

令和元年6月11日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07941

研究課題名（和文）腫瘍細胞膜上分子会合体情報を用いた分子標的薬併用効果の検討

研究課題名（英文）Characterization of combination effects of molecular targeted reagents based on the cell membrane bi-molecular cancer target

研究代表者

小谷 典弘 (Kotani, Norihiro)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90342782

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、腫瘍細胞膜上2分子会合体解析情報が分子標的薬剤の併用に関する抗腫瘍治療成績に影響する可能性を研究した。肺がん細胞に対して、発現している腫瘍細胞膜上2分子会合体それぞれに対する分子標的薬を単独もしくは併用してin vitro処理した結果、併用した場合には、肺がん細胞の増殖抑制が有意に亢進された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、現在様々な腫瘍治療に使用されている抗体医薬品を含む分子標的薬治療の治療前評価が可能になることが期待される。今後も、分子標的薬の使用は増え続けていくことが予想され、適切な薬剤選択は重要になると考えられる。

また、分子会合体情報を用いて分子標的薬剤併用効果について研究する試みは国内、国外においてもまだ実施された事例はなく、本研究により腫瘍薬物治療（抗がん剤治療）についての新規かつ重要な知見が得られると期待される。

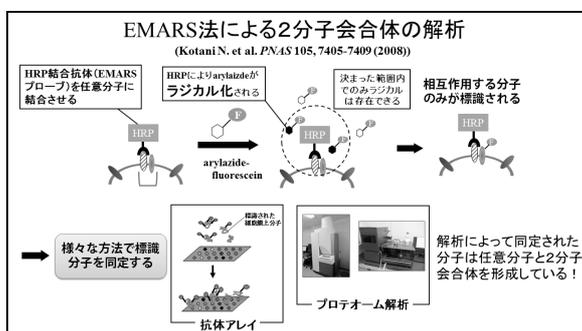
研究成果の概要（英文）：Here, we examined the cancer cell membrane-resident “cis-bimolecular complex as a possible cancer target. In vitro simulation of effective drug combinations used for multiple drug treatment strategy was performed using reagents targeted to cis-bimolecular complex. The combination treatment based on the information moderately suppressed cancer cell proliferation compared with single administration, suggesting that the information is profitable for the appropriate selection of the combination among molecular targeted reagents. Thus, cis-bimolecular complex has the possibility to make a contribution to several molecular targeted strategies in future.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肺がん 分子会合体 分子標的薬 膜タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

1972年、SingerとNicolsonは動物細胞膜が脂質二重層から成り、その上には各種受容体など細胞機能にとって重要な役割を果たしている細胞膜上分子が多数存在すること、同時にこれら細胞膜上分子は脂質二重層の流動に伴って膜上で常にダイナミックに運動していることを提唱した(Singer, SJ, and Nicolson, GL.: *Science* 175: 720-731(1972))。1990年代に入って細胞膜上分子の運動についての研究が進められるようになり、特定の細胞膜上分子同士が非常に短い一定時間内に膜上で会合し形成される「細胞膜上分子会合体」の存在が実証され、細胞内シグナル伝達に極めて重要であることが明らかとなってきた。このような学術的な背景の中、申請者は全く新規で実用的な細胞膜上分子会合体解析法の開発に成功した(Kotani N. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.*、特許第4929462号)。本法はEnzyme-Mediated Activation of Radical Sources (EMARS)と名付けたラジカル反応を利用して行われる解析法であり、通称EMARS法と呼称している(下記説明図参照)。

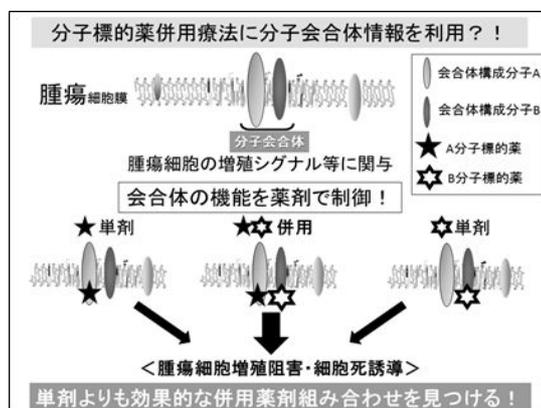


本解析法は現在国内外で用いられている既存法にない特徴(生理的条件下において、簡便に会合体形成した細胞膜上分子群を生化学的に解析できる)を持っているため、今後生化学や細胞生物学を中心とした様々な分野の発展に寄与できると予想している。実際に申請者は

EMARS法を用いて、B細胞リンパ腫細胞におけるCD20抗原の2分子会合体や細胞接着分子インテグリンと受容体型チロシンキナーゼの2分子会合体(Yamashita R, Kotani N. et al. *J Biochem.*)などを解析してきた。特にCD20抗原の解析においては、CD20抗原がFGFR3と会合体形成することを見出し、その複合体がB細胞リンパ腫治療用抗体医薬の薬効に影響している可能性を示唆することができた(Kotani N. et al. *J. Biol. Chem.*)。従って、申請者はEMARS法が様々な生物学的条件により特異的に形成される細胞膜上の分子会合体を研究するために実用的なツールであると考えた。

また、申請者らは上述のFGFR3の阻害剤が抗体医薬である抗CD20抗体リツキシマブの効果を制御している点に注目した。これは、会合体形成分子それぞれを標的とする薬剤の併用が抗腫瘍治療成績に影響する可能性を示唆している。近年、分子標的薬の併用により優れた治療効果を得る試みが注目されており、申請者は分子会合体情報(主に2分子会合体情報)が現在注目されている分子標的薬併用療法の研究にも応用できるのではないかと着想した(右記説明図参照)。

そこで、本研究では分子会合体情報を分子標的薬併用療法開発に応用するための基盤研究を行うことを目的とする。



これら分子会合体情報を用いて分子標的薬剤併用効果について研究する試みは国内、国外においてもまだ実施された事例はなく、本研究により腫瘍薬物治療（抗がん剤治療）についての新規かつ重要な知見が得られると期待される。

## 2. 研究の目的

具体的な到達目標は以下の2点である。

(1) EMARS法で腫瘍細胞（使用する細胞の詳細は後述）における細胞膜上分子会合体を標識し、プロテオーム解析により同定する。

(2) 適切な分子会合体を選択し（本段階での目標分子会合体数は1細胞種あたり5個程度）、それらの分子標的薬剤を *in vitro*, *in vivo* で単剤および併用使用した場合の効果を評価し、適切な分子標的薬剤併用情報を得る。

## 3. 研究の方法

<平成 27-28 年度>

### 【腫瘍細胞における分子会合体の同定】

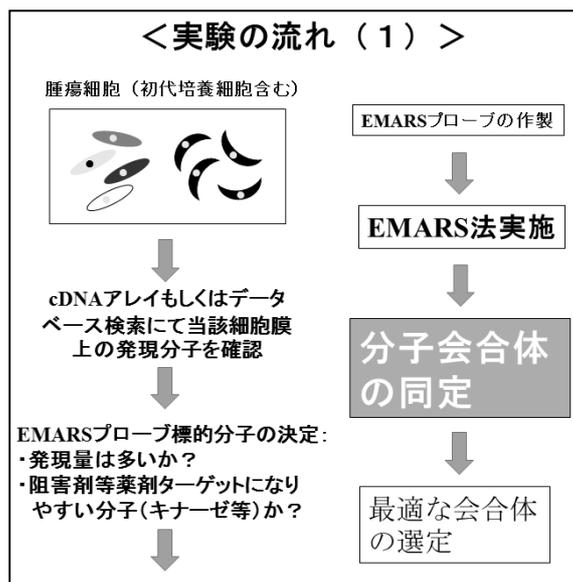
本研究では、以下の腫瘍モデルマウス及び腫瘍細胞を実験材料として研究を実施する。

(1) 肺がんモデルマウスである *EML4-ALK* マウス (Soda M. et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:19893-19897 (2008)) : 以前から申請者所属研究室で飼育・使用されている。

(2) マウス肺がん腫瘍細胞：上記(1)のマウスから初代培養細胞として調製する。

(3) ヒト培養肺がん細胞(ABC-1, A549, LK-2 など)およびヒトB細胞リンパ腫細胞(Raji, Daudi など)

以下、具体的な研究計画・方法について示す（下図参照）。



### (1) EMARS 法実施のための EMARS プローブ標的分子の選定

上記の使用細胞ごとに EMARS 法を行う上で必要な EMARS プローブの分子候補を以下のように決定する。

培養腫瘍細胞の場合は NCBI の GEO profile などのデータベースを使用し、細胞膜上に発現している分子をリストアップする。使用予定培養細胞はこれらのデータベースに発現情報が提示済である。なお、肺がんモデルマウスはすでにがん部・非がん部肺組織を用いた cDNA アレイ実験を行っており、がん部で発現している細胞

膜上分子を 167 個同定しているので、この中から選択する。

リストアップした分子から、腫瘍細胞形質との関連が予想される分子や分子標的薬剤の標的になりやすい分子を選択・決定する。

### (2) 候補分子に対する EMARS プローブの作製

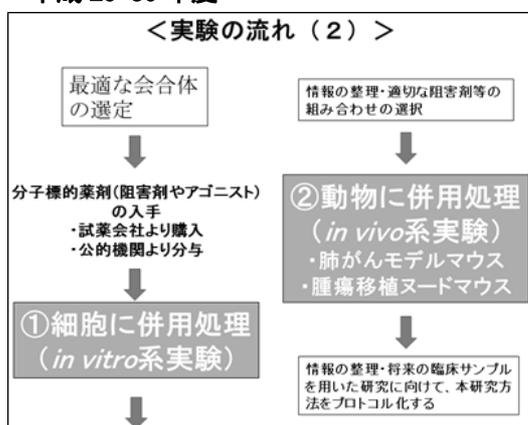
候補分子に対する抗体を入手し、その Fab もしくは還元型抗体を作製し、HRP を標識する

(Dojindo 社標識セットを用いる)。作製したプローブは、当該分子が発現している培養細胞や上述の初代培養細胞などを用いて、フローサイトメトリーや共焦点顕微鏡で結合能を確認する。

### (3) 分子会合体の同定・選択

作製した EMARS プローブを各細胞に処理し、fluorescein 標識 arylazide 試薬もしくは最近開発された高感度 tyramide 試薬を使用し EMARS 法を行う(「研究の学術的背景」欄参照)。標識された分子を、質量分析器を用いた EMARS 法標識産物ショットガンプロテオーム解析 (Jiang S, Kotani N, *Proteomics*) で同定する。なお、このプロテオーム解析については、研究分担および連携研究者の所属する高知大学で行う。本解析法がうまくいかない場合には、過去使用実績のある RTK 抗体アレイ (R&D 社) を使用して、受容体型チロシンキナーゼ (RTK) に特化して同定する。解析により検出された分子が、実際に細胞上で会合体を形成しているか、免疫沈降法や形態学的手法 (共焦点顕微鏡・電子顕微鏡) で追試を行う。追試できた分子群について、腫瘍細胞ごとにリストアップする。さらに、分子標的薬剤が存在するか等の指標により後述の *in vitro*, *in vivo* 薬剤処理実験に適切な分子会合体構成分子群を選択する。

#### <平成 29-30 年度>



#### 【同定分子会合体群に対する分子標的薬剤の *in vitro*, *in vivo* 併用効果の検討】

上記研究で、標的分子会合体が決定した後、それらに対する分子標的薬剤 (阻害剤やアゴニスト) を入手する。入手先は、試薬会社 (ミリポアやシグマ等) もしくは公的機関 (理化学研究所や文部科学省新学術領域研究「化学療法基盤支援活動」) を考えている。

#### (1) 腫瘍細胞を用いた薬剤併用効果の検討

上述の各腫瘍細胞でそれぞれ同定・選択された

分子会合体に対する阻害剤などの分子標的薬剤を各腫瘍細胞に併用処理する。薬剤処理後、細胞増殖アッセイ及び細胞死アッセイにより効能を評価する。単剤処理での ED50 を基にして、併用処理した場合に各薬剤の ED50 が低下する併用組み合わせを確認する。

#### (2) 腫瘍モデル動物を用いた薬剤併用効果の検討

上記 (1) の実験で併用効果が認められた薬剤について、その併用効果を動物実験にて確認する。肺がんモデルマウスからの初代培養腫瘍細胞を使用して判明した薬剤に関しては、モデルマウス自身に薬剤を投与して、腫瘍の縮退効果などを評価する。ヒト B 細胞リンパ腫細胞においては、ヌードマウスの皮下に播種することで腫瘍モデルマウスを作製し、薬剤投与を行って評価する。投与薬剤濃度に関しては、マウスに対する全身毒性などのファクターをあらかじめ検討してから実験を実施する。腫瘍の縮退効果については、動物実験施設に設置している *in vivo* イメージング装置を使用する。

## 4. 研究成果

### <平成 27-28 年度>

#### 【腫瘍細胞における分子会合体の同定】

(1) *EML4-ALK* 肺癌モデルマウスから採取した初代培養細胞 (がん部組織を分離し、通常の培

養ディッシュにて培養すると3日後にコンフルエントになる)およびヒト肺がん培養細胞であるLK2を用いた。

(2)この2細胞に対してのEMARSプローブを作製することとした。以前より用いているCHL1の還元型抗体のHRP標識を作製し、培養細胞に処理し、結合することを確認した。

(3)作製したEMARSプローブを用いて、EMARS反応を行った。ウエスタンブロット法や直接蛍光法により、EMARS反応がうまく行われているか判定した結果、CHL1分子の相互作用分子が標識されていることが判明した。これら標識された分子には、integrinやFGFR3、contactin1などが含まれていた。

(4)電子顕微鏡を用いて、LK2細胞上にCHL1-FGFR3、CHL1-integrin alpha2会合体が発現しているか確認すると、細胞膜上および細胞内小胞に発現していることが分かった。

(5)ヒト肺がん組織において、共焦点顕微鏡レベルでこれら会合体それぞれの分子の共局在が観察できるか検討した結果、正常組織と比較して腫瘍組織で有意に共局在が観察された。

<平成29-30年度>

#### 【同定分子会合体群に対する分子標的薬剤の*in vitro*, *in vivo* 併用効果の検討】

(1)上記の結果から、会合体を形成していると考えられるCHL1およびFGFR3、integrin alpha2の抗体や阻害剤を用い、まずこれら標的薬剤の*in vitro*, *in vivo* 併用効果を観察することとした。阻害剤に関してはFGFR3ではPD173074、integrin alpha2に関してはBTT3033を使用した。まず、それぞれの適正濃度を見極めるために、単剤で細胞増殖に影響のない濃度をアッセイした。その結果、PD173074は30 nM、BTT3033は150 nMで使用することにした。

(2)*in vitro* 増殖阻害アッセイを用いて、3つの投与プロトコル(最初に1回のみ、1日1回毎日、および隔日投与プロトコル)下で、これらの抗体/阻害剤の単剤投与と併用投与の有効性を比較した。統計分析は、TukeyとDunnnettの多重検定の両方で行った。投与2日目のLK2細胞についての併用投与(CHL1+PD173074、CHL1+BTT3033、またはPD173074+BTT3033)は、単剤投与(約10%平均阻害)よりも有効であった。一方、投与2日目のEML4-ALK初代細胞に対しては、一部の併用投与についてのみ単剤投与よりも統計的に有意であった。毎日の薬剤処置プロトコルにおいては、2日目のLK2細胞についての単剤投与では統計的に有意な阻害がないのとは対照的に、併用投与は有効であった。4日目において、併用投与はLK2細胞に対して明らかに有効であり(約50%の平均阻害)そしてEML4-ALK初代細胞に対して適度に有効であった(約30%の平均阻害)。3つのプロトコル下でのこれらの実験は、阻害率の程度がプロトコル間で異なるが、相加的效果だけでなく相乗効果も観察することができた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

- 1: 本家 孝一, 山口 亜利沙, 小谷 典弘 EMARS 法の開発と膜マイクロドメイン研究への応用. *生体の科学* 69(3):258-262 (2018) (査読あり)
- 2: Imamaki R, Ogawa K, Kizuka Y, Komi Y, Kojima S, Kotani N, Honke K, Honda T, Taniguchi N, Kitazume S. Glycosylation controls cooperative PECAM-VEGFR2-β3 integrin functions at the endothelial surface for tumor angiogenesis. *Oncogene* 37(31):4287-4299 (2018). (査読あり)
- 3: Kotani N\*, Nakano T, Ida Y, Ito R, Hashizume M, Yamaguchi A, Seo M, Araki T, Hojo Y, Honke K, Murakoshi T. Analysis of Lipid Raft Molecules in the Living Brain Slices. *Neurochem Int*.

119:140-150 (2018). \*corresponding author (査読あり)

4: Esaki N, Ohkawa Y, Hashimoto N, Tsuda Y, Ohmi Y, Bhuiyan RH, Kotani N, Honke K, Enomoto A, Takahashi M, Furukawa K, Furukawa K. ASCT2 defined by enzyme-mediated activation of radical sources enhances malignancy of GD2-plus small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 109(1):141-153 (2017). (査読あり)

5: Kaneko K, Ohkawa Y, Hashimoto N, Ohmi Y, Kotani N, Honke K, Ogawa M, Okajima T, Furukawa K, Furukawa K.  
Neogenin defined as a GD3-associated molecule by enzyme-mediated activation of radical sources confers malignant properties via intra-cytoplasmic domain in melanoma cells. *J Biol Chem.* 291 (32):16630-43 (2016). (査読あり)

[学会発表](計 3 件)

1: 小谷典弘, 中野貴成, 井田唯, 伊藤吏那, 橋爪幹, 山口亜里沙, 瀬尾誠, 荒木智之, 北條泰嗣, 本家孝一, 村越隆之「マウス脳組織におけるガングリオシド GM1 脂質ラフトの生理的解析」第 36 回日本糖質学会年会, 旭川, (2017).

2: 小谷典弘, 山口亜利沙, 中野貴成, 荒木智之, 村越隆之, 本家 孝一  
「創薬ターゲット探索を指向したがん細胞膜上 2 分子会合体 (cell surface bi-molecule) の解析」第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, (2016).

3: 小谷典弘, 山口亜利沙, 中野貴成, 荒木智之, 村越隆之, 本家孝一  
「マウス肺がん細胞特異的に発現する細胞膜上分子会合体同定の試み」第 35 回日本糖質学会年会, 高知, (2016).

## 6 . 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：本家 孝一

ローマ字氏名：(HONKE, koichi)

所属研究機関名：高知大学

部局名：教育研究部医療学系

職名：教授

研究者番号(8桁)：80190263

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：山口 亜利沙

ローマ字氏名：(YAMAGUCHI, arisa)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。