

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 8 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659196

研究課題名（和文）分子標的薬による次世代テーラーメイドがん治療の実現にむけた基盤技術

研究課題名（英文）Foundational approach for next-generation personalized cancer therapy with molecular target agents

研究代表者

大場 雄介 (OHBA YUSUKE)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30333503

研究成果の概要（和文）：

フェルスター共鳴エネルギー移動の原理を応用したバイオセンサーを用い、Ph 陽性急性リンパ球性白血病からイマチニブ耐性細胞を単離し、その細胞特性を解析した。耐性細胞群で活性化している 24 のシグナル伝達経路を同定し、メバロチン酸経路阻害が耐性細胞の再増殖抑制に有効であることを明らかにした。本成果によりスタチンの併用が Ph 陽性急性リンパ球性白血病やイマチニブ耐性慢性骨髄性白血病の治療における有効な候補となることが示された。

研究成果の概要（英文）：

With the use of a biosensor based on the principle of Förster resonance energy transfer, we isolated imatinib-resistant cells of Ph-positive acute lymphoid leukemia and explored their properties. Twenty-four signaling pathways were found activated in the resistant cells, among which inhibition of the mevalonate pathway was revealed effective in preventing repopulation of such resistant cells. These results thereby indicate that the combined application of statin may serve to cure Ph-positive acute lymphoid leukemia as well as imatinib-resistant chronic myeloid leukemia.

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	870000	3,770,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：分子標的治療薬、フェルスター共鳴エネルギー移動

1. 研究開始当初の背景

分子標的治療薬は主に悪性腫瘍で特徴的に機能亢進している分子に特異的に作用する薬剤であり、複数の悪性腫瘍治療で著明な成果をあげている。一方、その高い特異性が故に 1 アミノ酸レベルの点突然変異でも耐性が生じるといった問題点も存在する。耐性の原因変異の多くは体細胞性変異で、かつ治療前には腫瘍全体のごく一部の細胞のみが有する場合も少なくない。こうしたケースの典型的経過は、薬剤で腫瘍がコントロール可能という説明のもと治療を開始し、一旦は薬の効果で腫瘍が縮小した後に耐性細胞の再増殖により増悪するというもので、患者の多大な

精神的負担に加えて医療経済的効率の低下の問題もある。これらの課題克服には、極少数の薬剤耐性細胞を治療前に検出し、治療効果を予測する技術開発が必要である。

我々は、これまでの研究で使用していた蛍光バイオイメージングを臨床応用し、慢性骨髄性白血病（Chronic myeloid leukemia, CML）で一定以上の効果を挙げているイマチニブ、ニロチニブ、ダサチニブ等の薬剤の効果を、患者自身の生きた細胞で判定する技術を開発した（*Clin. Cancer Res.* 16: 3064, 2010）。この技術開発により、患者末梢血や骨髄中の腫瘍細胞が示す薬剤感受性プロファイル作成、潜在的耐性細胞有無の明示、薬剤治療後の経

過予測等が可能であり、治療を受ける患者と治療に当たる臨床医にとって多数の有用な情報提供が可能となった。

2. 研究の目的

本研究では、我々の開発した技術の特徴である、生細胞解析のメリットを生かした薬剤耐性細胞の解析を行う。薬剤耐性と診断された細胞が、判定時点でまだ生きていることが我々のアドバンテージであり、薬剤処理後も高い FRET 効率を示す薬剤耐性細胞を、セルソーターを用いて分取する。分離されたそれぞれの細胞群に対し、第二世代薬剤であるニコチン・ダサチニブ等やインターフェロンの併用等様々な治療オプションについてその効果を判定する手法を確立し、薬剤耐性患者それぞれに対する分子標的治療薬テーラーメイド医療を実現する。セルソーターで耐性細胞を分離・培養し、それらの特性を解明する。また、CML について確立した本技術を、分子標的治療薬が有用な他の血液腫瘍や固形癌に適応を広げる。特にチロシナーゼに対する分子標的治療薬の有効性が証明されている腫瘍について、本手法の有用性を確認し、応用範囲を広げたい。

さらに、分離採取した細胞を継続培養する。耐性細胞群の遺伝子発現パターンを薬剤感受性細胞のそれと比較することで、薬剤耐性関連分子群を同定する。また、メチルロースセルロースを用いたコロニー解析等を行い、薬剤耐性細胞が幹細胞の性格を有するか否かを検討する。上記で得られた薬剤耐性細胞の有する分子生物学的および細胞生物学的性質を元に、効果的な治療法につながる標的を決定する。

3. 研究の方法

—耐性細胞の単離・解析—

発現プラスミド、pCAGGS-Pickles2.31 および pCMV-BCR-ABL の Ph 陽性ヒト急性リンパ性白血病 (acute lymphoid leukemia, ALL) 細胞株 MY 細胞および 293F 細胞 (Invitrogen 社) への導入は、それぞれ nucleofection (Amaxa Biosystems; プログラム T-020 および Solution V を使用) と 293fectin™ を用いて行った。BCR-ABL を発現する 293F 細胞あるいはコントロールベクターを導入した細胞に Pickles を導入し、FACS Aria II (BD Bioscience) を用いて、BCR-ABL 活性の高い細胞が分布する領域 (FRET^{high}) と低い細胞が分布する領域 (FRET^{low}) を決定した。一方、MY 細胞に Pickles を導入し、0.1 μM で 18 時間処理した後、上記ゲートを利用して、FRET^{high} (IM 耐性) と FRET^{low} (IM 感受性) の画分に分けて細胞を分取、遠心操作で細胞を回収して培養した。

培養後の細胞について、幹細胞の性格を有

するか否かを、メチルセルロースコロニー形成試験で検討した。また、両者の mRNA 発現パターンを cDNA マイクロアレイで比較し、アノテーションツール the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, USA; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いて、それら遺伝子が関与するシグナル伝達経路を探索した。

—バイオセンサーの作製および改変—

我々の開発した CrkL リン酸化をモニターするバイオセンサーは、従来のウエスタンロットティングによる評価と比較し、100 倍以上高感度かつ 100 倍以上の薬剤濃度範囲において、BCR-ABL 活性とそれに対するイマチニブの効果を測定可能である。しかし、研究開発の過程で、実際の患者細胞においてはバイオセンサーに切断が生じ、期待ほど検出感度が得られない症例も出現した。本研究では、上述切断が阻害される新規バイオセンサーを開発し、さらなる検出の高感度化をはかる。

具体的にはウエスタンロットティング法を用いてセンサー分子の切断部位を同定し、当該部位に遺伝子工学的手法を用いて変異を導入することで、切断されないバイオセンサーを開発する。

—他の腫瘍への応用—

チロシナーゼに対する分子標的治療薬の有効性が証明されている腫瘍、特に肺癌について本手法の有効性を検討し、薬剤耐性細胞の検出、単離とその機能解析を行う。具体的には、EGFR 阻害薬の効果が明らかになっている肺癌細胞株群を用いて、EGFR 阻害薬の効果判定における本バイオセンサーの適否を判断する。

4. 研究成果

—耐性細胞の単離・解析—

現在多くのがんにおいて、薬剤耐性獲得とがん幹細胞との関連性が報告されているので、分取した FRET^{high} 細胞を用いてメチルセルロースコロニー形成試験を行った。その結果、FRET^{high} 細胞により形成されたコロニー数は、FRET^{low} 細胞のそれよりも少なく (図 1)、FRET^{high} 細胞はがん幹細胞性質を持つ細胞が濃縮した集団ではないことが示唆された。

次に、FRET^{high} 細胞の薬剤耐性メカニズムを解明するため、cDNA マイクロアレイを用いて FRET^{high} と FRET^{low} 細胞での mRNA 発現パターンを比較した。その結果、FRET^{high} 細胞で mRNA の上昇が認められた遺伝子は 4528 個、減少した遺伝子は 405 個であった。さらに、アノテーションツール the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID, National Institute of Allergy

and Infectious Diseases, National Institute of Health, USA; <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) を用いて、それら遺伝子が関与するシグナル伝達経路を探索したところ、FRET^{high} 細胞で亢進するシグナル経路が 24 個、不活性化する 5 経路が見出された。これらの中から、メバロン酸経路に注目し、律速酵素 HMG-CoA 還元酵素の阻害薬であるフルバスタチン (FS, Merck Calbiochem 社) を用いて細胞増殖アッセイを行った。MY 細胞を 15 日間 IM 処理し、その後各濃度の FS を添加し 21 日間培養、定期的に細胞数を計測したところ、IM により大多数の細胞は死滅し、ごく一部の IM 耐性細胞は約 1 ヶ月後には対数増殖期に入る (図 2)。しかし、FS 処理はこの耐性細胞の増殖がほぼ完全に抑制され、IM 耐性細胞に FS の併用が有効であることが明らかとなった。

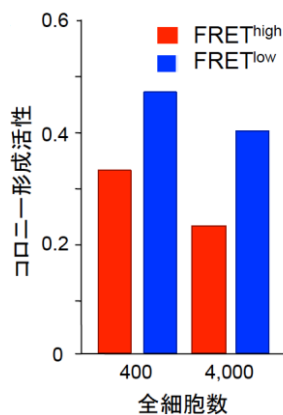


図 1 がん幹細胞性質の解析

メチルセルロース培地中で FRET^{high} 及び FRET^{low} 細胞を 35 mm ディッシュ 2 皿当り 400 個と 4000 個播種し、14 日後に形成したコロニーを計数、コロニー形成活性の相対値を示した。

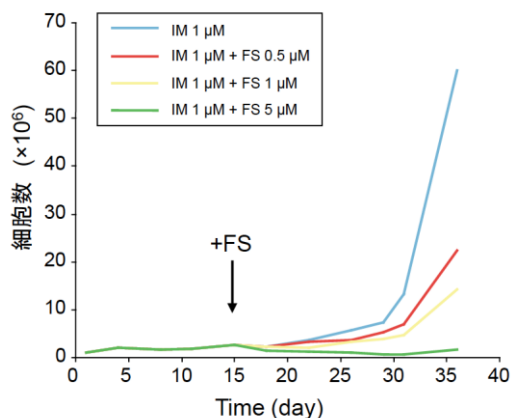


図 2 フルバスタチンによる耐性細胞再増殖の抑制 MY 細胞をイマチニブ (IM, 1 μM) で前処理後、15 日目からさらにフルバスタチン (FS; 0.5, 1, 5 μM) をさらに添加し、経時的に細胞数を計測しグラフ化した。

今回のコロニー形成能試験の結果に加えて、マイクロアレイ解析でも FRET^{high} 細胞では造血幹細胞マーカーの CD34 や ABC 輸送体 (ABC1、ABCG2)、Shh (Sonic hedgehog) シグナル、Wnt/β-カテニンシグナル経路の関連分子等の発現亢進は認められなかった。我々の結果は生体内で白血病幹細胞が薬剤耐性能を有することを否定するものではないが、少なくとも耐性能獲得に幹細胞の性質は必須ではないことは興味深い。HMG-CoA 還元酵素阻害薬が高脂血症の治療に広く用いられているが、ある種の BCR-ABL 陽性白血病細胞において、IM の感受性を増強させる³。本研究において見出した IM と FS の併用による著明な増殖抑制効果は、実臨床で使用される際の薬剤濃度で達成されるものであり、この併用療法は IM 耐性 CML および Ph 陽性 ALL において有用な治療選択肢となり得る可能性がある。

一方、CML で成功した分子標的治療薬の薬効評価を、肺癌における EGFR 阻害薬の効果予測法として応用も検討中である。我々の開発した Pickles は EGFR 活性モニターが可能であることが明らかになり、また阻害薬の耐性メカニズムとして知られる c-Met のシグナル伝達経路には影響されないことが明らかになった。またバイオセンサーにも種々の改変を加え、肺癌細胞で EGFR 活性モニターと耐性細胞の検出に足る改変型バイオセンサーも開発した。現在は本系を用いて耐性細胞単離作業を行なっているところである。

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 12 件)

1. T. Hattori, J. Maruyama, Y. Fujioka, Y. Nakayama, Y. Ohba, T. Niki, Y. Arikawa, T. Miyazaki, M. Hirashima, and H. Kida. Inhibition of influenza A virus infection by Galectin-9. **Jpn. J. Vet. Res.**, in press (査読有)
2. H. Nagai, S. Yasuda, Y. Ohba, M. Fukuda, and T. Nakamura. All members of the EPI64 subfamily of TBC/RabGAPs also have GAP activities toward Ras. **J. Biochem.** 153: 283-288, 2013 (査読有)
3. S. Chiba, M. Baghdadi, H. Akiba, H. Yoshiyama, I. Kinoshita, H. Dosaka-Akita, Y. Fujioka, Y. Ohba, J.V. Gorman, J.D. Colgan, M. Hirashima, T. Uede, A. Takaoka, H. Yagita and M. Jinushi. Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. **Nat. Immunol.** 13: 832-842, 2012 (査読有)

4. R. Arai, M. Tsuda, T. Watanabe, T. Ose, C. Obuse, K. Maenaka, A. Minami and Y. Ohba. Simultaneous inhibition of Src and Aurora kinases by SU6656 induces therapeutic synergy in human synovial sarcoma growth, invasion, and angiogenesis in vivo. **Eur. J. Cancer** 48: 2417-2430, 2012 (査読有)
 5. Y. Usami, T. Hatano, S. Imai, S.I. Kubo, S. Sato, S. Saiki, Y. Fujioka, Y. Ohba, F. Sato, M. Funayama, H. Eguchi, K. Shiba, H. Ariga, J. Shen and N. Hattori. DJ-1 associates with synaptic membranes. **Neurobiol. Dis.** 43: 651-662, 2011 (査読有)
 6. T. Yamada, M. Tsuda, T. Takahashi, Y. Totsuka, M. Shindoh and Y. Ohba. RANKL expression specifically observed in vivo promotes epithelial mesenchymal transition and tumor progression. **Am. J. Pathol.** 178: 2846-2857, 2011 (査読有)
 7. K. Tsushima, T. Osawa, H. Yanai, A. Nakajima, A. Takaoka, I. Manabe, Y. Ohba, Y. Imai, T. Taniguchi and R. Nagai. IRF3 regulates cardiac fibrosis but not hypertrophy in mice during angiotensin II-induced hypertension. **FASEB J.** 25: 1531-1543, 2011 (査読有)
 8. Y. Fujioka, M. Tsuda, T. Hattori, J. Sasaki, T. Sasaki, T. Miyazaki and Y. Ohba. The Ras-PI3K Signaling Pathway Is Involved in Clathrin-Independent Endocytosis and the Internalization of Influenza Viruses. **PLoS One** 6: e16324, 2011 (査読有)
 9. K. Atarashi, T. Tanoue, T. Shima, A. Imaoka, T. Kuwahara, Y. Momose, G. Cheng, S. Yamasaki, T. Saito, Y. Ohba, T. Taniguchi, K. Takeda, S. Hori, I.I. Ivanov, Y. Umesaki, K. Itoh and K. Honda. Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous *Clostridium* Species. **Science** 331: 337-341, 2011 (査読有)
 10. S. Hayakawa, S. Shiratori, H. Yamato, T. Kameyama, C. Kitatsuji, F. Kashigi, S. Goto, S. Kameoka, D. Fujikura, T. Yamada, T. Mizutani, M. Kazumata, M. Sato, J. Tanaka, M. Asaka, Y. Ohba, T. Miyazaki, M. Imamura and A. Takaoka. ZAPS is a potent stimulator of RIG-I-mediated signaling for antiviral response. **Nat. Immunol.** 12: 37-44, 2011 (査読有)
 11. 大場雄介, 津田真寿美. 蛍光タンパク質を用いた細胞内シグナル伝達の可視化. **日薬理誌** 138 巻 271-275 ページ, 2011 年 (査読有)
 12. 大場雄介. 蛍光タンパク質を用いた白血病分子標的治療薬の効果判定技術. **バイオインダストリー** 28 巻 33-39 ページ, 2011 年 (査読有)
- [学会発表] (計 15 件)
1. 藤岡容一郎 津田真寿美 服部ともえ 佐々木純子 佐々木雄彦 宮崎忠昭 大場雄介. Ras-PI3K シグナルによる外来因子取込み制御機構の解析 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 10-14 日 福岡国際会議場 (福岡)
 2. 我妻孝則 津田真寿美 山田珠希 藤岡容一郎 芳賀永 戸塚靖則 近藤正信 大場雄介. RANKL はインテグリン $\alpha 2$ の発現とエンドサイトーシスを介したインテグリンの細胞内輸送を亢進する第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 10-14 日 福岡国際会議場 (福岡)
 3. T.Wagatsuma, M.Tsuda, T.Yamada, Y.Fujioka, H.Haga, Y.Totsuka, M.Shindoh, and Y. Ohba. RANKL enhances integrin $\alpha 2$ expression and cell adhesion in oral cancer cells. The 31st Sapporo International Cancer Symposium, Advanced Radiation Therapy and Cancer Research. 2012 年 07 月 23-24 日 The Alumni Hall "Frate" Graduate School of Medicine, Hokkaido University (Sapporo)
 4. 大場雄介. FRET による慢性骨髄性白血病分子標的治療薬の効果判定法 徳島大学大学院 HBS 研究部総合研究支援センターバイオイメージング研究部門キックオフシンポジウム(招待講演) 2012 年 07 月 19-20 日 徳島大学病院日亜メディカルホール (徳島)
 5. 大場雄介. 蛍光タンパク質を用いた細胞内シグナル伝達の解析と応用日本薬学会第 132 回年会 (招待講演) 2012 年 3 月 30 日 北海道大学 (札幌)
 6. 金安頭子 近藤健 ダルマニン ステファニー 津田真寿美 大場雄介. 慢性骨髄性白血病薬剤耐性細胞の分離と解析第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 14 日 パシフィコ横浜 (神奈川)

7. 藤岡容一郎 津田真寿美 服部ともえ 佐々木純子 佐々木雄彦 宮崎忠昭 大場雄介. Involvement of RhoA-PIP5K-mediated calcium signaling in influenza virus entry and infection 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月16日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
8. 我妻孝則 津田真寿美 山田珠希 藤岡容一郎 甲斐原拓真 戸塚靖則 近藤正信 大場雄介. RANKL upregulates integrin $\alpha 2$ expression and cell adhesion in oral cancer cells 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月15~16日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
9. 新井隆太 津田真寿美 渡部琢哉 尾瀬農之 小布施力史 前仲勝実 三浪明男 大場雄介. SU6656 suppresses human synovial sarcoma progression through Src and Aurora kinase inhibition 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月14日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
10. 間石奈湖 大賀則孝 樋田泰治 大場雄介 浜田淳一 秋山廣輔 山本和幸 大澤崇宏 近藤美弥子 川本泰輔 近藤正信 井上農夫 樋田京子. 腫瘍血管内皮細胞とがん転移の相互作用解析第70回日本癌学会学術総会 2011年10月5日 名古屋国際会議場 (愛知)
11. 津田真寿美_新井隆太 渡部琢哉 尾瀬農之 小布施力史 前仲勝実 三浪明男 大場雄介. SrcおよびAurora キナーゼ2重阻害による滑膜肉腫の相乗的 in vivo 抗腫瘍効果第70回日本癌学会学術総会 2011年10月4日 名古屋国際会議場 (愛知)
12. 大場雄介 金安頭子 水谷龍明 タルマニン ステファニー 近藤健 津田真寿美. 慢性骨髄性白血病に対する分子標的治療薬の反応性・抵抗性判定試験第70回日本癌学会学術総会 2011年10月4日 名古屋国際会議場 (愛知)
13. 津田真寿美 新井隆太 大場雄介 SU6656はAurora kinaseを標的にすることによりG2/M進行を阻害する第63回日本細胞生物学会大会 2011年6月29日 北海道大学 (札幌)
14. 大場雄介 山田珠希 藤岡容一郎 甲斐原拓真 戸塚靖則 近藤正信 津田真寿美. RANKLは口腔癌細胞のインテグリン $\alpha 2$ の発現と細胞接着を亢進する第63回日本細胞生物学会大会 2011年6月29日 北海道大学 (札幌)

15. 藤岡容一郎 津田真寿美 服部ともえ 佐々木純子 佐々木雄彦 宮崎忠昭 大場雄介. Influenza viruses activate Ras-PI3K-mediated endocytosis via calcium signaling 第63回日本細胞生物学会大会 2011/6/28 北海道大学 (札幌)

[図書] (計3件)

1. Ohba Y, Fujioka Y, Nakada S and Tsuda M. Elsevier (London), Fluorescent Protein-Based Biosensors and Their Clinical Applications. **Fluorescence-Based Biosensors-concepts and applications. Progress in Molecular Biology and Translational Science** Morris MC (.ed) (2012) 429 pages (p313-348)
2. Ohba Y, Darmanin S, Mizutani T, Tsuda M and Kondo T. SCIENCE PUBLISHERS (London), Biosensors for BCR-ABL activity and their application to cancer. **Biosensors and Cancer** Hunter RJ and Preedy VR (ed.) (2012) 408 pages (p268-283)
3. Tsuda M and Ohba Y. InTech (Croatia), Functional Biomarkers of Oral Cancer. **Oral Cancer** Kalu U. E. Ogbureke (.ed) (2012) 388 pages (p277-294)

[産業財産権]

○出願状況 (計5件)

名称: FRET計測措置及びFRET計測方法
 発明者: 中田成幸・大場雄介・土井恭二・浅野有美
 権利者: 三井造船株式会社・北海道大学
 種類: 特許
 番号: 特願 PCT/JP2013/058325 号
 出願年月日: 24年3月22日
 国内外の別: 国外

名称: FRET計測措置及びFRET計測方法
 発明者: 中田成幸・大場雄介・土井恭二・浅野有美
 権利者: 三井造船株式会社・北海道大学
 種類: 特許
 番号: 特願 PCT/JP2013/058317
 出願年月日: 24年3月22日
 国内外の別: 国外

名称: FRET計測措置及びFRET計測方法
 発明者: 中田成幸・大場雄介・土井恭二・浅野有美
 権利者: 三井造船株式会社・北海道大学
 種類: 特許
 番号: 特願 2012-065769 号
 出願年月日: 24年3月22日
 国内外の別: 国内

名称：FRET 計測措置及び FRET 計測方法
発明者：中田成幸・大場雄介・土井恭二・浅野有美
権利者：三井造船株式会社・北海道大学
種類：特許
番号：特願：2012-065771 号
出願年月日：24 年 3 月 22 日
国内外の別：国内

名称：ウイルス感染抑制および／または感染症治療剤、ならびにウイルスの感染を抑制および／または感染症を治療する方法
発明者：大場雄介・宮崎忠昭
権利者：北海道大学
種類：特許
番号：特願 2011-058804 号
出願年月日：23 年 4 月 7 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 件）
なし

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.cellsignal-imaing.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大場 雄介 (OHBA YUSUKE)
北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号：30333503

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし