていない。ごく最近我々はドラッグリポジショニングの手法を用いて、JNK の上流因子 MLK3 阻害薬である CEP1347 が癌幹細胞性を喪失させるという予備的知見を得た。この知見より我々は「CEP1347 を用いた JNK 経路阻害により癌幹細胞を制御する」という治療戦略を立て、ヒトにおいて安全かつ有効な癌幹細胞標的療法の確立を目指すとともに癌幹細胞における MLK3 が新たな治療標的因子になりうる可能性を検討する。

3. 研究の方法

癌幹細胞標的治療薬候補である MLK3 阻害薬 CEP1347 が様々な癌幹細胞の幹細胞性(自己複製能、腫瘍創始能)を喪失させる事が可能か検討し、ヒトへの応用研究を前提とした、ヌードマウスを用いた治療モデルの作出を目指す。さらに CEP1347 の標的である MLK3 が種々の癌幹細胞性維持に JNK 経路を介して必須であることも合わせて検討する。このために以下の項目に沿って検討する。

(1) MLK3-JNK 経路の阻害は種々の癌幹細胞で JNK 活性を抑制し自己複製能を喪失させるか？
種々の癌幹細胞に対し、様々な濃度および処理時間で MLK3 阻害薬 CEP1347 処理後、JNK の活性化状態を phospho-JNK, phospho-c-Jun の量をウエスタンブロット法にてモニターし癌幹細胞中の JNK 活性が MLK3 依存的に維持されているかを検討する。また、幹細胞マーカーとして知られる Sox2, Nanog, Oct4, Nestin のタンパク発現量や ALDH 活性を、さらに分化マーカーとして知られる GFAP や E-cadherin などのタンパク発現量を調べると共に CEP1347 洗浄除去後に sphere 形成試験を複数種の癌幹細胞を用いて検討する。加えて CEP1347 処理で見られた効果が確かに MLK3 依存的か、もしくは他の機序が介入しているかどうかを MLK3 遺伝子ノックダウンを用いて同様の解析を行うことで確かめる。

(2) CEP1347/ MLK3 ノックダウンは癌幹細胞の腫瘍創始能を阻害するか？

CEP1347 が種々の癌幹細胞において腫瘍創始能を抑制するかどうかを確かめるために、ヌードマウスを用いた移植実験を行う。一過的に CEP1347 処理もしくは MLK3 遺伝子ノックダウンを行い、予め幹細胞性を失わせた後に、移植細胞数を変化させながらヌードマウスの皮下に移植もしくは可能であれば同所性移植を行う。腫瘍形成の有無を確認し、腫瘍が形成された場合は経時的に腫瘍径を計測およびマウスの生存期間することで定量的に観察する。

(3) CEP1347 は in vivo で腫瘍中の癌幹細胞を枯渇させることは可能か？

腫瘍内に存在する癌幹細胞の割合を評価する唯一の信頼性の高い実験方法である連続移植実験を用いて、CEP1347 の全身投与が in vivo において確かに腫瘍内の癌幹細胞を減少できるかどうかを検討する。まずヌードマウスの皮下に癌幹細胞を移植し、腫瘍が形成された後に CEP1347 を全身投与、投与期間終了後翌日に腫瘍を摘出し、酵素分散後、移植細胞数を変化させながら別のマウスに再移植し、そこで腫瘍形成の有無を検討する。この方法では限界希釈的に細胞数を変化させながら癌幹細胞を再移植することから、薬剤による癌幹細胞の減少効果を定量的に評価可能である。また、再移植前の分散サンプルから一部の細胞を標本として採集し、幹細胞マーカー・分化マーカーのタンパク発現量の変化を確認する。これにより確かに CEP1347 が in vivo でも

癌幹細胞を直接標的としていることと共に癌幹細胞性を抑制しうることを確認する。

(4) CEP1347 は *in vivo* モデルで種々の癌種に対し癌幹細胞標的治療薬として有効か？

癌幹細胞をヌードマウスの皮下に移植し、移植翌日から CEP1347 を全身投与し経時的に腫瘍形成状態をモニター・計測することで定量化する。仮に皮下腫瘍に対する効果が確認できた場合は、さらに同所性移植モデルが可能な癌種を用いて、脳内(グリオーマ幹細胞)や腹腔内(卵巣がん幹細胞)に移植し、その翌日から CEP1347 を全身投与しマウスの健康状態を観察しつつ Kaplan-Meier 生存解析を行う。

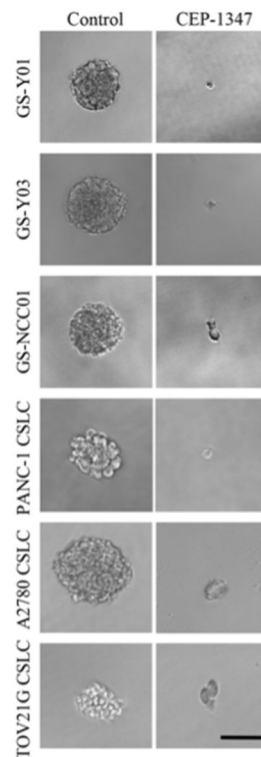
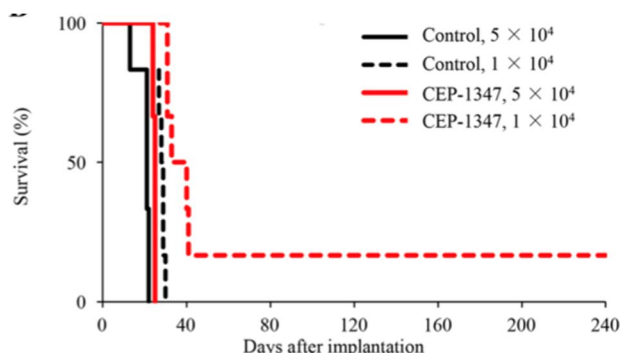
4. 研究成果

(1) CEP1347 はグリオーマ・膵癌・卵巣がんの各種がん幹細胞に対して、がん幹細胞性を抑制するとともに、分化を亢進することを明らかにした。さらに、sphere 形成試験を用いて、CEP1347 が各種がん幹細胞の自己複製能を抑制することも明らかにした(右図)。

(2) CEP1347 の標的として報告されていた MLK3 遺伝子に対する siRNA を各種がん幹細胞に導入し、その性状を解析した結果、癌種によってはがん幹細胞性を抑制したが、効果が一定しなかった。CEP1347 は他の MLK に対しても抑制作用が報告されていることから、複数の MLK ががん幹細胞性維持に関与している可能性を明らかにした。

(3) CEP1347 によって予め処理した細胞は腫瘍形成能を喪失することを、ヌードマウスを用いた膵癌もしくはグリオーマ幹細胞の移植実験で明らかにした。

(4) 皮下に移植したグリオーマ幹細胞に対し CEP1347 を *in vivo* で投与した後に、皮下腫瘍から取り出した腫瘍細胞を脳内に限界希釈的に再移植する連続移植実験を用いて、腫瘍発生能をもったがん幹細胞数を調べたところ、CEP1347 の *in vivo* 処理は確かに腫瘍中のがん幹細胞数を減少させるということが明らかとなった(下図)。



(5) CEP1347 の *in vivo* 投与はグリオーマ幹細胞同所性移植モデルにおいて、生存期間を有意に延長可能であることを明らかにした。このことは CEP1347 ががん幹細胞標的治療薬として生体でも使用可能であることを強く示唆している。

(6) その他、ドラッグリポジショニングの手法を用いて、抗がん薬の感受性亢進作用を持つ薬剤、標的を変更して抗腫瘍効果を見出した薬剤、を数種見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Yamamoto M, Suzuki S, Togashi K, Sanomachi T, Seino S, Kitanaka C, Okada M.	4. 巻 39
2. 論文標題 AS602801 Sensitizes Ovarian Cancer Stem Cells to Paclitaxel by Down-regulating MDR1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 609-617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13154.	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 -

1. 著者名 Yamamoto M, Suzuki S, Togashi K, Sanomachi T, Seino S, Kitanaka C, Okada M.	4. 巻 38
2. 論文標題 AS602801, an Anticancer Stem Cell Candidate Drug, Reduces Survivin Expression and Sensitizes A2780 Ovarian Cancer Stem Cells to Carboplatin and Paclitaxel.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 6699-6706.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.13038.	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 -

1. 著者名 Suzuki S, Okada M, Takeda H, Kuramoto K, Sanomachi T, Togashi K, Seino S, Yamamoto M, Yoshioka T, Kitanaka C.	4. 巻 9
2. 論文標題 Involvement of GLUT1-mediated glucose transport and metabolism in gefitinib resistance of non-small-cell lung cancer cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 32667-32679.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25994.	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 Kuramoto K, Yamamoto M, Suzuki S, Sanomachi T, Togashi K, Seino S, Kitanaka C, Okada M.	4. 巻 38
2. 論文標題 AS602801, an Anti-Cancer Stem Cell Drug Candidate, Suppresses Gap-junction Communication Between Lung Cancer Stem Cells and Astrocytes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 5093-5099
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.12829.	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 -

1. 著者名 Togashi K, Okada M, Yamamoto M, Suzuki S, Sanomachi T, Seino S, Yamashita H, Kitanaka C.	4. 巻 38
2. 論文標題 A Small-molecule Kinase Inhibitor, CEP-1347, Inhibits Survivin Expression and Sensitizes Ovarian Cancer Stem Cells to Paclitaxel.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 4535-4542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12757.	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 -

1. 著者名 Okada M, Takeda H, Sakaki H, Kuramoto K, Suzuki S, Sanomachi T, Togashi K, Seino S, Kitanaka C.	4. 巻 8
2. 論文標題 Repositioning CEP-1347, a chemical agent originally developed for the treatment of Parkinson's disease, as an anti-cancer stem cell drug.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 94872-94882
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.22033	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 Takeda H, Okada M, Kuramoto K, Suzuki S, Sakaki H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Hirano H, Arita K, Kitanaka C.	4. 巻 8
2. 論文標題 Antitumor activity of gemcitabine against high-grade meningioma in vitro and in vivo.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 90996-91008
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.18827	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 Sanomachi T, Suzuki S, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Togashi K, Seino S, Yoshioka T, Okada M, Kitanaka C.	4. 巻 37
2. 論文標題 Olanzapine, an Atypical Antipsychotic, Inhibits Survivin Expression and Sensitizes Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 6177-6188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12067	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 -

1. 著者名 Kuramoto K, Suzuki S, Sakaki H, Takeda H, Sanomachi T, Seino S, Narita Y, Kayama T, Kitanaka C, Okada M.	4. 巻 7
2. 論文標題 Licochalcone A specifically induces cell death in glioma stem cells via mitochondrial dysfunction.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio.	6. 最初と最後の頁 835-844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12226	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 Takeda H, Okada M, Suzuki S, Kuramoto K, Sakaki H, Watarai H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C.	4. 巻 12
2. 論文標題 Rho-Associated Protein Kinase (ROCK) Inhibitors Inhibit Survivin Expression and Sensitize Pancreatic Cancer Stem Cells to Gemcitabine.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 6311-6318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.11227	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 -

1. 著者名 Suzuki S, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Watarai H, Sanomachi T, Seino S, Yoshioka T, Kitanaka C.	4. 巻 10
2. 論文標題 Aripiprazole, an Antipsychotic and Partial Dopamine Agonist, Inhibits Cancer Stem Cells and Reverses Chemoresistance.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 5153-5161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.11085	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 -

1. 著者名 Watarai H, Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Sakaki H, Suzuki S, Seino S, Oizumi H, Sadahiro M, Kitanaka C.	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of H3K27 Demethylase Inhibitor GSKJ4 on NSCLC Cells Alone and in Combination with Metformin.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 6083-6092.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.11198	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 -

1. 著者名 Okada M, Kuramoto K, Takeda H, Watarai H, Sakaki H, Seino S, Seino M, Suzuki S, Kitanaka C.	4. 巻 19
2. 論文標題 The novel JNK inhibitor AS602801 inhibits cancer stem cells in vitro and in vivo.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 27021-32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.8395.	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 Tomomi Sanomachi, Shuhei Suzuki, Keita Togashi, Asuka Sugai, Shizuka Seino, Masashi Okada, Takashi Yoshioka, Chifumi Kitanaka, Masahiro Yamamoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Spironolactone, a Classic Potassium-Sparing Diuretic, Reduces Survivin Expression and Chemosensitizes Cancer Cells to Non-DNA-Damaging Anticancer Drugs	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 1550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11101550.	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 Tomomi Sanomachi, Shuhei Suzuki, Keita Togashi, Shizuka Seino, Takashi Yoshioka, Chifumi Kitanaka, Masashi Okada, Masahiro Yamamoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Brexiprazole Reduces Survivin and Reverses EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor Resistance in Lung and Pancreatic Cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4817-4828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.13667.	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 -

1. 著者名 Shuhei Suzuki, Masahiro Yamamoto, Tomomi Sanomachi, Keita Togashi, Asuka Sugai, Shizuka Seino, Takashi Yoshioka, Chifumi Kitanaka, Masashi Okada	4. 巻 7
2. 論文標題 Brexiprazole, a Serotonin-Dopamine Activity Modulator, Can Sensitize Glioma Stem Cells to Osimertinib, a Third-Generation EGFR-TKI, via Survivin Reduction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers (Basel)	6. 最初と最後の頁 947
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers11070947	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 Shuhei Suzuki, Masahiro Yamamoto, Keita Togashi, Tomomi Sanomachi, Asuka Sugai, Shizuka Seino, Takashi Yoshioka, Chifumi Kitanaka, Masashi Okada	4. 巻 37
2. 論文標題 In vitro and in vivo Anti-Tumor Effects of Brexpiprazole, a Newly-Developed Serotonin-Dopamine Activity Modulator With an Improved Safety Profile	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 3547-3558
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26949	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5件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Masashi Okada, Shuhei Suzuki, Manabu Seino, Hiroyuki Takeda and Chifumi Kitanaka
2. 発表標題 The novel JNK inhibitor AS602801 inhibits cancer stem cells in vitro and in vivo
3. 学会等名 日本癌学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡田 雅司、鈴木 修平、倉元 謙太、武田 弘幸、清野 静香、北中 千史
2. 発表標題 がん幹細胞におけるJNK経路の機能解析
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Masashi Okada, Shuhei Suzuki, Manabu Seino, Hiroyuki Takeda, and Chifumi Kitanaka
2. 発表標題 Targeting the facilitative glucose transporter GLUT1 inhibits the self-renewal and tumor-initiating capacity of cancer stem cells
3. 学会等名 日本癌学会 年会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 岡田雅司, 北中 千史
2. 発表標題 グルコース代謝の抑制はがん幹細胞の 幹細胞性維持および腫瘍創始能を抑制する
3. 学会等名 放射線影響学会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 岡田 雅司、北中 千史
2. 発表標題 がん幹細胞におけるJNKの役割
3. 学会等名 生化学会大会
4. 発表年 2019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