

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 1 月 12 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25830121

研究課題名(和文) ヒト癌薬剤耐性コロニーのタンパク質発現プロファイルによる癌再発機構に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of cancer relapse mechanisms by proteomic profiling using drug-tolerant cell subpopulation

研究代表者

久米 浩平 (Kume, Kohei)

岩手医科大学・医学部・ポスドクター

研究者番号：10609663

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：根治的手術および術後補助化学療法を行っても、再発は一定の確率で起こる。我々は、再発癌のモデルと考えられる、抗癌剤存在下に出現する癌細胞コロニー(drug-tolerant colonies, DTCs)を分子細胞生物学的に解析した。我々は独自に開発した逆送タンパク質マイクロアレイ解析から、DTCsは既知の薬剤耐性関連分子では区別できない細胞集団である事を明らかにし、DTCs阻害化合物のスクリーニングからRNAポリメラーゼ阻害剤(RNAPI)を同定した。RNAPIをシスプラチンと併用すると、マウス腹膜播種再発モデルにおいて結節数の減少および生存期間の延長が観察された。

研究成果の概要(英文)：Cancer relapse is often seen even after curative operation followed by adjuvant chemotherapy. In this study, we analyzed cancer cell colonies that emerge in the presence of anticancer drugs (drug-tolerant colonies, DTCs) as a cancer relapse model. Proteomic characterization of DTCs identified two major subgroups, but none of these characters associated with DTCs. A lead compound screening identified an RNA polymerase inhibitor (RNAPI) bearing potency in DTC suppression. RNAPI with cisplatin significantly reduced the number of nodules of peritoneal dissemination of gastric cancer in mice. These findings suggest that RNAPI is potent in suppression of cancer relapse such as peritoneal dissemination of gastric cancer.

研究分野：癌の分子細胞生物学

キーワード：抗癌剤耐性 癌性腹膜炎 RNAポリメラーゼ 逆相タンパク質マイクロアレイ 逆相タンパク質マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

根治手術によって肉眼的に癌が認められない状態に対して術後補助化学療法を施行しても再発がしばしば見られる。本研究室では抗癌剤存在下に形成される薬剤寛容性コロニー (drug-tolerant colonies, DTCs) を再発癌のモデルと考え、以下の様な結果を得ていた。

(1) コロニー形成阻害は、細胞増殖抑制アッセイにおいてほとんど効果が無い抗癌剤濃度 (1.0 μM 以下) で起こる。

(2) 同一環境下から採取した DTCs を個別にヌードマウス皮下に移植すると、腫瘍を形成するものと形成しないものが存在する。

(3) タンパク質発現プロファイルによって 2,000 個の DTCs を幹細胞様または上皮様を示す 2 グループに分類可能であった。

(4) 幹細胞様および上皮様の特徴は DTCs と通常のコロニーを区別するものではなかった。

(5) DTCs と通常のコロニーにおける薬剤耐性関連タンパク質の発現レベルはオーバーラップしており、DTCs 出現との関連は極めて限定的であった。

(6) DTCs と通常のコロニーにおける多能性関連タンパク質の発現レベルはオーバーラップしていたが、SSEA4、TRA-1-60、Nanog、Oct-4、Sox2 が統計学的有意差をもって DTCs において発現上昇していた。

以上から、DTCs 出現は生理的条件下に近い抗癌剤濃度で起こる； 幹細胞様の階層型モデルでは説明が困難である； および 転写活性に依存している事が推測された。

2. 研究の目的

DTCs 出現抑制が術後補助化学療法後の再発予防につながると考え、以下の目的を設定した。

(1) DTCs 出現阻害化合物の同定

(2) DTCs 出現阻害化合物の *in vivo* における効果検証

(3) DTCs 出現に促進的に働く遺伝子の同定

3. 研究の方法

(1) DTCs 出現阻害化合物の同定

癌細胞が薬剤寛容性を発現する上で mRNA およびタンパク質合成を含む遺伝子発現過程は基本的に重要であると考えられるが、背景(4)-(6)は DTCs 出現がタンパク質合成よりも mRNA 合成に依存していることを示唆している。そこで、RNA ポリメラーゼ阻害剤の DTCs 出現抑制効果を他の阻害化合物との比較により検証した。治療後に残存する癌細胞が再発に至る上でコロニー形成初期過程が重要であると考え、化合物へ 4 時間暴露した癌細胞をシスプラチン存在下に低密度に播種し、出現した DTCs 数を計測した。また、文部科学省新学術領域「癌研究分野の特性などをふまえた支援活動 (代表: 矢守隆夫先生)」から提供される化合物ライブ

ラリー (338 化合物) を用いて、コロニー形成に対して阻害的に作用する化合物に共通の特徴が存在するかを検証した。

(2) DTCs 出現阻害化合物の *in vivo* における効果検証

ヌードマウス腹腔内にヒト胃癌細胞を播種すると腹腔内に多数の結節を形成する。この結節はシスプラチン投与によっても完全に抑制できないことから、再発癌のモデルと言える。DTCs 出現阻害化合物をシスプラチンと併用することによって、体重減少の改善； 腸間膜に形成される結節数の減少； および生存期間の延長が統計学的に有意な差を持って観察されるかどうかによって再発予防効果を判定した。

(3) DTCs 出現に促進的に働く遺伝子の同定

DTCs と通常のコロニーのトータル RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ法による遺伝子発現プロファイルの比較を行った (GSE65419)。DTCs において発現の高かった上位 2.5% の遺伝子群について、遺伝子オンロジーに基づく解析データや自験データを照らし合わせ、DTCs 関連遺伝子を抽出した。抽出した遺伝子について qRT-PCR およびウェスタンブロットングによる検証を行い、最終的に遺伝子ノックダウンが DTCs 出現に阻害的に作用するかどうかを解析した。

4. 研究成果

RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) 阻害剤を補助化学療法前に投与する事により癌性腹膜炎を予防できる可能性を示唆するデータを得た (論文投稿中)。本研究で創出されたシングルコロニーのタンパク質発現プロファイル法； RNAPII 阻害剤/シスプラチン併用による癌再発予防効果； および 再発癌治療の標的分子としての *TAF15* 遺伝子について特許出願準備が進行中である。

(1) DTCs 出現阻害化合物の同定

スクリーニングに用いた化合物のうち、RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) 阻害剤が最も効果的にシスプラチン存在下の DTCs 出現を抑制した。RNAPII 阻害剤に 4 時間接触した癌細胞はシスプラチン存在下における DTC の出現数を 93% 低下させた。

RNAPII 阻害剤は、1.0 μM でコロニー出現を 100% 抑制する特徴を有していた。そこで、上記化合物ライブラリーを用いて RNAPII 阻害剤と同様の特徴を有する化合物のスクリーニングを行った。各化合物をターゲット分子または生物学的プロセス毎にソートし、陽性化合物数のランキングを行ったところ、RNAPII 阻害剤を含む転写阻害剤は 162 カテゴリー中 4 位であった。

以上から DTCs 出現阻害化合物として RNAPII 阻害剤を同定した。

(2) DTCs 出現阻害化合物の *in vivo* における効果検証

マウス癌性腹膜炎モデルにおいてシスプラチン投与の 24 時間前に RNAPII 阻害剤を投与すると、シスプラチン単剤投与に比べ結節数を 36%、無治療に比べて 73%低下させた。興味深い事に、RNAPII 阻害剤単剤投与群は投与後 40 日後に 60%の個体が死亡したのに対しシスプラチン併用投与群では 10%のみであった。よって RNAPII 阻害剤の癌性腹膜炎予防効果は明らかであるが、臨床応用には毒性軽減メカニズムの解明が必要である。

(3) DTCs 出現に促進的に働く遺伝子の同定

通常のコロニーと比較して DTCs において発現の高かった上位 2.5%の遺伝子群について、DNA/RNA に結合するタンパク質をコードする遺伝子を抽出し、10 種類の候補遺伝子を得た。そのうち RNAPII と直接結合することが報告されている *TAF15* に絞って解析を行った (Bertolotti et al., 1996, 1998)。RNAPII 阻害剤に接触した癌細胞において *TAF15* の発現低下が観察された。*TAF15* をノックダウンした癌細胞は RNAPII 阻害剤に接触した細胞に観察される紡錘型への形態変化が起こった。これらの細胞はコントロールに比べ DTC 出現数が 90%低下した。

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 3 件)

- 1:Ishida K, Nishizuka SS, Ohmori Y, Kume K, Sato K, Iwaya T, Koeda K, Mori M, Wakabayashi G. Evaluation of the antitumor effects of alternate-day 5-fluorouracil administration model using human gastric cancer cell lines. J Iwate Med Assoc. in press.
- 2:Endo F, Nishizuka SS, Kume K, Ishida K, Katagiri H, Ishida K, Sato K, Iwaya T, Koeda K and Wakabayashi G. A compensatory role of NF- κ B to p53 in response to 5-FU-based chemotherapy for gastric cancer cell lines. PLoS ONE. 2014; 9(2).
- 3:Matsuo T, Nishizuka S S, Ishida K, Endo F, Katagiri H, Kume K, Ikeda M, Koeda K and Wakabayashi G. Evaluation of chemosensitivity prediction using quantitative dose-response curve classification for highly advanced/relapsed gastric cancer. World

J Surg Oncol. 2013; 11(11).

[学会発表](計 13 件)
特別講演 (国際)

1:Ishida K, Nishizuka SS, Kume K, Sato K, Endo F, Katagiri H, Koeda K, Wakabayashi G. Drug-tolerant gastric cancer cell subpopulation enriched by 5-fluorouracil acquires malignant phenotype. 3rd Reverse-phase protein array global workshop; 2013 Nov; Kobe.

一般講演 (国内)

1: 久米浩平, 西塚哲, 遠藤史隆, 片桐弘勝, 前沢千早, 若林剛. Inhibition of RNA Pol II suppresses the emergence of drug-tolerant cell subpopulations. 第73回日本癌学会学術総会; 2014年 9月; 横浜.

一般示説 (国際)

- 1: Kume K, Nishizuka SS, Wakabayashi G. Emergence of bimodal responses to etoposide in human cancer cell lines. The 15th International Conference on Systems Biology; 2014 Sep; Melbourne.
- 2: Kume K, Nishizuka SS, Maesawa C, Wakabayashi G. Imaging cytometric analysis of cancer cell subpopulation accumulating p53 in the nucleus in response to etoposide. 37th The Naito Conference; 2014 Jul; Niseko.
- 3: Kume K, Nishizuka SS, Ikeda M, Miura S, Endo F, Katagiri H, Ishida K, Sato K, Maesawa C, Wakabayashi G. Transcriptional and proteomic profiling of drug-tolerant cancer cell subpopulations using colonies that emerge in the presence of anticancer agents. 105th American Association for Cancer Research Annual meeting; 2014 Apr; San Diego.
- 4: Kume K, Nishizuka SS, Ikeda M, Miura S, Endo F, Katagiri H, Ishida K, Sato K, Maesawa C, Wakabayashi G. Molecular characterization of drug-tolerant cancer cell subpopulations using colony lysate

microarrays. 3rd Reverse-phase protein array global workshop; 2013 Nov; Kobe.

5: Kume K, Nishizuka SS, Takisawa H, Maesawa C, Wakabayashi G. WinP-scan, a user-friendly platform for RPPA image analysis. 3rd Reverse-phase protein array global workshop; 2013 Nov; Kobe.

6: Kume K, Nishizuka SS, Maesawa C, Wakabayashi G. Genotoxic drug-induced switch-like protein expression of nuclear p53 in human cancer cells. The 14th International Conference on Systems Biology; 2013 Sep; Copenhagen.

7: Kume K, Nishizuka SS, Ikeda M, Miura S, Wada Y, Fujikawa S, Maesawa C, Wakabayashi G. Analysis of cancer cell populations by isolated single colonies for the identification of drug-tolerance inducing factor. 104th American Association for Cancer Research Annual meeting; 2013 Apr; Washington DC.

一般示説 (国内)

1: 久米浩平, 西塚哲, 池田みゆき, 三浦佐和子, 前沢千早, 若林剛. コロニー形成試験を用いた薬剤寛容性細胞集団の分子プロファイリング. 未来医療開発プロジェクトシンポジウム; 2014年 8月; 盛岡.

2: 久米浩平, 西塚哲, 前沢千早, 若林剛. 癌細胞の抗癌剤反応における細胞間不均一性. 定量生物学の会 第6回年会; 2013年 11月; 大阪.

3: 久米浩平, 西塚哲, 遠藤史隆, 片桐弘勝, 前沢千早, 若林剛. Analysis of drug-tolerant phenotype by molecular profiling of single colonies. 第72回日本癌学会学術総会; 2013年 10月; 横浜.

4: 久米浩平, 西塚哲, 前沢千早, 若林剛. 癌細胞の抗癌剤反応における細胞間不均一性の解析. GE Life Science Day; 2013年 7月; 横浜.

〔図書〕(計 1 件)

1: 西塚哲, 松尾鉄平, 石田和茂, 遠藤史隆, 久米浩平, 片桐弘勝, 石田馨, 佐藤慧, 野田宏伸, 杉立彰夫, 岩谷岳, 若林剛. CHAPTER 1 癌バイオマーカー探索 再発癌制御を目指した科学的根拠に基づくバ

イオマーカー探索. 分子細胞治療フロンティア 2015. 第 1 版. 東京・飯田橋パピルス; 2015: 20-26.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 3 件)

1: 腫瘍の再発を抑制する医薬 (久米浩平, 西塚 哲, 特願2015-175211, 出願中, 岩手医科大学).

2: 腫瘍の再発を抑制するための標的分子としてのTAF15遺伝子およびその産物 (久米浩平, 西塚 哲, 特願2015-175212, 出願中, 岩手医科大学).

3: 微小細胞集団の発現プロファイル法 (久米浩平, 西塚 哲, 特願2015-175213, 出願中, 岩手医科大学).

〔その他〕

ホームページ等

1: Nishizuka Lab.

<http://www.nishizukalab.org/>

2: 久米浩平の研究ブログ

<http://blog2012kkume.japanprize.jp/>

3: Nishizuka Lab. Facebook

データ解析ツール等

マイクロアレイスキャニングプログラム Win P-scan

<http://www.nishizukalab.org/downloads>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

久米浩平 (Kume Kohei)

岩手医科大学 医歯薬総合研究所

腫瘍生物学研究部門 ポストドクター

研究者番号 : 10609663

(2)研究分担者

()

研究者番号 :

(3)連携研究者

()

研究者番号 :