

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650590

研究課題名（和文）脊椎動物胚発生を用いた新たな癌分子標的治療への応用

研究課題名（英文）Screening of novel anticancer target molecules using vertebrate embryos

研究代表者

田中 正光 (TANAKA MASAMITSU)

秋田大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20291396

研究成果の概要（和文）：

癌の浸潤・転移に対する治療標的分子や化合物を選別するため、胚発生過程で一過性に出現する癌と類似した移動様式や未分化性を有する細胞集団を利用したスクリーニング法を作製した。アフリカツメガエル神経堤細胞の集団移動を指標に、その阻害作用のある化合物の中から癌細胞の集団移動にも抑制効果のあるものを選別した。また成体消化管粘膜の幹細胞を遺伝学的に蛍光ラベルして、その変異をモニター可能なトランスジェニックツメガエルを作製した。

研究成果の概要（英文）：

In order to identify novel anticancer chemicals, we developed new strategies to screen chemicals which modifies collective invasion of cranial neural crest cells of *Xenopus* embryos. From this screening, several chemicals were selected which also affects collective invasion of human cancer cells *in vitro*. We also established transgenic *Xenopus* which are available for monitoring the adult gut epithelial stem cells by genetically labeling with fluorescence.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

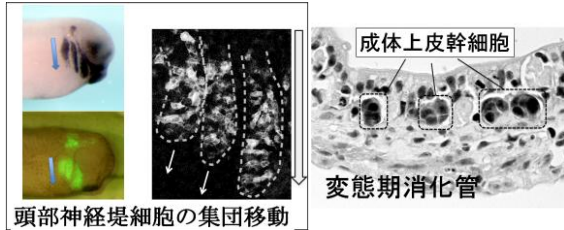
キーワード：がん細胞の特性

1. 研究開始当初の背景

これまでマウスへの異種間移植を用いて、癌の浸潤に伴うチロシンリン酸化蛋白質の同定などを行ってきた。その過程で培養状態では個々の細胞移動に異常が見出せないが、生体内では移動が大きく変化する例があり、個体レベルの機能に直結したスクリーニングの重要性を感じた。哺乳類は癌の生体内イメージングが困難で、判定に長時間を要するという問題点を克服するため、ツメガエル初期胚を用いた実験経験から癌と類似した特性をもつ発現現象を積極的に応用したい

と考えた。本課題で癌と共通性の高い特性として注目したのは、細胞の集団移動と可塑性である。これまで転移に対しては、癌細胞が個別にほぐれて侵入する機構の解明に主体が置かれていた。しかし実際には血管内でも構造を持った集団として観察される癌も多く、“癌はいかに集団として移動・転移するのか”は重要である。一方、細胞集団移動は胚発生においてよく観察されている。例えばツメガエル頭部神経堤細胞は、ある発生段階を機に間質内を目的地まで集団移動する。メラノーマなどは、ニワトリ胚の神経堤に移

植すると神経堤細胞と同様の移動様式を示し、ある種の腫瘍と神経堤細胞は移動機序に共通性がある。これらは発生過程で一過性に出現する細胞であり、その特異的な阻害剤は成体正常組織への副作用が少ない事も期待される。



また、癌幹細胞研究は最近のトピックスであるが、固形癌に関して正常組織からいかに癌幹細胞が出現するのかは、情報が少ない。癌幹細胞の出現に関する因子を個体レベルで解析する方法として、ツメガエルの変態に伴い幼生組織から脱分化により出現する成体組織幹細胞に注目した。

癌の特性に関わる分子を個体レベルで探索するため、細胞の集団移動や可塑性に焦点を絞り、癌との共通性の高い発生的手法・材料を応用する事を考えた。発生系によるスクリーニングの利便性を利用し、続けて癌細胞を用いた検証を行う。異分野の材料・アッセイ系を用いることで、最初から癌細胞だけで選別した時には得られない治療標的分子や、新規の分子メカニズムが発見される可能性がある。

2. 研究の目的

本申請は、癌の浸潤・転移に対する治療標的分子や化合物を選別するため、胚発生過程で一過性に出現する癌と類似した移動様式や未分化性を有する細胞集団をアッセイ法に用いるものである。モニターが容易で多検体のスクリーニングに適した、ツメガエル胚による生物アッセイ法を1次スクリーニングとして、癌の集団移動や可塑性を制御する化合物・分子の選別を行う。また、そのためのツールとして、変態期消化管に出現する幹細胞を可視化した胚を作製する。癌は個体レベルでは詳細なイメージングが困難で、転移の効果判定などにも時間を要するという問題を克服し、また化合物の作用機序も分析しやすい利点がある。

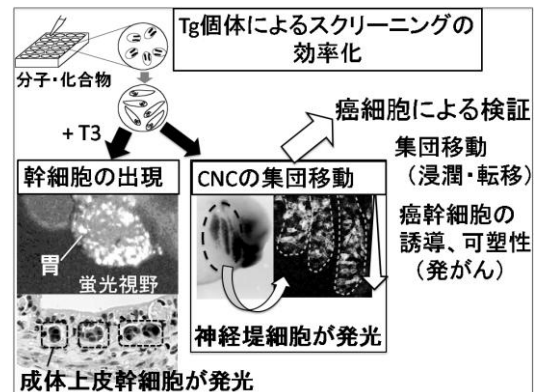
3. 研究の方法

(1) 癌細胞の集団移動を制御する化合物の同定を目標に、アフリカツメガエル初期胚をツ

ールに用いたスクリーニングを行う。頭部神経堤細胞(CNC)の移動への影響: CNCの形成された神経胚後期(stage 17)に vitelline envelope を除去した正常胚の飼育水中に合成化合物を添加する。神経堤細胞の移動が完了する尾芽胚期で固定、保存する。CNCのマーカである FoxD3, Dlx2 など全胚 in situ ハイブリダイゼーションを行い、CNC 移動パターンの異常(促進、阻害、変形)を判定する。神経堤細胞自体の形成が障害されていた胚は容易に区別でき、分化と移動に対する作用を鑑別できる。胚の化合物処理と観察は48穴プレート内で行う。

(II) 変態期消化管の幹細胞の可視化

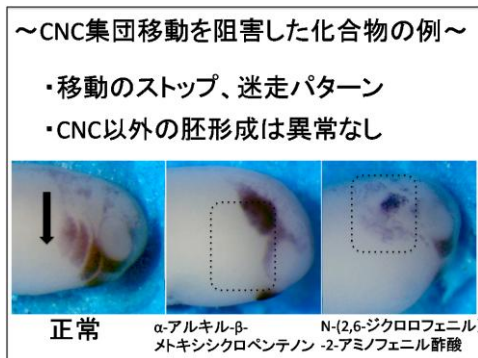
アフリカツメガエル胚は自然変態以前でも、T3(甲状腺ホルモン)、インスリン、コルチゾールを飼育水に添加することで人工的に変態が誘導できる。最初に、ツメガエル消化管の変態に際して、幼生上皮の脱分化により出現する成体上皮の幹細胞を、蛍光で可視化可能なトランスジェニック個体を作製する。
*化合物ライブラリーは、東北大学大学院薬学研究科との共同研究で供与されたものを使用した。



4. 研究成果

(I) 集団移動を制御する化合物の同定を目標に、アフリカツメガエル初期胚をツールに用いたスクリーニングを行った。所属機関の臨床腫瘍学講座との共同研究の基に供与された低分子化合物ライブラリーを用い、胚の飼育水中に添加した。細胞集団移動の指標として神経堤細胞(CNC)の移動パターンに影響するものを、CNCのマーカであるFoxD3を用いて効率化した全胚in situハイブリダイゼーション法を行うことにより選別した。その結果、他の器官の発生異常を伴わずにCNCの移動を阻害するものとして、N-(2,6-ジクロロフェニル)-2-アミノフェニル酢酸 や α -アルキル

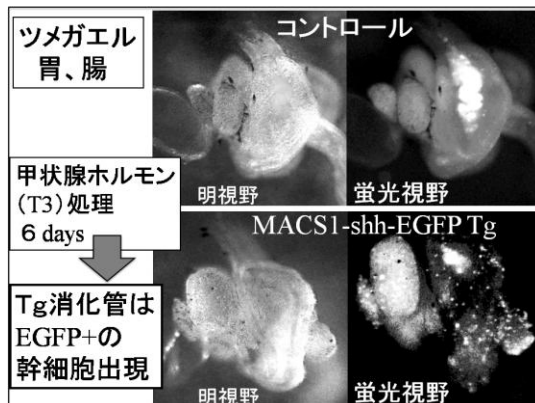
-β-メトキシシクロペンテノン など10種類の低分子化合物が得られた。



それらが癌細胞の集団移動にも影響するかを胃癌細胞株のゲル内浸潤アッセイを用いて検討したところ、癌細胞の接着性に影響を与えずにその浸潤性を低下させた。また、クルクミン誘導体はアフリカツメガエル初期胚形成において背側大動脈や体節間の血管新生も阻害する効果が確認された。

(II) 癌の可塑性を制御する化合物・分子を選別するツールとして、ツメガエル消化管の変態に際して幼生上皮の脱分化により出現する成体上皮の幹細胞を蛍光で可視化可能なトランスジェニック個体の作製を試みた。

同幹細胞のマーカー遺伝子として知られている Shh (Sonic hedgehog) のプロモーターに、EGFP 蛍光遺伝子を融合したレポーター遺伝子を導入したトランスジェニック個体 (Shh-EGFP Tg) を作製し、F1 (第二世代) が得られた。同トランスジェニック胚は、甲状腺ホルモンの投与による変態の誘導に際して、その消化管粘膜上皮に顆粒状の蛍光発光が観察され、それらは成体上皮幹細胞に一致する事が確認できた。



これらの成果により、個体全体には毒性が低く特定の細胞の浸潤性を標的にした生体スクリーニングが可能であることが提示でき、また消化管上皮幹細胞の制御により上皮の

再生や癌化に作用する化合物・分子のスクリーニングを今後容易に行いうるアッセイ系が確立できたと考える。

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 4 件)

1 Shimamura S., Sasaki K. and Tanaka M.
The Src substrate SKAP2 regulates actin assembly by interacting with WAVE2 and cortactin. 査読有 J Biol Chem 288, 1171-1183, 2013 10.1074/jbc.M112.386722

2 Tanaka M., Kuriyama S., Aiba N.

Nm23-H1 regulates contact inhibition of locomotion which is affected by ephrin-B1. 査読有 J Cell Science 125, 4343-4353, 2012 10.1242/jcs.104083

3 Yagi R., Tanaka M., et al. (7人中2 番目) 10.1038/onc.2010.522

ARAP3 inhibits peritoneal dissemination of scirrhous gastric carcinoma cells by regulating cell adhesion and invasion. 査読有, Oncogene 30 1413-1421, 2011

4 Tanaka M., et al. (4人中1 番目)

Suppression of gastric cancer dissemination by ephrin-B1 derived peptide. 査読有
Cancer Science 101, 87-93, 2010 10.1111/j.1349-7006.2009.01352

[学会発表] (計 13 件)

1 田中正光

Coordinated invasion of scirrhous gastric carcinoma with stromal cells

第71回日本癌学会学術総会 2012年9月19日
ロイトン札幌

2 島村真太郎、田中正光

A Src substrate SKAP2 regulates actin assembly by interacting with WAVE2 and Cortactin

第71回日本癌学会学術総会 2012年9月20日
ロイトン札幌

3 栗山 正、田中正光

Lipoma Preferred Partner (LPP) knockdown stabilizes N-cadherin in

non-small cell lung carcinoma cell, PC14PE6

第71回日本癌学会学術総会 2012年9月20日
ロイトン札幌

4 田中正光
Coordinated invasion of scirrhou gastric carcinoma with stromal cells
第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日福岡国際会議場
5 島村真太郎、田中正光
A Src substrate SKAP2 regulates actin assembly by interacting with WAVE2 and Cortactin
第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日福岡国際会議場
6 田中正光
細胞移動の接触阻止機構と腫瘍における破綻
第 100 回日本病理学会総会 2011 年 4 月 30 日パシフィコ横浜
7 田中正光
Ephrin-B1 affects contact inhibition of locomotion through negative regulation of Nm23-H1
第 70 回日本癌学会学術総会 2012 年 10 月 3 日名古屋国際会議場
8 島村真太郎、田中正光
A Src substrate Skap2 regulates actin cytoskeleton by interacting with WAVE2 and cortactin
第 70 回日本癌学会学術総会 2012 年 10 月 3 日名古屋国際会議場
9 栗山 正、田中正光
A novel Wnt signal modifier, Cancrin works as a neural crest specifier
第 44 回日本発生物学会年会 2011 年 5 月 18 日 沖縄コンベンションセンター
10 田中正光
Ephrin 合成ペプチドによる胃癌の播種抑制
第 99 回日本病理学会総会 2010 年 4 月 27 日 京王プラザホテル
11 田中正光
Ephrin-B1/Dishevelled を介した癌細胞の播種の制御機構
第 69 回日本癌学会学術総会 2010 年 9 月 22 日 大阪国際会議センター
12 島村真太郎、田中正光
A Src substrate Skap2 is associated with adhesion and migration of cancer cells
第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 10 日 神戸ポートアイランド
13 栗山 正、田中正光
A common molecular switch of EMT in neural crest and tumor: role of LPA and Lipoma

preferred partner on cell adhesion
第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 8 日 神戸ポートアイランド

〔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
http://www.med.akita-u.ac.jp/seika2/Akita_Univ_Dept_Molecular_Biochemistry/Welcome.html

6. 研究組織
(1) 研究代表者
田中正光 (TANAKA MASAMITSU)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号 20291396

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：