

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830109

研究課題名(和文)細胞競合を利用した新規がん治療薬の開発

研究課題名(英文)The development of a novel type of cancer preventive medicine that targets cell competition

研究代表者

山内 肇(YAMAUCHI, Hajime)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：50541273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：私達はこれまで正常上皮細胞とがん変異細胞の間では細胞競合が生じ、正常細胞は変異細胞を認識し排除することを明らかにしている。本研究ではこの相互作用に着目し、細胞競合を利用したスクリーニングプラットフォームを開発した。これを利用し、RasV12変異細胞の排除を特異的に促進するヒット化合物としてVC1を同定した。さらにVC1類縁化合物の中で、VC1-8が正常細胞に対する毒性が最小限かつ変異細胞のVC1と同等の変異細胞の排除効果を示すことを見出した。このVC1-8の細胞競合活性はin vitroに加えex vivoでも見られ、VC1-8が新規のタイプの癌予防薬となる可能性を秘めていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Our recent studies have revealed that cell competition can occur between normal and transformed epithelial cells, and normal epithelial cells recognize the presence of the neighboring transformed cells and actively eliminate them cells from epithelial tissues. We focused this interaction and established the screening platform that targets cell competition. By using this platform, we have identified VC1 as a hit compound that specifically promotes elimination of RasV12-transformed cells from the epithelium. Among several VC1 derivative compounds, we have found that VC1-8 has least cytotoxicity against normal cells but shows the comparable effect on the elimination of transformed cells. This cell competition activity of VC1-8 is observed both in vitro and ex vivo, indicating that VC1-8 is a promising novel type of cancer preventive medicine.

研究分野：分子生物学

キーワード：癌 細胞・組織 細胞競合 ケミカルバイオロジー 抗がん物質探索

1. 研究開始当初の背景

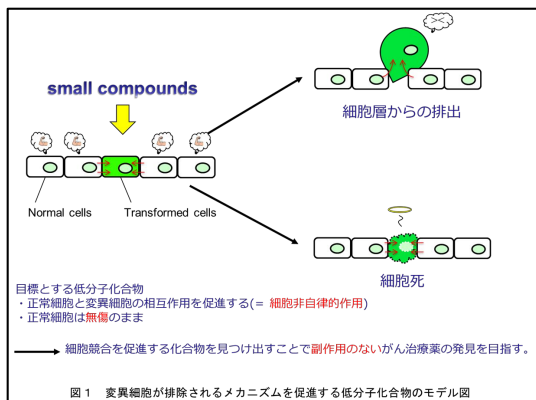
ヒトの癌の大部分は乳腺や肺、腎臓、腸管などの上皮細胞において起こり、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の変異が蓄積していくことによって進行する。癌発生の初期段階において、正常上皮細胞層内部に生じた変異細胞は正常細胞に囲まれた状態で成長する。その際に、正常上皮細胞と変異細胞の境界で何が起きるのかに関してはほとんど解明されていないままであった。

近年、私たちの研究室では、正常上皮細胞と変異細胞間で細胞競合が起こり、癌タンパク質 RasV12 変異細胞が正常上皮細胞に囲まされると RasV12 変異細胞のシグナル伝達に様々な変化が起きて上皮細胞層から排出されることを明らかにした。また癌タンパク質 v-Src 変異細胞と正常上皮細胞の間でも競合現象が起きることも分かった。

正常上皮細胞と変異細胞の共存下で見られる細胞競合の研究については、1970年初頭にショウジョウバエを用いた研究において細胞の「勝者」と「敗者」の生存競争が生じることが発見されて以来、国内外でもいくつかの研究室で進められてきた。しかし、正常上皮細胞と変異細胞が互いを認識する分子メカニズムは何か、脊椎動物でも同様の競合が起きているのか、など多くの点で疑問点が残されてきた。我々は哺乳類を用いた培養細胞系でもショウジョウバエと同様に細胞競合が起きて変異細胞が排除されることを明らかにした。また、生体モデルとして脊椎動物のゼブラフィッシュにおいても、同様の細胞競合が起こることを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究では、正常細胞と変異細胞間で起こる相互作用に注目し、正常細胞に囲まれた変異細胞が排除されるメカニズムを促進する低分子化合物の探索と機能解析を行う(図1)。



従来の癌研究においては、癌細胞内で変異した癌遺伝子や癌抑制遺伝子が誘起するシグナル伝達機構について分子レベルでの解析を進めることにより、正常細胞と癌細胞の相違点を基にして癌細胞のみを特異的に攻撃するという手法が主に取られてきた。本研究では正常上皮細胞と変異細胞間の細胞競合をターゲットにし、これまでの癌研究とは

一線を画した極めて独創的な切り口から新しい癌治療法確立を目指す。本研究分野は、癌細胞を単独で攻撃する治療薬ではなく、正常上皮細胞と協力し癌細胞を攻撃するメカニズムを助太刀する治療薬の開発を目的とした全く新規の創薬の開発を目指すものである。

3. 研究の方法

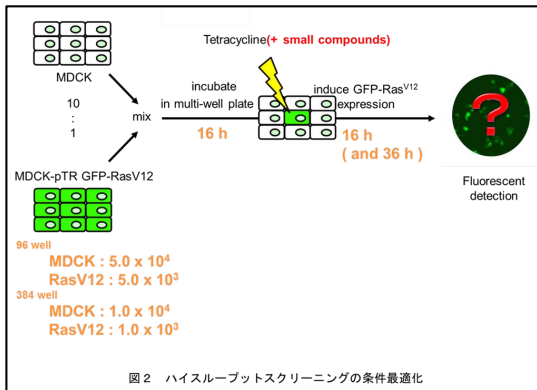
(1) これまで独自に確立した哺乳類培養細胞系を用いて、癌化した細胞とそれを取り囲む正常上皮細胞間で細胞競合が起こり、癌化細胞は上皮細胞層からの排出や細胞死など様々なメカニズムを介して排除されることを利用し、この細胞競合をさらに促進させる低分子化合物の探索をハイスループットスクリーニングにて行う。具体的には、テトラサイクリン依存的に GFP タグ付き RasV12 を発現する変異細胞が正常上皮細胞に囲まれた状態において、ライブラリー由来の低分子化合物をテトラサイクリンと同時に添加し、正常上皮細胞が変異細胞を排除する機構を促進する低分子化合物を見つけ出す。低分子化合物は正常細胞に対しては毒性を最小限にとどめ、正常細胞に囲まれた変異細胞に対してのみ特異的に作用するものを選び出しヒット化合物とする。さらに、より多くのライブラリー化合物からヒット化合物に構造的に類縁な化合物を選び出し、ヒット化合物より効果的なものを探索する。

(2) 上記の in vitro における解析に加えて、ex vivo での解析を行う。私が所属する研究室では、腸管の正常上皮管腔形成過程においてごくわずかの細胞にモザイク状に変異が生じる細胞競合モデルマウスを既に確立している。このマウスモデルの腸管を摘出しスクリーニングで選抜した化合物を添加し、ex vivo レベルで共焦点顕微鏡にて正常上皮細胞に囲まれた変異細胞の動態を観察し、生体モデルにおける影響を調べる。

4. 研究成果

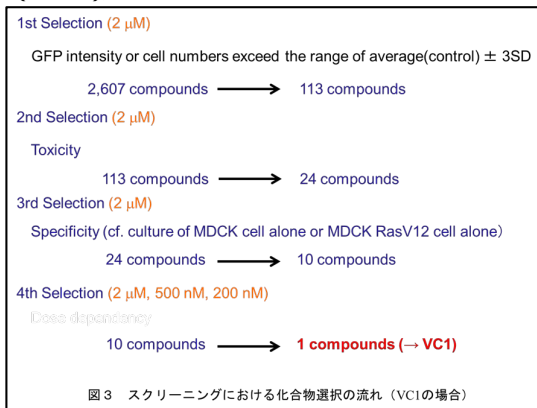
(1) ハイスループットスクリーニングプラットフォームの開発と最適化

96および384ウェルプレート上で正常上皮細胞としてイヌ腎臓尿管(MDCK)細胞、変異細胞としてテトラサイクリン依存的に GFP-Ras 変異を発現する MDCK 細胞を用いて、両細胞をそれぞれ 10:1 の割合で播種し、一層の細胞層が形成された後、テトラサイクリンを添加することにより変異細胞が正常上皮細胞に囲まれた癌発生の超初期段階を模倣し、この一定時間後に細胞競合が生じることを GFP 蛍光強度の低下によって確認した。さらに 96 および 384 ウェルプレート上で細胞競合が生じる条件として、細胞の播種密度、テトラサイクリンを添加するまでの時間、テトラサイクリン添加後から蛍光イメージング装置にて観察するまでの時間を最適化した(図2)。



(2) 細胞競合促進化合物の探索

上記の条件下でハイスループットスクリーニングを利用して、2,607種類からなる既知薬効化合物ライブラリー、および約20万化合物からなるフルライブラリーの構造多様性等を考慮して選択した9,600種類のコア化合物ライブラリーをテトラサイクリンと同時に添加することで細胞競合を促進する化合物を探索した。その結果、両ライブラリーからそれぞれ約100種類および約600種類の化合物が添加によってGFP蛍光強度を低下させることを見つけた。さらにこれらの化合物から将来の医薬品の開発につながるために、正常上皮細胞に対して毒性が比較的少なく、変異細胞の排除を促進する効果が正常上皮細胞と変異細胞の混合培養でのみ生じ、用量依存性のあるものを選択した結果、該当する化合物を両ライブラリーから1つずつ同定し、これをそれぞれVC1、CC1と名付けた(図3)。

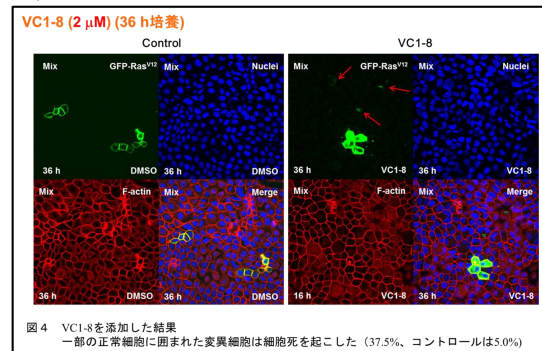


(3) 類縁化合物の探索

まずVC1に関して、将来の癌治療薬となるために、選抜したVC1の細胞競合効果を保持しVC1よりも正常上皮細胞に対して毒性が低い化合物の探索を行った。まず約20万種類からなる化合物から類縁化合物の探索を試みたところ、VC1と類縁な構造を持つ化合物を10種類見出した。この中でVC1と同等の細胞競合促進効果があり、正常上皮細胞にほとんど毒性を示さない新規の化合物を1つ見出し、これをVC1-8と名づけた。同様にCC1についても類縁化合物を7種類見出し、その中で正常上皮細胞との混合培養下で変

異細胞特異的に形態に変化をもたらすCC1-2を見出した。

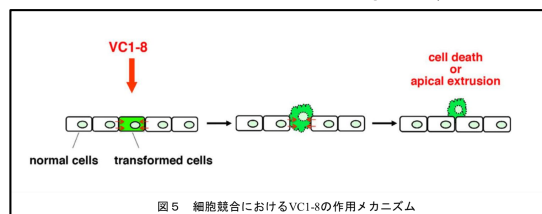
(4) VC1-8の変異細胞に対する詳細な解析
まずVC1-8の効果を調べるために、正常上皮細胞と変異細胞の混合培養下でVC1-8を添加し、経時変化を観察したところ、変異細胞は細胞死を起こし、細胞層から排除されることがわかった。コントロール条件下では変異細胞は細胞層から排除されるのみであり、細胞死はVC1-8特有の効果であった(図4)。



またこの細胞死促進効果は上記のイヌ腎臓尿細管細胞だけでなくヒト乳腺上皮細胞にRasV12変異を起こした変異細胞でも同様の排除効果が見られた。一方でSrc変異細胞ではコントロール(DMSO添加群)と有意な差が見られなかった。以上のことからVC1-8は動物種を越えてRasV12変異細胞に対して細胞死を促進することで排除する能力を有している事を明らかにした。今後はCC1-2についても詳細な解析を続けていく予定である。

(5) VC1-8のマウス腸管上皮細胞におけるex vivoでの解析

VC1-8のさらなる薬理学的作用を確認するため、私たちが既に確立している細胞競合モデルマウス由来の腸管を摘出しVC1-8のex vivoでの効果を調べた。その結果、コントロール条件と比較して有意に細胞競合が促進されRas変異細胞は正常細胞層から排出された。以上のことからVC1-8はin vitroおよびex vivoでRas変異細胞に対して細胞競合を促進し、将来の抗癌剤となる可能性を秘めた化合物であることを明らかにした(図5)。



本研究で得られた成果は癌予防薬の発見につながるスクリーニング系の開発に世界で初めて成功したとして第一著者として論文を発表しただけでなく北海道新聞の第一面記事に記載されるなど高い注目を受けた(Yamauchi et al, Scientific Reports, 2015)(北海

道大学プレスリリース(2015/10/26) (北海道新聞 2015 年 10 月 27 日朝刊第一面記事)。

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1件)

Hajime Yamauchi, Takanori Matsumaru, Tomoko Morita, Susumu Ishikawa, Katsumi Maenaka, Ichigaku Takigawa, Kentaro Semba, Shunsuke Kon, Yasuyuki Fujita, The cell competition-based highthroughput screening identifies small compounds that promote the elimination of RasV12- transformed cells from epithelia、Scientific Reports、査読有り、5:15336、2016、DOI: 10.1038/srep15336

[学会発表](計4件)

山内 肇、正常細胞によるがん細胞の排除を促進する低分子化合物の探索と解析、第三回細胞競合コロキウム、2014年3月14日、北海道大学(北海道札幌市)

山内 肇、がん細胞に対する正常細胞の細胞競合力を高める化合物のハイスループットスクリーニングと機能解析、第二回がん細胞競合イメージング研究会、2014年7月30日、北海道大学(北海道札幌市)

山内 肇、High-throughput screening of small compounds that enhance the ability of cell competition、第十二回未来創薬・医療イノベーション拠点形成国際シンポジウム、2014年9月5日、北海道大学(北海道札幌市)

山内 肇、細胞競合を促進する低分子化合物のハイスループットスクリーニング、2014年11月7日、六甲山ホテル(兵庫県神戸市)

[その他]

ホームページ等

がん予防薬の発見につながるスクリーニング系の開発に世界で初めて成功
https://www.hokudai.ac.jp/news/151026_cris_pr.pdf

6. 研究組織

(1)研究代表者

山内 肇 (YAMAUCHI, Hajime)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：50541273

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし