

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04163

研究課題名(和文)Connectivity Map解析に基づいた新しい大腸癌予防薬の開発

研究課題名(英文)Development of chemopreventive agents using Connectivity Map analysis

研究代表者

高山 哲治(TAKAYAMA, Tetsuji)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：10284994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト大腸腺腫及びSSA/P組織を用いてマイクロアレイ解析を行い、正常組織と比べることにより腺腫やSSA/Pに特異的な遺伝子発現signatureを作成した。次いで、Connectivity mapを解析を行い、既存薬剤の中からこれらに対する予防候補薬を抽出した。また、ヒト腺腫及SSA/Pよりオルガノイドを樹立し、これらに有効な予防候補薬をそれぞれ5つと3つに絞り込んだ。さらに、大腸発癌モデルラットに予防候補薬Aを投与し、20週後に屠殺して腺腫数を評価したところ、投与群では有意に腺腫数が抑制された。Minマウスを用いた実験でも同様の結果が得られた。今後は、臨床応用に向けた臨床試験を考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、既存の薬剤を網羅的に解析して、大腸腺腫やSSLに対する予防薬を探索した研究は無く、本研究が初めてである。本研究では、大腸腺腫に対する予防候補薬とSSLに対する予防候補薬を抽出し、in vitroの系で有効な薬剤を絞り込み、in vivoの系で有効性の高い薬剤を絞り込むことができた。既存の薬剤を対象にしているため、速やかに臨床試験に進むことができるという利点がある。また、本研究はドラッグ・リポジショニングという観点からも重要性が高い。

研究成果の概要(英文)：We performed microarray analysis of human adenoma and serrated sessile lesions (SSL) tissues as well as of normal colorectal mucosa, and determined gene expression signature in each lesion. Applying the gene signature data for connectivity map analysis which includes the data of all existing drugs, we chose candidate preventive drugs, which are expected to normalize gene expression profile of those lesions. We then established organoid from human adenoma and SSL tissues respectively, and screened candidate drugs to evaluate inhibitory effects of candidate preventive drugs. The most effective 5 drugs for adenoma and 3 drugs for SSL have been chosen. When some of the drug were administered to rat chemical carcinogenesis model, APC KO mice or SSL-xenograft model, numbers of polyps were significantly inhibited. Currently, we are planning a clinical trial for these drugs to evaluate inhibitory effect on adenoma or SSL in human.

研究分野：消化器病学

キーワード：大腸癌予防薬 大腸腺腫 オルガノイド SSA/P

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌の死亡率は欧米を中心に依然高く、我が国においても、近年急速に増加したことから、有効な予防法の確立が求められている。大腸癌を予防するために、前癌病変である腺腫を抑制する薬剤の開発が行われ、これまでランダム化比較試験によりカルシウム、アスピリン、非ステロイド系消炎鎮痛剤(NSAIDs)などの有効性が報告されている。しかし、副作用などの問題がありこれまでに十分なコンセンサスの得られた大腸癌予防薬の開発には至っていない。一方、最近 Golub らは多数の低分子化合物(既存の薬剤 1300 種類)を培養癌細胞に添加し、それぞれのマイクロアレイ解析により得られた遺伝子発現プロファイルデータベース化して Connectivity Map を作成した。大腸腺腫や SSA/P などの前癌病変の遺伝子発現プロファイルを調べることで、これらを負に動かす(打ち消す)作用の薬剤を網羅的に検索することが可能となった。

### 2. 研究の目的

本研究では、まずヒト大腸腺腫や SSA/P の生検組織より RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行い、得られた遺伝子発現プロファイルからそれぞれの疾患特異的 signature を作成した。次いで、約 1300 種類の既存の薬剤の培養細胞に対する遺伝子発現プロファイルより作成された Connectivity Map を用いて、腺腫及び SSA/P に有効と思われる予防候補薬剤を抽出した。また、ヒト大腸腺腫、SSA/P、正常大腸粘膜のオルガノイドを培養し、これらの予防候補薬剤の抗腫瘍効果を *in vitro* で検証(スクリーニング)して腺腫や SSA/P に有効な薬剤を選択した。さらに、大腸癌の化学発癌動物モデル及び自然発癌モデルを用いてその有効性を確認するとともに、これらの予防候補薬の抗腫瘍活性の機序を明らかにした。

### 3. 研究の方法

#### (1)大腸腺腫、SSA/P、正常大腸粘膜のマイクロアレイ解析

大腸内視鏡検査下に前癌病変である腺腫、SSA/P、及び同一症例の正常大腸粘膜より生検を行い、速やかに RNAlater に浸して凍結保存した。常法により RNA を抽出し、T7 oligodT primer, T7 RNA polymerase などを用いて増幅するとともに、Cy3 による蛍光標識を行い、ヒト全ゲノム cDNA chip (Whole Human Genome 4x44K v2, Agilent)とハイブリダイゼーションした。解析ソフトウェアによりスキャニング・データを解析した。

#### (2)大腸腺腫、SSA/P における遺伝子発現プロファイルの Signature の作成

上記実験で得られた腺腫または SSA/P における各種遺伝子発現と対応する正常大腸粘膜における遺伝子発現をサブトラクションし、各病変に特異的な遺伝子発現 Signature を推定した。まず、得られた腺腫 5 病変、SSA/P 5 病変の各遺伝子シグナル値の平均値を計算した。次いで、外れ値検定の後正規化を行い、各遺伝子発現の差異を確率に変換し、有意差のある遺伝子群を選定した。これらの遺伝子群を腺腫または SSA/P の遺伝子発現 Signature とした。

#### (3)Connectivity map を用いた予防候補薬の抽出

腺腫または SSA/P の遺伝子発現 Signature より Connectivity Map 解析を行い、それぞれにおいて strong negative に作用する薬剤を 100 種類選択した。今後のヒトを対象とした臨床試験に進むことを想定し、本邦で承認されている薬剤に絞り込み、さらに、大腸癌予防薬として用いることができる経口薬剤を 20~50 種類に絞り込みを行った。

#### (4)腺腫、SSA/P、正常大腸粘膜オルガノイド培養を用いた抗腫瘍活性の検索

大腸内視鏡検査下に前癌病変である腺腫、SSA/P、及び正常大腸粘膜より生検検体を採取し、佐藤らの報告に従い各種オルガノイドを培養した(Gastroenterology141:1762-1772,2011)。樹立した大腸腺腫、SSA/P 及び正常大腸粘膜由来のオルガノイドを用いて、Connectivity Map により抽出した予防候補薬のスクリーニングを行った。すなわち、各候補薬剤を種々の濃度でオルガノイド培地に添加し、48~72 時間後に感受性試験(WST-8 assay)を行い Cell viability を測定し、IC50 を算出した。腺腫または SSA/P に高い細胞障害性を示し、正常大腸上皮に細胞毒性を示さない(または低い)候補薬を選択した。

#### (5)大腸化学発癌モデルを用いた予防効果の検討

F344 ラット(5 週齢, 雄)の背部に大腸発癌物質である Azoxymethane(以下 AOM)を 0 週目と 1 週目の 2 回、15mg/kg 皮下投与した。予防候補薬剤を飲水中(溶けない場合には餌と混和)に溶かして 15~20 週間投与して屠殺した。摘出した大腸の粘膜面を実体顕微鏡を用いて観察し、その数を算出した。ポリープはナイフで半切り、片方をホルマリン固定して病理学的に腺腫または癌の診断を行った。残り半分は凍結保存し、機序の解析に用いた。

#### (6)Min マウスを用いた大腸癌予防効果の検討

ヒト家族性大腸腺腫症のモデルマウスである APC 変異マウス(Min マウス, C57BL/6J-Apc<sup>Min/+</sup>, 6 週齢, 雄)及びコントロールとして用いる APC 野生型マウス(C57BL/6J-Apc<sup>+/+</sup>, 6 週齢, 雄)より

尾組織を採取して PCR 法により遺伝子型を確認した。予防候補薬を飲水中(溶けない場合には餌と混和)に溶かして 6 週間投与し、6 週後に屠殺した。小腸及び大腸を摘出して実体顕微鏡下に観察してポリープ数を数えた。

#### (7) 予防候補薬の抗腫瘍活性の機序の解析

腺腫及び SSA/P の遺伝子発現プロファイルデータを KNIME ワークフロー(KNIME2.5.2)により主成分分析(principal component analysis)を行い、どの遺伝子群が主に効果の発現に関わっているのかを検討した。また、腺腫や SSA/P の遺伝子発現 signature のパスウェイ解析を行い、候補薬剤が主にどのパスウェイを抑制(または活性化)することにより効果を発現するのかを調べた。

腺腫、SSA/P 及び正常大腸粘膜のオルガノイド培養細胞に各種予防候補薬を添加し、細胞増殖に関わる蛋白質(シグナル伝達系)の発現を western blot により解析した。

#### (8) オルガノイドの xenograft を用いた抗腫瘍活性の検索

GFP 遺伝子を導入した SSA/P のオルガノイド培養細胞をそれぞれ  $1 \times 10^5$  個 5-6 週齢の SCID マウス (Male Nude Mouse:5-6 weeks old, CLEA Japan) の直腸に同所移植を行った。3-6 週間後に腫瘍が生着したことを確認後 in vitro で強い抑制効果が認められた予防候補薬を経口投与し、毎週 IVIS を用いて直腸の腫瘍を観察し、明らかに腫瘍縮小効果を認めたとところで屠殺し、腫瘍を摘出した。さらに、それらの腫瘍を病理組織学的に評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 大腸腺腫及び SSA/P のマイクロアレイ解析と遺伝子発現 Signature の作成

大腸内視鏡検査下に前癌病変である腺腫 3 例、SSA/P3 例、及び同一症例の正常大腸粘膜(それぞれ 3 個)より生検を行い、マイクロアレイ解析を行った。正常大腸組織に比べて、腺腫では疾患特異的な遺伝子群 700 以上を同定した。また、パスウェイ解析を加えた腺腫特異的な遺伝子群 300 以上を認めた。一方、SSA/P においても疾患特異的な遺伝子群 200 以上を認め、パスウェイ解析を加えた SSA/P 特異的な遺伝子群 100 以上を認めた。

#### (2) Connectivity map を用いた予防候補薬の抽出

上記の腺腫特異的な 2 つの Signature を用いて Connectivity Map 解析を行ったところ、それぞれに 200 個近い予防候補薬が抽出され、両者より 100 個以上の予防候補薬を抽出した。このうち、実際に予防薬として使用可能な経口薬剤を 30 種類選択した。同様に、SSA/P に対する予防候補薬剤を 80 種類以上抽出し、このうち予防薬として使用可能な経口薬剤を 20 種類以上選択した。

#### (3) 腺腫、SSA/P、正常大腸粘膜オルガノイド培養を用いた抗腫瘍活性の検討

樹立した大腸腺腫及び正常大腸粘膜由来のオルガノイドに、上記薬剤 30 種類をそれぞれ添加し、腺腫細胞のみを有意に抑制する薬剤 4 つ(A,B,C,D)を抽出した。これらの薬剤は、いずれも異なる腺腫症例 3 例に対して有意な抑制効果を認めた。一方、樹立した SSA/P のオルガノイドに、上記の予防候補薬 20 種類を添加したところ、2 種類の薬剤(E,F)が SSA/P 細胞を有意に抑制した。これらの薬剤は、いずれも異なる SSA/P 3 例に対して有意な抑制効果を認めた。

#### (4) 大腸化学発癌モデルを用いた予防効果の検討

Azoxymethane-DSS 誘導ラット発癌モデルを用いて、A, B, C, D の薬剤(または溶媒のみ)をそれぞれ 20 週間経口投与し、屠殺して腺腫の数、頻度、大きさ等々を評価した。その結果、薬剤 A の投与群ではもっとも強く腺腫の発生を抑制することが明らかとなった。次いで、azoxymethane 誘導ラット発癌モデルに薬剤 A を 20 週間投与したところ、投与群ではいずれも腺腫数を有意に抑制した。

#### (5) Min マウスを用いた大腸癌予防効果の検討

APC 欠損マウスに薬剤 A または溶媒のみを経口投与し、4 ヶ月後にマウスを屠殺して大腸及び小腸のポリープ(腺腫)数、頻度、大きさなどを評価したところ、治療群ではいずれも対照群に比べて明らかに腺腫数は有意に減少した。

#### (6) 予防候補薬の抗腫瘍活性の機序の解析

薬剤を投与した azoxymethane 投与ラットと対照群ラットより形成された腺腫を摘出して遺伝子プロファイルを作成し、細胞増殖シグナルのパスウェイ解析を行った。その結果、Wnt シグナルや Map kinase シグナルに関与する複数の遺伝子の発現の抑制が確認された。つまり、薬剤投与群では、これらの遺伝子の発現を抑制することにより、腺腫の形成が抑制することが明らかとなった。

#### (7)SSA/P に対する予防薬の開発研究

SSA/P については、適切な動物モデルがないため、SSA/P オルガノイドを SCID マウスの大腸に同所移植を行い、SSA/P 治療評価モデルになるかどうかを検討した。すなわち、SSA/P オルガノイド細胞に GFP 遺伝子を導入し、免疫不全マウスに移植して薬剤の効果の評価するモデルを作成した。このモデルマウスに薬剤 E, F を 8 週間投与して SSA/P 病変の蛍光強度を評価したところ、薬剤 E では 8 週後の蛍光強度は有意に低下した。つまり、薬剤 E の SSA/P に対する抑制効果が示された。現在、SSA/P オルガノイドに薬剤 A を添加してマイクロアレイ解析を行い、薬剤 A がどのようなパスウェイ、シグナルを抑制しているのか、その機序を検討中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fujimoto D, Muguruma N, Okamoto K, Fujino Y, Kagemoto K, Okada Y, Takaoka Y, Mitsui Y, Kitamura S, Kimura T, Miyamoto H, Bando Y, Sonoda T, Takayama T	4. 巻 6
2. 論文標題 Linked Color Imaging Enhances Endoscopic Detection of Sessile Serrated Adenoma/Polyps.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Endoscopy International Open	6. 最初と最後の頁 E322-E334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0043-124469	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shigeyasu K, Okugawa Y, Toden S, Miyoshi J, Toiyama Y, Nagasaka T, Takahashi N, Kusunoki M, Takayama T, Yamada Y, Fujiwara T, Chen L, Goei A	4. 巻 3
2. 論文標題 AZIN1 RNA Editing Confers Cancer Stemness and Enhances Oncogenic Potential in Colorectal Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e99976
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.99976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Muguruma N, Okamoto K, Nakagawa T, Sannomiya K, Fujimoto S, Mitsui Y, Kimura T, Miyamoto H, Higashijima J, Shimada M, Horino Y, Matsumoto S, Hanaoka K, Nagano T, Shibutani M, Takayama T.	4. 巻 7
2. 論文標題 Molecular imaging of aberrant crypt foci in the human colon targeting glutathione S-transferase P1-1	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 6536
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-06857-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Adachi S, Hamoya T, Fujii G, Narita T, Komiya M, Miyamoto S, Kurokawa Y, Takahashi M, Takayama T, Ishikawa H, Tashiro K, Mutoh M	4. 巻 111
2. 論文標題 Theracurmin Inhibits Intestinal Polyp Development in Apc-mutant Mice by Inhibiting Inflammation-Related Factors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1367-1374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Muguruma N, Tanaka K, Teramae S, Takayama T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Colon capsule endoscopy: toward the future.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Clinical Journal of Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-016-0710-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 岡本耕一, 川口智之, 影本開三, 藤本大策, 六車直樹, 高山哲治	4. 巻 32
2. 論文標題 大腸癌の疫学と基礎 大腸鋸歯状病変のメカニズム	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床消化器病	6. 最初と最後の頁 818-824
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中村文香, 岡本耕一, 影本開三, 藤本大策, 田中久美子, 藤野泰輝, 北村晋志, 宮本浩, 佐藤康史, 六車直樹, 高山哲治
2. 発表標題 Serrated polyposis syndromeの臨床病理学的特徴ならびに発癌機序の検討
3. 学会等名 第16回日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高山哲治, 岡本耕一, 六車直樹
2. 発表標題 大腸がん予防研究のサロゲートマーカー Aberrant crypt fociの分子イメージング
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田浩典、藤本将太、川口智之、板東正浩、三好人正、岡本耕一、宮本弘志、佐藤康史、高山哲治
2. 発表標題 Connectivity Mapと大腸腺腫オルガノイドを用いた網羅的な大腸癌予防薬の検索
3. 学会等名 第5回 G-PLUS
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武藤 倫弘 (MUTOH Michihiro) (30392335)	国立研究開発法人国立がん研究センター・社会と健康研究センター・室長  (82606)	
研究分担者	堀本 勝久 (HORIMOTO Katsuhisa) (40238803)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・副研究センター長  (82626)	
研究分担者	岡本 耕一 (OKAMOTO Koichi) (60531374)	徳島大学・病院・講師  (16101)	
研究分担者	六車 直樹 (MUGURUMA Naoki) (90325283)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授  (16101)	