

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591633

研究課題名(和文)メダカHRAS悪性黒色腫モデルを用いた薬剤スクリーニング系の構築

研究課題名(英文)Establishment of transgenic HRAS medaka as a tumor model for in vivo drug screening

研究代表者

松崎 ゆり子 (Matsuzaki, Yuriko)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：40255435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：既に樹立したヒト癌遺伝子HRASの変異型導入メダカ系統を利用した新規抗癌化合物スクリーニングシステムの確立を目的とした。既存薬ライブラリーを用いた一次スクリーニングではゼブラフィッシュ胚の黒色素産生を減少させる35薬剤を取得し、神経冠細胞系列遺伝子の発現低下を起こす7薬剤を候補とした。二次スクリーニングにおける薬剤投与試験の予備実験としていくつかのRASシグナル下流因子の阻害剤を水槽へ投与し、変異型HRASメダカ個体への効果として生存期間の延長や腫瘍組織中の活性化タンパク質量の減少を確認できた。このシステムでHRAS高発現型腫瘍に効果のある薬剤をスクリーニングできると考えている。

研究成果の概要(英文)：We have previously reported a transgenic medaka strain expressing human HRAS mutant gene. Here, we further intend to establish a novel drug screening system using this medaka. In the first screen using our drug library, we obtained 35 drugs which could decrease pigmentation of zebrafish embryos. Seven out of 35 drugs were selected as candidate drugs because they had affected the downregulation of the gene for marker of embryonic neural crest progenitors. Before the second screening, we tried to validate the experimental system using the transgenic HRAS medaka. Inhibitors for downstream molecules of RAS signaling were administered to the HRAS medaka. Treatment with sorafenib, an inhibitor of Raf kinase, improved their survival, and Trametinib, an inhibitor of MEK, decreased the levels of phosphorylated ERK in the tumor tissue. The in vivo system presented here is promising to screen potential anticancer drugs.

研究分野：腫瘍医学

キーワード：がん遺伝子導入メダカ 抗癌剤スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は平成 23 年度までにヒト *HRAS* 遺伝子導入による、メダカ悪性黒色腫モデルを構築した。この系統は受精後 6 ヶ月までに 100%の個体に外観から確認できる黒色腫瘍がみられたが、腫瘍を生じるまでの期間には個体差があり、受精後 1 ヶ月の稚魚では 30%程度であった。大規模の薬剤ライブラリーを扱う場合、稚魚の段階で利用することができれば、労力とコストの面で非常に優れたスクリーニング系になりうる。2011 年に White らはゼブラフィッシュ野生型稚魚を用いて神経冠細胞系列の遺伝子指標である *crestin* の発現低下を起す薬剤をスクリーニングし、この方法で得た薬剤が黒色素細胞数をも減少させ、さらに腫瘍増殖を抑制することを示した。そこで、本研究では当初メダカ野生型稚魚での黒色素胞の減少を薬剤一次スクリーニングの指標とし、その結果得られた候補薬剤の二次スクリーニングに *HRAS^{G12V}* トランスジェニックメダカを用いることとした。

2. 研究の目的

小型魚類の黒色素胞を稚魚の段階で減少させる薬剤を既存薬ライブラリーの一次スクリーニングにより取得し、二次スクリーニングでは *HRAS^{G12V}* トランスジェニックメダカを用いる。黒色腫を発症した *HRAS^{G12V}* トランスジェニックメダカに得られた候補薬剤を投与し、治療効果を評価する。

3. 研究の方法

- (1) 黒色素胞量の豊富な近交系黒メダカを複数系統入手し、生育能力や薬剤耐性能力を比較し、既存薬ライブラリーを用いた一次スクリーニングに使用可能である系統を選択する。
- (2) 一次スクリーニングについては薬剤濃度の検討を行う。既存薬ライブラリー（薬剤数：1164）を初期濃度 10 μ M で受精後 5 時間のゼブラフィッシュ胚に添加し 48 時間後、対照群と比較し胚の色素胞黒化抑制が見られた薬剤を黒色腫瘍化抑制候補として選択する。スクリーニングの結果、黒色素胞の減少もしくは消失のみられた薬剤については投与する薬剤濃度を希釈し、効果の濃度依存性を確認する。さらにゼブラフィッシュ *crestin* 遺伝子について whole mount *in situ hybridization* (WISH) を行い、神経冠細胞系列の遺伝子発現低下を確認することで、二次スクリーニングを行う薬剤を決定する。決定した薬剤については新たに異なる製造元の試薬を購入し、同じ結果が得られるかどうかについて確認する。
- (3) 二次スクリーニングでは黒色腫瘍が進展した *HRAS^{G12V}* トランスジェニックメダカ

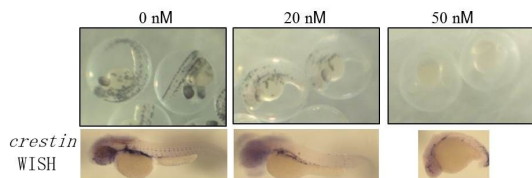
に薬剤を投与し、生存期間および RAS シグナル下流遺伝子産物の増減により治療効果の測定を試みる。候補薬剤が得られる前での検証実験であるため、RAS シグナル下流遺伝子産物のいくつかの阻害剤を用いることとした (RAS ファルネシル化阻害剤 FTI-277、BRAF 阻害剤ソラフェニブ、MEK 阻害剤トラメチニブ、S6K1 阻害剤 N-トシル-L-フェニルアラニンクロロメチルケトン (TPCK))。使用濃度については、予め野生型メダカ系統で 72 時間投与による急性毒性がみられない濃度を決定する。

4. 研究成果

(1) 一次スクリーニング

当初野生型メダカ胚を用いる予定であったが、卵膜の硬さが薬剤処理に適さなかったため、野生型ゼブラフィッシュ胚に変更した。現在までに既存薬ライブラリー1164の薬剤すべてについてスクリーニングを行う事が出来た。黒色化抑制効果のみられた 35 の試薬については、さらにゼブラフィッシュ *crestin* 遺伝子の発現を WISH により評価し、発現を抑制することのできた 7 種の薬剤を候補として得た。下図上段は既存薬ライブラリーの候補として残った試薬 A を受精後 5 時間のゼブラフィッシュ胚に 0 nM、20 nM、50 nM の濃度で添加し、48 時間後、胚を撮影したものである。薬剤濃度依存的に黒色素産生の減少が見られ、48 時間後の胚を用いて行った WISH においても *crestin* 遺伝子の発現が濃度依存的に減少していた(下図下段)。

試薬A 投与48時間後の胚

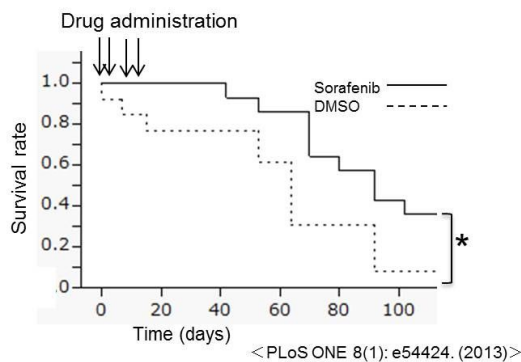


候補となった 7 薬剤については異なる製造元の試薬を購入し色素産生抑制や遺伝子発現抑制が再現できるかどうかについて検討をはじめた。効果の再現された薬剤については *HRAS^{G12V}* トランスジェニックメダカに投与を行う予定である。

(2) 二次スクリーニング

RAS ファルネシル化阻害剤 FTI-277、BRAF 阻害剤ソラフェニブ、MEK 阻害剤トラメチニブ、S6K1 阻害剤 N-トシル-L-フェニルアラニンクロロメチルケトン (TPCK) を用いて生存期間、RAS シグナル下流遺伝子産物の増減による治療効果の測定について検討した。

黒色素胞を過剰発現しているメダカをソラフェニブ投与群と対照群とで各々 5 個体以上準備し、薬剤濃度は 0.1 μ M から 1 μ M、投与時間は 1 回につき 24 時間 1 週



間 1-2 回、4-12 週間とした。3 回行った生存曲線の解析では、常に有意な生存期間の延長がみられた。図の生存曲線はソラフェニブ 0.1 μ M 投与群 14 個体と対照群 13 個体とで、1 回につき 24 時間、2 週間で 4 回投与した実験で得た結果である。両群間でログランク検定を行うと $P = 0.0267$ と有意な差が生じた。

FTI-277 (5 μ M、72時間 \times 4) トラメチニブ(10-50 nM、72時間 \times 4)、については生存期間の延長はみられていない。トラメチニブを72時間2回投与後、黒色腫瘍部からタンパクを抽出しウェスタンブロッティングを行ったところ活性型リン酸化 ERK のタンパク量が著しく減少していた。生存期間の延長はみられなかったものの、水槽中の薬剤が体内にとりこまれ、その結果組織から抽出したタンパク量が変化したと考えられる。

トラメチニブ(10-50 nM)、TPCK(50-100 nM)を併用し、2ヶ月齢のHRAS^{G12V}腫瘍メダカの飼育水中に投与後(72時間 \times 4-10)、生存期間、RAS下流シグナルタンパク質リン酸化を指標に評価を行った。単剤投与では現時点で対照群との有意な差は見られず、並行投与群は濃度を低く設定しても約2週間で死滅してしまうため投与法の改善が必要である。

これらの結果から、HRAS腫瘍メダカに対し薬剤を水中投与することで効果の測定評価が可能であると考えられる。

(3) 考察

一次スクリーニングではゼブラフィッシュ野生型稚魚を用いたが、孵化前の胚は多数の個体(数百)を同時に用意できるとともに、個体サイズが1 mmと小さいため投与に必要な薬剤量が少なくて済む(約1/200量)という利点がある。また、黒色素胞の減少もしくは消失を薬剤評価の指標にしているため、この時選択されてくる薬剤には色素細胞の生成に関わる多くの分子が含まれるはずであり、悪性黒色腫だけでなく、色素異常関連疾患に関与する分子も存在すると考えられる。色素異常関連疾患では、生育に支障のある疾患から美容上の問題となる疾患まで幅広い症状が関わっており、得られた候補薬剤の応用範囲は広い。

HRAS^{G12V}トランスジェニックメダカに候補薬剤を投与して行う二次スクリーニングの予備実験として、RASシグナル関連のいくつかの阻害剤を用いて生存期間および下流遺伝子産物の増減により治療効果の測定を試みた。このような *in vivo*での簡便な治療実験は今までに行われたことはなく、これらは臨床応用の前段階試験として最適な実験系であると考えている。

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 7件)

以下全て査読有

Matsuzaki Y, Hosokai H, Mizuguchi Y, Fukamachi S, Shimizu A and Saya H: Establishment of HRAS^{G12V} transgenic medaka as a stable tumor model for *in vivo* screening of anticancer drugs. *PLoS One* 8: e54424, 2013 (doi:10.1371/journal.pone.0054424)

Osuka S, Sampetean O, Shimizu T, Saga I, Onishi N, Sugihara E, Okubo J, Fujita S, Takano S, Matsumura A and Saya H: IGF1 receptor signaling regulates adaptive radioprotection in glioma stem cells. *Stem Cells* 31: 627-640, 2013 (doi: 10.1002/stem.1328)

Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, Yae T, Motohara T, Sugihara E, Onishi N, Masuko T, Yoshizawa K, Kawashiri S, Mukai M, Asoda S, Kawana H, Nakagawa T, Saya H and Nagano O: xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 73: 1855-1866, 2013 (doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3609-T)

Kai K, Iwamoto T, Kobayashi T, Arima Y, Takamoto Y, Ohnishi N, Bartholomeusz C, Horii R, Akiyama F, Hortobagyi GN, Puzstai L, Saya H and Ueno NT: *Ink4a/Arf*^{-/-} and *HRAS(G12V)* transform mouse mammary cells into triple-negative breast cancer containing tumorigenic CD49f⁺ quiescent cells.

Oncogene 33: 440-448, 2014

(doi: 10.1038/onc.2012.609)

Nobusue H, Onishi N, Shimizu T, Sugihara E, Oki Y, Sumikawa Y, Chiyoda T, Akashi K, Saya H and Kano K:

Regulation of MKL1 via actin cytoskeleton dynamics drives adipocyte differentiation. *Nat Commun* 5: 3368, 2014 (doi: 10.1038/ncomms4368)

Shimizu T, Sugihara E, Yamaguchi-Iwai S, Tamaki S, Koyama Y, Kamei W, Ueki A, Ishikawa T, Chiyoda T, Osuka S, Onishi N, Ikeda H, Kamei J, Matsuo K, Fukuchi Y, Nagai T, Toguchida J, Toyama Y, Muto A and Saya H: IGF2 preserves osteosarcoma cell survival by creating an autophagic state of dormancy that protects cells against

chemotherapeutic stress. *Cancer Res*

74: 6531-6541, 2014 (doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0914)

Masuda K, Chiyoda T, Sugiyama N, Segura-Cabrera A, Kabe Y, Ueki A, Banno K, Suematsu M, Aoki D, Ishihama Y, Saya H and Kuninaka S: LATS1 and LATS2 Phosphorylate CDC26 to Modulate Assembly of the Tetratricopeptide Repeat Subcomplex of APC/C.

PLoS One 10: e0118662, 2015

(doi: 10.1371/journal.pone.0118662)

[学会発表](計6件:研究代表者のみ)

松崎ゆり子, 佐谷秀行, 他, Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) システムを用いて作製した phosphatase and tensin homolog (PTEN) ノックアウトメダカ, 日本分子生物学会年会, 2014年11月25日, 神奈川県: 横浜国際会議場

松崎ゆり子, 佐谷秀行, 薬剤スクリーニングに用いる癌遺伝子 *HRAS* 導入メダカモデルの確立, 日本癌学会学術総会, 2014年9月26日, 神奈川県: 横浜国際会議場

松崎ゆり子, 佐谷秀行, 他, Establishment of transgenic *HRAS* medaka as a tumor model for *in vivo* drug screening 2014年9月20日, 小型魚類研究会 東京都: 慶應義塾大学

松崎ゆり子, 佐谷秀行 抗癌剤スクリーニングに用いるための遺伝子導入メダカ腫瘍モデルの確立, 日本動物学会 2013年9月26日, 岡山県: 岡山大学

松崎ゆり子, 佐谷秀行, 他, Establishment of transgenic medaka as a stable tumor model for *in vivo* screening of anticancer drugs 2013年4月8日, アメリカ癌学会 米国: ワシントン DC

松崎ゆり子, 佐谷秀行, 他, Establishment of the medaka melanoma model and drug administration trials 2012年9月22日, 小型魚類研究会 京都府: 京都大学

[その他]

ホームページ等

<http://www.genereg.jp/html/research/2011/08/post.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松崎 ゆり子 (MATSUZAKI, Yuriko)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 40255435

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐谷 秀行 (SAYA, Hideyuki)
慶應義塾大学・医学部・教授
研究者番号: 80264282