

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670576

研究課題名(和文) 治療抵抗性癌幹細胞の酸化ストレス応答を担うNrf2機能の解明と創薬シーズの開発

研究課題名(英文) Find out of Nrf2 function and development of the inhibitor of Nrf2 for cancer stem cells

研究代表者

工藤 敏啓 (Kudo, Toshihiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座助教

研究者番号：20593859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年肺がんなどの固形癌においてNrf2の機能亢進が報告されており、癌の悪性化に貢献していることが知られている。また、癌細胞において特異的にNrf2の機能を阻害することはがんの治療にきわめて有効であると期待されているが、Nrf2が核局在タンパク質であることから創薬の標的として難易度が高いと考えられ、その阻害剤の開発は全く進んでいない。そこで本研究ではハイスループットスクリーニングを行い、Nrf2の阻害剤スクリーニングを行いヒット化合物候補として数十種類の化合物まで絞り込むことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Recently it is reported that Nrf2 play an important role for cancer malignancy. So it is thought that the inhibitor of Nrf2 is effective for cancer therapy. In this study we tried to screening for the inhibitor of Nrf2. And we succeeded to get the many kinds of inhibitor of Nrf2.

研究分野：腫瘍内科

キーワード：癌 発現制御 薬学

1. 研究開始当初の背景

NF-E2-related factor 2 (NRF2)は、塩基性ロイシンジッパー構造を持つ転写因子であり、Keap1-Nrf2 制御系は細胞の酸化ストレス応答に重要な役割を果たしていることが知られている。通常 Nrf2 は Keap1 により抑制された状態にあり、細胞の内外から親電子性物質や活性酸素などの酸化ストレスが加わった際に活性化されることが知られている。近年肺癌などの固形腫瘍において、NRF2 の機能亢進が報告され、癌の悪性化に貢献していることが知られている。NRF2 陽性の症例では極めて予後が不良であることが複数の施設から報告されている。その原因として NRF2 は癌の放射線耐性の増強に加え、ペントースリン酸経路の酵素遺伝子や、NADPH 産生に關与する酵素の遺伝子を直接的に活性化することで、細胞増殖を促進することが明らかとなっている(図 1)。癌細胞において特異的に Nrf2 の機能を阻害することは、がんの治療に極めて有効であると期待されている。一方 Nrf2 は核局在タンパク質であり、創薬の標的としては難易度が高いとされており、Nrf2 阻害剤の開発は全く進んでいない。

2. 研究の目的

癌は我が国の死亡原因第一位である。消化器癌はその大半を占め、その根治は国民的喫緊の課題である。癌医療改善の加速施策に資するために、固形癌細胞の悪性度を決定する Nrf2 及び Nrf2 が直接關与する標的代謝酵素を標的とする効率の良い阻害部位及び阻害剤研究開発を目的とする。Nrf2 と代謝に關する報告はこれまで多数あるが、癌細胞代謝マスター遺伝子 Nrf2 とそれが制御する下流の代謝酵素を含めた阻害による癌のメタボリックリプログラミング及び阻害剤のハイスループットスクリーニングは世界初である。癌幹細胞のメタボリックリプログラミングにより癌の悪性度を低下させることは世界

初。本研究終了後には癌幹細胞の悪性度合いを決定する代謝メカニズムが解明されるだけでなく、Nrf2 及びその下流酵素制御により代謝をリプログラミングすることで根絶するというこれまでに無かった全く新しい治療の開発にもつながる。

3. 研究の方法

効果的阻害部位の検討

Nrf2 はペントースリン酸経路の酵素遺伝子や、NADPH 産生に關与する酵素の遺伝子を直接的に活性化することが知られており、癌の悪性度に関わる因子として注目されている。しかし、Nrf2 が活性化す様々な代謝経路のどこが癌の悪質形質に關与するのかは未知である。そこで、Nrf2 が活性化する各種代謝関連酵素を一つずつ阻害し、Proliferation アッセイ、MTT アッセイ、Invasion アッセイまた、FACS で癌幹細胞を含む画分(CD44+, ALDH+)の増減をみることで癌細胞への影響を見る。これらの結果から効果的な阻害部位のセットを決定した。

阻害による癌幹細胞の挙動の検討

癌幹細胞を含む画分(CD44+, ALDH+)の細胞の決定した部位を阻害しメタボローム解析等を用いて癌幹細胞の代謝機構の変化を確認した。

阻害剤のハイスループットスクリーニング

低分子化合物ライブラリー(約6万種)を用いて T_m シフトアッセイ(Differential Scanning Fluorimeter)を行う。しかし、T_m シフトアッセイのみでは目的以外の化合物がヒットしてくる可能性があるため、2nd スクリーニングとして蛍光法(FEBS Journal 2012)また、APADH 定量法を用いて IC₅₀ が一桁 μM オーダーになる化合物のスクリーニングを行う。

同定した新規阻害剤の効果確認(in vitro)

ハイスループットスクリーニングにより同定した阻害剤を大腸癌細胞株培養培地へ添

加し、Proliferation アッセイ、MTT アッセイ、Invasion アッセイを行い、阻害剤の癌細胞への効果を確認する。また、メタボローム解析を行うことで同定した阻害剤の代謝への影響を確認する。

阻害剤の効果確認 (in vivo)

患者由来転移性大腸癌細胞をマウス生体内へ移植し、その後阻害剤をマウスへ投与することで、腫瘍への影響をみる(造腫瘍能の確認)。副作用の確認として、各種マウス正常組織を組織切片、メタボローム解析等で確認する。

4. 研究成果

Nrf2 を過剰発現又はノックダウンした大腸がん細胞株を用いてメタボローム解析を行い Nrf2 活性化時に活発に動く代謝経路の同定を行った。結果 Nrf2 を過剰発現した細胞に比べて Nrf2 ノックダウン細胞ではグルタミン代謝系、TCA サイクル、ペントースリン酸経路などの代謝経路へ大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。また、Nrf2 をノックダウンした大腸がん細胞株では増殖能の低下、浸潤能の低下、薬剤への感受性の増加、アポトーシス細胞の増加が認められ、癌の悪性形質の減弱につながる事が明らかとなった。次に siRNA を用いて本研究により明らかとなったグルタミン代謝系、TCA サイクル、ペントースリン酸経路を担う各種代謝酵素のノックダウン実験を行った。それぞれの代謝酵素をノックダウンした細胞を用いて細胞増殖能、浸潤能、抗癌剤感受性などへの影響を確認した。その結果グルタミン代謝系酵素をノックダウンした細胞で顕著に増殖能の低下、浸潤能の低下、薬剤への感受性の増加が認められた。また、低分子化合物ライブラリー(約 6 万種)を用いて Tm シフトアッセイ(Differential Scanning Fluorimeter)を行った。しかし、Tm シフトアッセイのみでは目的以外の化合物がヒットしてくる可能性

があったため、2nd スクリーニングとして蛍光法(FEBS Journal 2012)また、APADH 定量法を用いて IC50 が一桁 μM オーダーになる化合物のスクリーニングを行った。結果として本研究ではハイスループットスクリーニングを行い、Nrf2 の阻害剤スクリーニングを行いヒット化合物候補として数十種類の化合物まで絞り込むことに成功した。このハイスループットスクリーニングにより同定した阻害剤を大腸癌細胞株培養培地へ添加し、Proliferation アッセイ、MTT アッセイ、Invasion アッセイを行い、阻害剤の癌細胞への効果を確認した。その結果阻害剤を加えた群において優位に増殖能の低下、浸潤能の低下が認められ、さらに患者由来転移性大腸癌細胞をマウス生体内へ移植し、その後阻害剤をマウスへ投与することで、腫瘍への影響を確認したところ造腫瘍能に関しても優位に低下することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

- 1) Koseki, J., Colvin, H., Fukusumi, T., Nishida, N., Konno, M., Kawamoto, K., Tsunekuni, K., Matsui, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Mathematical analysis predicts imbalanced IDH1/2 expression associate with 2-HG-inactivating β -oxygenation pathway in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* 46: 1181-1191. 2015.
- 2) Sueda, T., Kudo, T., Sakai, D., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Yamamoto, H., Ezoe, S., Matsumoto, K., Doki, Y., Mori, M., Satoh, T. Safety and pharmacokinetics of S-1 in a recurrent colon cancer patient with chronic myeloid leukemia treated with dasatinib: a case report. *Cancer Chemother Pharmacol.* 74(6):1321-1324. 2014.
- 3) Hamabe, A., Konno, M., Tanuma, N., Shima, H., Tsunekuni, K., Kawamoto, K.,

- Nishida, N., Koseki, J., Mimori, K., Gotoh, N., Yamamoto, H., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Role of pyruvate kinase M2 in transcriptional regulation leading to epithelial–mesenchymal transition. **PNAS** 111: 15526-15531. 2014.
- 4) Hayashi, K., Tamari, K., Ishii, H., Konno, M., Nishida, N., Kawamoto, K., Koseki, J., Fukusumi, T., Kano, Y., Nishikawa, S., Miyo, M., Noguchi, K., Ogawa, H., Hamabe, A., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Visualization and characterization of cancer stem-like cells in cervical cancer. **Int. J. Oncol.** 45: 2468-2474. 2014.
- 5) Hasegawa, S., Eguchi, H., Nagano, H., Konno, M., Tomimaru, Y., Wada, H., Hama, N., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Nishida, N., Koseki, J., Nishimura, T., Gotoh, N., Ohno, S., Yabuta, N., Nojima, H., Mori, M., Doki, Y., Ishii, H. MicroRNA-1246 expression associated with CCNG2-mediated chemoresistance and stemness in pancreatic cancer. **British Journal of Cancer** 45: 2468-2474. 2014.
- 6) Tamari, K., Hayashi, K., Ishii, H., Kano, Y., Konno, M., Kawamoto, K., Nishida, N., Koseki, J., Fukusumi, T., Hasegawa, S., Ogawa, H., Hamabe, A., Miyo, M., Noguchi, K., Seo, Y., Doki, Y., Mori, M., Ogawa, K. Identification of chemoradiation-resistant osteosarcoma stem cells using an imaging system for proteasome activity. **Int. J. Oncol.** 45: 2349-2354. 2014.
- 7) Hamabe, A., Yamamoto, H., Konno, M., Uemura, M., Nishimura, J., Hata, T., Takemasa, I., Mizushima, T., Nishida, N., Kawamoto, K., Koseki, J., Doki, Y., Mori, M., Ishii, H. Combined evaluation of

hexokinase 2 and phosphorylated pyruvate dehydrogenase-E1 α in invasive front lesions of colorectal tumors predicts cancer metabolism and patient prognosis. **Cancer Sci.** 105: 1100-1108. 2014.

〔学会発表〕(計 1 件)

- 1) Kudo T 他 9 件 Clinical validation of a novel multiplex kit for all RAS mutations in colorectal cancer: Results of RASKET(RAS Key Testing)prospective multicenter...、ESMO 2014、2014 年 9 月 26 日～9 月 30 日、スペイン

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤敏啓 (KUDO Toshihiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
助教

研究者番号：20593859

(2) 研究分担者

石井 秀始 (ISHII Hideshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授
(常勤)

研究者番号：10280736

今野 雅允 (KONNO Masamitsu)

大阪大学・大学院医学系研究科・寄附講座
助教

研究者番号：80618207