

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290060

研究課題名(和文)がん幹細胞を標的とするグアニン4重鎖リガンドの開発

研究課題名(英文)Development of G-quadruplex ligands that target cancer stem cells

研究代表者

清宮 啓之(Seimiya, Hiroyuki)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・部長

研究者番号：50280623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、核酸の特殊構造グアニン4重鎖(G4)を安定化するG4リガンドを創製し、がん幹細胞に対する増殖抑制効果とその分子機構を明らかにすることを目的とする。我々は、テロメスタチンとその誘導体XなどのG4リガンドが、難治性神経膠芽腫のがん幹細胞(GSC)に対して高い増殖抑制効果を示すことを見出した。複製や転写の過程で生じる1本鎖DNAがG4形成に寄与し、これがG4リガンドの標的になると考えられた。GSCの高感受性を説明する分子機構として、過剰な複製ストレス応答が観察された。誘導体Xはマウスに移植したGSCの腫瘍増殖を抑制した。以上は、G4リガンドを抗がん剤として開発するための基盤的成果である。

研究成果の概要(英文)：This study aims to develop G4 ligands that stabilize G-quadruplex (G4), a specialized structure of nucleic acids, and establish their anti-proliferative effects on cancer stem cells and the underlying molecular mechanisms. We found that G4 ligands, such as telomestatin and its derivative, X, preferentially attack the cancer stem cells of intractable glioblastoma (GSC). Our observations suggest that single-stranded DNA formed during replication and transcription causes G4 formation, which is targeted by G4 ligands. As a molecular mechanism that could explain the higher sensitivity of GSCs to G4 ligands, GSCs exhibited excessive response to the drug-induced replication stress. X inhibited the growth of GSC-derived tumors explanted in mice. These observations are fundamental achievement for development of G4 ligands as anticancer drugs.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：がん幹細胞 テロメア 分子標的 DNA損傷 グアニン4重鎖 神経膠腫 複製 創薬

1. 研究開始当初の背景

テロメアは染色体末端を安定に保つ構造体であり、細胞の分裂寿命を規定する。ヒト体細胞におけるテロメアの短縮は、細胞老化を誘導し、発がん抑制に寄与する。がん細胞は、テロメア合成酵素テロメラーゼを活性化させることによってテロメアを維持するため、無限増殖が可能である。我々はこれまでに種々のテロメラーゼ阻害剤を同定・開発し、これらががん細胞の細胞老化や細胞死を誘導することを実証してきた (Seimiya et al. *Cancer Cell*, 2005 他)。

テロメラーゼ阻害剤には「テロメア短縮誘導型」と「テロメア DNA 直接攻撃型」の2つのタイプが存在する。後者は、テロメアをはじめとする反復配列 [(GGG-X₁₋₇)₃-GGG] が形成する、グアニン4重鎖 (G-quadruplex: 以下、G4) という高次核酸構造を安定化するため、G4 リガンドと呼ばれる。我々は、G4 リガンドの代表格であるテロメスタチン (Shin-ya et al. *JACS*, 2001) ががん細胞のテロメアを即座に脱保護化し、細胞死を誘導することを報告してきた (Tahara, Shin-ya, Seimiya et al. *Oncogene*, 2006)。さらに近年、テロメスタチンが神経膠芽腫由来のがん幹細胞に対して高い制がん効果を発揮することを見出した (Miyazaki, Seimiya et al. *Clin Cancer Res*, 2012)。神経膠芽腫は難治性であり、アルキル化剤であるテモゾロミドが治療薬として開発されたものの、この30年間で治療成績の大幅な改善には至っていない。一方、がん幹細胞はがんの治療抵抗性や再発を引き起こす根源の一つとされ、神経膠芽腫の幹細胞を標的とするテロメスタチンは革新的創薬シーズとして有望である。

但し、テロメスタチンは天然化合物であり、これを産生する放線菌株の不安定性からも、持続的で大量な供給は困難である。全合成の報告はあるものの、工程数や収率の面で実用性は必ずしも高くない。そもそも、テロメスタチンは難溶性で化学的に不安定である。これらの背景から我々は、合成が容易でG4 リガンドとしての特性もすぐれた新規誘導体を創製中である (Tera, Seimiya et al. *Org Biomol Chem*, 2010; Nakamura, Seimiya et al. *Chembiochem*, 2012)。

一方、G4の生物学的意義にも注目が集まっている。G4はテロメア以外のグアニンに富むゲノム領域にも存在し、これらがG4 リガンドの新たな作用点となりうることで英国で明らかにされた (Rodriguez et al. *Nat Chem Biol*, 2012)。さらに、G4はゲノム全体の安定性や複製・転写調節に関与することが明らかにされつつあり、疾病との関連および治療応用への新たな可能性が本格的に議論されるようになってきた (Bochman et al. *Nat Rev Genet*, 2012)。したがって、G4 リガンドの開発研究を推進するには、その根底にあるG4の生理機能やその調節機構を詳細に理解することも必要である。

2. 研究の目的

(1) 新規G4 リガンドを創製し、その制がん効果を明らかにする：神経膠腫幹細胞 (glioma stem cells: GSC) および分化誘導した非神経膠腫細胞 (non-stem glioma cells: NSGC) に対する新規オキサゾール・テロメスタチン誘導体群 (oxazole telomestatin derivatives: OTDs) の増殖抑制効果を明らかにする。比較対照としてテロメスタチンを解析の中心に据え、特に有望な新規誘導体については、さらに *in vivo* での制がん効果を検証する。

(2) 神経膠腫幹細胞は何故G4 リガンドに高感受性を示すのか、その分子基盤を明らかにする：前述の通り、少なくともテロメスタチンはGSCにより高い効果を示すので、同細胞におけるG4形成制御機構が、分化誘導したNSGCの場合と比較してどのように異なるのか、また、その差異がG4 リガンド感受性の違いにどのように反映されるのかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 新規G4 リガンドの制がん薬効評価：一連の新規テロメスタチン誘導体OTDsについては、試験管内レベルでG4構造を安定化し、テロメラーゼ活性も阻害することをすでに確認済みであった。そこでまず、これらをGSCに処理し、増殖抑制効果を調べた。GSCについては、無血清培地によるスフェア培養により幹細胞性を維持することができる。これらは通常の血清培地で接着培養後、速やかに幹細胞性を消失する。これらの細胞について、OTDsの感受性を検討した。さらに、免疫FISH法により、テロメアおよび非テロメア部位におけるDNA損傷の程度を評価した。さらに、ヌードマウスに神経膠芽腫細胞株およびGSCを移植し、薬剤の *in vivo* 制がん効果を検討した。

(2) 神経膠腫幹細胞におけるG4 リガンド感受性とその分子基盤の解析：G4は複製や転写など、DNAが1本鎖になる過程で生じる可能性があるため、GSCとNSGCにおける細胞周期S期の比率を調べるとともに、前者において複製や転写を阻害したときに、G4 リガンドによって生じるDNA損傷がどの程度抑制されるかを調べた。複製阻害にはaphidicolin、転写阻害には5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazoleを用い、DNA損傷についてはγH2AXや53BP1などのマーカー因子を免疫蛍光染色で定量評価した。また、抗G4抗体BG4で細胞内のG4形成を観察した。GeneChipマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析により、G4 リガンドの感受性に関係すると予想される分子経路を抽出し、関連タンパク質の挙動をウェスタンブロット法および免疫蛍光染色法により観察した。

4. 研究成果

(1)新規 G4 リガンドによる GSC のターゲティング：GSC および NSGC に対する新規合成テロメスタチン誘導体群 OTDs の増殖抑制効果を調べ、有望な化合物として X を選定した。この化合物は強い G4 安定化活性を有するとともに、NSGC よりも GSC の増殖を選択的に抑制した。これと一致し、DNA 損傷応答は GSC でのみ顕著に誘導されることが明らかとなった。重要なことに、誘導体 X の有効濃度はテロメスタチンよりも低く、化学的に安定で大量合成が可能な、優れた G4 リガンドの創製に成功したと判断した。

ヒトがん細胞パネル JFCR39 を用いて誘導体 X の感受性プロファイリングを実施したところ、神経膠腫細胞株が高感受性を示すことが確認された（この成果の一部は、文科省科学研究費・新学術領域研究・がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動「化学療法基盤支援活動」の支援によるものである）。誘導体 X は GSC の細胞周期停止およびアポトーシス、テロメア偏向性の DNA 損傷を誘導することが見出された（テロメア偏向性の DNA 損傷は、G4 リガンドの選択性を評価するバイオマーカーである）。そこで、がん研究会動物委員会による審査承認のもと、ヒト神経膠芽腫細胞株および GSC を移植したヌードマウスに対する誘導体 X の *in vivo* 治療効果を検討した。その結果、誘導体 X は忍容性用量の範囲内において、これらの腫瘍増殖を有意に抑制することが確認された。

(2)神経膠腫幹細胞における G4 リガンド感受性とその分子基盤：GSC と NSGC における細胞周期 S 期の比率を調べたところ、前者において若干高い傾向が認められたものの、大きな差異は認められなかった。これと一致し、GSC と NSGC では G4 形成を検出する BG4 抗体の免疫蛍光染色フォーカスの個数に差異は認められなかった。一方、GSC において複製および転写をそれぞれ aphidicolin (Aph) および 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) で阻害すると、テロメスタチンによって生じる DNA 損傷が顕著に抑制された（図 1）。この結果は、G4 が形成されるには複製や転写などによって当該 DNA 配列の 2 本鎖構造が解消されることが必要であるとの推論と一致する。

GSC では G4 の解消を司る各種ヘリカー

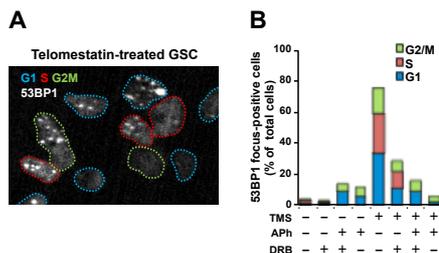


図1. テロメスタチンによるDNA損傷は複製と転写に依存する
A. DNA損傷53BP1フォーカス、B. DNA損傷に対する複製・転写阻害の影響

ゼ群のタンパク質発現が高く、NSGC への分化とともにこれらの発現が低下することが見出された。この結果は網羅的遺伝子発現解析および定量 RT-PCR 解析でも再現され、G4 リガンドの GSC 選択性を説明する分子変動の一つである可能性が示唆された。そこでこれらの遺伝子群のノックダウンによる検証解析を試みたが、これらの遺伝子群についてはノックダウン自体の細胞毒性が強いことが判明したため、結論は保留とした。一方、GSC では NSGC と比べ、基底状態における CHK1 キナーゼの発現レベルが高く、テロメスタチン処理によって生じる複製ストレス応答が強いことが明らかとなった（図 2）。

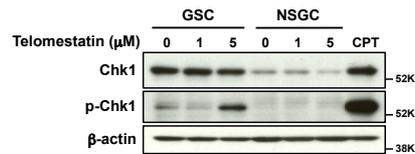


図2. テロメスタチンによるGSC選択的なChk1キナーゼの活性化
p-Chk1: 活性化型リン酸化Chk1, CPT: カンプトテシン

CHK1 は細胞周期チェックポイントに重要な役割を果たすが、その過度な活性化は細胞毒性を導くことが知られており、このことが GSC の G4 リガンドに対する高感受性の根拠の一つになると考えられた。

以上の成果は、GSC を標的とする新規抗がん剤として G4 リガンドを開発するための基盤となり、ひいては神経膠腫の再発抑制および予後改善に繋がるものと期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 17 件）

- Hasegawa D, Okabe S, Okamoto K, Nakano I, Shin-Ya K, Seimiya H. G-quadruplex ligand-induced DNA damage response coupled with telomere dysfunction and replication stress in glioma stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 471(1):75-81. 査読有、DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.176.
- Ouchi R, Okabe S, Migita T, Nakano I, Seimiya H. Senescence from glioma stem cell differentiation promotes tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 470(2):275-81. 査読有、DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.071.
- Mizutani A, Koinuma D, Seimiya H, Miyazono K. The Arkadia-ESRP2 axis suppresses tumor progression: analyses in clear-cell renal cell carcinoma. *Oncogene*. In press. 査読有、DOI: 10.1038/onc.2015.412.

- ④ Seimiya H. Predicting Risk at the End of the End: Telomere G-tail as a Biomarker. *EBioMedicine*. 2015 2(8):804-5. 査読有、DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.07.006.
- ⑤ Tera M, Hirokawa T, Okabe S, Sugahara K, Seimiya H., Shimamoto K. Design and synthesis of a berberine dimer: a fluorescent ligand with high affinity towards G-quadruplexes. *Chemistry Eur J*. 2015 21(41):14519-28. 査読有、DOI: 10.1002/chem.201501693.
- ⑥ Mashima T, Ushijima M, Matsuura M, Tsukahara S, Kunimasa K, Furuno A, Saito S, Kitamura M, Soma-Nagae T, Seimiya H., Dan S, Yamori T, Tomida A. Comprehensive transcriptomic analysis of molecularly targeted drugs in cancer for target pathway evaluation. *Cancer Sci*. 2015 106(7):909-20. 査読有、DOI: 10.1111/cas.12682.
- ⑦ Hirashima K, Seimiya H. Telomeric repeat-containing RNA/G-quadruplex-forming sequences cause genome-wide alteration of gene expression in human cancer cells in vivo. *Nucleic Acids Res*. 2015 43(4):2022-32. 査読有、DOI: 10.1093/nar/gkv063.
- ⑧ Shimamoto A, Kagawa H, Zensho K, Sera Y, Kazuki Y, Osaki M, Oshimura M, Ishigaki Y, Hamasaki K, Kodama Y, Yuasa S, Fukuda K, Hirashima K, Seimiya H., Koyama H, Shimizu T, Takemoto M, Yokote K, Goto M, Tahara H. Reprogramming suppresses premature senescence phenotypes of Werner syndrome cells and maintains chromosomal stability over long-term culture. *PLoS One*. 2014 9(11):e112900. 査読有、DOI: 10.1371/journal.pone.0112900.
- ⑨ Mashima T, Soma-Nagae T, Migita T, Kinoshita R, Iwamoto A, Yuasa T, Yonese J, Ishikawa Y, Seimiya H. TRIB1 supports prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival by regulation of endoplasmic reticulum chaperone expression. *Cancer Res*. 2014 74(17):4888-97. 査読有、DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3718.
- ⑩ Ohishi T, Muramatsu Y, Yoshida H, Seimiya H. TRF1 ensures the centromeric function of Aurora-B and proper chromosome segregation. *Mol Cell Biol*. 2014 34(13):2464-78. 査読有、DOI: 10.1128/MCB.00161-14.
- ⑪ Migita T, Okabe S, Ikeda K, Igarashi S, Sugawara S, Tomida A, Soga T, Taguchi R, Seimiya H. Inhibition of ATP citrate lyase induces triglyceride accumulation with altered fatty acid composition in cancer cells. *Int J Cancer*. 2014 135(1):37-47. 査読有、DOI: 10.1002/ijc.28652.
- ⑫ Hirashima K, Migita T, Sato S, Muramatsu Y, Ishikawa Y, Seimiya H. Telomere length influences cancer cell differentiation in vivo. *Mol Cell Biol*. 2013 33(15):2988-95. 査読有、DOI: 10.1128/MCB.00136-13.
- ⑬ Iida K, Majima S, Nakamura T, Seimiya H., Nagasawa K. Evaluation of the interaction between long telomeric DNA and macrocyclic hexaoxazole (6OTD) dimer of a G-quadruplex ligand. *Molecules*. 2013 18(4):4328-41. 査読有、DOI: 10.3390/molecules18044328.
- ⑭ Migita T, Okabe S, Ikeda K, Igarashi S, Sugawara S, Tomida A, Taguchi R, Soga T, Seimiya H. Inhibition of ATP citrate lyase induces an anticancer effect via reactive oxygen species: AMPK as a predictive biomarker for therapeutic impact. *Am J Pathol*. 2013 182(5):1800-10. 査読有、DOI: 10.1016/j.ajpath.2013.01.048.

[学会発表] (計 76 件)

- ① Seimiya H. TERRA G-quadruplex as a potential modifier of cancer behavior. The 13th Korea-Japan Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, Plenary Lecture, 2016 年 2 月 25 日～27 日, Jeju (Korea)
- ② 清宮啓之、がん分子標的創薬をめぐる最近の話題、第 74 回日本癌学会学術総会 モーニングレクチャー、2015 年 10 月 8 日～10 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- ③ Seimiya H. G-quadruplex: a potential modifier of cancer behavior and a therapeutic target for glioma stem cells. Special DTB Seminar, Developmental Therapeutics Branch, National Cancer Institute, 2015 年 4 月 23 日、Bethesda (USA)
- ④ 清宮啓之、グアニン 4 重鎖を標的としたがん創薬、愛媛大学医学部分子病態医学セミナー、2015 年 4 月 3 日、愛媛大学 (愛媛県東温市)
- ⑤ 清宮啓之、G-quadruplex, a potential modifier of cancer behavior and a target for therapeutic intervention. 「クロマチン・デコーディング」2014 年

- 度第1回研究会、2015年3月19日、国際高等研究所（京都府木津川市）
- ⑥ 清宮啓之、グアニン4重鎖を標的としたがん創薬、広島大学大学院医歯薬保健学研究院セミナー、2015年2月18日、広島大学（広島県広島市）
- ⑦ 清宮啓之、グアニン4重鎖リガンドによる神経膠腫幹細胞のターゲティング、日本癌学会シンポジウム/共同利用・共同研究拠点シンポジウム「がん幹細胞・微小環境・分子標的～がん進展制御への挑戦」、2015年1月22日、石川県立音楽堂交流ホール（石川県金沢市）
- ⑧ Seimiya H. G-quadruplex as a therapeutic target for glioma stem cells. The 19th Japan-Korea Cancer Research Workshop, 2014年11月28日～29日, Jeju (Korea)
- ⑨ Seimiya H. G-quadruplex, a potential modifier of cancer behavior and a therapeutic target for glioma stem cells. 平成26年度日仏がんワークショップ、2014年11月19日～21日、関西セミナーハウス（京都府京都市）
- ⑩ Seimiya H, Ohishi T. Telomeric protein TRF1 regulates proper chromosome segregation, 第73回日本癌学会学術総会シンポジウム、2014年9月26日～26日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ⑪ Seimiya H. Telomeres and G-quadruplexes as targets for cancer therapy. Kangwon National University Research Seminar, 2014年1月21日、Gangwon-Do (Korea)
- ⑫ Seimiya H. Telomere length influences cancer cell differentiation *in vivo*. The 3rd GDRI French Japanese Cancer Meeting, 2013年11月20日～23日、Toulouse (France)
- ⑬ 清宮啓之、抗がん剤探索アプローチの変遷と最近の話題、第72回日本癌学会学術総会モーニングレクチャー、2013年10月3日～5日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ⑭ Seimiya H, Okabe S, Nagasawa K, Yamori T, Shin-ya K, Targeted therapy of glioma stem cells with G-quadruplex ligands. 第72回日本癌学会学術総会シンポジウム、2013年10月3日～5日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）
- ⑮ 清宮啓之、岡部幸子、村松由起子、中村貴大、飯田圭介、矢守隆夫、長澤和夫、新家一男、中野伊知郎、グアニン4重鎖リガンドによる神経膠腫幹細胞のターゲティング、第17回日本がん分子標的

治療学会学術集会シンポジウム、2013年6月12日～14日、国立京都国際会館（京都府京都市）

〔図書〕（計4件）

- ① 清宮啓之、がん幹細胞を標的とする新たな創薬展開、メディカルレビュー社、がん分子標的治療、11: 53-58 (2013)
- ② 清宮啓之、癌細胞の不死化と難治性、大道学館、臨牀と研究、90: 20-26 (2013)
- ③ 清宮啓之、分子標的薬の概念と分類、南山堂、抗がん薬の臨床薬理（相羽恵介編）、pp.33-45 (2013)
- ④ 清宮啓之、ノーベル賞をもたらしたテロメア研究と癌の診断・治療応用への期待、メディカルレビュー社、Surgery Frontier、20: 149-155 (2013)

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：抗腫瘍剤
 発明者：長澤和夫、清宮啓之、飯田圭介、中村貴大
 権利者：同上
 種類：特許
 番号：特許願 2014-29221 号
 出願年月日：2014年11月11日
 国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular_biotherapy/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清宮 啓之 (SEIMIYA, Hiroyuki)
 公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・部長
 研究者番号：50280623

(2) 連携研究者

長澤 和夫 (NAGASAWA, Kazuo)
 東京農工大学・大学院工学研究院生命工学専攻生命有機化学講座・教授
 研究者番号：10247223

(3) 連携研究者

松阪 諭 (MATSUSAKA, Satoshi)
 公益財団法人がん研究会・がん研有明病院消化器化学療法科・医長
 研究者番号：80396572