

令和 6 年 5 月 14 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07631

研究課題名(和文) 酸化リン酸化を標的とした新規がん幹細胞標的治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-cancer stem cell therapeutic strategies targeting oxidative phosphorylation

研究代表者

岡田 雅司 (Okada, Masashi)

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：70512614

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)：腫瘍の発生・維持にはがん幹細胞が中心的な役割を果たしており、様々な治療法が報告されつつあるがその制圧は未だ困難である。我々はがん幹細胞(CSC)とCSCと同一遺伝子を持つ非がん幹細胞(non-CSC)を比較・差分解析することでCSC特異的脆弱性を見出しCSCを制圧可能な治療法開発を目指している。本課題において、細胞内脂肪酸蓄積がCSCの幹細胞性機能維持に必要であること、CSCはnon-CSCに比較してOXPHOSや葉酸代謝が高くその生存に必須であり、この阻害がCSC殺傷薬となり、CSC殺傷薬と分化誘導薬の併用がin vivoにおいても有効であることなどを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、CSCにはnon-CSCと比較して様々な特異的脆弱性が存在し、それらを標的とすることでCSCを機能的もしくは物理的に殺傷することで腫瘍中のCSC数を減少させること、また、CSC殺傷薬とCSC分化誘導薬を併用により腫瘍中のCSC数を減らすことを明らかにしたことは、これらのCSC標的治療法が非常に有望であることを示している。特に本課題にて我々が見出した一部のCSC標的薬はヒトに対して安全性情報がある薬剤をドラッグリポジショニングの手法により流用したものであるため、臨床応用により踏み込みやすく社会的意義も非常に高いことがわかる。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells (CSCs) play pivotal roles in the development and maintenance of tumors. Although various therapies/drugs against CSCs have been developed, their suppression remains difficult. We performed differential analyses between CSCs and isogenic non-CSCs to develop CSC-targeted therapies. In this study, we show that the lipid accumulation in the lipid droplet and its turnover are essential for the maintenance of stemness. And we revealed that CSCs have higher OXPHOS and folate metabolisms than non-CSCs, and their inhibition is lethal in CSCs. Moreover, we indicated that the combination treatment of a CSC-differentiation inducer developed in our previous studies and a CSC-killing drug described above is a promising CSC-targeting approach.

研究分野：腫瘍生物学、腫瘍治療学、生化学、分子生物学

キーワード：がん幹細胞 酸化リン酸化 OXPHOS ドラッグリポジショニング 代謝

1. 研究開始当初の背景

がん根治を阻む主要原因として再発・転移が挙げられるが、その中心的役割を果たしているものとして、がん幹細胞 (Cancer stem cells: CSC) の存在がある。CSC は腫瘍中のごく一部にしか存在しない小集団ではあるが、高い腫瘍形成能・治療抵抗性を持つことから CSC の制御こそが根治の鍵として期待されており、世界中でその制御方法について研究が行われている。このような背景の中、我々は CSC を非がん幹細胞(non-CSC)へと分化誘導させる薬剤の開発を手がけ、「分化誘導療法」が非常に有効であることを世界に先駆けて報告してきた (Okada M et al., Oncotarget. 2017., Matsuda K et al., Sci Rep. 2012 他)。この「分化誘導療法」の効果は腫瘍中に存在する CSC が一定数以内の場合、その根絶が期待できるため、予め腫瘍中に含まれる CSC 数を減じることができれば「分化誘導療法」をより効果的に運用可能ではないかと考えられた。一方で過去の我々の研究課題から、ドラッグリポジショニングを活用し、生薬成分であるリコカルコン A 及び加齢黄斑変性治療薬であるビスサインが CSC 選択的に殺細胞効果を有する「CSC 殺傷薬」として働きうること、CSC の OXPHOS がその標的候補として上がりつつあった (Okada M et al., FEBS Open bio. 2017)。また当時、CSC のエネルギー代謝は Warburg 効果で説明されるような解糖系のみでの ATP 供給系とは異なり OXPHOS が重要であるという報告が相次ぎ (Sancho P, et al. Br. J. Cancer 2016., De Francesco EM., et al. Biochem. J. 2018)、我々の知見だけでなくこの別角度の研究報告からも、CSC の OXPHOS を標的とする治療法の確立ががん根治に有要である事が再確認されつつあった。一方で、CSC 殺傷薬の問題点として、治療後に non-CSC のうち完全分化に至っていない(=分化過程の中間段階にある)分化途上細胞からの再幹細胞化が起き、単独治療は効果が限定的である可能性があるが、上記の如く分化誘導療法前の CSC 数を減じる方法としての CSC 殺傷薬、特に、CSC の OXPHOS を標的とした薬剤の開発は CSC 標的治療法の最適解の一つと考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、これまでに我々が見出しつつあった OXPHOS が確かに CSC の特異的脆弱性であるかどうかを再確認しつつ、がん根治の最難関として考えられる CSC の OXPHOS 標的治療薬もしくはその他の CSC 特異的脆弱性標的薬を開発し、これまでに我々が開発してきた分化誘導薬と併用する新規 CSC 標的治療薬の確立を目的とした。

3. 研究の方法

CSC およびその CSC から分化誘導させた同質遺伝子を持つ non-CSC に対して、まずはミトコンドリア呼吸鎖複合体の様々な特異的阻害薬で処理しその生存を解析した。同様に、ヒトに対して安全性情報を持つ様々な薬剤を CSC および non-CSC に対して処理し、ミトコンドリア膜電位の減少および細胞生存を指標にして CSC 選択的に障害性を持つ薬剤を選別し一次スクリーニングとした。選別された薬剤に対して、正常細胞を加えた三者で色素排除法、ウエスタンブロット法などによる生存性試験や性状解析を行い、正常細胞に毒性がない条件下での CSC 殺傷効果を確認し二次スクリーニングとした。選別をクリアした一部の薬剤は動物実験に使用した。異所性もしくは同所性移植を行い、薬剤を投与し、腫瘍径もしくは生存期間を調べた。次に、腫瘍中の CSC 数を減じることができかどうかを連続移植実験を用いて調べた。また並行して、CSC と non-CSC を用いて様々なタンパク質の差分析を行い、仮にその差因子標的薬が存在するのであれば随時上記選別作業に組み込み検討を進めた。

4. 研究成果

4-1. CSC のモデル系として、膠芽腫がん幹細胞(glioma stem cells: GSC)を用いて実験を行った。GSC と non-GSC に対して、各種呼吸鎖複合体に対する阻害薬で処理すると、GSC のみこれらの阻害薬で生存が抑制され、non-GSC ではほとんど影響が見られなかった。また、通常の培養条件でミトコンドリア膜電位および ATP 産生量を測定すると GSC で有意に高いことが明らかとなった(図 1)。以上より、GSC の OXPHOS が non-GSC に比較して高く、GSC 特異的脆弱性の一つであることを明らかにした。

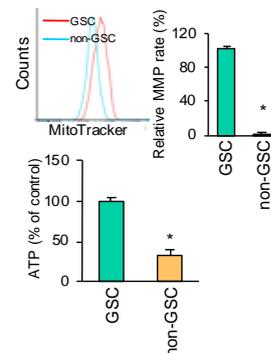


図1. GSCは膜電位、ATP産生が高い

4-2. GSC と non-GSC に対して様々な薬剤を処理し、スクリーニングを繰り返すことで、verteporfin が GSC の OXPHOS を標的として働く可能性が考えられた。verteporfin は GSC 選択的にその膜電位および ATP 産生量を減少させた。また、verteporfin は正常細胞や正常神経細胞に毒性を与えない濃度域で、GSC に対して有意に細胞死を誘導することを明らかにした(図 2)。以上より、verteporfin は GSC 選択的殺傷薬として働く、ということが示された。

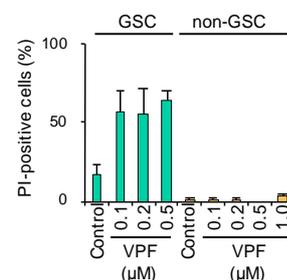


図2. VPFはGSC殺傷薬として働く

4-3. CSC のモデル系として、大腸がんおよび膵臓がん CSC を用いた。CSC と non-CSC を用いて薬剤

処理をしていたところ、その細胞形状に相違を見出し検証したところ、CSC では non-CSC に比較して脂肪滴が多く存在しており、細胞内の脂肪酸蓄積量もそれに相関することを明らかにした(図 3)。さらに脂肪酸代謝関連タンパク群の差分解析を行ったところ、Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) 標的遺伝子の発現が CSC に置いて高いことを見出した。この CSC における高い PPAR 活性の意義を明らかにするために、薬理的および遺伝学的に PPAR を抑制すると、CSC の幹細胞性が喪失することが明らかとなった。

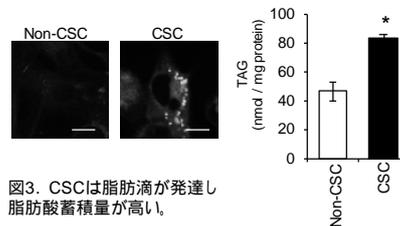


図3. CSCは脂肪滴が発達し脂肪酸蓄積量が高い。

4-4. CSCのモデル系としてGSCを用いた。GSC 選択的に殺傷性を持つ薬剤を探索していた時に、GSC の OXPHOS に影響は殆ど与えなかったが、正常細胞に影響を及ぼさない濃度域で GSC 選択的に殺傷する薬剤として、methotrexate/pemetrexed を同定した(図 4)。これら葉酸拮抗薬は葉酸トランスポーターによって取り込まれ代謝経路に作用するが、葉酸トランスポーターである RFC-1/SLC19A1 の発現が non-GSC に比較して GSC で高く、methotrexate の GSC 殺傷効果は RFC-1 に依存することを明らかにした。ヌードマウスを用いた治療モデルにて methotrexate 単剤では腫瘍の増大に影響を与えなかったが、連続移植実験にて methotrexate を CSC 殺傷薬として使用し分化誘導薬 CEP1347 と併用すると有意に生存期間の延長が見られたことから、たしかに腫瘍中の GSC を減少させることが明らかとなった(図 5)。これは CSC 殺傷薬+分化誘導薬の併用は非常に有望ながん幹細胞標的治療戦略であることを示している。

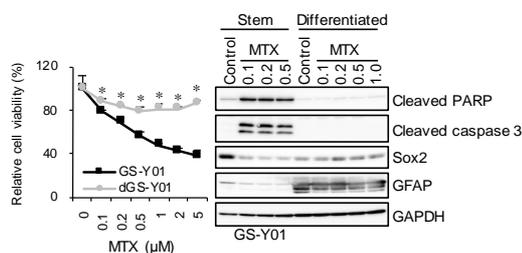


図4. MTXはGSC選択的に細胞死を誘導する

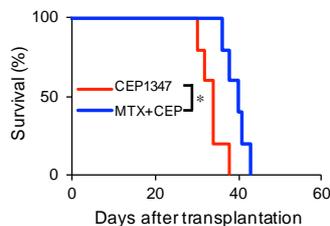


図5. MTX(GSC殺傷薬)とCEP(分化誘導薬)の併用は有意に生存期間を延長する

4-5. 分化誘導薬として用いた CEP1347 の薬理的性質を調べたところ、CEP1347 はがん幹細胞に対する分化誘導活性とは独立して、がん抑制遺伝子 p53 の負の制御因子の一つである Murine double minute (MDM) 4 の発現抑制によって p53 の発現上昇を促し強力に細胞増殖を抑制することを見出した(図 6)。特に p53 遺伝子が野生型で保持されていることが多い網膜芽細胞腫・髄膜腫・神経膠芽腫およびぶどう膜悪性黒色腫に対して有効であることを見出した。

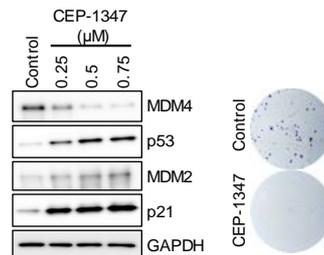


図6. CEP1347はMDM4を減少させp53を上昇させることで細胞増殖を抑制する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 16件）

1. 著者名 Nakagawa-Saito Y, Mitobe Y, Togashi K, Suzuki S, Sugai A, Kitanaka C, Okada M.	4. 巻 3
2. 論文標題 Givinostat Inhibition of Sp1-dependent MGMT Expression Sensitizes Glioma Stem Cells to Temozolomide.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 1131-1138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.16258.	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 Mitobe Y, Nakagawa-Saito Y, Togashi K, Suzuki S, Sugai A, Matsuda KI, Sonoda Y, Kitanaka C, Okada M.	4. 巻 10
2. 論文標題 CEP-1347 Targets MDM4 Protein Expression to Activate p53 and Inhibit the Growth of Glioma Cells.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 4727-4733
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15977	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 Masashi, Nakagawa-Saito Yurika, Mitobe Yuta, Sugai Asuka, Togashi Keita, Suzuki Shuhei, Kitanaka Chifumi	4. 巻 23
2. 論文標題 Inhibition of the Phospholipase C -c-Jun N-Terminal Kinase Axis Suppresses Glioma Stem Cell Properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8785 ~ 8785
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23158785	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 Nakagawa-Saito Yurika, Saitoh Shinichi, Mitobe Yuta, Sugai Asuka, Togashi Keita, Suzuki Shuhei, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 23
2. 論文標題 HDAC Class I Inhibitor Domatinostat Preferentially Targets Glioma Stem Cells over Their Differentiated Progeny	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8084 ~ 8084
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23158084	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 Okada M, Suzuki S, Togashi K, Sugai A, Yamamoto M, Kitanaka C.	4. 巻 22(21)
2. 論文標題 Targeting Folate Metabolism Is Selectively Cytotoxic to Glioma Stem Cells and Effectively Cooperates with Differentiation Therapy to Eliminate Tumor-Initiating Cells in Glioma Xenografts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	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) 10.3390/ijms222111633	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 M, Sanomachi T, Suzuki S, Togashi K, Sugai A, Seino S, Sato A, Okada M, Kitanaka C.	4. 巻 3(1)
2. 論文標題 Gemcitabine radiosensitization primes irradiated malignant meningioma cells for senolytic elimination by navitoclax.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurooncol Adv.	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) 10.1093/naajnl/vdab148.	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 S, Yamamoto M, Sanomachi T, Togashi K, Sugai A, Seino S, Yoshioka T, Okada M, Kitanaka C.	4. 巻 11(9)
2. 論文標題 Dexamethasone Sensitizes Cancer Stem Cells to Gemcitabine and 5-Fluorouracil by Increasing Reactive Oxygen Species Production through NRF2 Reduction.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Life (Basel)	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) 10.3390/life11090885	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 S, Yamamoto M, Sanomachi T, Togashi K, Seino S, Sugai A, Yoshioka T, Okada M, Kitanaka C.	4. 巻 41(9)
2. 論文標題 Lurasidone Sensitizes Cancer Cells to Osimertinib by Inducing Autophagy and Reduction of Survivin.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 4321-4331
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.15237	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, Sanomachi T, Suzuki S, Uchida H, Yonezawa H, Higa N, Takajo T, Yamada Y, Sugai A, Togashi K, Seino S, Okada M, Sonoda Y, Hirano H, Yoshimoto K, Kitanaka C.	4. 巻 23(6)
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 Oncol.	6. 最初と最後の頁 945-954
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 Yamamoto M, Sanomachi T, Suzuki S, Uchida H, Yonezawa H, Higa N, Takajo T, Yamada Y, Sugai A, Togashi K, Seino S, Okada M, Sonoda Y, Hirano H, Yoshimoto K, Kitanaka C.	4. 巻 -
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 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) 10.1093/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 K, Yamamoto M, Suzuki S, Togashi K, Sanomachi T, Kitanaka C, Okada M.	4. 巻 12(1)
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 (Basel)	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) 10.3390/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 S, Okada M, Sanomachi T, Togashi K, Seino S, Sato A, Yamamoto M, Kitanaka C.	4. 巻 295(52)
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 J Biol Chem.	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 Togashi K, Okada M, Suzuki S, Sanomachi T, Seino S, Yamamoto M, Yamashita H, Kitanaka C.	4. 巻 40(9)
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 Res.	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/anticancerres.14499.	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 S, Yamamoto M, Sanomachi T, Togashi K, Sugai A, Seino S, Okada M, Yoshioka T, Kitanaka C.	4. 巻 8(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 -
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 K, Yamamoto M, Suzuki S, Sanomachi T, Togashi K, Seino S, Kitanaka C, Okada M.	4. 巻 287(10)
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 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 2023-2036
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Togashi Keita, Suzuki Shuhei, Mitobe Yuta, Nakagawa-Saito Yurika, Sugai Asuka, Takenouchi Senri, Sugimoto Masahiko, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 16
2. 論文標題 CEP-1347 Dually Targets MDM4 and PKC to Activate p53 and Inhibit the Growth of Uveal Melanoma Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 118 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers16010118	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 Mitobe Yuta, Suzuki Shuhei, Nakagawa-Saito Yurika, Togashi Keita, Sugai Asuka, Sonoda Yukihiko, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 15
2. 論文標題 Antagonizing MDM2 Overexpression Induced by MDM4 Inhibitor CEP-1347 Effectively Reactivates Wild-Type p53 in Malignant Brain Tumor Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4326 ~ 4326
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers15174326	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 Mitobe Yuta, Suzuki Shuhei, Nakagawa-Saito Yurika, Togashi Keita, Sugai Asuka, Sonoda Yukihiko, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 11
2. 論文標題 The Novel MDM4 Inhibitor CEP-1347 Activates the p53 Pathway and Blocks Malignant Meningioma Growth In Vitro and In Vivo	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1967 ~ 1967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11071967	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 Nakagawa-Saito Yurika, Mitobe Yuta, Suzuki Shuhei, Togashi Keita, Sugai Asuka, Kitanaka Chifumi, Okada Masashi	4. 巻 24
2. 論文標題 Domatinostat Targets the FOXM1/Survivin Axis to Reduce the Viability of Ovarian Cancer Cells Alone and in Combination with Chemotherapeutic Agents	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 10817 ~ 10817
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms241310817	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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Masashi Okada, Shuhei Suzuki, Tomomi Sanomachi, Keita Togashi, Shizuka Seino, Atsushi Sato, Masahiro Yamamoto, and Chifumi Kitanaka
2. 発表標題 Therapeutic targeting of pancreatic cancer stem cells by dexamethasone modulation of the MKP-1- JNK axis
3. 学会等名 第94回 生化学大会
4. 発表年 2021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
---------	---------