

氏名	SUBEDI AMIT		
博士の専攻分野の名称	博士（理学）		
学位記号番号	博理工甲第 1023 号		
学位授与年月日	平成 28 年 9 月 23 日		
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
学位論文題目	Identification of small molecule inhibitors of cancer stem cells by target-based and cell-based screenings (標的ベースおよび細胞ベースの探索によるがん幹細胞の小分子阻害剤の同定)		
論文審査委員	委員長	連携教授	長田 裕之
	委員	教授	弥益 恭
	委員	連携准教授	堂前 直
	委員	准教授	朝井 計

## 論文の内容の要旨

Decades of anti-cancer drug discovery approaches are largely based on cancer cell killing ability, and precisely inhibiting specific oncogene. These approaches have led to accumulation potent cytotoxic drugs that achieve partial or even complete tumor regression, but are frequently followed by resistant relapse. Cancer cells within a tumor are heterogeneous and consist of large number of cancer cells along with small population of differently progressing cancer stem cells (CSCs). CSCs are defined as small population within tumor cells with stem cell-like properties that drive tumorigenesis. The challenges faced by current standard treatment against cancer includes resistant relapse after initial tumor regression followed by metastasis. The current standard anti-cancer drugs, like paclitaxel or gemcitabine, show initial tumor shrinkage and regression due to their efficacy against non-CSCs. This causes enrichment of CSCs population, and re-establish resistant and aggressive tumor. Combination of conventional chemotherapy with CSCs directed therapy might lead to complete and early cure of cancer. Thus, inhibition of CSCs holds great therapeutic potential to cure cancer.

Peptidyl prolyl cis/trans isomerization by Pin1 regulates various oncogenic signals during cancer progression and CSCs maintenance, and its inhibition through multiple approaches has established Pin1 as a therapeutic target. In our target based approach to discover CSC inhibitors, I developed screening system to discover Pin1 since there is lack of simplified screening system. The Pin1 screening system, called Pin1 binding assay, was developed based on phospho-substrate binding ability of Pin1. Using this system I screened compounds from chemical library and obtained novel selenium containing compound as Pin1 inhibitor. This hit compound did not have activity against other PPIase indicating selective action on Pin1. I utilized the hit compounds as lead compound and synthesized its various derivatives. Pin1 is known to play role in various diseases including cancer, and also involved in maintenance of CSCs. Thus I evaluated the effect of these derivatives against cancer cells and CSCs. Among various derivative, compound 18 showed most effective activity against Pin1 and cancer cells. Also the compound 18 was effective against

CSCs. However, the discovered Pin1 inhibitor was not selective against CSCs. These results have been published in *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2016).

Cancer stem cells (CSCs) have robust systems to maintain cancer stemness and drug resistance. Thus, approaches should be taken to target such robust systems within CSCs instead of focusing individual signaling pathways. I utilized an approach to identify inhibitors for cancer stemness using alkaline phosphatase assay in induced cancer stem-like (iCSCL) cells. I screened natural product chemical library and evaluated hit compounds for their efficacy on cancer stemness using tumorspheres of iCSCL cells. I identified antimalarial drug artesunate and new small molecule NPD2381 as a selective inhibitor of cancer stemness. They selectively inhibited tumorspheres while standard anti-cancer drugs were in-effective. This indicated that artesunate and NPD2381 are effective where standard anti-cancer drugs do not work. Further I found that mitochondrial metabolism plays critical role in cancer stemness and mitochondrial dysfunction provides selectivity against CSCs. Although artesunate induced typical cell death is mediated by free iron, CSCs inhibition do not need free iron. Rather, mitochondrial dysfunction by artesunate and NPD2381 at lower dose is sufficient for inhibition of CSCs. Further to validate the effectiveness of these compounds, I used tumorspheres of colon cancer cells. These tumorspheres were resistant to standard anti-cancer drugs but susceptible to NPD2381 and artesunate. Some of these results have been published in *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2016).

In conclusion, CSCs are challenging obstacle against cancer cure and needs to be targeted selectively. I used multiple approach to discover CSC inhibitors using RIKEN NPDepo chemical library and successfully discovered small molecules effective against CSCs. I expect that our screening methods and compounds discovered will be valuable for treatment of disease like cancer.

## 論文の審査結果の要旨

本学位論文の審査委員会は、当該論文の発表会を平成28年8月4日に理学部4番講義室にて公開で開催し、詳細な質疑をもとに論文内容を審査した。以下に、学位論文の審査結果を要約する。

本論文は、腫瘍の中に存在するがん幹細胞と呼ばれるがんの長期にわたる維持に重要な細胞群に着目して、その増殖・維持を阻害することでがんの根本的な治療に役立たせる物質の取得を目指した研究である。

第1章では、序論として、がん腫瘍を構成する活発に増殖するがん細胞と、増殖速度は速くないが自己複製とがん細胞への分化を担うことで腫瘍の維持に関与するがん幹細胞について述べている。がん細胞はがん腫瘍の大部分を構成する細胞群であり、活発に増殖することで個体の栄養成分を奪い死に至らしめる。これまでのがん研究では、がん細胞が活発に増殖する性質を利用してその増殖阻害を引き起こす物質の単離が行われ、実際にはがん治療に用いられてきた。たとえば、活発に増殖する細胞の細胞分裂装置を構成するチューブリンを標的とする化合物、DNA複製を阻害するDNAの構成成分のアナログ物質やDNA複製酵素の阻害物質、細胞分裂前に遺伝子損傷を誘導しその損傷を固定化することで細胞死を誘導する物質などである。これらの物質は、活発に増殖するがん細胞を、増殖をしない他の正常細胞と区別して効果的に細胞死をもたらす。しかし、がん腫瘍の中に、活発には分裂せず、自己複製とがん細胞への分化を行う幹細胞様の性質をもつがん細胞、すなわちがん幹細胞がわずかに存在し、これが腫瘍の形成、転移に重要であることが明らかになってきた。これらの細胞は活発に分裂するがん細胞を標的とするこれまでの抗がん剤には耐性であり、抗がん剤治療ののちにも体内にとどまりがんの再発を引き起こす。従って、がんの根治にはがん幹細胞を標的として阻害する物質をもちいた治療が必須であるが、そのような物質はこれまで存在しない。そこで本研究では、がん幹細胞の増殖・維持を特異的に阻害する物質の単離を、標的ベースと細胞ベースの2通りの探索方法で行った。

第2章では、標的ベースのがん幹細胞阻害物質の探索について記載している。がん幹細胞中の標的としては幹細胞の維持に重要なことが知られているタンパク質(Oct4, Sox2, Dvl, Gli, Pin1)に注目した。数千の化合物がスライドガラス上にスポットされた化合物アレイをもちい、これらのタンパク質が特異的に結合する化合物を探索したが、見出す事が出来なかった。そこで、特にPin1に着目し、そのリン酸化ペプチドに特異的に結合する物質の探索系を利用した探索を行った。その結果セレンを含む化合物に、Pin1のシトランス異性化酵素活性を強く阻害する活性を見出した。さらにその化合物の誘導體から、より強く酵素活性を阻害する物質を見出した。誘導體の中で酵素活性を阻害する物質には乳がん細胞の増殖を阻害する活性も認められ、2つの活性の間には相関関係が認められた。最も強く阻害した物質には、がん幹細胞様の性質を有するがん幹細胞株のtumorsphere(腫瘍塊)維持に対する阻害能も認められ、Pin1阻害物質が、がん細胞のみならず、がん幹細胞の増殖維持を阻害することが確認できた。

第3章では、細胞ベースのがん幹細胞阻害物質の探索について記載している。腫瘍中のがん幹細胞はわずかな割合しか存在しないため、化合物探索系の構築は不可能である。そこで、横浜市大のグループが確立した、樹立したがん幹細胞様の性質を有する細胞株を利用した探索系をもちいて探索を行った。探索は、代表的な幹細胞様の性質であるアルカリ性フォスファターゼの発現を阻害する物質をハイスループットで探索す

る一次探索系を利用して化合物ライブラリーの約 6,000 の化合物から約 80 の物質を単離し、さらにこれらの中で、単層培養よりも腫瘍塊での生存を特異的に阻害する物質を探索する二次探索系で行った。2つの探索系で得られた物質の中で、強くがん幹細胞様の性質を阻害する物質が2種得られた。ひとつはマラリアの治療薬として利用されているアルテスネイトであり、もう一つは活性の報告がない NPD 化合物である。

これら2種の化合物についてその作用機作に関する解析も行った。その結果、どちらの物質もミトコンドリアの呼吸を阻害することが明らかになった。がん幹細胞はがん細胞に比べ、解糖系よりもミトコンドリア呼吸に依存して生存している。従って、ミトコンドリアの呼吸を阻害するこれらの物質は、がん細胞よりもがん幹細胞に対して生存阻害活性が強い作用を示すことが明らかになった。この性質は探索に用いたがん幹細胞様細胞株のみならず、大腸がんの細胞株を腫瘍塊形成させて培養させたときにも認められ、一般的に幹細胞特異的に作用する物質であることが示された。

以上、本学位論文は、がん幹細胞を正常細胞や活発に増殖するがん細胞と区別して生存を阻害する物質の単離を目指した研究である。探索を標的ベースおよび細胞ベースの2通りの方法で行い、どちらの系からもがん幹細胞の生存を阻害する物質を獲得することができ、その作用メカニズムも明らかに出来た。期待される物質が得られたこれらの探索は、今後がん幹細胞の阻害物質探索へ広く応用される可能性があり、本研究は先駆的な非常に重要な解析である。以上のことから、本論文は博士の学位に相当する内容であると判断された。