

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23560951

研究課題名(和文) がん細胞の三次元培養による薬剤耐性の発現と新規がん剤アッセイ系への応用

研究課題名(英文) Expression of drug resistance phenomena of cancer cells by 3D-culture and its application to development of new assay system for anti-cancer drugs

研究代表者

松下 琢 (MATSUSHITA, Taku)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：10209538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：がんには、制がん剤を使って治療を続けるうちに、細胞の薬物排出活性の亢進による薬剤耐性を獲得するケースがあり、この薬剤耐性の克服は、がん治療の大きな課題となっている。

そこで本研究では、これまで研究代表者らが研究してきた正常肝細胞の三次元培養技術を肝がん細胞に適用し、薬剤耐性などのがん細胞の諸性質を生体外で発現させることを試みた。結果として、通常用いられる96ウェル培養プレートを用いて、肝がん細胞(HepG2)の三次元培養を利用した新規アッセイ系の開発に成功した。また、このアッセイ系を利用して、脂質分子とミセル分子から成るハイブリッドリポソームが、薬剤耐性克服薬として有効であることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Intrinsic or acquired multidrug resistance (MDR) of cancer cells is one of the major obstacles in the chemotherapeutic treatment of solid tumors. We have investigated three-dimensional cultures for the maintenance of various biological characteristics of normal hepatic cells.

In this research, we have succeeded in the expression of drug resistance phenomena of hepatic cancer cells and the development of the new assay system for screening of anticancer drugs using 96 well three-dimensional culture plate. Furthermore, we found that hybrid liposomes composed of dimyristoylphosphatidylcholine and polyoxyethylene dodecyl ether have remarkable inhibitory effect on the drug efflux activity of hepatic cancer cells which cultured in three-dimensionally. Consequently, hybrid liposomes will be a new anticancer drug to overcome the multidrug resistance of hepatic cancer cells.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：プロセス工学・生物機能バイオプロセス

キーワード：三次元培養 がん細胞 薬剤耐性 肝細胞 ハイブリッドリポソーム スクリーニング 薬剤耐性克服薬 薬物排出活性

1. 研究開始当初の背景

がんには、制がん剤(抗がん剤)を使って治療を続けるうちに、がん細胞が薬剤耐性を獲得し、薬が効きづらくなって再発するケースがあり、この薬剤耐性の克服は、がん治療の大きな課題となっている(T. Tsuruo et al, *Cancer Sci.*, 94:15-21, 2003)。

現在、制がん剤の開発には、大きく分けて、【候補化合物の探索・合成】 【細胞レベルでの有効性試験とスクリーニング】 【動物レベルでの有効性・安全性試験】 【臨床試験】の各段階があり、この【細胞レベルでのスクリーニング】には、これまで主に 96 ウェルプレートの各ウェル底部に平面的に二次元単層培養した細胞アッセイ系が用いられてきた。研究代表者の松下らは、最近、肝がん細胞を用いて、この細胞を三次元に培養すると、薬剤耐性の原因の一つである薬物排出活性が、従来の二次元単層培養よりも亢進されることを見出した(図 1 参照, DOX; ドキソルピシン)。またこの活性亢進の原因が、

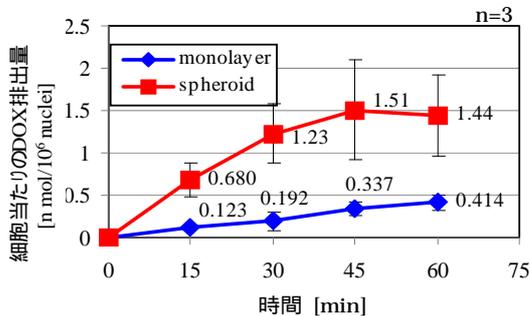


図 1 肝がん細胞における単層培養 ( :monolayer) と三次元培養 ( :spheroid) の薬物排出活性の違い

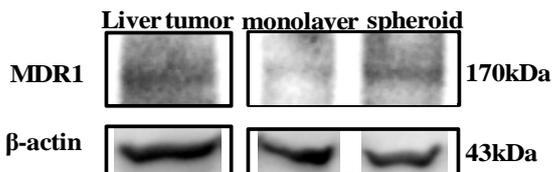
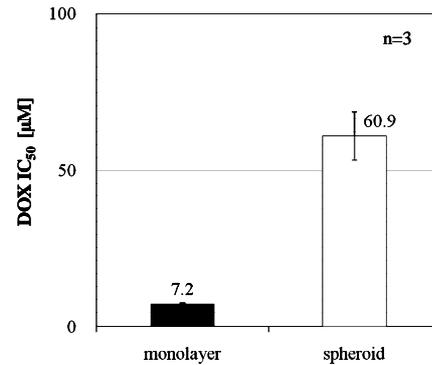


図 2 肝がん細胞における薬物排出タンパク質 (MDR1) の発現量の違い

薬剤排出タンパク質 (MDR1) の発現量の増加にあり、その細胞当たりの発現量は、生体内のがん組織中の細胞当たりの発現量とほぼ同等であることを突き止めた(図 2 参照)。また研究分担者の石田らは、三次元培養によって、薬剤耐性のもう一つの原因である薬物代謝活性の亢進に関連する遺伝子の発現が上昇することを遺伝子の網羅的解析によって報告している(S. Ishida et al, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 378:558, 2009)。これらの結果は、がん細胞を三次元培養することで、薬剤耐性を再現した新しい細胞レベルのアッセイ系が構築できることを示唆している。すでに申請者らは、96 ウェルプレートのウェル内部で、肝がん細胞 (HepG2 細胞) を三次元培養させる手技を確立し、MDR1 で

排出される制がん剤 (DOX) 及び排出されない制がん剤 (5-FU) による増殖抑制濃度 (IC<sub>50</sub> 値) を、二次元培養と比較した。その結果、5-FU では、両培養系で差が出なかったものの、MDR1 で排出される制がん剤 (DOX) では、二次元培養において、より低い IC<sub>50</sub> 値が得られ、従来のがん細胞の二次元単層培養では、がんの薬剤耐性を再現できていないことが示唆された(図 3)。

A MDR1で排出される制がん剤(DOX)のIC<sub>50</sub>値



B MDR1で排出されない制がん剤(5-FU)のIC<sub>50</sub>値

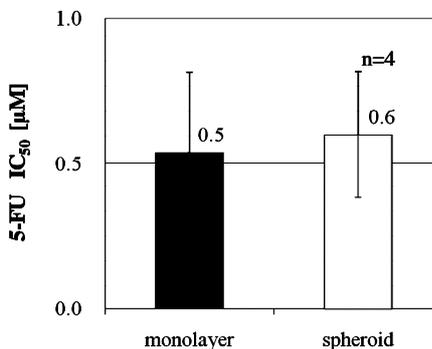


図 3 肝がん細胞の三次元培養 (spheroid) による薬剤耐性 (IC<sub>50</sub> 値の上昇) の再現

また、がん細胞の薬剤耐性を低下させる薬剤の開発は、制がん剤の効果を回復させ、また副作用の出ないより低い濃度で制がん剤を作用させることも可能となるため、現在制がん剤開発のターゲットの一つとなっている (T. Ochiya et al, *Nature Med.*, 14:939, 2008)。研究分担者の松本らは、がん細胞と正常細胞を識別し、がん細胞膜にのみ融合蓄積するハイブリッドリポソーム (HL) を開発している。この HL は、細胞膜の流動性を変化させることで、デスレセプター (Fas) などの膜タンパク質の活性を変化させ、HL のみによってがん細胞のアポトーシスを誘導し制がん効果を発揮することが実証され、臨床応用が進んでいる。

2. 研究の目的

本研究の主な目的は次の 2 つである。

(1) 申請者らが独自に開発したがん細胞の薬剤耐性を生体外で再現できる三次元培養法を利用し、新しい制がん剤のアッセイ系を

開発する。この時、研究分担者の石田との共同で、がん細胞の薬剤耐性発現の機構を、細胞活性と遺伝子の網羅的解析を含めて詳細に検討する。

(2)このアッセイ系を用いて、がん細胞の薬剤耐性を低下させる新しいタイプの制がん剤(薬剤耐性克服薬)を探索する。この耐性克服薬として、研究分担者の松本らが開発した、がん細胞膜に選択的に融合蓄積し、膜タンパク質に作用するハイブリッドリポソーム(HL)の効果を検証し、最適な脂質組成・有効濃度についての知見を得る。

### 3. 研究の方法

#### (1)がん細胞の薬剤耐性を *in vitro* で再現できる制がん剤の新規スクリーニング系の開発

申請者らが独自に開発した poly-L-glutamic acid を被覆した 96 ウェルプレートを用いて、肝がん細胞 (HepG2, HuH7) 及び、腎がん細胞 (OS-RC-2) などの薬物排出活性の高い細胞の三次元培養技術を確立する。この時、がん細胞の薬剤耐性発現の機構を、細胞活性(ドキシソルピシンの排出活性)と網羅的遺伝子発現解析(GeneChip 利用)を含めて詳細に検討する。

#### (2)ハイブリッドリポソームの薬物排出活性に与える影響の検討

この系を用いて、がん細胞の薬剤耐性を低下させる新しいタイプの制がん剤(薬剤耐性克服薬)として、がん細胞膜に選択的に融合蓄積し、膜タンパク質の活性に作用するハイブリッドリポソーム(HL)の効果を検証し、最適な脂質組成・有効濃度についての知見を得る。

### 4. 研究成果

#### (1)がん細胞の薬剤耐性を *in vitro* で再現できる制がん剤の新規スクリーニング系の開発

申請者らが独自に開発した poly-L-glutamic acid を被覆した 96 ウェルプレートを用いて、肝がん細胞 (HepG2) の三次元培養を利用した新規アッセイ系を開発した。このアッセイ系を用いて、肝がんの効果のある様々な制がん剤の増殖抑制試験(IC50 値の測定)を行った。その結果、三次元培養によって薬物排出タンパク質(MDR1)の発現の増大が確認されるとともに、MDR1 によって排出されるドキシソルピシン(DOX)やエピルピシンなどの薬剤に対して、肝がん細胞の三次元培養によって、薬剤耐性の発現が確認された。また、研究分担者の石田との共同で、がん細胞の薬剤耐性発現の機構を、細胞活性と遺伝子の網羅的解析から検討するための遺伝子抽出などの準備を行い、基礎的知見を得た。

#### (2)ハイブリッドリポソームの薬物排出活性に与える影響の検討

このアッセイ系を用いて、がん細胞の薬剤耐性を低下させる新しいタイプの制がん剤(薬剤耐性克服薬)の探索を行った。その結果、研究分担者の松本らが開発した、がん細胞

膜に選択的に融合蓄積し、膜タンパク質に作用することでがん細胞のアポトーシスを誘導するハイブリッドリポソーム(HL)が、本肝がん細胞の MDR1 タンパク質による薬物排出活性を阻害し、DOX に対する薬剤耐性を低下させる効果を見出した。このことは、HL が制がん剤としての効果だけでなく、薬剤耐性克服薬としての効果を有していることを示している。また、脂質分子として、L-Dimyristoylphosphatidylcholine(DMPC)が、ミセル分子として、Poly(oxyethylene)laurylether(C<sub>12</sub>(EO)<sub>23</sub>)が有効であることを見出した。また DMPC 濃度は 150 μM で効果を発揮すること、作用時間としては 48 時間で適当であることを見出した。

### 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 6 件)

(1)M.Hino, H.Ichihara, R.Ueoka, Y.Matsumoto, Therapeutic Effects of Cationic Hybrid Liposomes on the Hepatic Metastasis of Colon Carcinoma Along with Apoptosis *in vivo*, Biol.Pharm.Bull., 査読有, 37, 2014, pp.498-503.(DOI:10.1248/bpb.b13-00764).

(2)Y.Matsumoto, E.Cao, R.Ueoka, Growth Inhibition by Novel Liposomes Including Trehalose Surfactant Against Hepatocarcinoma Cells, Anticancer Res., 査読有, 33, 2013, pp.4727-4740.

(3)Y.Matsumoto, E.Cao, R.Ueoka, Hybrid Liposomes Composed of Dimyristoylphosphatidylcholine and Trehalose Surfactants Inhibit the Growth of Tumor Cells Along with Apoptosis, Biol.Pharm.Bull., 査読有, 36, 2013, pp.1258-1262.

(4)A.Oshikata, T.Matsushita, R.Ueoka, Enhancement of drug efflux activity via MDR1 protein by spheroid culture of human hepatic cancer cells, J.Biosci.Biotech., 査読有, 111, 2011, pp.590-593.(DOI:10.1016/j.jbiosc.2011.01.006).

(5)M.Yukihara, K.Ito, O.Tanoue, K.Goto, T.Matsushita, Y.Matsumoto, M.Masuda, S.Kimura, R.Ueoka, Effective drug delivery system for Duchenne Muscular Dystrophy using hybrid liposomes including gentamicin along with reduced toxicity, Biol.Pharm.Bull., 査読有, 34, 2011, pp.712-716.

(6)押方歩, 宮崎龍介, 松下琢, 上岡龍一, ハイブリッドリポソームを用いた形質転換肝幹細胞の選択的排除に関する基礎研究, YAKUGAKU ZASSHI, 査読有, 131, 2011,

〔学会発表〕(計 16 件)

(1)大田裕也, 肝がん細胞三次元培養の薬剤耐性克服薬スクリーニングへの応用, 日本組織培養学会第 87 回大会, 2014 年 5 月 30 日, 東京都千代田区星陵会館.

(2)松下琢, ヒト肝細胞の中空系膜型三次元細胞培養モジュールを用いた長期培養と毒性評価への応用, 日本薬学会第 134 年会(招待講演), 2014 年 3 月 30 日, 熊本県熊本市熊本大学.

(3)松下琢, ハイブリッドリポソームを用いた形質転換肝幹細胞の選択的排除に関する研究, 第 13 回日本再生医療学会総会, 2014 年 3 月 6 日, 京都府京都市国立京都国際会館.

(4) 松下琢, 中空系膜型三次元培養モジュールを用いたヒト肝細胞の長期培養と毒性評価への応用, 日本動物実験代替法学会第 26 回大会, 2013 年 12 月 20 日, 京都府京都市京都テルサ.

(5)S.Ishida, Comparative analysis of human fetal hepatocytes and adult hepatocytes by metabolomics and toxicity test, 日本薬物動態学会第 28 回大会, 2013 年 10 月 10 日, 東京都江戸川区タワーホール船堀.

(6)T.Ishii, Drug metabolism activity (CYP3A4 activity) of human hepatocytes cultured in 3D using nano-fibers, The 3<sup>rd</sup> SOJO-UTP Joint Seminar on Nano and Bio Research, 2013 年 8 月 27 日, 熊本県熊本市崇城大学.

(7)T.Matsushita, Development of 3D-culture module for human hepatocytes using two kinds of hollow fibers and nano-fibers, The 3<sup>rd</sup> SOJO-UTP Joint Seminar on Nano and Bio Research(招待講演), 2013 年 8 月 27 日, 熊本県熊本市崇城大学.

(8)生田健次郎, 創薬支援に向けたヒト肝細胞の遺伝子発現解析, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日, 神奈川県横浜市パシフィコ横浜.

(9)渋谷望, 中空系膜型三次元細胞培養モジュールによる肝幹細胞の高密度培養と機能発現, 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日, 神奈川県横浜市パシフィコ横浜.

(10)生田健次郎, DNA チップによる肝細胞の性質評価方法, 第 12 回日本再生医療学会総会, 2013 年 3 月 22 日, 神奈川県横浜市パシフィコ横浜.

(11)渋谷望, 三次元培養モジュールの開発における中空系膜の効果, 第 12 回日本再生医療学会総会, 2013 年 3 月 21 日, 神奈川県横浜市パシフィコ横浜.

(12)松下琢, 三次元培養モジュールによる肝幹細胞の高密度培養と機能発現, 第 12 回日本再生医療学会総会, 2013 年 3 月 21 日, 神奈川県横浜市パシフィコ横浜.

(13)渋谷望, 中空系膜型三次元細胞培養モジュールの開発 - 肝細胞増殖に関して -, 化学工学会第 78 年会, 2013 年 3 月 17 日, 大阪府豊中市大阪大学豊中キャンパス.

(14)石井貴晃, 中空系膜型三次元細胞培養モジュールの開発 - 肝細胞機能の解析 -, 化学工学会第 78 年会, 2013 年 3 月 17 日, 大阪府豊中市大阪大学豊中キャンパス.

(15)石井貴晃, 中空系膜型三次元細胞培養モジュールの開発 - 肝細胞機能に関して -, 日本動物実験代替法学会第 25 回大会, 2013 年 12 月 8 日, 東京都港区慶応大学芝共立キャンパス.

(16)渋谷望, 中空系膜型三次元細胞培養モジュールの開発 - 肝細胞増殖に関して -, 日本動物実験代替法学会第 25 回大会, 2013 年 12 月 8 日, 東京都港区慶応大学芝共立キャンパス.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
崇城大学生物生命学部応用生命科学科医学生体工学講座HP  
<http://www.life.sojo-u.ac.jp/biomed/index.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松下 琢 (MATSUSHITA, Taku)  
崇城大学・生物生命学部・教授  
研究者番号: 10209538

### (2)研究分担者

松本 陽子 (MATSUMOTO, Yoko)  
崇城大学・生物生命学部・教授  
研究者番号: 00133562  
石田 誠一 (ISHIDA, Seiichi)  
国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・室長  
研究者番号: 10270505