

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05329

研究課題名(和文) 癌発生機序の解明を目指した酸化還元酵素を基盤とするタンパク質ネットワークの理解

研究課題名(英文) Elucidation of protein networks for the mechanism of carcinogenesis through the oxidoreductase in the endoplasmic reticulum

研究代表者

野村 尚生 (Nomura, Takao)

北海道大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：90597840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌幹細胞を得る手段として、初代培養細胞以外では、多くの研究者は薬剤による耐性獲得細胞株を癌幹細胞として調製しているが、これはあくまでも“薬剤耐性株”であり、真の癌幹細胞なのかはわかっていない。申請者は複数の手法を組み合わせ、癌細胞株中にごく微量存在する癌幹細胞様細胞を単離することに成功した。小胞体局在酸化還元酵素を標的とする新規HE-1抗癌剤による機構究明を目指した。好気条件では、ミトコンドリア異常は検出されず、同様の挙動を示すが、嫌気条件では、HE-1への感受性が高まることが判明した。これはHE-1は試験管よりも生体中での効果が高いことを証明していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

申請者が開発を続けている抗癌剤は今までの抗癌剤とは標的を別とし、新規作用機序で癌細胞に作用することが考えられる。そのため、既存の癌タンパク質以外で、新たなタンパク質ネットワークが見出されることに期待ができた。以前の研究で見出されたミトコンドリアタンパク質群を本研究では標的としたが、活性酸素種の産生には大きな違いが見出されなかった。しかしながら、嫌気・好気条件ではミトコンドリアによるエネルギー産生には大きな違いがあり、ここに新規抗癌剤の作用機序解明の手がかりが見つかった。

研究成果の概要(英文)：There are reports that drug-resistant cell lines were created as cancer stem cells other than primary cultured cells in order to obtain cancer stem cells, but these are just "drug-resistant cells" and are true cancer stem cells. Our research team has succeeded in isolating cancer stem cell-like cells, which are present in very small amounts in commercially available cancer cell lines, by combining multiple methods. The purpose of this study was to investigate the mechanism of a novel HE-1 anticancer drug that targets oxidoreductase localized in the endoplasmic reticulum. Under aerobic conditions, no mitochondrial abnormalities were obtained and similar behavior was observed, however, under anaerobic conditions, susceptibility to HE-1 was found to increase. This is considered to prove that HE-1 is more effective in vivo than in vitro.

研究分野：創薬研究

キーワード：癌 ミトコンドリア 機能解明

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

標的とした酸化還元調節酵素は酸素を消費して、様々なタンパク質のジスルフィド結合形成を触媒する酸化還元酵素の調節タンパク質として働き、小胞体内でのタンパク質の成熟に重要な役割を担っている。正常組織と比較して酸化還元調節酵素が種々の癌細胞株および癌組織において高発現していることを確認した。一方で、RNA 干渉による酸化還元調節酵素のノックダウンによって腫瘍増殖能の減少が見られたことから、腫瘍形成において酸化還元調節酵素の重要性が明確となり、酸化還元調節酵素の高発現によって腫瘍増殖能が亢進することが明らかとなった。当初、この酸化還元調節酵素は腫瘍増殖において、ジスルフィド結合を有する血管内皮増殖因子 VEGF などの増殖因子産生制御に直接的役割を果たしていると考えていたが、共同研究グループの田村らがケモカインの産生に関与していることを報告し、免疫系に働き血管新生を誘導していることを示した[1]。また、我々も酸化還元調節酵素阻害剤を用いて VEGF 産生量を解析したが、優位差を検出することはできなかった。酸化還元調節酵素の制御は薬剤耐性・転移に関与する癌幹細胞への制癌効果も大いに期待できる。

### 2. 研究の目的

申請者は酸化還元調節酵素を有用な創薬標的と見なし、1 万化合物ライブラリーからスクリーニングを行い、阻害化合物 HE-I を得た。さらに、HE-I 添加による次世代シーケンサーを用いた CAGE 法（発現量および転写因子活性化解析）により、分化に関与する転写因子；①神経分化、糖新生、老化にも関係や②造血管、性分化の活性低下、が大腸癌幹細胞において見出された。さらに、興味深いことにミトコンドリア関連タンパク質の増減が多く観察された。腫瘍は恒常的な低酸素環境に曝されていることを考えると、酸化還元調節酵素の発現増強による新生血管の誘導は理にかなっているが、一方で酸化還元調節酵素の発現に依存性が高い腫瘍にとってはアキレス腱となる。酸化還元調節酵素により誘導される転写因子、ミトコンドリアの環境変化を解明することで腫瘍増殖・転移を制御でき、癌の根治につながることを期待できる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規癌幹細胞様細胞の作成

癌幹細胞を得る手段として、初代培養細胞以外では、多くの研究者は薬剤による耐性獲得細胞株を癌幹細胞として調製しているが、これはあくまでも“薬剤耐性株”であり、真の癌幹細胞なのかはわかっていない。癌幹細胞は通常のカンサ細胞内にわずかに含まれると考えられる。そこで、申請者は複数の手法を組み合わせ、通常の購入可能な癌細胞株からその中に極微量存在する癌幹細胞を単離することに成功した。この細胞は酸化還元調節酵素の発現量が高く、さらに逆解析としてその酸化還元調節酵素をノックダウン・ノックアウトすることで、この性質がキャンセルされることを見出した。すなわち酸化還元調節酵素と癌幹細胞形成の明確な正の相関を明らかとした。本手法により独自の癌幹細胞様細胞として SPAF 細胞を調製する。

#### (2) HE-I 添加によるミトコンドリア電子伝達系への効果解析

複数種類での SPAF 細胞株を用いることで、ミトコンドリア電子伝達系で機能するタンパク質の機能を、産生される活性酸素種を測定することで解析する。それぞれの活性酸素種と反応する蛍光プローブを用いて、HE-I 添加時、非添加時のミトコンドリアにおける活性酸素種（ROS）の種類をそれぞれ特異的に検出することで、その ROS を生み出す電子伝達系における機能不全部位の同定を目指す。測定にはフローサイトメトリー法を用いて、細胞中の活性酸素種発生分布を解析した。（セルソーター SH800, Sony

Lifesciences)。

### (3) 好気・嫌気条件下での HE-I による制癌効果解析

ミトコンドリアの機能のもう一つとして、エネルギー産生がある。エネルギー産生は好気条件と嫌気条件では大きく違い、電子伝達系とグルコース代謝による別の経路を複合的に調べる必要がある。そこで、グルコース取り込みを活発に行なっている乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞株とそれの SPAF 細胞株を用いて細胞外フラックスアナライザー (XFe96, Agilent Technologies) によるミトコンドリア酸素濃度および水素イオン濃度の測定から、ミトコンドリア呼吸および解糖系の計測を行なった。また、HE-I 添加により低酸素培養を行い、細胞増殖能アッセイを実施した。

## 4. 研究成果

### (1) 新規癌幹細胞様細胞の作成

申請段階では大腸癌細胞株および1種類の乳癌細胞株のみ、SPAF 細胞を単離していたが、HE-I の抗癌作用の比較検討のため、さらに複数種類癌細胞株の SPAF 細胞の作成を行なった。さらに、乳癌2株、肺癌、子宮頸癌、悪性黒色腫、ADL 血液癌、胎児性腎臓癌、神経芽腫細胞株の SPAF 細胞調製を実施した。乳癌2株、肺癌、子宮頸癌、悪性黒色腫細胞株については SPAF 細胞を単離可能であり、残りの ADL 血液癌、胎児性腎臓癌、神経芽腫細胞株では、分離の過程で死滅する細胞やそもそも基準となる測定に適さない細胞しか存在せず、濃縮分離することができない細胞株であった。前者の死滅する細胞に関しては、条件検討により改善の余地があり、培養条件の検討を行なっている。

### (2) HE-I 添加によるミトコンドリア電子伝達系への効果解析

複数種類の蛍光プローブ (五稜化学) を用いて、活性酸素種の測定を行なった。まず、元の癌細胞株ではほぼ全ての細胞株で  $H_2O_2$  の活性化が見られ、HE-I を添加することで蛍光強度の減少が見られた (図1)。しかしながら、他の活性酸素種 ( $\cdot OH$ 、 $ONCO\cdot$ 、 $HClO\cdot$ 、 $O_2\cdot$ ) については HE-I 添加によって大きな変化を観測することはできず、Linear スケールでの変化では、もっとも  $HClO\cdot$  が蛍光強度の減少を示した。このことから、活性酸素種の生産を行うミトコンドリアタンパク質にはほぼ影響がないことが示唆された。しかしながら、 $H_2O_2$  の産生数を抑えているのは酸化還元調節酵素を阻害しているためかは本実験からはわからない。活性酸素種の無毒化を行う SOD1 などの可能性もあるが、HE-I による制癌効果はミトコンドリアを標的としていない可能性が高い。

HE-I添加による蛍光強度変化 (%)

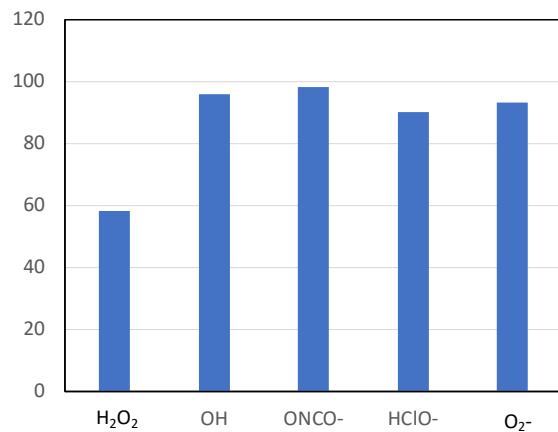


図1 活性酸素種のHE-Iによる減少度

### (3) 好気・嫌気条件下での HE-I による制癌効果解析

活性酸素種の生産、消化以外のミトコンドリアの機能として、エネルギー産生がある。特に癌細胞においてはワールブルグ効果が報告されており、腫瘍環境からも低酸素状態であることから好気呼吸でのエネルギー産生は抑えられ、グルコース-ピルビン酸合成経路を介した解糖系からのエネルギー産生が優勢であると考えられている。そこで、

MDA-MB-231 細胞株系を用いて好気・嫌気条件でのエネルギー産生を解析可能な細胞外フラックスアナライザーを用いて、エネルギー経路解析を行なった(図2)。しかしながら、HE-I 添加・非添加時を比較した場合、元の癌細胞で

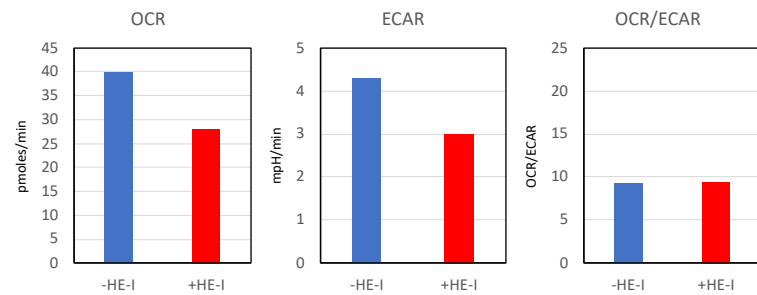


図2 細胞外フラックスアナライザー解析

は酸素濃度 (OCR) および水素イオン濃度 (ECAR) の減少が確認されたが、その比率; ミトコンドリア代謝 (OCR/ECAR) に大きな変化が見られず、(2) の結果と同様に、ミトコンドリア代謝にも影響が好気条件ではないことが判明した。

そこで、好気条件ではなく、嫌気条件での解析を試みた。低酸素培養装置を用いて、酸素濃度 2%での癌細胞および癌幹細胞様細胞の培養を行い、HE-I 添加・非添加時の細胞増殖能を解析した。その結果、癌細胞・癌幹細胞様細胞、両方において、低酸素培養時に制癌効果が高いことが判明した(図3)。通常の培養では、薬剤排泄能の高い癌幹細胞様細胞は HE-I を排泄することで薬剤耐性を示していたと考えられるが、低酸素培養を行うことで、元の細胞株と同程度まで細胞増殖能を抑えることができることが判明した。

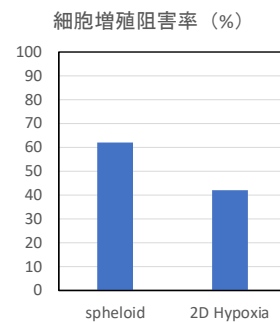


図3 腫瘍環境模倣による増殖率阻害

腫瘍モデルとして用いられるスフェロイド培養などの三次元培養を行なった際にも、同様に HE-I の効果が発揮されることが、以前の研究からも判明しているため、HE-I は *in vitro* よりも *in vivo* で効果を示す可能性が高い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakagawa Natsumi, Sakaguchi Shuya, Nomura Takao, Kamada Rui, Omichinski James G., Sakaguchi Kazuyasu	4. 巻 521
2. 論文標題 The tetramerization domain of the tree shrew p53 protein displays unique thermostability despite sharing high sequence identity with the human p53 protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 681 ~ 686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.10.130	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 Tokuda Eiichi, Nomura Takao, Ohara Shinji, Watanabe Seiji, Yamanaka Koji, Morisaki Yuta, Misawa Hidemi, Furukawa Yoshiaki	4. 巻 1864
2. 論文標題 A copper-deficient form of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase as an early pathological species in amyotrophic lateral sclerosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 2119 ~ 2130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2018.03.015	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 Kakuguchi Wataru, Nomura Takao, Kitamura Tetsuya, Otsuguro Satoko, Matsushita Kazuhiro, Sakaitani Masahiro, Maenaka Katsumi, Tei Kanchu	4. 巻 7
2. 論文標題 Suramin, screened from an approved drug library, inhibits HuR functions and attenuates malignant phenotype of oral cancer cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 6269 ~ 6280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.1877	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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 野村尚生、松丸尊紀、春山知樹、前田直良、奥村正樹、金村進吾、稲葉謙次、田村保明、前仲勝実
2. 発表標題 小胞体ストレス応答性酸化還元調節酵素を標的とした創薬スクリーニング
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村尚生、松丸尊紀、春山知樹、前田直良、奥村正樹、金村進吾、稲葉謙次、田村保明、前仲勝実
2. 発表標題 Acadenia anti-cancer Drug Discovery targeted for ER-stress Responsive Enzyme
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野村尚生、柿田浩輔、古川敦、穴田仁洋、橋下俊一、松永茂樹、齊藤貴士、前仲勝実
2. 発表標題 免疫受容体PILRaと単純ヘルペスウイルス1型gB糖ペプチドの相互作用解析
3. 学会等名 第13回ケミカルバイオロジー学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村尚生、柿田浩輔、古川敦、穴田仁洋、橋下俊一、松永茂樹、齊藤貴士、前仲勝実
2. 発表標題 Binding Mechanism of Glycopeptide Derived from HSV-1 with Human Immune Receptor PILRa
3. 学会等名 第10回国際ペプチドシンポジウム / 第55回ペプチド討論会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 野村尚生、柿田浩輔、古川敦、穴田仁洋、橋下俊一、松永茂樹、齊藤貴士、前仲勝実
2. 発表標題 ヒト単純ヘルペスウイルス由来糖ペプチドと免疫受容体PILR 相互作用解析
3. 学会等名 第57回NMR討論会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 初代培養細胞を用いない株化細胞からの癌幹細胞の調製法	発明者 前仲勝実、野村尚生	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-097691	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
---------------------------	-----------------------	----

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