

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460201

研究課題名(和文) がん幹細胞を標的とする新規がん分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-cancer agents targeting cancer stem cells

研究代表者

池田 龍二 (Ikeda, Ryuji)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・准教授

研究者番号：50398278

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤の耐性機序としては、がん細胞の薬剤排出の亢進、増殖因子などによる生存シグナルの活性化など様々な因子の関与が知られている。また、腫瘍中にがん幹細胞が存在することが判明しており、その特徴として、P-糖タンパク質やBCRPといったABCトランスポーターが過剰発現していることが知られている。これらの発現は、がんが多剤耐性を示す原因の一つでもある。近年、新しい治療薬や治療法が開発され、次々とがん分子標的薬剤が登場し脚光を浴びているが、これらの薬剤に対しても耐性を示す腫瘍が出現し治療の障害となっている。患者に適切な医療を提供するためにさらに科学的な根拠に基づいた業務・研究を行う必要がある。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms of anti-cancer drug resistance include various factors, such as the increased drug efflux by cancer cells, activation of survival signaling pathways by growth factors. In addition, cancer stem cells have been found in tumors. Cancer stem cells are characterized by the overexpression of ABC transporters, such as P-glycoproteins and breast cancer resistance protein. The expressions of the transporters partially explain the multidrug resistance of cancer. Novel anti-cancer agents and therapies have been developed every year. Besides conventional anti-cancer agents, molecular target drugs for cancer play important roles in the management of cancer therapy. However, some tumors become resistant to these drugs. Medical practice and research based on more scientific evidence are demanded to provide appropriate and high-quality treatments for patients.

研究分野：医療系薬学

キーワード：抗がん剤耐性 がん幹細胞 ABCトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

ABC トランスポーターは、ヒトでは約 50 種類存在する。そのうち P-糖タンパク質 (MDR1/ABCB1)、MRP1 (ABCC1)、BCRP (ABCG2) は、抗がん剤を細胞内から細胞外に排泄する排出トランスポーターとして知られており、これら遺伝子発現によってがん細胞の薬剤耐性を誘導する因子であることが分かっている。また、腫瘍中に、がん幹細胞が存在することが分かっている。がん幹細胞の特徴の1つとして、P-糖タンパク質 (P-gp) や BCRP といった ABC トランスポーターが過剰発現している。がん幹細胞は、抗がん剤に抵抗性を示し、その後再び増殖してくる。これらのトランスポーターの発現は、がんが多剤耐性を示す原因の1つでもある。悪性腫瘍に対する抗がん剤耐性やがんの再発は大きな問題であり、耐性・進展の機序を解明し、実用的な耐性克服薬や再発予防薬を開発することは重要且つ緊急課題であると考えられる。

一方、1986年にラットより vault が細胞内オルガネラとして coated vesicle から単離された。電子顕微鏡による解析から、形態がゴシック様式の大聖堂のアーチ型に似ているため vault と名付けられた。Vault は中空になっており、その中に 70S 大腸菌リボソームを数個取り込めるほど大きく、今日まで報告されている中で最大のリボ核蛋白体を形成している。Vault は、100kDa の LRP/MVP (Lung Resistance Protein/Major Vault Protein) のほかに、240kDa(p240)、193kDa(p193)の蛋白質と 1 種類の vault RNA (vRNA) から構成されている。また、LRP はラットの vault の 70%

以上を占める major vault protein (MVP) と 88% のアミノ酸相同性を有していることなどから、ヒトの MVP であることが分かった。LRP/MVP だけでは多剤耐性形質を付与するのに不十分であり、vault 粒子の数の増加が耐性の獲得に必要であると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、がん幹細胞の抗がん剤の耐性化およびがんの再発の機序を解明し、がん幹細胞を標的とする新規がん分子標的治療薬の開発を行うことを目的とした。プレート表面を特殊加工して細胞が接着しない条件で培養すると、腫瘍細胞のほとんどは死滅するが、がん幹細胞と考えられる一部の細胞は sphere を形成することから、がん幹細胞のモデルとして有用である。がん幹細胞モデルを用い、がん幹細胞の発現分子を詳細に解析し、実用的な新規がん幹細胞を標的とする新規がん幹細胞分子標的治療薬の開発を目的とした。

3. 研究の方法

Sphere 形成能を基にした cancer stem-like cells (CSCs : がん幹細胞様細胞) モデルを用いて研究を実施した。細胞株として、ヒトグリオーマ細胞株 U251 を使用した。抗がん剤感受性試験を MTT アッセイ法にて調べた。遺伝子発現は、RT-PCR 法を用いた。網羅的遺伝子解析には、マイクロアレイ法にて実施した。

4. 研究成果

Sphere 形成能を基にした cancer stem-like cells (CSCs : がん幹細胞様細胞) モデルを用いて研究を実施した。特殊加工して細胞がプレート表面に接着しない条件で培養すると、腫瘍細胞のほとんどは死滅

するが、CSCs と考えられる一部の細胞は sphere を形成し細胞死から回避することが分かっている。このがん幹細胞モデルを用いて sphere 化した細胞が親細胞と比較して、どの程度抗がん剤耐性になるか調べた。ゲムシタビン、パクリタキセル、カルボプラチンを用いて抗がん剤感受性試験を MTT アッセイ法にて調べたところ、一度 sphere 化した細胞集団は、ゲムシタビン、パクリタキセルに対して親細胞と比較して抵抗性を示した。一方、カルボプラチンに対しては影響が認められなかった。

ABC トランスポーターである ABCB1、ABCC1、ABCG2 等は、抗がん剤を細胞内から細胞外に排泄する排出トランスポーターとして知られている。Sphere 化した細胞の ABC トランスポーターの発現を RT-PCR 法で親細胞と sphere 化した細胞集団とで比較したところ、ABCB1、ABCC1、ABCG2、ABCB5 の発現亢進が sphere 化した細胞集団で認められた。また、vault の構成成分である MVP の発現について、コントロール細胞と sphere 化した細胞集団とで比較したところ sphere 化した細胞集団で MVP の発現亢進が認められた。

また、sphere 化させた細胞と親細胞の遺伝子発現の変動をマイクロアレイにて網羅的に解析した。その結果、複数の遺伝子発現の変動が認められ、特に secretogranin II (SCG2) , carbonic anhydrase XII (CA12) , lysosomal-associated membrane protein family, member 5 (LAMP5) , immediate early response 3 (IER3) , diacylglycerol O-acyltransferase 2-like 6 (DGAT2L6) , SMAD family member 5, peptidyl

arginine deiminase type III (PADI3) は、コントロール細胞と比較して 20 倍以上 sphere 化した細胞集団で遺伝子の発現の亢進が認められた。さらに、マイクロアレイ解析の結果より、CSCs に重要なシグナル伝達経路として、Akt シグナル伝達経路の関与が示唆された。Akt は、多くの腫瘍で強く活性化されており、phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) による phosphatidyl inositol (3,4,5) triphosphate (PIP3) の産生によって活性化される。CSCs の Akt シグナル伝達経路の活性化が、抗がん剤耐性にも寄与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) Tabata, S., Yamamoto, M., Goto, H., Hirayama, A., Ohishi, M., Kuramoto, T., Mitsuhashi, A., Ikeda, R., Haraguchi, M., Kawahara, K., Shinsato, Y., Minami, K., Saijo, A., Hanibuchi, M., Nishioka, Y., Sone, S., Esumi, H., Tomita, M., Soga, T., Furukawa, T., Akiyama, SI., Thymidine Catabolism as a Metabolic Strategy for Cancer Survival, Cell Rep. 2017 , 19: 1313-1321. (査読〇)

(2) Desaki, R., Sawada, G., Okumura, H., Ikeda, R., Tanabe, K., Komatsu, H., Mimori, K., Mori, M., Kita, Y., Uchikado, Y., Arigami, T., Uenosono, Y., Owaki, T., Ishigami, S., Natsugoe, S., As a Novel Prognostic Marker, Cysteine/histidine-rich 1 (CYHR1) is a Therapeutic Target in Patients with Esophageal Squamous Cell Carcinoma,

Ann Surg Oncol. 2017, 24: 586-593. (査読○)

(3) Minami, K., Shinsato, Y., Yamamoto, M., Takahashi, H., Zhang, S., Nishizawa, Y., Tabata, S., Ikeda, R., Kawahara, K., Tsujikawa, K., Chijiwa, K., Yamada, K., Akiyama, S., Pérez-Torras, S., Pastor-Anglada, M., Furukawa, T., Takeda, Y., Ribonucleotide reductase is an effective target to overcome gemcitabine resistance in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells with dual resistant factors, J Pharmacol Sci. 2015, 127: 319-325. (査読○)

(4) Tabata, S., Ikeda, R., Yamamoto, M., Shimaoka, S., Mukaida, N., Takeda, Y., Yamada, K., Soga, T., Furukawa, T., Akiyama, S., Thymidine phosphorylase activates NFκB and stimulates the expression of angiogenic and metastatic factors in human cancer cells, Oncotarget. 2014, 5: 10473-10485. (査読○)

(5) Sonoda, JI., Ikeda, R., Baba, Y., Narumi, K., Kawachi, A., Tomishige, E., Nishihara, K., Takeda, Y., Yamada, K., Sato, K., Motoya, T., Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, attenuates the cell viability of human non-small-cell lung cancer A549 cells via reducing Bel-xL expression, Exp Ther Med. 2014, 8: 59-63. (査読○)

[学会発表] (計 25 件)

(1) 池田龍二、武田泰生、抗がん剤耐性機序の解明と耐性克服薬剤の開発に向けて、日本薬学会第 137 年会、仙台国際センター

(宮城県仙台市) 2017 年 3 月 24 日~3 月 27 日

(2) 中嶋洋生、橋口怜未、有馬由佳、松田絹代、菅原英輝、有馬純子、井上和啓、池田龍二、水野圭子、井上博雅、武田泰生、外来患者に対する内服抗がん薬の副作用チェックリストを用いた診察前面談の取り組みについて、日本臨床腫瘍薬学会学術大会 2017、朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター(新潟県新潟市) 2017 年 3 月 18 日~19 日

(3) Takahama, K., Futagawa, T., Masuda, S., Yamada, K., Ikeda, R., Takeda, Y., AICD negatively regulate neural differentiation in P19 cells、第 90 回日本薬理学会年会、長崎ブリックホール(長崎県長崎市) 2017 年 3 月 15 日~3 月 17 日

(4) 柴田由香里、畑こず恵、茂見茜里、中目順子、高橋毅行、新田美奈、池田龍二、武田泰生、中枢神経系原発悪性リンパ腫に対するメトトレキサート大量療法施行時のホスアプレピタントの有効性、第 33 回日本薬学会九州支部大会、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島) 2016 年 12 月 3 日~12 月 4 日

(5) 富山成章、池田龍二、西澤由紀彦、益田将吾、田實裕介、武田泰生、子宮頸癌細胞の cancer-stem cells において S100A16 は Oct4 と Nanog の発現を制御している、第 33 回日本薬学会九州支部大会、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市) 2016 年 12 月 3 日~12 月 4 日

(6) 深水知英、有馬純子、池田龍二、武田泰生、ベバシズマブの分割使用による薬剤費削減効果の検討、第 26 回医療薬学会年会、

国立京都国際会館（京都府京都市）2016年
9月17日～19日

（7）上片平恵、池田龍二、島晃大、吉満誠、武田泰生、ダカルバジン投与時の難治性の血管痛に対して疼痛を緩和することが可能であった一症例、第26回医療薬学会年会、国立京都国際会館（京都府京都市）2016年9月17日～19日

（8）迫田友理、松田絹代、坂本綾奈、橋口怜未、本木下真亜紗、日高伸之助、有馬由佳、菅原英輝、池田龍二、武田泰生、ST合剤の先発品と後発品における副作用発現の比較に関する後ろ向き研究、第26回医療薬学会年会、国立京都国際会館（京都府京都市）2016年9月17日～19日

（9）池田龍二、屋地慶子、菅原英輝、井上和啓、田川まさみ、武田泰生、薬学生および医学生による共同実習体制の確立と教育効果について、医療薬学フォーラム2016 / 第24回クリニカルファーマシーシンポジウム、滋賀県立芸術劇場びわ湖ホール（滋賀県大津市）2016年6月25日～26日

（10）有馬由佳、松田絹代、牛之濱風見、新田美奈、菅原英輝、有馬純子、井上和啓、池田龍二、武田泰生、経口抗がん剤内服中外来患者に対するB型肝炎ウイルススクリーニング実施実態調査とスクリーニング実施率向上を目指した取り組み、日本臨床腫瘍薬学会学術大会2016、鹿児島市民文化ホール（鹿児島県鹿児島市）2016年3月12日～13日

（11）松田絹代、久土綾香、橋口怜未、有馬由佳、新田美奈、有馬純子、菅原英輝、池田龍二、井上和啓、眞田宏樹、水野圭子、井上博芽、武田泰生、シスプラチン誘発性腎機能障害に対するマグネシウムの腎保護

作用に対する前向き研究、日本臨床腫瘍薬学会学術大会2016、鹿児島市民文化ホール（鹿児島県鹿児島市）2016年3月12日～13日

（12）高橋毅行、菅原英輝、満尾明恵、本木下真亜紗、迫田友理、中嶋洋生、池田龍二、武田泰生、プロトンポンプ阻害薬およびH₂受容体遮断薬の併用におけるゲフィチニブ治療期間と副作用発現状況の調査、日本臨床腫瘍薬学会学術大会2016、鹿児島市民文化ホール（鹿児島県鹿児島市）2016年3月12日～13日

（13）富山成章、池田龍二、西澤由紀彦、益田将吾、武田泰生、Cancer stem-like cellsにおけるS100A16の役割、第32回日本薬学会九州支部大会、九州保健福祉大学薬学部（宮崎県延岡市）2015年11月28日～29日

（14）牛之濱風見、森川由梨、池田龍二、山下八重乃、岡島隼輔、新田美奈、武田泰生、プレオマイシン、エトポシド、シスプラチン（BEP）療法時のプレオマイシンによる発熱に対するステロイドの抑制効果、第25回日本医療薬学会年会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2015年11月21日～11月23日

（15）森川由梨、牛之濱風見、池田龍二、山下八重乃、岡島隼輔、新田美奈、武田泰生、当院におけるペグフィルグラスチムの使用経験およびG-CSF製剤追加投与の効果発現状況、第25回日本医療薬学会年会、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）2015年11月21日～11月23日

（16）茂見茜里、渡辺英里香、松元一明、横山雄太、猪川和太、金澤直子、梅崎靖弘、竹下鮎美、池田龍二、森川則文、武田泰生、

小児における静注・経口ポリコナゾール至適量の検討、第 25 回日本医療薬学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)2015 年 11 月 21 日~11 月 23 日

(17) 池田龍二、山田勝士、武田泰生、ゲムシタピン耐性非小細胞肺癌細胞の耐性機序と耐性克服薬剤の開発、第 8 回トランスポーター研究会九州部会 JTRAQ2015、鹿児島大学医学部鶴陵会館(鹿児島県鹿児島市)2015 年 7 月 18 日

(18) 岡島隼輔、新田美奈、田邊徹、池田龍二、永野広海、黒田祐一、武田泰生、頭頸部癌患者におけるセツキシマブ投与による電解質異常に関する検討、医療薬学フォーラム 2015、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)2015 年 7 月 4 日~7 月 5 日

(19) 西澤由紀彦、池田龍二、新田美奈、南謙太郎、武田泰生、5-aza-2-deoxycytidine(5-Aza-CdR)による 5-fluorouracil (5-FU) の抗腫瘍効果増強作用の機序解明、日本臨床腫瘍薬学会 2015、みやこめっせ(京都府京都市)2015 年 3 月 14 日~3 月 15 日

(20) 池田龍二、武田泰生、安全で有効ながん化学療法を目指して -抗がん剤耐性機序解明に向けて-、日本臨床腫瘍薬学会 2015、みやこめっせ(京都府京都市)2015 年 3 月 14 日~3 月 15 日

(21) 池田龍二、古川龍彦、山田勝士、武田泰生、抗浸透圧ストレスによって誘導される vault の機能解析、第 7 回トランスポーター研究会九州部会 JTRAQ2014、産業医科大学ラマツィーニホール(福岡県北九州市)2014 年 11 月 22 日

(22) 池田龍二、武田泰生、抗がん剤耐性機序の解明と臨床応用に向けて、第 8 回次

世代を担う若手医療薬科学シンポジウム、熊本大学薬学部(熊本県熊本市)2014 年 11 月 15 日~11 月 16 日

(23) 有馬由佳、新田美奈、有馬純子、下堂蘭権洋、池田龍二、武田泰生、処方監査手順の改訂によるがん化学療法監査均てん化への取り組み、第 17 回日本医薬品情報学会総会・学術大会、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)2014 年 7 月 12 日~7 月 13 日

(24) 橋口怜未、近藤智子、内山弘彦、下堂蘭権洋、池田龍二、武田泰生、鹿児島大学における経口血糖降下薬と持続型インスリン併用療法の実態調査、医療薬学フォーラム 2014/ 第 22 回クリニカルファーマシーシンポジウム、ビッグサイト TFT ホール(東京都江東区)2014 年 6 月 28 日~6 月 29 日

(25) 菅原英輝、牛之濱風見、重永明恵、有馬由佳、本木下真亜紗、迫田友理、松下格司、小玉哲史、岩坪笑、池田龍二、武田泰生、オピオイド鎮痛薬による重篤な副作用発現に関連する要因の調査、第 19 回日本緩和医療薬学会、神戸国際展示会場・神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)2014 年 6 月 19 日~6 月 21 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 龍二 (Ikeda Ryuji)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・准教授

研究者番号：50398278

(2) 研究分担者

武田 泰生 (Takeda Yasuo)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・教授

研究者番号：60245462