

氏名・(本籍)	鈴木 麻弥 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1081 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	A curcumin analogue GO-Y030 diminishes cancer stem cell population by inhibiting interaction of HSP70/HSP40 complex with its substrates (クルクミン類縁体 GO-Y030 は HSP70/HSP40 と基質との結合を阻害することでがん幹細胞画分を減少させる)
論文審査委員	(主査) 三浦 昌朋 教授 (副査) 田中 正光 教授 石井 聡 教授

学位論文内容要旨

A curcumin analogue GO-Y030 diminishes cancer stem cell population by inhibiting interaction of HSP70/HSP40 complex with its substrates (クルクミン類縁体 GO-Y030 は HSP70/HSP40 と基質との結合を阻害することでがん幹細胞画分を減少させる)

申請者氏名 鈴木 麻弥

研究目的

がん組織は、がん幹細胞 cancer stem cell (CSC) と、より分化した non-CSC から構成されると考えられている。CSC は、自己複製能と多分化能を持つことが特徴とされており、がん組織内にごく少数存在するのみだが、分裂頻度が低いこと、DNA 損傷応答機構や薬剤排泄能が亢進していること、および酸化ストレスをはじめとする様々なストレス耐性能を持つことなどから強い治療抵抗性を示す。この CSC を標的とした治療は、がんの根治のために必須であると考えられる。

クルクミンは抗腫瘍作用を持つ天然化学物質として知られているが、生体内有用性が低いことが指摘されており、化学療法への応用には至っていない。それを改善する目的で Ohori ら (Mol. Cancer Ther., 5:2563-2571, 2006) により開発されたのが、クルクミン類縁体 GO-Y030 である。GO-Y030 は、in vitro にてクルクミンの約 30 倍の腫瘍増殖抑制効果が示されているが、CSC に対する効果についての検討は少ない。そこで GO-Y030 の CSC に与える影響と、その機序について検討した。

研究方法

まず数種の癌細胞株を用いて sphere formation assay を行い、GO-Y030 が CSC sphere 形成能を阻害するかを確かめた。CSC は様々なストレスを強く受けている画分であり、ストレス応答因子である heat shock protein (HSP) が高発現していることが知られている。実際、

HSP70 阻害剤は CSC 画分を減少させた。このことから GO-Y030 が HSP70 を標的としている可能性を考え、培養細胞および cell-free assay を用い、HSP による不良タンパクの修正機能を測定し、GO-Y030 が与える影響について検討した。さらに、HSP70 とコシャペロン HSP40 との相互作用、HSP70 とターゲット基質との相互作用を検討するため、それぞれ共免疫沈降法および substrate-binding activity assay を用いた。

研究成績

sphere formation assay により GO-Y030 が濃度依存性に CSC sphere 形成能を阻害することを確かめ、さらに HSP70 阻害剤でも同様の結果を得たことから、GO-Y030 と HSP70 との関係に着目して次の実験を行った。はじめに、培養細胞内において GO-Y030 が HSP 活性を有意に抑制することを示した。次に GO-Y030 が HSP70/HSP40 に直接作用しているかを、cell-free assay で確かめた。結果 GO-Y030 は、HSP70/HSP40 によるリフォールディング活性を効率的に阻害し、HSP70/HSP40 を直接ターゲットとしていることが明らかとなった。さらにその機序を検討するため、癌細胞株に GO-Y030 を添加後、共免疫沈降法を用いて HSP70 と HSP40 との相互作用を確認したが、有意な差は得られなかった。次に HSP70 および HSP40 と、ターゲット基質との相互作用を検討するため substrate-binding activity assay を行った結果、GO-Y030 が HSP70 および HSP40 とターゲット基質との結合を有意に阻害することを示した。

結論

HSP は細胞内タンパク質の品質管理を行い、環境ストレスから細胞を防御する機能を有する。盛んに増殖するがん細胞内はストレスに満ちた環境であり、それゆえ様々ながん細胞で HSP ファミリーの高発現が指摘されている。CSC は、より強いストレスを受けている画分であり、細胞内で産生される多量の不良タンパクを HSP によりリフォールディングすることは、生存に重要と考えられる。GO-Y030 は、HSP70 および HSP40 と基質との結合を阻害することで CSC のストレス適応応答能を低下させ、細胞死を高め、CSC 画分の減少に寄与しているものと考えられる。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査： 三浦 昌朋申請者： 鈴木 麻弥

論文題名: A curcumin analogue GO-Y030 depletes cancer stem cells by inhibiting the interaction between the HSP70/HSP40 complex and its substrates

クルクミン類縁体 GO-Y030 は HSP70/HSP40 と基質との結合を阻害することでがん幹細胞画分を減少させる

要旨

申請者は、クルクミン類縁化合物である GO-Y030 の抗腫瘍効果について、がん幹細胞(CSC)に与える影響とその機序解明を行った。その結果、前立腺がんと肝がんの両細胞株を用いた CSC sphere-forming assay において、GO-Y030 は濃度依存的に CSC の spheres 形成を阻害した。申請者はこの機序として heat shock proteins(HSP)70 に着目し、まず cell-free assay を用いて、GO-Y030 は HSP70/HSP40 によるリフォールディング機能を阻害することを明らかにし、次いで substrate-binding activity assay を用いて、HSP70 および HSP40 と変性(unfolded, misfolded)タンパク質との結合を阻害することを明らかにしている。本研究において申請者は、HSP70 阻害剤としての GO-Y030 の可能性を見出している。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明確さを以下に記載する。

1) 斬新さ

GO-Y030 の抗腫瘍活性は、クルクミンの 50 倍以上であることが明らかにされているが、その作用機序は十分明らかにされていない。これまで GO-Y030 の STAT3 阻害効果や、制御性 T 細胞の抑制効果が報告されているが、申請者は新たな可能性として GO-Y030 に HSP70/HSP40 機能阻害作用があることを本研究から見出している。HSP70 はがん細胞内の変性タンパク質をリフォールディングすることで、がんの進展へと繋げているが、申請者は本研究の中で GO-Y030 は GO-Y030 は HSP70 と HSP40 との結合を阻害しているのではな

く、変性タンパク質と HSP70/HSP40 との結合を阻害することで、リフォールディングを阻害する機序を解明しており、斬新である。

2) 重要性

近年、特定の分子やタンパク質に作用する分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害剤が登場し、がん治療は飛躍的に発展した。それでもまだ新規作用機序を持つ薬剤や新規分子を標的とした薬剤の誕生が待ち望まれている。多くのがん種において HSP70 の構成的な高発現が認められ、がんの進展と抗がん剤耐性への関与が報告されていることから、申請者が今回見出した GO-Y030 の HSP70/HSP40 機能阻害作用は、今後の創薬研究において重要な情報となると考える。またがん幹細胞説は、腫瘍組織中にも幹細胞が存在し、自己を複製する能力を持つとともに、少数存在するだけで元の腫瘍組織と同様の腫瘍を形成する能力をもつと考えられている。がん幹細胞を標的とした薬剤や治療法が確立されることで再発、転移のリスクの少ないがん治療へと繋がるのが期待される。

3) 実験方法の正確性

申請者は 2 つの細胞株を用いて CSC sphere-forming assay, cell-free assay, substrate-binding activity assay と既存の方法に従って研究を進めている。各測定は 3 回以上行われ、統計学的検討がなされている。データは客観的な評価法で解析されており、正確性があると判断される。

4) 表現の明瞭さ

GO-Y の抗腫瘍効果の機序解明という目的に沿って、ストーリーを考えながら論文が構成されており、研究目的、方法、結果、考察を簡便かつ明瞭に記載している。

以上のことより、本論文は学位を授与するに十分値すると判定された。