

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08638

研究課題名(和文) 二重機能を有する抗酸化物質による難治性乳癌に対する新たな治療戦略

研究課題名(英文) Novel Therapeutic Strategies for Refractory Breast Cancer by Antioxidants with Dual Functions

研究代表者

高田 護 (Takada, Mamoru)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90800392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：難治癌に対する新規殺細胞性抗癌剤としてのCMPD1のメカニズム(MOA)を探索する研究である。CMPD1は細胞周期M期の有糸分裂時間延長と分裂異常から染色体不安定性の誘導に加えてCMPD1投与によるM期の細胞運動増加、間期の運動低下、癌細胞の遊走能低下、非足場依存性増殖能阻害、乳癌モデルマウスのCMPD1投与による血管侵襲低下、異常形態とそのMOAとしてMK2阻害活性によるアクチンのリモデリング抑制を発見した。乳癌モデルマウスではCMPD1の極めて微量での強い抗腫瘍効果と高い癌細胞障害選択性の発見とそのMOAとしてwash-out効率の差とCMPD1の非常に独特な微小管阻害MOAを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌診療において医療資源の多くはその治療薬、特に抗体医薬などの中・高分子型抗癌剤の開発に集中している。しかし現在の固形癌治療やICIやADCは併用及びペイロードとしてにおいて殺細胞性抗癌剤は必須である。細胞分裂を標的とした殺細胞性抗癌剤はひとつの理想型であり、重要性は益々高まっている。本研究はCMPD1の殺細胞性抗癌剤のポテンシャルを示し、その詳細なメカニズムを追求するものである。旧来の微小管阻害剤とは異なる微小管阻害メカニズムと、それらがもたらす癌細胞選択性と強い抗腫瘍効果を示したものである。CMPD1は癌細胞に対する複数標的治療の優位性と微小管ダイナミズムの中で未知の領域を示唆している。

研究成果の概要(英文)：This study investigates CMPD1, a novel cytotoxic anticancer agent for refractory cancers. CMPD1 induces chromosomal instability by extending mitotic duration and causing abnormalities during the M phase. It increases cell motility during mitosis and decreases it during interphase, reducing cancer cell migration and anchorage-independent growth. In a breast cancer mouse model, CMPD1 reduced vascular invasion and altered cellular morphology by inhibiting actin remodeling through MK2 inhibition. Remarkably, CMPD1 showed potent antitumor effects at low concentrations with minimal damage to normal cells, linked to differences in wash-out efficiency. CMPD1 also exhibits a unique microtubule inhibition mechanism, highlighting its potential as a promising therapeutic agent with multifaceted mechanisms against refractory cancers.

研究分野：腫瘍医学

キーワード：微小管阻害剤 小分子医薬 細胞分裂 微小管重合 ストレスキナーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

CMPD1の研究を行う前に、私は有糸分裂のメカニズムと細胞分裂における微小管動態の役割を詳細に研究してきました。私の研究は、特に紡錘体微小管の機能とそれがキネトコアと相互作用する際の染色体分配に関与する重要なプロセスに焦点を当ててきました。紡錘体形成チェックポイント (SAC) の理解と、その正確な染色体分配を保証する役割は私の研究の重要な側面であり、キネトコアと微小管の不適切な結合が異数性を引き起こし、癌の進行に寄与する可能性があります。

さらに、私は癌の病態生理学も探求し、癌細胞が正常な制御機構を回避して無制御の増殖を維持する方法に重点を置いて研究しました。私の研究は、細胞周期の進行を妨げることが癌治療の戦略として持つ治療的潜在能力を強調しています。特に、タキソールやエリブリンのような微小管標的薬 (MTAs) の有糸分裂停止および癌細胞死を誘導する効果について調査しました。これらの薬剤が広く使用されているにもかかわらず、オフターゲット効果や特定の癌サブタイプにおける耐性の発現などの限界を指摘し、新しくより効果的な MTAs の必要性を強調しました。

細胞シグナル伝達経路の文脈においては、p38 MAPK 経路とその下流のエフェクターである MK2 を研究しました。私の研究は、有糸分裂紡錘体の形成における MK2 の重要性と、癌治療の標的としての潜在能力を明らかにしました。

2. 研究の目的

CMPD1は、p38 依存性の MK2 リン酸化を阻害する薬剤として初めて開発されましたが、この分野において有望な候補として浮上しています。したがって、私の現在の研究は、CMPD1 がどのように抗癌効果を発揮するかの詳細なメカニズムを解明することを目的としています。具体的には、細胞周期の進行、微小管の動態、および癌細胞の遊走および侵襲に与える影響に焦点を当てています。

3. 研究の方法

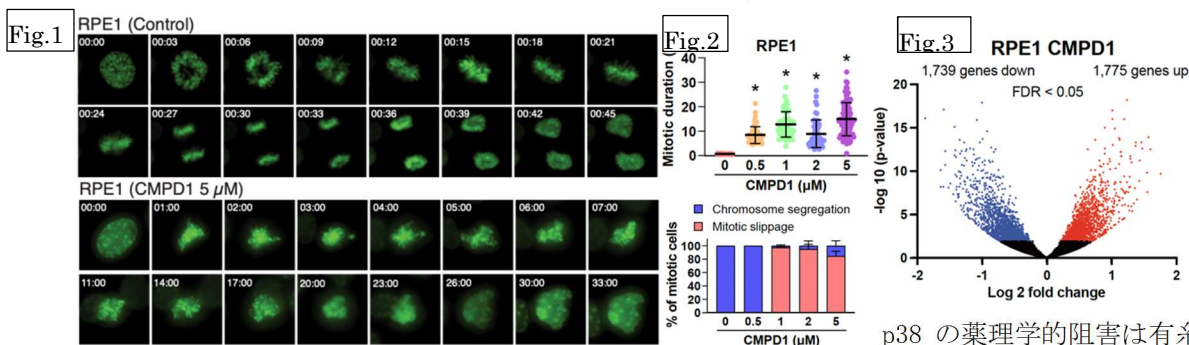
- (1) 細胞培養: ① 細胞: RPE1、CAL-51、MDA-MB-231、T47-D、HeLa ② 培地: DMEM または DMEM/F12 に 10% FBS、100 U/ml ペニシリン、100 mg/ml ストレプトマイシンを添加 ③ 条件: 37°C、5% CO₂ ④ 試薬: CMPD1、タキソール、MG132、MPS1 阻害剤 (DMSO に溶解) ⑤ 洗浄アッセイ: 2 μM CMPD1 を 4 時間インキュベートし、温めた完全培地で洗浄
- (2) イメージング: ① 機器: Nikon Ti-2 倒立顕微鏡、Hamamatsu Flash V2 CMOS カメラ、様々な対物レンズ (20x、40x、60x、100x) ② 手順: 1-3 μm の z ステップで 3D 積層画像を取得、2-3 分間隔で 24-72 時間 ③ 環境: Tokai Hit STX ステージトップインキュベーター ④ 解析: Nikon Element、MetaMorph、Imaris ⑤ 再現性: 全てのイメージングは少なくとも三回繰り返し実施
- (3) 画像解析: ① 有糸分裂の継続時間: NEBD から中期開始または有糸分裂終了まで ② チューブリン強度: カスタム ROI 解析 ③ キネトコアシグナル: 局所バックグラウンドを差し引いた統合蛍光強度 ④ 移動および運動性: Imaris ソフトウェアを使用して核の中心を追跡
- (4) 免疫蛍光: ① 固定: 37°C、10-15 分間、PHEM バッファーに 3% PFA で固定 ② 透過化: 0.5% NP40 ③ 抗体: CREST、Mad1、二次抗体 (Alexa488 または Rhodamine Red-X で標識) ④ 封入: Prolong Diamond 抗退色封入剤
- (5) 試験管内微小管動態アッセイ: ① 準備: GMPCPP 安定化シード、ローダミン標識チューブリンでの微小管重合 ② イメージング: 全内部反射蛍光 (TIRF) 顕微鏡 ③ 解析: FIJI/ImageJ
- (6) 非足場依存性増殖アッセイ: ① 設定: 底層に 1% アガロース、細胞および化合物を含む 0.8% アガロース/培地 ② インキュベーション: 5% CO₂、湿潤環境で 3 週間 ③ 染色: 100 μg/ml のヨードニトロテトラゾリウム塩化物溶液
- (7) チューブリン重合アッセイ: ① キット: HTS-チューブリン重合アッセイバイオキット (Cytoskeleton Inc.) ② 測定: 340 nm で吸光度を 60 分間、30 秒間隔で測定 ③ コントロール: パクリタキセル (10 μM)
- (8) トランスウェル移動アッセイ: ① キット: CytoSelect 24 ウェル細胞侵襲アッセイキット ② 手順: 血清なし培地、夜間飢餓、3.0 × 10⁴ 細胞/ウェルを播種し、48 時間インキュベーション ③ 測定: 560 nm で吸光度を測定
- (9) 血管侵襲評価: ① 染色: HE 染色 ② 評価: 2 名の研究者による盲検評価、血管侵襲の厳格な基準
- (10) RNA-Seq: ① 処理: 10 μM CMPD1 を 24 時間処理 ② RNA 精製: RNeasy Mini Kit ③ シーケンシング: TruSeq ストランド mRNA キット、NovaSeq6000 ④ 解析: STAR アライ

ナー、featureCounts、DESeq2、経路強化のための DAVID

- (11) 腫瘍異種移植: ① モデル: 直腸癌モデル (CB17-Prkdcscid/Jcl マウス) ② 手順: MDA-MB-231 細胞を注入、CMPD1 またはタキソールで治療、腫瘍測定 ③ 遵守: 国立衛生研究所ガイドライン
- (12) FACS: ① 準備: エタノール固定、PI 染色、フローサイトメトリー
- (13) 統計: ① テスト: 両側無対立学生 t 検定、一元配置分散分析 (ANOVA) ② TIRF 実験: Z スコア、マンホイットニー検定、ウェルチの t 検定 ③ 有意性: $p < 0.05$, $** p < 0.01$, $*** p < 0.001$, $**** p < 0.0001$ ④ 再現性: 少なくとも二つの独立した実験

4. 研究成果

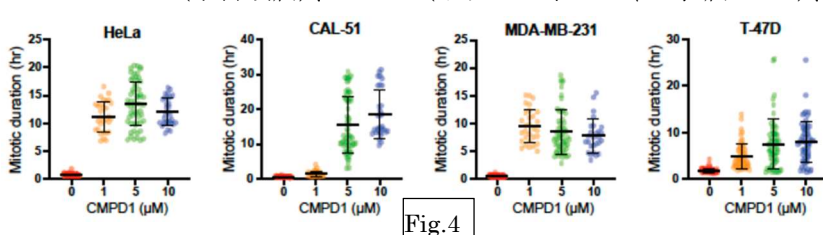
CMPD1 は RPE1 細胞において重度の中期前期停止と有糸分裂スリッページを誘導する



p38 の薬理的阻害は有糸分裂停止を引き起こし、MK2 の枯渇は細胞分裂中の紡錘体形成を破壊することが示されています。CMPD1 が細胞周期の進行に与える影響を評価するため、まず非転換性網膜色素上皮細胞 (RPE1) において CMPD1 が細胞周期停止を誘導するかどうかをフローサイトメトリー (FACS) で検討しました。FACS 解析により、CMPD1 処理は RPE1 細胞を G2/M 期で停止させることが明らかになり、これは以前の神経膠芽腫および胃癌細胞を用いた結果と一致しています。CMPD1 によって細胞が G2/M 期のどの段階で停止するかを特定するために、高い時空間分解能のライブセルイメージングを実施しました。CMPD1 存在下でも細胞は核膜崩壊 (NEBD) を起こすことができ、これは CMPD1 が G2 期または前期で細胞周期停止を誘導しないことを示しています。有糸分裂の継続時間 (NEBD から中期開始または有糸分裂終了までの時間) を測定したところ、CMPD1 処理細胞では有意に延長され、平均有糸分裂継続時間は対照細胞の 25 分に対して 9 時間以上でした (Fig. 1-2)。2 μM CMPD1 で処理した後 12 時間で測定した有糸分裂指数は、対照細胞に比べて CMPD1 処理細胞で有意に高かったです。高濃度の CMPD1 (1-5 μM) は、有糸分裂細胞の 90%以上が有糸分裂スリッページを介して有糸分裂を終了する結果となりました (Fig. 1D)。低濃度の CMPD1 (0.5 μM) ではほとんどの細胞が中期を通過しましたが、90%の中期細胞で染色体の不整合が見られ、35%の中期開始細胞で染色体ブリッジが観察され、低濃度でも CMPD1 が有糸分裂の欠陥を引き起こすことが示されました (Fig. 2)。さらに、CMPD1 は有糸分裂終了後の微小核または多核の発生を有意に増加させました。10 μM CMPD1 で処理した 24 時間後の RPE1 細胞における RNA-seq 解析では、1,739 個の遺伝子がダウンレギュレーションされ、1,775 個の遺伝子がアップレギュレーションされていることが明らかになりました (Fig. 3)。遺伝子オンロジー解析は、アップレギュレーションされた遺伝子が有糸分裂および有糸分裂紡錘体に関連するものであることを示しました。これらの発見は、CMPD1 処理が RPE1 細胞において中期前期の長時間の停止とその後の有糸分裂スリッページを誘導することを示唆しています。

CMPD1 は様々な細胞株で重度の有糸分裂停止を誘導する

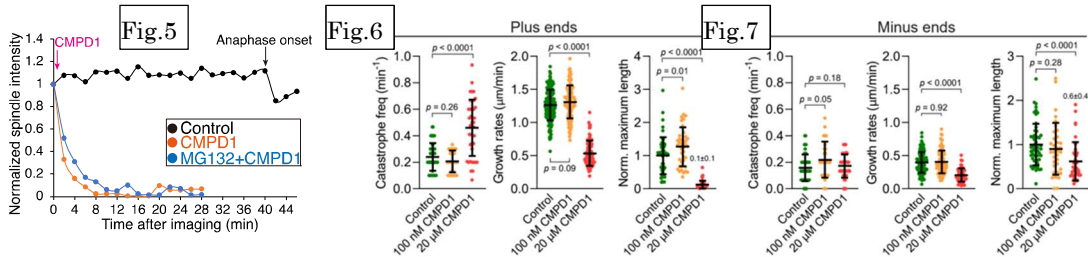
CMPD1 が HeLa (子宮頸癌)、CAL-51 (トリプルネガティブ乳癌: TNBC)、MDA-MB-231 (TNBC)、T-47D



(ルミナル A 乳癌) などの様々な癌細胞種で有糸分裂停止を誘導できるかを調査しました。全ての癌細胞株で、CMPD1 処理により RPE1 細胞と同様の顕著な中期前期停止が観察されました (Fig. 4)。FACS 解析により、CMPD1 処理が MDA-MB-231 細胞の G2/M 期集団を増加させることが確認され、これは p53 状態に依存しない中期前期停止を誘導することを示唆しています。中期前期停止は通常、紡錘体形成チェックポイント (SAC) の活性化によって引き起こされます。必須の SAC 構成要素である Mad1 の免疫染色により、CMPD1 処理でキネトコアにおける Mad1 シグナルレベルが増加することが示され、SAC の活性化が示唆されました。SAC 活性を低下させる Mps1 阻害剤 Reversine を用いた処理は、CMPD1 存在下でも有糸分裂の継続時間

を有意に減少させました。これらの結果は、CMPD1 が SAC の活性化を介して中期前期停止を引き起こすことを示しています。

CMPD1 は細胞内および in vitro で微小管脱重合を誘導する

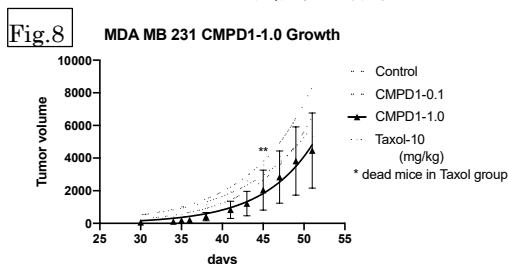


CMPD1 処理により SAC の活性化および有糸分裂紡錘体に関連する遺伝子のアップレギュレーションが観察されたため、CMPD1 が微小管脱重合を引き起こす可能性があると仮定しました。免疫蛍光解析により、0.5 μM を超える濃度の CMPD1 で処理された RPE1 細胞で微小管シグナル強度が低下し、紡錘体形成が阻害されることが示されました。mNeonGreen-チューブリンおよび mScarlet-ヒストン H2B で標識された中期 CAL-51 細胞の高時空間分解能ライブセルイメージングにより、CMPD1 添加後 8 分以内に紡錘体シグナルレベルが急激に低下し、中期板の整列が破壊されることが示されました (Fig. 5)。同様の微小管脱重合効果が CMPD1 処理された RPE1 細胞でも観察されました。プロテアソーム阻害剤 MG132 での処理は、CMPD1 による紡錘体シグナルレベルの減少を防がなかったため、プロテアソーム依存の分解が原因ではないことが示されました。試験管内チューブリン重合アッセイでは、CMPD1 が用量依存的に微小管重合を抑制することが示されました。全内部反射蛍光顕微鏡 (TIRF) により、高濃度の CMPD1 (20 μM) が微小管プラス端の安定性を有意に低下させ、破局頻度を増加させ、成長速度およびプラス端での最大長を減少させる一方で、マイナス端の動態には影響を与えないことが示されました (Fig. 6-7)。既知の微小管脱重合剤であるビンブラスチンは両端に影響を与え、CMPD1 のプラス端を不安定化させる独特の特性を強調しています。これらのデータは、CMPD1 が直接的かつ選択的に微小管のプラス端を不安定化させることを示しています。

CMPD1 は有糸分裂停止細胞において [Protrusion] を誘導する

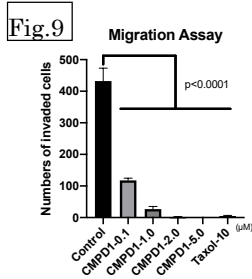
ライブセルイメージングにより、CMPD1 処理された中期前期細胞が対照細胞よりも 12 倍長い距離を移動する高い染色体運動性を示すことが明らかになりました。この増加した運動性は、延長された有糸分裂停止の結果ではなく、タキソールによる中期前期停止では同じ効果が得られませんでした。CMPD1 処理はまた、染色体のクラスター化を引き起こし、CMPD1 処理細胞の 50% で複数の染色体クラスターが観察されました。CMPD1 は有糸分裂細胞において顕著な膜変形を引き起こし、動的なフィロポディア様突起を形成しました。これらの突起は、クラスター化された染色体の移動に寄与し、CMPD1 による膜動態が染色体の運動性を促進することを示唆しています。

CMPD1 は非足場依存性成長およびマウス異種移植モデルにおける腫瘍成長を抑制する



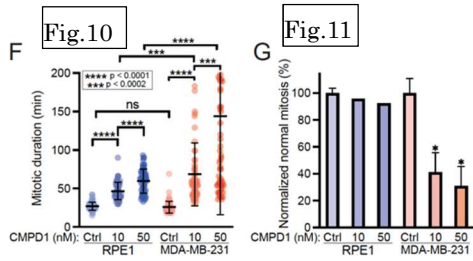
CMPD1 は、HeLa および MDA-MB-231 細胞において用量依存的に非足場依存性成長を有意に減少させ、500 nM で完全に抑制しました。インビボでは、CMPD1 は MDA-MB-231 異種移植マウスモデルにおける腫瘍成長をタキソールよりも低濃度で効果的に減少させ、全体的な生存率を向上させました (Fig. 8)。

CMPD1 は Migration および Invasion を抑制する



CMPD1 は用量依存的に間期 RPE1 細胞の運動性、移動、および侵襲を有意に減少させました (Fig. 9)。MDA-MB-231 細胞を用いたトランスウェル侵襲アッセイでは、CMPD1 が侵襲能力を有意に抑制し、1 μM で完全に抑制することが示されました (Fig. 9)。インビボでは、CMPD1 処理マウスで血管への癌細胞浸潤が減少しました。CMPD1 は微小管動態およびアクチンリモデリングの両方を破壊し、細胞移動および侵襲に対する抑制効果に寄与しています。

CMPD1 は癌細胞に対する強力で選択的な微小管脱重合剤である



Washout アッセイにより、CMPD1 で停止した RPE1 細胞のほぼ 100% が治療後正常に進行できる一方で、MDA-MB-231 および CAL-51 細胞は高い有糸分裂エラーおよび細胞死率を示すことが明らかになりました (Fig. 10-11)。癌細胞は CMPD1 に対してより感受性が高く、低濃度で染色体不安定性が増加し、有糸分裂継続時間が延長されました (Fig. 10-11)。これらの結果

は、CMPD1 が選択的に癌細胞に染色体不安定性を誘導し、強力な抗癌剤であることを示しています。

結論

CMPD1 は、中期前期停止、有糸分裂停止、微小管脱重合を誘導し、独自のメカニズムを介して癌細胞の成長および侵襲を抑制することにより、選択的な抗癌剤としての可能性を示しています。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1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 DiDonna Sarah C., Nagornyuk Aerica, Adhikari Neeta, Takada Mamoru, Takaku Motoki	4. 巻 preprint
2. 論文標題 P4HTM: A Novel Downstream Target of GATA3 in Breast Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Res Sq.	6. 最初と最後の頁 preprint
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21203/rs.3.rs-2622989/v1	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 Takada M, Fukushima T, Ozawa S, Matsubara S, Suzuki T, Fukumoto I, Hanazawa T, Nagashima T, Uruma R, Otsuka M, Tanaka G.	4. 巻 12
2. 論文標題 Infection control for COVID-19 in hospital examination room.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18230
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-22643-w.	査読の有無 無
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 Sasaki Kosuke, Takano Shigetsugu, Tomizawa Satoshi, Miyahara Yoji, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Takada Mamoru, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 40
2. 論文標題 C4b-binding protein γ -chain enhances antitumor immunity by facilitating the accumulation of tumor-infiltrating lymphocytes in the tumor microenvironment in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental & Clinical Cancer Research	6. 最初と最後の頁 212-212
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13046-021-02019-0	査読の有無 無
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 Shimazaki Reiri, Takano Shigetsugu, Satoh Mamoru, Takada Mamoru, Miyahara Yoji, Sasaki Kosuke, Yoshitomi Hideyuki, Kagawa Shingo, Furukawa Katsunori, Takayashiki Tsukasa, Kuboki Satoshi, Sogawa Kazuyuki, Motohashi Shinichiro, Nomura Fumio, Miyazaki Masaru, Ohtsuka Masayuki	4. 巻 44
2. 論文標題 Complement factor B regulates cellular senescence and is associated with poor prognosis in pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Oncology	6. 最初と最後の頁 937 ~ 950
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13402-021-00614-z	査読の有無 無
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 Takada Mamoru, Tanaka Gaku, Hashimoto Hideyuki, Hirai Yasuyuki, Fukushima Taichi, Nagashima Takeshi, Otsuka Masayuki, Imazeki Fumio	4. 巻 28
2. 論文標題 Practical approach to prevent COVID-19 infection at breast cancer screening	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 969 ~ 976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12282-021-01235-y	査読の有無 無
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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 戸井 雅和	4. 発行年 2022年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 688
3. 書名 乳癌診療state of the art 科学に基づく最新診療	

〔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
研究分担者	榊原 淳太 (Sakakibara Junta) (20896427)	千葉大学・医学部附属病院・助教 (12501)	
研究分担者	長嶋 健 (Nagashima Takeshi) (60292710)	千葉大学・医学部附属病院・准教授 (12501)	
研究分担者	藤本 浩司 (Fujimoto Hiroshi) (60456027)	千葉大学・医学部附属病院・講師 (12501)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	大塚 将之 (Otsuka Masayuki) (90334185)	千葉大学・大学院医学研究院・教授 (12501)	

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