

癌転移を標的とした新しい創薬探索基盤の開発とその実践

研究代表者：原 敏文（医療生命薬学研究ユニット）

研究分担者：中島健一（医療生命薬学研究ユニット）

研究分担者：森田あや美（医療生命薬学研究ユニット）

衛生環境および医療技術の向上は、日本人の長寿化をもたらした。一方で、癌患者の数は増加の一途を辿っており、1981年より現在に至るまで、日本人の死因の第1位は癌である。近年、癌の検出技術の進展により、癌の早期発見が可能となり、これに伴い癌の予後は改善されつつある。また、次世代シーケンサーの開発により、癌発生の原因となる遺伝子を迅速かつ高精度に解析することが可能となった。そのため、癌の原因遺伝子を直接標的とする分子標的薬の開発も急速に進んでいる。さらに、癌の原因遺伝子を直接標的とせず、免疫システムを活性化することで癌を治療する免疫療法が注目を集め、また成果もあげている。つまり、癌治療も向上的に発展を続けているのが現状である。一方で、癌患者の予後の劇的な改善には至っていない。その原因の一つは、癌による死の直接的な原因が癌の転移によるためである。これまで、癌の転移を標的とする治療薬は、開発されておらず、転移を起こした癌患者の治療法の選択肢は制限されている。つまり、癌転移を標的とした治療薬が開発できなければ、今後も癌による死亡者数は減少することはないと予想される。言い換えれば、癌転移を標的とした治療薬が開発できれば、癌予後の劇的な改善が期待できる。

著者ら研究グループは、これまでにスキルス胃癌の患者より独自に複数のスキルス胃癌細胞株（親細胞株）を樹立し、さらにこれら細胞株をヌードマウス胃に同所性移植を繰り返したことにより、腹膜転移好発細胞株を樹立した。これら細胞株を用いて、癌転移に関わる分子機構の解明を進めてきた。本研究では、独自の腹膜転移細胞モデルを用いて、癌転移能を標的とした化合物をスクリーニングするための、これまでにない機能的スクリーニングシステムの開発を行った。本研究は、癌転移を標的とする治療薬の開発のための創薬探索基盤の確立を目指している。

1. 腹膜転移細胞モデルを用いたスクリーニングの有効性についての検討

本研究では、独自に樹立した親細胞株と腹膜転移好発細胞株をペアとし、腹膜転移細胞モデルとして実験に用いた。癌の転移を標的とする化合物は、腹膜転移好発細胞株に選択的に細胞生存能、遊走能や浸潤能に影響を与えることが予想される。そこで、本モデルを用いて、筆者らはスクリーニング基盤の確立を試みた。まず、細胞内ATP量の定量に基づく細胞生存のスクリーニング方法により、腹膜転移細胞モデルを用いたスクリーニングの予備検討を行った。親細胞株および腹膜転移細胞株をそれぞれ、384穴プレートに1穴当たり500細胞ずつ加え、1日後に植物抽出エキスを最終濃度0.1 μg/ml、もしくは100 μg/mlとなるように加えた。3日間細胞を培養した後、サンプル毎のATP量を測定するため、CellTiter-Glo (Promega)を384穴プレートの各サンプルに直接添加し、発光量をプレートリーダーSpark (Tecan)により検出した。

植物抽出エキスの溶媒であるジメチルスルホキシド(DMSO)のみを加えたサンプルを陰性コントロールの基準とした。植物抽出エキスを最終濃度0.1 μg/mlで添加したところ、親細胞株および腹膜転移後発細胞株ともに、その影響は少なかった(図1)。その一方で、植物抽出エキスを最終濃度100 μg/mlと高濃度で添加した際には、植物エキス

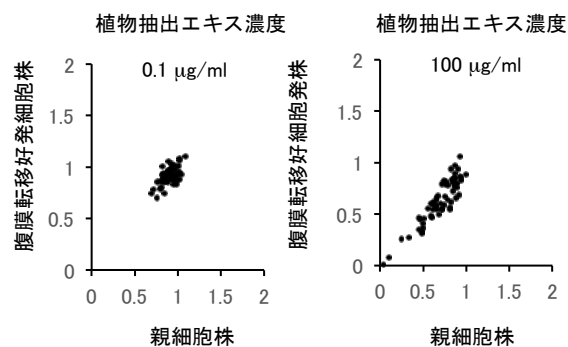


図1. 癌転移細胞モデルを用いた1次スクリーニングの結果

によっては親細胞株および腹膜転移後発株ともに細胞数に大きく影響を与えることが明らかとなった。また、腹膜転移後発細胞株を選択的に細胞生存に影響を与える植物エキスは少ないことも見出された。加えて、細胞遊走アッセイを行ったところ、細胞数に影響を及ぼした植物エキスが、細胞遊走能にも影響を与えることを見出した。これら結果から、腹膜転移細胞モデルを用いることで、腹膜転移を標的とする化合物のスクリーニングを行うことは可能であると示唆された。しかしながら、ATP量に基づく細胞生存アッセイでは、細胞死による細胞数減少なのか細胞周期停止による細胞数の減少なのかなど、細胞の応答状況が不明瞭であることも明らかとなった。そこで、スクリーニングの際に、細胞の応答状況を捉える方法の確立が重要であると考えられた。

2. 細胞周期をリアルタイムで可視化する Fucciシステムの導入と検出系の確立

細胞の応答状況を捉える方法として、筆者らは生細胞の細胞周期をリアルタイムに観察するための蛍光プローブ Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator (Fucci)システムの利用に着手した。本研究では、Fucciシステムのうち、Fucci2aシステム¹⁾を利用し、Fucci2aの細胞株への導入を試みた。また、同時に蛍光タンパク質を検出するための検出機器について検討を行った。

細胞で発現する蛍光タンパク質を検出するための機器として、In Cell Analyzer、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。その結果、共焦点レーザー顕微鏡に炭酸ガスおよび温度調節ユニットを接続したタイムラプス解析が最も本研究にはマッチすることが明らかとなった。予備実験として、Fucci2aの蛍光タンパク質の一つと同じ蛍光波長を有するCalceinで細胞を染色し、タイムラプス解析を行い、細胞動態の検出を検討した。また、抗腫瘍効果をもつことが知られるハービマイシンで処理した際の細胞の運動能の変化について検討を行った。その結果、共焦点レーザーでタイムラプス解析を行うことにより、観察時間内の細胞の遊走状況を詳細に捉えることが可能になるとともに、その細胞動態を移動距離から定

量的に解析することも可能となった。低濃度のハービマイシンで処理した際、細胞の大きさや形などには変化がない一方で、顕著な細胞運動能の低下を検出できることが明らかとなった。

Fucci2aシステムの腹膜転移細胞モデルへの導入は、Fucci2a発現プラスミドの細胞株への導入が最初の段階となる。しかし、腹膜転移細胞モデルの低い遺伝子導入効率の問題とFucci2a発現プラスミドが抗生物質耐性遺伝子を有さないことから、Fucci2a発現プラスミドが導入された細胞を選択的に培養することに問題が生じた。そこで、セルソーターSH800 (SONY)を用いて、Fucci2aの蛍光を示す細胞を選択的に分取することで、Fucci2aシステムを有する細胞集団の獲得を行った。これら細胞を用いて、タイムラプス解析を行ったところ、腹膜転移細胞モデルは細胞周期の変化に応じた蛍光を示すことが明らかになった。また、ハービマイシンで処理した際の運動能低下の検出にも成功した。しかしながら、セルソーターにより分取したFucci2aシステムを有する細胞集団は、2週間程度の培養でFucci2aシステムが細胞から消失してしまうことが明らかとなった。その原因は、Fucci2aシステムが細胞で安定発現していないことが考えられ、その改良が必要であることが明らかとなった。次年度は、この問題点を克服し、スクリーニング系を確立した上で、スクリーニングの実践へと展開していく予定である。

参考文献

1. Mort RL, et al., Fucci2a: a bicistronic cell cycle reporter that allows Cre mediated tissue specific expression in mice. *Cell Cycle*, 13, 2681-96 (2014)

謝辞

愛知学院大学医療生命薬学研究所・医療生命薬学助成により、本研究を実施できましたことに感謝申し上げます。

研究成果発表

学会発表

1. 野村有紀, 原 敏文, 森田あや美, 小幡 徹, 田中基裕, 武井佳史. 第64回日本薬学会東海支部総会・大会 2018年6月(名古屋)