

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380067

研究課題名(和文) 臨床分離脳腫瘍由来のがん幹細胞に特異的に作用する化合物の探索研究

研究課題名(英文) Studies on screening for substances which act on cancer stem cells established from tumors surgically excised from brain tumor patients.

研究代表者

新家 一男 (SHIN-YA, Kazuo)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長

研究者番号：20251481

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円、(間接経費) 4,110,000円

研究成果の概要(和文)：癌化学療法の最大の問題点の一つは、薬剤耐性獲得であるが、その原因として近年「がん幹細胞」の存在が示唆されている。がん幹細胞は、腫瘍形成に関与する大多数のがん細胞を生み出す元になっている細胞であり、もっとも悪性度の高い細胞であるが、容易に通常のがん細胞に分化してしまうことから、スクリーニング目的での使用は困難である。

本研究では、sphere培養を行うことにより安定にがん幹細胞の性質を維持できる、癌患者脳由来の二種類の悪性グリオーマ細胞を用いて、種々のアッセイ系を構築し、がん幹細胞に特異的に作用する化合物を見出すことを目的に、天然物ライブラリーよりスクリーニングを行った。

研究成果の概要(英文)：One of the biggest problems of cancer chemotherapy is the acquisition of drug resistance. Recent years, it has been considered that "cancer stem cell" plays a significant role in drug resistance. Most of tumor is originated from cancer stem cells, thus it is thought to be the severest malignant cells. Like this, cancer stem cells are promising targets for the development of antitumor drugs, however, cancer stem cells are difficult to be applied for drug screenings since it is unstable being to differentiate to various cell types. Glioblastoma multiforme (GBM) excised from cancer patients is stably shows the character of cancer stem cells when cultured in spheroid system. In this study, we performed the screening for substances which act on GBM cells using natural library.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物有機化学

キーワード：膠芽腫グリオブラストーマ スクリーニング がん幹細胞 sphere形成 sphere特異的細胞死

1. 研究開始当初の背景

近年、がん分子標的に基づく抗腫瘍剤の開発が盛んに行われ、慢性骨髄白血病の治療薬である Gleevec (Glivec, Imatinib) や、非小細胞肺癌治療薬である Iressa (Gefitinib) などが開発され、また多剤併用療法などが確立され、癌患者の生存率を飛躍的に上昇させている。実際に難治療癌と考えられてきた、肝癌などに対しても、抗がん剤の多剤併用により縮小させた後に外科的手法により切除するような新しい治療法が開発されてきている。多剤併用療法は、がん細胞の薬剤耐性出現率を下げる意味でも効果的な療法ではあるが、悪性腫瘍の場合、腫瘍細胞はいくつかの種類の細胞が混在しており、薬剤に耐性を得やすく、癌化学療法の限界となっている。癌化学療法の問題点として、(i) 浸潤・転移と、いわゆる再燃性癌の原因となる (ii) 薬剤耐性があげられる。

このような中、高い悪性度の原因として、がん幹細胞の存在が注目されている。がん細胞の特徴は、高い増殖力、細胞の不死化、周辺組織への浸潤や転移など代表的であるが、全てのがん細胞がこのような特徴全てを持っているわけではなく、実際にこれらの特徴を併せ持ち、ヒトや動物に癌を生じさせたり、進行させる能力(造腫瘍能)があるものは、全体のごく一部である。そういった違う機能を持ったがん細胞を作り続ける最も未分化な細胞をがん幹細胞と呼ばれ、がんがこの幹細胞様の細胞から発生・進行するという仮説(がん幹細胞仮説)が提唱されている。

従来の抗がん剤は、固形腫瘍の縮小を治療指針としているため、腫瘍の大部分を占める、がん幹細胞としての機能を持たない、分化したがん細胞だけを標的としている可能性がある。また一部のがん幹細胞には、薬剤耐性を獲得しているものがあり、治療によって大部分のがん細胞を除いても、ごく少数のがん幹細胞が生き残っていれば再発が起こる。したがって、がん幹細胞を標的として除去することができれば、がんの転移や再発の防止にも有用な治療法の開発につながる事が期待されている。

2. 研究の目的

現在、一般の研究室で行われている樹立細胞株の培養法では、固形癌細胞でもいわゆる接着系細胞と呼ばれるように、シャーレ底面に張り付いた状態で培養しているに過ぎず、エネルギー産生に関しても、解糖系に依存した特殊な細胞のみが培養維持されている。従って、このような従来のがん細胞とその培養法を用いた抗がん剤探索系は、実際の臨床状態・環境を反映しているわけではなく、体内の癌細胞を根本から無くすような抗がん剤は得られないのは当然であったと考えられる。

がん幹細胞に対して特異的に細胞死を誘導する化合物の探索アイディアは、癌研究者

であれば思い付くものであるが、がん幹細胞の分離は大多数のがん細胞のうちほんの一握りであり、フローサイトメーターを用いて、がん幹細胞マーカーを標的に分離しなければならず、苦労して分離したがん幹細胞も直ぐに分化してしまいがん幹細胞としての特徴を失ってしまう。そのため、化合物スクリーニングに用いる量のがん幹細胞のスクリーニングとは困難であり、これまでスクリーニングの対象とは成りにくかった。ヒト脳腫瘍幹細胞の一つである神経膠腫(グリオーマ)の中でも、ほぼ治療不可能な最も悪性度の高い膠芽腫[グリオブラストーマ、Glioblastoma multiforme (GBM)]は、極端に未分化で増殖能が高い細胞である。図に示す細胞は、脳腫瘍患者から分離した GBM 細胞であるが、正常幹細胞培養条件で培養すると、幹細胞と同様の形態である sphere (細胞塊)を形成し増殖する。本細胞は、がん幹細胞マーカーである CD133 陽性であることから、膠芽腫はがん幹細胞由来であると考えられ、スクリーニングに必要な細胞数を容易に確保可能である。

本研究の目的は、この癌患者脳由来のがん幹細胞性グリオーマ細胞に対して、特異的に細胞死を誘導する化合物を天然物より見出し、全く新しいコンセプトの抗腫瘍剤のリード化合物を創製すると共に、未解明ながん幹細胞の生物学を明らかにすることを目的とするものである。

3. 研究の方法

脳腫瘍患者脳由来の BGM がん幹細胞(146NS および 1123 細胞)を、B27 サプリメント、20 ng/ml bFGF、50 ng/mL EGF、penicillin/streptomycin、L-glutamine および 5 µg/ml Heparin を添加した DMEM/F12 培地中にて継代維持する。細胞塊を回収し、trypsin で処理後分散した細胞を 250 cells/well となるよう 384-well プレートへ播種した。天然物ライブラリーを添加しインキュベート後、検鏡、細胞数測定法など用いて、sphere 形成および細胞死を観察することによりヒット化合物を選抜した。バイオアッセイにより、ヒット株より活性物質を単離・同定する。実際のスクリーニングは、以下の二つの現象を指標に行った。

(1) GBM を用いた sphere 形成物質のスクリーニング

スループットの高いアッセイ系とするため、384-well ベースのアッセイ系の確立を行った。細胞の生存率は WST-8 を用い、細胞塊形態は検鏡により確認を行った。WST-8 の値(細胞生存率)、顕微鏡下での細胞観察(形態変化)を指標にした。形態変化とは、顕微鏡下で観察した際に、細胞が死滅し、小さくバラバラになっているもの(統計処理上 100 とした)、細胞がバラバラになっているが、死滅してはいないように見えたもの(200)である。これらの結果より、下記の活性に分類し

た。

WST-8 (低い値)、形態変化 (100 or 200): 細胞毒性

WST-8 (高い値)、形態変化 (200): sphere 形成阻害

WST-8 (低い値)、形態変化 (0): sphere 形成状態で増殖停 or 細胞毒性

(2) Sphere 選択的に細胞死を誘導する物質のスクリーニング

二種類の患者由来の GBM 細胞のうち、より悪性度の高い 1123 (mesenchymal 由来) を用いて、分化させた同細胞に対する細胞毒性和比較対象に用い、一つの大きな sphere 塊に対して選択的に細胞死を誘導するアッセイ系を用いて、がん幹細胞選択的阻害剤のスクリーニングを行った。

大きな sphere 塊を形成する手法として、PrimeSurface プレートを用いることにより、安定に大きな sphere 塊を形成させる系の確立に成功した。また、イメージアナライザーを併用することにより、propidium iodide (PI) を用いて死細胞を染色定量した。

正常細胞との比較として、正常 (f16w、6 週中絶胎児脳由来) に対する毒性を評価する。上記 GBM 細胞は、10%FCS 添加した DMEM/F12 中で培養すると、容易に分化し接着系細胞と形態変化すると共に CD133 ががん幹細胞マーカーが消失する。これらのコントロール細胞に対する細胞死誘導効果を観察することにより、ヒット株のがん幹細胞選択性の評価を行った。

4. 研究成果

(1) GBM を用いた sphere 形成物質のスクリーニング

146NS (proneural 由来) および 1123 (mesenchymal 由来) の二種類の患者由来の GBM 細胞を用いて、sphere 形成の有無を指標とした、sphere 形成阻害剤のスクリーニングを行った。

本アッセイ系を用いて、約 5 万ライブラリーについてスクリーニングした結果、146NS 細胞で 12 化合物、および 1123 細胞で 15 化合物を見出した。これらのヒット化合物のうち、アクチン重合阻害剤である cytochalasin 系化合物、PKA 活性化化合物であるインドールラクトン系化合物、ヒストンメチル化阻害活性を示す verticillin 系化合物、mocimycin および destruxin 系化合物が 146NS および 1123 細胞で活性を示す共通ヒットとして見出された。

その他の活性物質として、共通構造は持たないが、大環状ペプチド系化合物がヒット化合物として見出された。両細胞は、sphere の

形態に違いがあるが、1123 細胞ではマクロライド系化合物もヒット化合物として活性を示した。今後は、これらの化合物の作用機作から sphere 形成に関わる共通因子あるいは共通カスケードを明らかにすることにより、

がん幹細胞機能維持に深く関与する細胞塊形成機構を解明し、新たな薬剤開発ターゲットを見出すことが期待される。

(2) Sphere 選択的に細胞死を誘導する物質のスクリーニング

GBM は sphere 形成を維持することで、がん幹細胞の性質を維持するが、通常の方法で播種すると、様々な大きさの sphere が形成され、薬剤に対する感受性に大きな差が出るのが懸念された。この問題を克服し、均一かつ大きな sphere を形成させる手法について検討した結果、PrimeSurface プレートを用いる手法が最も効果的であることを見出した。図 1 は、大きな sphere 塊を用いたアッセイ結果の例を示したものであるが、ヒットサンプル添加群では、細胞死が誘導されることによる PI の取り込みで染色される sphere 塊が観察される。

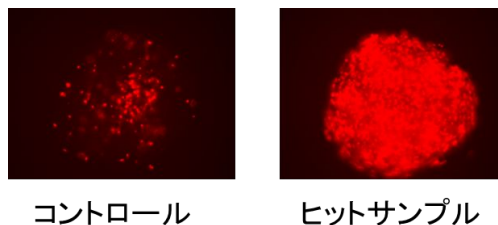
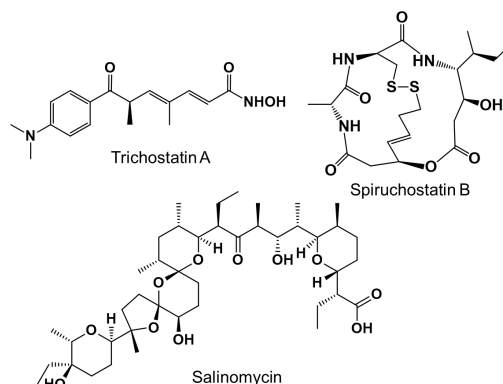


図 1. 大きな sphere 塊を用いたアッセイ結果

本系を用いて、1123 細胞を対象に、sphere 選択的毒性を示す化合物のスクリーニングを行った結果、V-type H⁺-ATPase 阻害剤である、bafilomycin および concanamycin をヒット化合物として得た。本系において強力な活性を示す化合物として注目されたのは、trichostatin A、trapoxin B および spiruchostatin (YM734) と言ったヒストンデアセチラーゼ阻害剤である。この他にも、免疫抑制物質である elaiophylin やイオノフォアである salinomycin がヒット化合物として得られたが、salinomycin は R. Weinberg らが、人工癌幹細胞特異的毒性を示す化合物として報告されている。



がん幹細胞は、増殖速度の遅い、通常のがん細胞とは異なる性質を示す薬剤耐性細胞

である。今後、本スクリーニングで見出されたヒット化合物と既存の抗がん剤との併用を行うことで、両がん細胞に細胞死を誘導することが期待されることから、併用実験に大きな興味を持たれる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Jun-ya Ueda, Miho Izumikawa, Akira Mukai, Aya Nagai, Ji-Hwan Hwang, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. New angucycline C-glycosides from *Streptomyces* sp. RI33. *J. Antibiot.*, **64** (5), 367-372 (2011). doi:10.1038/ja.2011.8, 査読有

Miho Izumikawa, Takahiro Hosoya, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. A new cyclizidine analog—JBIR-102—from *Saccharopolyspora* sp. RL78 isolated from mangrove soil. *J. Antibiot.*, **65** (1), 41-43 (2012). doi:10.1038/ja.2011.99, 査読有

Teppei Kawahara, Aya Nagai, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. JBIR-137 and JBIR-138, new secondary metabolites from *Aspergillus* sp. fA75J. *J. Antibiot.*, **65** (10), 535-538 (2012). doi: 10.1038/ja.2012.64, 査読有

Teppei Kawahara, Ji-Hwan Hwang, Miho Izumikawa, Junko Hashimoto, Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. JBIR-129 and -139, cytotoxic 34-membered polyol macrolides of microbial origin. *J. Nat. Prod.*, **133** (10), 1638-1641 (2012). doi: 10.1021/np3004358, 査読有

Teppei Kawahara, Miho Izumikawa Motoki Takagi and Kazuo Shin-ya. Relative configuration of JBIR-129, a cytotoxic 34-membered glycosidic polyol macrolide from *Streptomyces* sp. RK74. *Org. Lett.*, **14** (17), 4434-4437 (2012). doi: 10.1021/ol301940q, 査読有

Teppei Kawahara, Masashi Itoh, Miho Izumikawa, Noriaki Sakata, Toshio Tsuchida and Kazuo Shin-ya. New chaetoglobosin derivatives, MBJ-0038, MBJ-0039 and MBJ-0040, isolated from the fungus *Chaetomium* sp. f24230. *J. Antibiot.*, **66** (12), 727-730 (2013). doi: 10.1038/ja.2013.75, 査読有

Teppei Kawahara, Masashi Itoh, Miho Izumikawa, Noriaki Sakata, Toshio Tsuchida and Kazuo Shin-ya. Cytotoxic sesquiterpenoids MBJ-0009 and MBJ-0010

from a saprobic fungus *Nectria* sp. f26111. *J. Antibiot.*, **66** (9), 567-569 (2013). doi: 10.1038/ja.2013.45, 査読有

Teppei Kawahara, Masashi Itoh, Miho Izumikawa, Ikuko Kozono, Noriaki Sakata, Toshio Tsuchida and Kazuo Shin-ya. New hydroxamate metabolite, MBJ-0003, from *Micromonospora* sp. 29867. *J. Antibiot.*, **67** (3), 261-263 (2014). doi: 10.1038/ja.2013.124, 査読有

[学会発表](計 3 件)

新家 一男, 天然物のハイスル プットランドムスクリーニングへの応用、日本化学会 第92春季年会、平成24年3月20日、神奈川県、慶應義塾大学キャンパス

新家 一男, 世界最大級の天然物 ライブラリーの大規模 HTS への応用、第333回 CBI学会研究講演会、平成25年1月22日、東京、東京大学山上会館

新家 一男, 世界最大の天然物ライブラリーを用いたハイスループットランドムスクリーニング、第31回 日本ヒト細胞学会学術集会、平成25年8月10日、埼玉県、所沢市民文化センター

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等無し

6. 研究組織

(1)研究代表者

新家 一男 (SHIN-YA, Kazuo)

研究者番号: 0251481

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し