

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08539

研究課題名(和文) 除鉄による幹細胞性喪失のメカニズムの解明と癌幹細胞治療への新展開

研究課題名(英文) Exploring the mechanism of stemness suppression by iron chelators and applying a novel therapeutic modality for cancer stem cells

研究代表者

大原 利章 (Ohara, Toshiaki)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40623533

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)：癌の治療抵抗性のメカニズムとして、癌幹細胞の存在が知られており、幹細胞性を有する癌細胞が腫瘍の再発、転移等の悪性化に寄与している事が報告されている。私達は幹細胞性の維持に鉄代謝が必要であることを見出し、鉄代謝を阻害する鉄キレート剤を癌細胞投与すると、増殖抑制効果と複数の幹細胞性マーカーの発現が阻害される事を *in vitro* および *in vivo* で示した。また、食道癌切除症例(134例)について幹細胞性マーカーNanogの発現と予後について検討を行い、Nanog高発現症例は予後が悪い事を明らかにした。これらの結果より、鉄キレート剤は治療困難であった癌幹細胞の新規治療法となり得る可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究によって癌細胞の幹細胞性は、iPS細胞から誘導したモデル細胞だけでなく、広く鉄代謝に依存的であり、鉄キレート剤を用いて鉄代謝を阻害する事が、癌幹細胞の治療になり得る事が示された。また、鉄キレート剤による幹細胞性抑制効果は、既存のSTAR3のリン酸化を阻害する癌幹細胞治療薬よりも高い事が示された。これらの結果は治療困難であった幹細胞性を有する癌の理解を深め、さらに治療に結び付く一助になる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) are reportedly responsible for therapeutic resistance such as recurrence and metastasis. We found that iron metabolism is a key factor in the stemness of CSCs. We demonstrated that iron chelators (DFX, DFO and SP10) suppressed the proliferation and stemness markers of cancer cells *in vitro* and *in vivo*. Among 134 immunohistochemically analyzed cases, high Nanog expression, correlated with low overall survival. In conclusion, iron chelators can be a novel therapeutic strategy for CSCs.

研究分野：消化器外科

キーワード：癌 幹細胞 鉄 キレート

## 1. 研究開始当初の背景

鉄は生体にとって必須の微量元素であり、正常細胞内はもとより癌細胞内でもエネルギーの産生等、様々に利用されている。癌の治療抵抗性のメカニズムのひとつとして癌幹細胞の存在が知られており、幹細胞性を有する癌細胞の存在が腫瘍の再発、転移等の悪性化に寄与している事が報告されている。癌幹細胞にはいくつか目印となる特徴的な因子(マーカー)が存在し、幹細胞性の度合いにより発現が変化する事が知られている。私達はこの幹細胞性の維持に鉄代謝が必要であることを見出し、**iPS**細胞から誘導した癌幹細胞モデル(**miPS-LLCcm**)に対して鉄キレート剤を投与すると、複数の幹細胞性マーカーの発現が喪失する事を明らかにした。しかし、幹細胞性の維持に関与する鉄代謝の詳細は未知であり、治療への応用研究も行われていない状態であった。

## 2. 研究の目的

癌幹細胞モデル以外の通常の癌細胞株についても、同様にその幹細胞性が鉄代謝に依存しているかを明らかにし、そのメカニズムを明らかにする。その知見を元に食道癌における幹細胞性マーカーと予後の関係性を明らかにし、さらに既存の癌幹細胞治療薬と幹細胞性制御能を比較し、鉄キレート剤の有用性を明らかにする事で癌幹細胞の新規治療法を確立する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

- 1) 通常の癌細胞株における幹細胞性の鉄代謝依存性の検討  
幹細胞性マーカーを発現しているヒト扁平上皮癌株(**HSC-2**、**TE8**)およびヒト食道腺癌株(**OE33**)を準備し、鉄キレート剤(**Deferasirox**; **DFX**、**Super-polyphenol**; **SP10**)投与時の幹細胞性マーカーおよび鉄関連蛋白の発現の変化を検討した。また、癌細胞内の**2**価鉄を蛍光プローブ(**Ferhonox-1**)で染色し、その変化を観察した。
- 2) 鉄キレート剤投与時の機能的な幹細胞性の変化の検討  
幹細胞性マーカーを発現しているヒト癌細胞株(**HSC-2**、**OE33**)について鉄キレート剤(**DFX**)投与時の**Sphere**形成能の変化について検討した。
- 3) 鉄キレート剤と既存の癌幹細胞治療薬との比較  
癌幹細胞治療薬で**Stat3**のリン酸化を抑制する**BBI608**(**Napabucasin**)と鉄キレート剤(**DFX**、**SP10**)との幹細胞性マーカーの阻害活性の違いについてヒト食道癌細胞株(**TE8**、**OE33**)を用いて検討を行った。
- 4) 治療抵抗性および幹細胞性維持に関わるメカニズムの探索  
幹細胞性マーカーの発現を抑制させることのできる鉄キレート剤(**DFX**、**SP10**)とできない既存の抗がん剤(**CDDP**、**5-FU**)を用いて、**RNA**マイクロアレイ、**PCR**、**ELISA**で関係するメカニズムの探索を行った。
- 5) 担癌マウスモデルでの鉄キレート剤の効果の検証  
幹細胞性マーカーを発現しているヒト癌細胞株(**HSC-2**、**OE33**)で皮下腫瘍マウスモデル**BALB/c**(**nu/nu**)を作成し、鉄キレート剤(**DFX**、**SP10**)を投与し、抗腫瘍効果について検討を行った。
- 6) 癌における幹細胞性マーカーの発現と予後との関係  
岡山大学病院で手術を受けた食道癌切除症例(134例)について**Nanog**で免疫染色を行い、**Nanog**の発現と予後について検討を行った。

## 4. 研究成果

- 1) 通常の癌細胞株における幹細胞性の鉄代謝依存性の検討  
幹細胞性マーカーを発現しているヒト癌細胞株(**HSC-2**、**TE8**、**OE33**)はいずれも鉄キレート剤(**DFX**、**SP10**)の投与により濃度依存的に幹細胞性マーカーである**Nanog**、**c-Myc**、**Klf4**、**Oct4**、**SOX2**の発現が低下し、増殖抑制効果も認められた。対照的に既存の抗がん剤(**CDDP**、**5-FU**)では増殖抑制効果は認められるものの上記の幹細胞性マーカーの発現低下は得られず、癌細胞の幹細胞性は鉄代謝に依存しており、鉄キレート剤による鉄代謝阻害がその喪失に繋がる事が示された。また、鉄キレート剤投与時に癌細胞内

- 2 価鉄は、その分布に変化が認められ、幹細胞性の変化と連動している事が確認された。
- 2) 鉄キレート剤投与時の機能的な幹細胞性の変化の検討  
同様に **HSC-2**、**OE33** に対して鉄キレート剤 (**DFX**) 投与時すると **Sphere** 形成が抑制され、**siNanog** で処理しても同様に **Sphere** 形成が抑制されたため、鉄キレート剤によって **Nanog** の発現を阻害する事が、機能的な幹細胞性の抑制に繋がる事が証明された。
- 3) 鉄キレート剤と既存の癌幹細胞治療薬との比較  
**BB1608** はヒト食道癌細胞株 (**TE8**、**OE33**) に対して **STAR3** のリン酸化阻害活性は確認されたが、幹細胞性マーカーの **Nanog**、**c-Myc**、**Klf4**、**Oct4** の発現阻害効果は認められなかった。鉄キレート剤 (**DFX**、**SP10**) はいずれのマーカーの発現も抑制するため、**BB1608** と比較すると幹細胞性阻害効果は強い事が示された。
- 4) 治療抵抗性および幹細胞性維持に関わるメカニズムの探索  
**TE8** 細胞を用いた **RNA** マイクロアレイの結果から、治療抵抗性および幹細胞性の維持に係るシグナル経路のうち、**IL-6** およびその受容体が強く誘導する結果が得られた。そのため、ヒト食道癌細胞株 (**TE8**、**OE33**) に対して鉄キレート剤 (**DFX**、**SP10**) と既存の抗がん剤 (**CDDP**、**5-FU**) を投与し、**PCR**、**ELISA** を用いて実際の誘導効果の検証を行った。**CDDP** では **IL-6** の強い誘導効果が認められる一方、**DFX**、**SP10** では認められなかった。しかし、実際に **IL-6** および可溶性 **IL-6** 受容体を **TE8** 細胞に対して投与しても **Nanog** の発現に変化はなく、**IL-6** のオートクラインのみで幹細胞性マーカーの発現は制御されている訳ではなく、癌微小環境をより深く研究する必要があると考えられた。
- 5) 担癌マウスモデルでの鉄キレート剤の効果の検証  
**HSC-2**、**TE8** を用いてヌードマウスに皮下腫瘍マウスモデルを作成し、鉄キレート剤 (**DFX** ; **160mg/kg**、**3日/週**、**SP10** ; **200mg/kg**、**5日/週**) を投与し、抗腫瘍効果について検討を行った。いずれも腫瘍の増殖抑制効果が認められたが、**OE33** の実験では腫瘍の免疫染色を行い、**Nanog** の発現が抑制されている事が確認された。
- 6) 癌における幹細胞性マーカーの発現と予後との関係  
食道癌切除症例 (134 例) について幹細胞性マーカー **Nanog** の発現と予後について検討を行った。既報に習いスコアリングを行うと、**Nanog** の高発現群は 98 例、低発現群は 36 例であった。**Nanog** 陽性症例は有意に予後が悪い事が示され (HR, 2.53; 95%CI, 1.24-5.14; P = 0.01)、術後無再発期間についても同様に **Nanog** 陽性症例は有意に短かった (HR, 2.33; 95%CI, 1.19-4.58; P = 0.01)。さらに興味深い事に、術前補助化学療法の有無別に比較すると無し群では **Nanog** の発現と予後に差は認められなかったが、有り群のみで有意に **Nanog** 陽性症例の予後が悪い事が示された。このことは **Nanog** の発現が単に食道癌の予後と相関するだけでなく、治療抵抗性を示すバイオマーカーとなり得る事を示していると考えられた。

## まとめ

癌細胞の幹細胞性は鉄代謝に依存しており、鉄キレート剤で阻害すると増殖抑制効果と共に複数の幹細胞性マーカーの発現や機能的な幹細胞性が喪失する事が明らかになった。また、鉄キレート剤は既存の癌幹細胞治療と比較しても幹細胞性抑制効果が高く、新規治療薬となり得る事が示唆された。また、食道癌では幹細胞マーカーの **Nanog** の発現が、予後および治療抵抗性と関係がある事が示された。癌細胞の幹細胞性と鉄代謝の詳細との関係にはいまだ未知な部分も多く、癌微小環境を含めさらなる研究が必要と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yuehua Chen, Toshiaki Ohara, Boyi Xing, Jiping Qi, Kazuhiro Noma, Akihiro Matsukawa	4. 巻 74
2. 論文標題 A Promising New Anti-Cancer Strategy: Iron Chelators Targeting CSCs.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Medica Okayama	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18926/AMO/57946	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 該当する
1. 著者名 Yuki Katsura, Toshiaki Ohara, Kazuhiro Noma, Takayuki Ninomiya, Hajime Kashima, Takuya Kato, Hiroaki Sato, Satoshi Komoto, Toru Narusaka, Yasuko Tomono, Boyi Xing, Yuehua Chen, Hiroshi Tazawa, Shunsuke Kagawa, Yasuhiro Shirakawa, Tomonari Kasai, Masaharu Seno, Akihiro Matsukawa and Toshiyoshi Fujiwara	4. 巻 11
2. 論文標題 A Novel Combination Cancer Therapy with Iron Chelator Targeting Cancer Stem Cells via Suppressing Stemness.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 117
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25973.	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 Toshiaki Ohara, Yasuko Tomono, Xing Boyi, Sun Yingfu, Kazuhiro Omori, Akihiro Matsukawa	4. 巻 9
2. 論文標題 A novel, nontoxic iron chelator, super-polyphenol, effectively induces apoptosis in human cancer cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 32751-32760
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25973	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 該当する
1. 著者名 Toru Narusaka, Toshiaki Ohara, Kazuhiro Noma, Noriyuki Nishiwaki, Yuki Katsura, Takuya Kato, Hiroaki Sato, Yasuko Tomono, Satoru Kikuchi, Hiroshi Tazawa, Yasuhiro Shirakawa, Akihiro Matsukawa, Toshiyoshi Fujiwara	4. 巻 -
2. 論文標題 Nanog is a promising chemoresistant stemness marker and therapeutic target by iron chelators for esophageal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.33544	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大原 利章、桂 佑貴、野間 和広、西脇 紀之、河本 慧、田澤 大、香川 俊輔、藤原 俊義
2. 発表標題 鉄キレート剤による幹細胞性制御による新規食道癌治療法
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Narusaka, Toshiaki Ohara, Kazuhiro Noma, Yuki Katsura, Noriyuki Nishiwaki, Motoyasu Tabuchi, Takuro Fushimi, Toshihiro Ogawa, Sho Takeda, Satoshi Komoto, Hiroaki Sato, Takuya Kato, Satoru Kikuchi, Yasuko Tomono, Hiroshi Tazawa, Shunsuke Kagawa, Yasuhiro Shirakawa, Toshiyoshi Fujiwara.
2. 発表標題 Stemness control by iron chelator is a novel therapeutic strategy for esophageal cancer
3. 学会等名 110th Annual Meeting American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳴坂 徹、木村 文昭、大原 利章
2. 発表標題 除鉄による幹細胞性制御による新規食道癌治療法の開発
3. 学会等名 第43回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toshiaki Ohara, Yuki Katsura, Kazuhiro Noma, Toru Narusaka, Takayuki Ninomiya, Hiroaki Sato, Satoshi Komoto, Takuya Kato, Yasuko Tomono, Hiroshi Tazawa, Shunsuke Kagawa, Yasuhiro Shirakawa, Toshiyoshi Fujiwara
2. 発表標題 Iron depletion suppress the stemness markers and functions of cancer stem cells
3. 学会等名 109th Annual Meeting American Association for Cancer Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大原 利章、Sun, Yingfu、友野 靖子、松川 昭博
2. 発表標題 除鉄による癌幹細胞の幹細胞性マーカーと機能は制御される
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大原利章、桂佑貴、野間 和広、鳴坂 徹、佐藤浩明、河本慧、加藤卓也、田澤大、香川 俊輔、藤原 俊義
2. 発表標題 鉄キレート剤の幹細胞性制御による新規癌治療法
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大原利章、桂佑貴、野間 和広、鳴坂 徹、二宮 卓之、友野靖子、田澤大、香川 俊輔、白川 靖博、松川 昭博、藤原 俊義
2. 発表標題 鉄キレート剤の幹細胞性制御による新規癌治療法の確立
3. 学会等名 第29回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鳴坂徹，桂佑貴，木村文昭，大原利章
2. 発表標題 除鉄による幹細胞性制御による新規食道癌治療法の開発
3. 学会等名 第42回日本鉄バイオサイエンス学会学術集会
4. 発表年 2018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
連携研究者	松川 昭博  (Matsukawa Akihiro)  (90264283)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授    (15301)	

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