

氏 名 ながた こうへい  
長田 巧平

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 410 号

学位授与年月日 令和 5 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院医学薬学教育部 博士課程  
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **The oncogene-dependent resistance to reprogramming unveils cancer therapeutic targets**  
(がん細胞のiPS細胞化を阻害する分子メカニズムの解明及びその特性を応用した新しい薬剤スクリーニング系の開発)

論文審査委員

(主査)	教授	藤井	努
(副査)	教授	平林	健一
(副査)	教授	森	寿
(副査)	教授	野口	京
(指導教員)	教授	安田	一朗

論 文 要 旨

論 文 題 目

The oncogene-dependent resistance to reprogramming unveils cancer  
therapeutic targets

がん細胞の iPS 細胞化を阻害する  
分子メカニズムの解明及び  
その特性を応用した新しい薬剤スクリーニング系の開発

氏 名 長田 巧平

- 備考 ① 論文要旨は，2,000 字程度とする。  
② A4 判とする。

#### 〔目的〕

人工多能性幹細胞（iPS細胞）技術の発明により、様々な体細胞からiPS細胞の樹立が可能となった。一方で、がん細胞からiPS細胞への樹立効率は極めて悪く、がん細胞は細胞初期化に対して抵抗性（初期化抵抗性）を持つことが示唆されているが、がん細胞における初期化抵抗性に関わる分子メカニズムについては未だ解明されていない。がんは遺伝子変異が蓄積し、細胞内シグナル経路が異常活性化した結果生じると考えられるため、がん細胞において異常活性化した細胞内シグナル経路はがん治療における分子標的として注目され、その阻害剤は効果的な治療薬として期待され、実際広く臨床の場で用いられている。ただし、多くのがん種において治療標的となる細胞内シグナル経路はまだ同定されておらず、有効な治療標的経路を同定する方法の開発が望まれている。本研究では、がん細胞が持つ初期化抵抗性の分子メカニズムを解明するとともに、個々のがんに対応した治療標的経路を同定するスクリーニング系の開発を目的とした。

#### 〔方法並びに成績〕

まず、明細胞肉腫（Clear Cell Sarcoma 以下CCS）を用いてがん細胞の初期化抵抗性の分子メカニズムの解明を目指した。CCSでは、染色体転座による*EWS/ATF1*融合遺伝子が検出され、この融合遺伝子が腫瘍細胞の増殖や維持に必須であることが分かっているが、いまだ有効な分子標的薬は同定されていない。ドキシサイクリン（Dox）の投与で*EWS/ATF1*融合遺伝子の発現制御が可能なCCSマウスモデルから樹立したCCS細胞株を用いて、iPS細胞を樹立するために必要な4つの転写因子であるOct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc（OSKM：初期化因子）を強制発現させiPS細胞の樹立を試みた結果、*EWS/ATF1*融合遺伝子の発現下ではiPS細胞は樹立できないが、*EWS/ATF1*融合遺伝子の発現がない状態ではiPS細胞が樹立できることを見出した。次に*EWS/ATF1*の発現の有無によって初期化因子のDNA上の結合パターンがどのように変化するかをChIP-seq法にて検証した結果、初期化因子は*EWS/ATF1*融合遺伝子により形成されるCCSのエンハンサー領域に結合することが分かった。

つまり、初期化因子ががん細胞に特徴的なエンハンサー領域に誤って結合し、iPS細胞の誘導が妨げられていることが分かり、がんの形成に重要な遺伝子変異の作用を抑制することでがん細胞に特徴的なエンハンサー領域が消失し、iPS細胞の誘導が促進されることが示唆された。

CCSで得られた結果を踏まえ、他のがん種においてもがん化に関わるシグナル経路を阻害することでiPS細胞化が促進されるかについて検討した。まず、EGFR阻害剤であるGefitinibが有効である*EGFR*変異ヒト肺がん細胞株HCC827においてDoxの投与でOSKMを強制発現できるシステムを導入した。この細胞株を用いてGefitinib投与の有無によってOSKMを強制発現した際に発現が変動する遺伝子をRNA-seqで検証した結果、iPS細胞樹立の過程で発現が上昇する遺伝子がGefitinib投与群で有意に上昇していた。さらに複数のヒトがん


細胞株 [SK-BR3 (*HER2* 増幅乳がん細胞株)、K562 (*BCR/ABL* 融合白血病細胞株)、A549 (*KRAS* 変異肺がん細胞株)、LCC028-3 (*EML4/ALK* 融合肺がん細胞株)]において、分子標的薬とともに *OSKM* を強制発現させ、iPS 細胞の誘導を試みた結果、それぞれのがんに対応する分子標的薬の存在下で、*NANOG* をはじめとする細胞初期化関連遺伝子の発現が特異的に上昇することが分かり、*NANOG* を指標として iPS 細胞化の程度を比較することによって、がんに対する有効な分子標的薬を同定できる可能性が示唆されたため、これらの知見をもとにがんの分子標的薬を同定するスクリーニング系の開発を次に目指した。分子標的薬が同定されている肺がん細胞株 HCC827, A549, LCC028-3 に対して *OSKM* を強制発現可能なシステムを導入し、阻害剤ライブラリーの添加による *NANOG* の発現を確認した結果、実際に阻害剤ライブラリーの中からそれぞれのがんに対応した有効な分子標的薬が抽出できることを確認できた。

前述のごとく、CCSではがん化に関わる細胞内シグナル経路や有効な分子標的薬が同定されていないため、複数のヒトCCSの細胞株 (MP-CCS-SY, KAS) を用いて初期化抵抗性を指標としたスクリーニングを行った結果、*OSKM* 誘導ヒトCCS細胞において *NANOG* 発現を促進する薬剤として mTOR 阻害剤が抽出された。実際に *EWS/ATF1* 融合遺伝子をノックダウンすると mTOR 経路の標的遺伝子の発現が低下し、また、CCS細胞において mTOR に関わる遺伝子をノックダウンすると CCS細胞の増殖を抑制することを見出した。さらに、mTOR 阻害剤が *in vitro*、*in vivo* 双方で CCS細胞の増殖を強く抑制することが分かった。薬剤併用療法の可能性を探るため、mTOR 阻害剤との併用で *NANOG* 発現を促進させる化合物のスクリーニングを行った。その結果 mTOR 阻害剤と p38 MAPキナーゼの阻害剤の併用によって、CCSの細胞増殖がより強く抑制されることを *in vitro*、*in vivo* 双方で確認した。結果、本スクリーニング系は、併用効果のある化合物の組み合わせを同定する方法としても有効であることが示唆された。

#### [総括]

本研究では、がん細胞の初期化抵抗性の分子メカニズムの一端を明らかにし、その知見を応用してがん細胞における重要な細胞内シグナル経路およびがんの有効な分子標的薬を同定するスクリーニング系を開発した。効果的な分子標的薬が同定されていない CCS にスクリーニングを適用し、mTOR 阻害剤や p38MAPキナーゼ阻害剤が CCS の増殖抑制作用を来した点は新規性があり、本スクリーニング方法によって、それぞれのがん細胞における重要な細胞内シグナル経路が同定でき、治療候補となる分子標的薬の抽出を可能としたことは学術的重要性が高く、いまだ効果的な治療法が同定されていない様々ながんの新規治療戦略の開発にこのスクリーニング法を応用できる可能性があることから臨床的発展性も期待できる。

学 位 論 文 審 査 の 要 旨

<p>報 告 番 号</p>	<p>富医薬博甲第 号</p>	<p>氏 名</p>	<p>長田 巧平</p>
<p>論文審査委員</p>	<p>職 名 (主査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 教 授 (副査) 教 授</p>	<p>氏 名 藤井 努 平林 健一 森 寿 野口 京</p>	
<p>指導 (紹介) 教員</p>	<p>教 授</p>	<p>安田 一朗</p>	
<p>(論文題目) The oncogene-dependent resistance to reprogramming unveils cancer therapeutic targets (がん細胞のiPS細胞化を阻害する分子メカニズムの解明及びその特性を応用した新しい薬剤スクリーニング系の開発)</p>			<p>(判定)  合格</p>
<p>(論文審査の要旨) 〔目的〕 人工多能性幹細胞 (iPS細胞) 技術の発明により、様々な体細胞からiPS細胞の樹立が可能となった。一方で、がん細胞からiPS細胞への樹立効率は極めて悪く、がん細胞は細胞初期化に対して抵抗性 (初期化抵抗性) を持つことが示唆されているが、がん細胞における初期化抵抗性に関わる分子メカニズムについては未だ解明されていない。がんは遺伝子変異が蓄積し、細胞内シグナル経路が異常活性化した結果生じると考えられるため、がん細胞において異常活性化した細胞内シグナル経路はがん治療における分子標的として注目され、その阻害剤は効果的な治療薬として期待され、実際広く臨床の場で用いられている。ただし、多くのがん種において治療標的となる細胞内シグナル経路はまだ同定されておらず、有効な治療標的経路を同定する方法の開発が望まれている。長田氏は、本研究において、がん細胞が持つ初期化抵抗性の分子メカニズムを解明するとともに、個々のがんに対応した治療標的経路を同定するスクリーニング系の開発を目的とした。 〔方法並びに成績〕 長田氏は、まず明細胞肉腫 (Clear Cell Sarcoma 以下CCS) を用いてがん細胞の初期化抵抗性の分子メカニズムの解明を目指した。CCSでは染色体転座による<i>EWS/ATF1</i>融合遺伝子が検出され、この融合遺伝子が腫瘍細胞の増殖や維持に必須であることが分かっているが、いまだ有効な分子標的薬は同定されていない。長田氏はドキシサイクリン (Dox) の投与で<i>EWS/ATF1</i>融合遺伝子の発現制御が可能なCCSマウスモデルから樹立したCCS細胞株を用いて、iPS細胞を樹立するために必要な4つの転写因子である<i>Oct3/4</i>, <i>Sox2</i>, <i>Klf4</i>, <i>c-Myc</i> (OSKM: 初期化因子)を強制発現させてiPS細胞の樹立を試みた結果、<i>EWS/ATF1</i>融合遺伝子の発現下ではiPS細胞は樹立できないが、<i>EWS/ATF1</i>融合遺伝子の発現がない状態ではiPS細胞が樹立できることを見出した。長田氏は、次に<i>EWS/ATF1</i>の発現の有無によって初期化因子のDNA上の結合パターンがどのように変化するかをChIP-seq法にて検証した結果、初期化因子は<i>EWS/ATF1</i>融合遺伝子により形成されるCCSのエンハ</p>			



ンサー領域に結合することが分かった。つまり、初期化因子ががん細胞に特徴的なエンハンサー領域に誤って結合し、iPS細胞の誘導が妨げられていることが分かり、がんの形成に重要な遺伝子変異の作用を抑制することでがん細胞に特徴的なエンハンサー領域が消失し、iPS細胞の誘導が促進されることが示唆された。

長田氏は CCS で得られた結果を踏まえ、他のがん種においてもがん化に関わるシグナル経路を阻害することで iPS 細胞化が促進されるかについて検討した。まず、EGFR 阻害剤である Gefitinib が有効である *EGFR* 変異ヒト肺がん細胞株 HCC827 において Dox の投与で *OSKM* を強制発現できるシステムを導入した。この細胞株を用いて Gefitinib 投与の有無によって *OSKM* を強制発現した際に発現が変動する遺伝子を RNA-seq で検証した結果、iPS 細胞樹立の過程で発現が上昇する遺伝子が Gefitinib 投与群で有意に上昇していた。さらに複数のヒトがん細胞株 [SK-BR3 (*HER2* 増幅乳がん細胞株)、K562 (*BCR/ABL* 融合白血病細胞株)、A549 (*KRAS* 変異肺がん細胞株)、LCC028-3 (*EML4/ALK* 融合肺がん細胞株)] において、分子標的薬とともに *OSKM* を強制発現させ、iPS 細胞の誘導を試みた結果、それぞれのがんに対応する分子標的薬の存在下で、*NANOG* をはじめとする細胞初期化関連遺伝子の発現が特異的に上昇することが分かり、*NANOG* を指標として iPS 細胞化の程度を比較することによって、がんに対する有効な分子標的薬を同定できる可能性が示唆されたため、これらの知見をもとにがんの分子標的薬を同定するスクリーニング系の開発を次に目指した。分子標的薬が同定されている肺がん細胞株 HCC827、A549、LCC028-3 に対して *OSKM* を強制発現可能なシステムを導入し、阻害剤ライブラリーの添加による *NANOG* の発現を確認した結果、実際に阻害剤ライブラリーの中からそれぞれのがんに対応した有効な分子標的薬が抽出できることを確認できた。

前述のごとく、CCSではがん化に関わる細胞内シグナル経路や有効な分子標的薬が同定されていないため、複数のヒトCCSの細胞株(MP-CCS-SY, KAS)を用いて初期化抵抗性を指標としたスクリーニングを行った結果、*OSKM*誘導ヒトCCS細胞において*NANOG*発現を促進する薬剤としてmTOR阻害剤が抽出された。実際に*EWS/ATF1*融合遺伝子をノックダウンするとmTOR経路の標的遺伝子の発現が低下し、また、CCS細胞においてmTORに関わる遺伝子をノックダウンするとCCS細胞の増殖を抑制することを長田氏は見出した。さらに、mTOR阻害剤がin vitro、in vivo双方でCCS細胞の増殖を強く抑制することが分かった。薬剤併用療法の可能性を探るため、mTOR阻害剤との併用で*NANOG*発現を促進させる化合物のスクリーニングを行った。その結果、mTOR阻害剤とp38 MAPキナーゼの阻害剤の併用によって、CCSの細胞増殖がより強く抑制されることをin vitro、in vivo双方で確認した。結果、本スクリーニング系は、併用効果のある化合物の組み合わせを同定する方法としても有効であることが示唆された。

〔総括〕

長田氏は本研究においてがん細胞の初期化抵抗性の分子メカニズムの一端を明らかにし、その知見を応用してがん細胞における重要な細胞内シグナル経路およびがんの有効な分子標的薬を同定するスクリーニング系を開発した。以上のことから、効果的な分子標的薬が同定されていないCCSにスクリーニングを適用し、mTOR阻害剤やp38MAPキナーゼ阻害剤によるCCSの増殖抑制作用を明らかにした点は新規性があり、本法によってそれぞれのがん細胞における重要な細胞内シグナル経路が同定でき、治療候補となる分子標的薬の抽出を可能としたことは学術的重要性が高く、様々ながんの新規治療戦略の開発にこのスクリーニング法を応用できる可能性があることから臨床的発展性も期待できる。以上より、本審査会は本論文を博士(医学)の学位に十分値すると判断した。