

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：35302

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16364

研究課題名（和文）オートファジー活性制御を介した肝細胞がん幹細胞に対する治療法の開発

研究課題名（英文）Development of Therapies against Hepatocellular Carcinoma Stem Cells via Regulation of Autophagy Activity

研究代表者

藤原 信行（Nobuyuki, Fujiwara）

岡山理科大学・獣医学部・助教

研究者番号：30805875

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は当初、がん幹細胞でのオートファジーを特異的に抑制する抗がん戦略の構築を研究代表者がこれまでに明らかにしてきたオートファジーの制御機構に着目して行う予定であった。しかし、研究を進める中でがん幹細胞においてタンパク質脱リン酸化酵素であるPP6の発現が上昇していることが認められたため、その制御メカニズムを明らかにすることががん幹細胞を標的とした創薬につながると考え目標を変更した。その結果、PP6がオートファジーによる発現制御を受けること、PP6がオートファジーを抑制していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにProtein phosphatase 6（PP6）は、様々ながん種で遺伝子に変異していることや発現が変化することが報告されており、がんにおいて重要な因子であることは認識されているがPP6発現がどのように制御されているかは全く明らかになっていなかった。本研究によりPP6の発現制御機構の一端が明らかになったことにより、様々ながん種の発生メカニズムの解明や治療法の開発の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Initially, our plan was to develop an anticancer strategy to specifically inhibit autophagy in cancer stem cells by focusing on the regulatory mechanism of autophagy, which we had previously elucidated. However, as the expression of PP6, a protein phosphatase, was found to be up-regulated in cancer stem cells, I changed the goal of the project, thinking that clarifying the regulatory mechanism would lead to drug discovery targeting cancer stem cells. As a result, we found that PP6 is regulated by autophagy and that PP6 suppresses autophagy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：cancer stem cell autophagy PP6

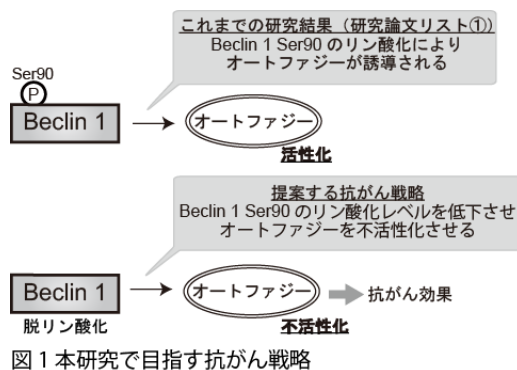
1. 研究開始当初の背景

がん組織は、未分化な細胞から高度に分化した細胞など、様々な「**がん細胞**」が混在することで複雑な腫瘍組織が構成されている。この腫瘍組織中には正常組織と同様な幹細胞「**がん幹細胞**」が存在し、がん幹細胞が様々な性質のがん細胞を供給することで階層性を有した腫瘍組織を構成していると考えられている。また、がん幹細胞は抗がん剤や放射線に対する強い抵抗性や、がんの再発・転移に重要な役割を果たしており、がん幹細胞を標的とした創薬が求められている。

オートファジーは細胞内小器官やタンパク質を膜構造で取り囲み、さらにリソソームと融合することで中身を分解する細胞内タンパク質分解機構である。近年、がん幹細胞においてオートファジー活性が上昇していることや (*Mol Cells*, 40 :54-65, 2017 他)、オートファジー活性を低下させることでがん幹細胞に対する抗がん効果が得られることが報告されている (*Int. J. Dev. Biol.* 59: 95-108 2015)。しかし、既存のオートファジーを抑制する薬剤 (クロロキンなど) は全ての細胞に存在するリソソームの機能抑制が標的となっているため、眼障害や骨髄抑制など様々な副作用の問題が指摘されている。研究代表者は、研究開始前までにオートファジーに必須の因子である Beclin 1 の新規リン酸化サイトとして、Ser90 を同定し、Ser90 のリン酸化がオートファジー誘導に関与すること、Ser90 が Death-associated protein kinase 3 (DAPK3) によりリン酸化されること、Protein phosphatase 2A (PP2A) により脱リン酸化されることを報告しており (*J Biol Chem.* 2016, 13;291 (20):10858-66)、肝細胞がん細胞から誘導したがん幹細胞で Beclin 1 の Ser90 がリン酸化されることを見出していた。

2. 研究の目的

以上のような背景から、肝内転移などによって再発率の高い予後不良ながん腫の1つである肝細胞がんのがん幹細胞での Beclin 1 Ser90 リン酸化の役割やがん幹細胞で Beclin 1 Ser90 がリン酸化されるメカニズムを明らかにし、抗がん剤の標的としての可能性を明らかにすることで、既存の抗がん剤とは全く異なる作用点を持つオートファジー活性を特異的に抑制する極めて独創的な抗がん戦略を構築することを目的とした (図1)。



3. 研究の方法

がん細胞株として肝細胞がん細胞株、大腸がん細胞株、すい臓がん細胞株を使用した。これらの細胞株を独自開発したがん幹細胞誘導培地で培養することで各種がん細胞株からがん幹細胞の誘導を行った。誘導した細胞を細胞生物学的手法や生化学的手法で解析を行った。また、免疫不全マウスを用いたがん細胞の移植実験により増殖速度や幹細胞性に関する解析を行った。さらに腫瘍組織を用いて生化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1)各種がん細胞株でタンパク質脱リン酸化酵素 Protein phosphatase 6 (PP6) 発現が上昇していることを見出し、PP6 がオートファジーにより分解されることを明らかにした。

各種がん細胞株でがん細胞株を誘導し、各種タンパク質脱リン酸化酵素の発現量を解析したところ、PP6 発現がいずれの細胞株でも発現が上昇していることが認められた。このため、この PP6 発現が上昇するメカニズムの検討を行った。その結果、PP6 は薬剤の処置やオートファジー関連タンパク質のノックアウトによるオートファジーの抑制により発現が上昇すること、反対に飢餓刺激によりオートファジーを誘導したときに発現が減少することが認められた。このことから、PP6 がオートファジーにより分解されていることが示唆された。そこで PP6 がオートファジーにより分解されるメカニズムを PP6 の結合因子を解析することで検討したところ、PP6 が選択的オートファジー分解の基質である p62 と結合することが認められ、p62 の発現抑制により PP6 のオートファジーによる分解が停止することが認められた。以上のことから、PP6 が p62 と結合することでオートファジーによる選択的な分解を受けることが明らかとなった。

一連の成果は「Autophagy regulates levels of tumor suppressor enzyme protein phosphatase 6」として、2020 年の cancer science 誌に掲載された。

(2)PP6 が Beclin 1 と結合することで Beclin 1-VPS34 複合体を解離させオートファジーを抑制していることを明らかにした。

(1) で PP6 がオートファジーにより分解されることが明らかになったことから、反対に PP6 がオートファジーに与える影響を検討した。shRNA を用いて PP6 発現を抑制し、オートファジー活性を検討したところ PP6 の発現抑制によりオートファジー活性が上昇することが明らかとなった。さらに PP6 と同じ type 2A protein phosphatase に分類される PP2A が Beclin 1 Ser90 を脱リン酸化していることを明らかにしていたことから、PP6 と Beclin 1 の結合を解析したところ PP6 が Beclin 1 の C 末端領域に結合していることが認められた。Beclin 1 の C 末端領域はオートファジー誘導に必須な Vps34 との結合領域であることから PP6 が Beclin 1-Vps34 複合体に与える影響を検討したところ、PP6 は Beclin 1-Vps34 複合体を解離させることが認められた。以上のことから PP6 は Beclin 1-Vps34 複合体を解離させることでオートファジーを抑制していることが明らかとなった。

一連の成果は「Protein phosphatase 6 dissociates the Beclin 1/Vps34 complex and inhibits autophagy」として、2021 年の Biochemical and Biophysical Research Communications に掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakashima-Nakasuga C, Hazama S, Suzuki N, Nakagami Y, Xu M, Yoshida S, Tomochika S, Fujiwara N, Matsukuma S, Matsui H, Tokumitsu Y, Kanekiyo S, Shindo Y, Maeda N, Tsunedomi R, Iida M, Takeda S, Yoshino S, Ueno T, Hamamoto Y, Ogihara H, Hoshii Y, Nagano H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Serum LOX-1 is a novel prognostic biomarker of colorectal cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol.	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) 10.1007/s10147-020-01673-2.	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 Fujiwara Yasuhiro, Tsunedomi Ryouichi, Yoshimura Kiyoshi, Matsukuma Satoshi, Fujiwara Nobuyuki, Nishiyama Mitsuo, Kanekiyo Shinsuke, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Tokumitsu Yukio, Yoshida Shin, Iida Michihisa, Suzuki Nobuaki, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, Hazama Shoichi, Nagano Hiroaki	4. 巻 50
2. 論文標題 Pancreatic Cancer Stem-Like Cells With High Calreticulin Expression Associated With Immune Surveillance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 405 ~ 413
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001772	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 Fujiwara Nobuyuki, Shibutani Shusaku, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 552
2. 論文標題 Protein phosphatase 6 dissociates the Beclin 1/Vps34 complex and inhibits autophagy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 191 ~ 195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.136	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 Fujimoto Takuya, Tsunedomi Ryouichi, Matsukuma Satoshi, Yoshimura Kiyoshi, Oga Atsunori, Fujiwara Nobuyuki, Fujiwara Yasuhiro, Matsui Hiroto, Shindo Yoshitaro, Tokumitsu Yukio, Suzuki Nobuaki, Kobayashi Shogo, Hazama Shoichi, Eguchi Hidetoshi, Nagano Hiroaki	4. 巻 21
2. 論文標題 Cathepsin B is highly expressed in pancreatic cancer stem-like cells and is associated with patients' surgical outcomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12291	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 Fujiwara Nobuyuki, Shibutani Shusaku, Sakai Yusuke, Watanabe Toshio, Kitabayashi Issay, Oshima Hiroko, Oshima Masanobu, Hoshida Hisashi, Akada Rinji, Usui Tatsuya, Ohama Takashi, Sato Koichi	4. 巻 111
2. 論文標題 Autophagy regulates levels of tumor suppressor enzyme protein phosphatase 6	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4371 ~ 4380
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14662	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 Yamada Kensuke, Hazama Shoichi, Suzuki Nobuaki, Xu Ming, Nakagami Yuki, Fujiwara Nobuyuki, Tsunedomi Ryouichi, Yoshida Shin, Tomochika Shinobu, Matsukuma Satoshi, Matsui Hiroto, Tokumitsu Yukio, Kanekiyo Shinsuke, Shindo Yoshitaro, Watanabe Yusaku, Iida Michihisa, Takeda Shigeru, Ioka Tatsuya, et al.	4. 巻 21
2. 論文標題 Siglec-7 is a predictive biomarker for the efficacy of cancer vaccination against metastatic colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 1 ~ 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2020.12271	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10件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤原信行、恒富亮一、碓彰一、友近忍、鈴木伸明、大浜剛、佐藤晃一、永野浩昭
2. 発表標題 Protein phosphatase 6は大腸癌細胞の幹細胞性を制御する
3. 学会等名 第9回日本プロテインホスファターゼ研究会 学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nobuyuki Fujiwara, Ryouichi Tsunedomi, Shoichi Hazama, Nobuaki Suzuki, Takashi Ohama, Shigefumi Yoshino, Hiroaki Nagano
2. 発表標題 Protein phosphatase 6 controls tumor malignancy of colon cancer through regulation of cancer stemness.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原 信行、恒富 亮一、碓 彰一、友近 忍、鈴木 伸明、大浜 剛、佐藤 晃一、永野 浩昭
2. 発表標題 Protein phosphatase 6は大腸癌細胞の幹細胞性を制御する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤原信行、碓彰一、友近忍、鈴木伸明、武田茂、吉野茂文、大浜剛、佐藤晃一、上野富雄、永野浩昭
2. 発表標題 Protein phosphatase 6は大腸癌の悪性化に関与する
3. 学会等名 第73回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原信行、恒富亮一、碓彰一、友近忍、鈴木伸明、武田茂、大浜剛、佐藤晃一、吉野茂文、上野富雄、永野浩昭
2. 発表標題 Protein phosphatase 6 controls tumor progression of colon cancer.
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 Nobuyuki Fujiwara, Shusaku T. Shibutani, Yusuke Sakai, Hiroshi Shima, Toshio Watanabe, Hiroko Ohshima, Masanobu Ohshima, Tathuya Saito, Shizuo Akira, Hiroaki Nagano, Tathuya Usui, Takashi Ohama, Koichi Sato
2. 発表標題 Elucidation of control mechanism of type 2A protein phosphatase by autophagy
3. 学会等名 第13回プロテインホスファターゼ国際カンファレンス Workshop on Frontiers in Phosphatase Research and Drug Discovery (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤原 信行、渋谷 周作、坂井 祐介、島 礼、渡邊 利雄、大島 浩子、大島 正伸、齋藤 達哉、審良 静男、永野 浩昭、白井 達哉、大浜 剛、佐藤 晃一
2. 発表標題 オートファジーによる type 2A protein phosphatase の制御機構の解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 恒富亮一、西山光郎、藤原信行、松隈 聡、兼清信介、友近 忍、徳光幸生、飯田通久、鈴木伸明、武田茂、山本 滋、吉野茂文、上野富雄、碓 彰一、永野浩昭
2. 発表標題 がん幹細胞様細胞と臨床サンプルとの統合解析により同定されたがん幹細胞関連遺伝子
3. 学会等名 第26回日本消化器関連学会週間 (JDDW2018)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ryouichi Tsunedomi, Kiyoshi Yoshimura, Satoshi Matsukuma, Nobuyuki Fujiwara, Shinsuke Kanekiyo, Michihisa Iida, Nobuaki Suzuki, Shigeru Takeda, Shigefumi Yoshino, Shoichi Hazama, Tomio Ueno, Hiroaki Nagano
2. 発表標題 RAB3B was identified as a gene involved in characteristics of induced cancer stem-like sphere cells
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 藤原信行、恒富亮一、碓彰一、友近忍、鈴木伸明、大浜剛、佐藤晃一、永野浩昭
2. 発表標題 Protein phosphatase 6は大腸がん細胞の幹細胞性を制御する
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術総会
4. 発表年 2020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
---------	---------