

令和 3 年 5 月 16 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02908

研究課題名（和文）独自多重的アプローチでグリオーマ幹細胞完全攻略を狙う新規治療戦略開発研究

研究課題名（英文）Complete targeting of glioma stem cells through an original, multi-layered approach

研究代表者

北中 千史 (Chifumi, KITANAKA)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70260320

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、まず初めにグリオーマ幹細胞特異的脆弱性としてミトコンドリア呼吸鎖に着目して検討を行なったところ、ミトコンドリアDNA(mtDNA)にコードされる呼吸鎖構成タンパクの発現が選択的にグリオーマ幹細胞で高まっていること、さらにはグリオーマ幹細胞の生存が呼吸鎖依存的に維持されていることが明らかとなった。そこですでに臨床で用いられている既承認薬の中でミトコンドリア呼吸鎖機能阻害活性が期待できる薬剤のスクリーニングを行った結果、加齢黄斑変性治療薬であるverteporfinが、正常細胞や分化グリオーマ細胞には低毒性の条件下で、グリオーマ幹細胞に高度な細胞死を誘導することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん（悪性新生物）は長年にわたり我が国の死亡原因圧倒的第1位を維持しており、がんの克服は国家的にも重要な課題である。本課題はがんの再発・転移の主要因と考えられているがん幹細胞に着目し、そのがん幹細胞に作用することで再発・転移を防ぎがん根治が期待できるがん幹細胞治療薬開発を目指そうとする課題である。本課題では特に悪性脳腫瘍のがん幹細胞が持つ「アキレス腱」に着目し、そこを攻撃する薬剤を見出した点がユニークなものとなっている。本課題で得られた成果は難治を極める悪性脳腫瘍の長期治療成績の改善に大きく貢献することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this project, we focused on the mitochondrial respiratory chain as a possible vulnerability specific to glioma stem cells. The results revealed that the expression levels of the components of the respiratory chain encoded by the mitochondrial DNA were increased in glioma stem cells compared to their differentiated counterparts and that glioma stem cells were dependent on the respiratory chain for their survival. We then screened a panel of approved drugs known to inhibit the function of the respiratory chain, and successfully identified verteporfin, a therapeutic agent for age-related macular degeneration, as a glioma stem cell-specific drug that can induce extensive cell death in glioma stem cells while sparing their differentiated counterparts or normal cells.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：膠芽腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は腫瘍細胞の「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治療後再発の原因となり、「がんの治療を阻む最大要因」と考えられる。従ってヒトがんの中でも難治を極めるグリオブラストーマの「根治」を実現するうえで、グリオーマ幹細胞の制御はそのカギを握る重要なプロセスになるものと期待される。

これに対して我々はこれまでの研究の中で分化グリオーマ細胞 (= 非がん幹細胞) や正常細胞に影響せずグリオーマ幹細胞のみを選択的に殺傷する薬剤を発見し、グリオーマ幹細胞の「特異的脆弱性」の存在に光をあてた (引用文献 1)。我々はこのようなオリジナルな発見を踏まえ、独自のスクリーニング系を利用することでグリオーマ幹細胞特異的脆弱性のさらなる同定を試みたいと考えるに至った。

また、申請者らはこれまでにヒトへの応用が可能なグリオーマ幹細胞分化誘導薬 (グリオーマ幹細胞を腫瘍形成能を持たない非がん幹細胞へと分化誘導する薬剤) の開発に相次いで成功しているが (引用文献 2 - 5)、分化誘導薬にグリオーマ幹細胞殺傷薬を組み合わせる治療戦略が相乗的な幹細胞治療効果を生み出す可能性については世界的にも検討されたことはない。そこで我々は独自開発した「グリオーマ幹細胞特異的脆弱性を標的とする殺傷薬」と分化誘導薬を組み合わせる多重的アプローチの有効性を検証し、新規治療戦略の有用性を世界に先駆けて実証・提唱したいと考えるに至った。

## 2. 研究の目的

上記「背景」に記載の如くグリオーマ幹細胞特異的脆弱性を標的とする薬剤を見出すとともに、分化誘導薬との組み合わせ治療の有効性を示すことで、新たなグリオーマ幹細胞治療戦略を構築することを本研究課題の目的とした。

## 3. 研究の方法

実験には患者腫瘍組織に直接由来するグリオーマ幹細胞を用いた。

グリオーマ幹細胞を選択的に殺傷する薬剤のスクリーニングは、グリオーマ幹細胞とそれを分化誘導した細胞 (すなわち遺伝的に同一な細胞) をペアにし、かつ同一培養条件下で行なった。これにより比較する細胞の遺伝的背景や培養条件の違いに左右されることなくグリオーマ幹細胞固有の脆弱性に作用する薬剤を探索することが可能となった。

グリオーマ幹細胞と分化誘導細胞のペアを候補薬剤に暴露後、WST 法 (= 生細胞のミトコンドリア代謝活性を吸光代謝物質により比色定量) によりプレートリーダーを用いて測定、溶媒コントロールに対する生存率を算出し、幹細胞選択的に生存率低下を示す薬剤を候補薬剤として選び出した。

次いでそれぞれの候補薬剤について色素排除法による細胞死アッセイにより結果の確認を行い、最終的により多種類のグリオーマ幹細胞において選択的殺傷効果を示す、あるいは殺傷の選択性がより高い薬剤を選んだ。

最後に、このようにして選択された薬剤について、上述のグリオーマ幹細胞分化誘導薬との組み合わせで、*in vivo* におけるがん幹細胞治療効果について検討を行なった。動物モデルとしては、まず皮下モデルを用いることで、薬剤の組み合わせが腫瘍中のがん幹細胞量に与える影響を調べた。さらに頭蓋内モデルを用いて、脳腫瘍モデルマウスの生存期間に対して薬剤の組み合わせがどの程度延長効果を示すことができるかについて検討を行なった。

## 4. 研究成果

本課題では以下の如く、具体的な成果を得ることができた。

まず初めにグリオーマ幹細胞特異的脆弱性としてミトコンドリア呼吸鎖に着目して研究を進めたところ、ミトコンドリア DNA (mtDNA) にコードされる呼吸鎖構成タンパクの発現が選択的にグリオーマ幹細胞で高まっていることに加え、グリオーマ幹細胞の生存が呼吸鎖依存的に維持されていることを明らかにした。そこで候補薬剤パネルからミトコンドリア呼吸鎖機能阻害活性が期待できる薬剤のスクリーニングを行った結果、加齢黄斑変性治療薬である verteporfin が、正常細胞や分化グリオーマ細胞には低毒性の条件下で、グリオーマ幹細胞に高度な細胞死を誘導することを見出し報告した (引用文献 6)。

さらにその後 verteporfin 以外にも同様の効果を持った薬剤を見出し、現在マウスモデルを用いて分化誘導薬との組み合わせによる相乗的ながん幹細胞治療効果について検討を行なっている。

### < 引用文献 >

1. Kuramoto K et al. *FEBS Open Biol* 7:835-844, 2017
2. Matsuda K et al. *Sci Rep* 2:516, 2012
3. Sato A et al. *Stem Cells Transl Med* 1:811-824, 2012

4. Okada M et al. *Oncotarget* 7:27021-27032, 2016
5. Okada M et al. *Oncotarget* 8:94872-94882, 2017
6. Kuramoto K et al. *FEBS J* 287:2023-2036, 2020

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15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 Masahiro, Sanomachi Tomomi, Suzuki Shuhei, Uchida Hiroyuki, Yonezawa Hajime, Higa Nayuta, Takajo Tomoko, Yamada Yuki, Sugai Asuka, Togashi Keita, Seino Shizuka, Okada Masashi, Sonoda Yukihiko, Hirano Hirofumi, Yoshimoto Koji, Kitanaka Chifumi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Roles for hENT1 and dCK in gemcitabine sensitivity and malignancy of meningioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/neuonc/noab015	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 Kenta, Yamamoto Masahiro, Suzuki Shuhei, Togashi Keita, Sanomachi Tomomi, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibition of the Lipid Droplet? Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Axis Suppresses Cancer Stem Cell Properties	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 99 ~ 99
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes12010099	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 Suzuki Shuhei, Okada Masashi, Sanomachi Tomomi, Togashi Keita, Seino Shizuka, Sato Atsushi, Yamamoto Masahiro, Kitanaka Chifumi	4. 巻 295
2. 論文標題 Therapeutic targeting of pancreatic cancer stem cells by dexamethasone modulation of the MKP-1/JNK axis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 18328 ~ 18342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.015223	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 ONO Takahiro, KITANAKA Chifumi, and others. For the Tohoku Brain Tumor Study Group	4. 巻 60
2. 論文標題 Molecular Features and Prognostic Factors of Pleomorphic Xanthoastrocytoma: A Collaborative Investigation of the Tohoku Brain Tumor Study Group	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 543 ~ 552
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmc.oa.2020-0155	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 KEITA, OKADA MASASHI, SUZUKI SHUHEI, SANOMACHI TOMOMI, SEINO SHIZUKA, YAMAMOTO MASASHIRO, YAMASHITA HIDETOSHI, KITANAKA CHIFUMI	4. 巻 40
2. 論文標題 Inhibition of Retinoblastoma Cell Growth by CEP1347 Through Activation of the P53 Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4961 ~ 4968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.14499	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 Shuhei, Yamamoto Masahiro, Sanomachi Tomomi, Togashi Keita, Sugai Asuka, Seino Shizuka, Okada Masashi, Yoshioka Takashi, Kitanaka Chifumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Doxazosin, a Classic Alpha 1-Adrenoceptor Antagonist, Overcomes Osimertinib Resistance in Cancer Cells via the Upregulation of Autophagy as Drug Repurposing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 273 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8080273	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 Tomomi, Suzuki Shuhei, Togashi Keita, Sugai Asuka, Seino Shizuka, Okada Masashi, Yoshioka Takashi, Kitanaka Chifumi, Yamamoto Masahiro	4. 巻 11
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	6. 最初と最後の頁 1550 ~ 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 Suzuki Shuhei, Yamamoto Masahiro, Togashi Keita, Sanomachi Tomomi, Sugai Asuka, Seino Shizuka, Yoshioka Takashi, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 10
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 -

1. 著者名 YAMAMOTO MASAHIRO, SUZUKI SHUHEI, TOGASHI KEITA, SANOMACHI TOMOMI, SEINO SHIZUKA, KITANAKA CHIFUMI, OKADA MASASHI	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 Research	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/anticanres.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 MASAHIRO, SUZUKI SHUHEI, TOGASHI KEITA, SANOMACHI TOMOMI, SEINO SHIZUKA, KITANAKA CHIFUMI, OKADA MASASHI	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 Research	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/anticanres.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 Shuhei, Okada Masashi, Takeda Hiroyuki, Kuramoto Kenta, Sanomachi Tomomi, Togashi Keita, Seino Shizuka, Yamamoto Masahiro, Yoshioka Takashi, Kitanaka Chifumi	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 KENTA, YAMAMOTO MASAHIRO, SUZUKI SHUHEI, SANOMACHI TOMOMI, TOGASHI KEITA, SEINO SHIZUKA, KITANAKA CHIFUMI, OKADA MASASHI	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 Research	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/anticanres.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 KEITA, OKADA MASASHI, YAMAMOTO MASAHIRO, SUZUKI SHUHEI, SANOMACHI TOMOMI, SEINO SHIZUKA, YAMASHITA HIDETOSHI, KITANAKA CHIFUMI	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 Research	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 Suzuki Shuhei, Yamamoto Masahiro, Sanomachi Tomomi, Togashi Keita, Sugai Asuka, Seino Shizuka, Okada Masashi, Yoshioka Takashi, Kitanaka Chifumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Doxazosin, a Classic Alpha 1-Adrenoceptor Antagonist, Overcomes Osimertinib Resistance in Cancer Cells via the Upregulation of Autophagy as Drug Repurposing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 273 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines8080273	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 Kenta, Yamamoto Masahiro, Suzuki Shuhei, Sanomachi Tomomi, Togashi Keita, Seino Shizuka, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Verteporfin inhibits oxidative phosphorylation and induces cell death specifically in glioma stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 not determined
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.15187	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 北中 千史
2. 発表標題 脳神経外科医にとっての (基礎) 研究
3. 学会等名 第39回脳神経外科コンgres総会 (招待講演)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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