

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06888

研究課題名(和文) 間質細胞に作用して抗がん活性を発揮する低分子化合物の開発とその作用機構の解明

研究課題名(英文) Development and mechanism analysis of small molecules affecting tumor-stromal cell interactions

研究代表者

川田 学 (KAWADA, Manabu)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・部長

研究者番号：20300808

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々はいままで、がん-間質相互作用を調節する、即ち間質細胞に作用して抗がん活性を発揮する低分子化合物を微生物培養液から発見してきた。本研究では最近発見した新規化合物 intervenolin の作用機構を解析すると共に新たな活性物質の探索を行った。その結果、intervenolin で間質細胞を処理するとがん細胞の増殖抑制因子が分泌されることがわかった。一方、新たに共培養系で放線菌培養液に活性を見出し、精製した結果 8-azaguanine と同定した。8-azaguanine はある種の肺がん細胞株に選択的な作用を示し、その作用には細胞同士の接着が必要なこと、核酸の代謝は関係ないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have been finding small molecule modulators of tumor-stromal cell interactions among natural compounds using coculture systems of cancer and stromal cells. Here we report the mechanism of action of intervenolin, a novel compound that we found recently, and a new modulator for the lung tumor-stromal cell interactions. We have found that intervenolin stimulates stromal cells to secrete cancer-growth inhibitory factors. Furthermore, we found activity in an actinomycete culture and isolated 8-azaguanine by coculture system of lung cancer and stromal cells. It is suggested that the action of 8-azaguanine needs the direct contact of cells and is independent on nucleotide metabolism.

研究分野：がん化学療法

キーワード：抗がん剤 がん間質 天然物

## 1. 研究開始当初の背景

近年のがん分子標的薬の開発によりがんの治療成績は著しく向上しているが、標的であるがん細胞のゲノムが不安定なため薬剤耐性化が問題となっている。従って、依然としてこれまでとは異なる新しいタイプの抗がん剤の開発が必要である。一方、がん組織はがん細胞だけでなく周辺の様々な間質成分と混在して成立しており、がんの増殖や転移に密接に関わっている。我々は、間質成分の中でも特に線維芽様細胞（間質細胞とも呼ぶ）に着目した。それは間質細胞が分泌因子や接着を介して（がん-間質相互作用と呼ぶ）がんの増殖や転移を正にも負にも制御しているからであり、我々はこのがん-間質相互作用を利用した新しいタイプのがん治療法および抗がん剤の開発を最終的な目標として研究を行っている。我々が開発を目指す抗がん剤はがん細胞を直接攻撃するものではなく、がん組織中の間質成分とがん細胞のやり取りを標的とするものであり、薬剤耐性化の問題も回避できる。また、従来のがん細胞を標的とした抗がん剤とは作用機構が基本的に異なるため、併用による効果の増強も期待できる。さらに最近の研究から、間質細胞はがん幹細胞の維持 (Lia, *Cancer Res* 70: 7294-303, 2010)、がん転移の成立 (Malanchi, *Nature* 481: 85-9, 2012)、抗がん剤耐性 (Straussman, *Nature* 487: 500-4, 2012) などががんの治療に極めて重要な現象に関わっていることが明らかにされている。このような背景から、間質細胞を標的とした新しいがん治療法の開発研究が注目されている。しかしながら、がん-間質相互作用には様々なメディエーターが関与し、各臓器・がん種によっても異なることから、その全容は解明されていない。

がん-間質相互作用の研究では、臨床組織から分離したがん細胞と間質細胞のペアを使用することが理想であるが、その入手や樹立など制限があり容易ではない。そこで、我々は入手可能な細胞株を用いて実験モデルを構築し、相互作用を調節する低分子化合物を利用するケミカルバイオロジーの手法で研究を行ってきた。即ち、相互作用を変化させる化合物を発見し、抗がん活性を評価するとともにその作用機構の解析から相互作用のメディエーターを解明し、実際の臨床組織サンプルで検証するという方法を行ってきた。具体的には、先ず前立腺がんをモデルとして、前立腺がん細胞の増殖が前立腺間質細胞によって促進される現象を *in vitro* で再現した両細胞の共培養実験系を構築した (Kawada et al, *Cancer Res* 66: 4419-25, 2006)。この共培養系を利用して、がん-間質相互作用を調節する化合物、即ちがん細胞や間質細胞のみの培養では毒性を示さず、共培養した時にごん細胞の増殖を選択的に阻害する活性物質を放線菌やカビの培養液から発見した

(Kawada et al, *For Immunopathol Dis Therp* 4: 53-62, 2013)。それらの中でも leucinstatin A や新規化合物 NBRI16716A などはヌードマウスを用いたヒト前立腺がんの移植モデルで抗がん活性を示した (Kawada et al, *Int J Cancer* 126: 810-8, 2010; Kawada et al, *J Antibiot* 63: 319-23, 2010)。また、これらの低分子化合物の作用機構の解析から前立腺間質細胞が産生する IGF-I が前立腺がんの増殖因子として働くことを見出した (Kawada et al, *Cancer Res* 66: 4419-25, 2006; Kawada et al, *Cancer Sci* 100: 150-7, 2009)。このように我々が独自に開発したモデルを利用したがん-間質相互作用の検討および活性物質の探索研究は有効であると考え、胃がん、大腸がん、肺がん、膵がん、乳がんなど他のがん種へと応用し、それぞれの組織由来の間質細胞との共培養実験系を構築した。その結果、最近胃がん-間質相互作用を調節する活性物質として、放線菌の培養液から新規化合物 *intervenolin* を発見した (Kawada et al, *J Antibiot* 66: 543-8, 2013)。Intervenolin は経口投与でヌードマウスを用いたヒト胃がん細胞や大腸がん細胞の移植モデルで顕著な抗がん活性を示した。

## 2. 研究の目的

我々のこれまでの研究から、がん-間質相互作用を調節する化合物が期待通り抗がん活性を発揮することが分かり、この戦略の基礎は確立しつつあることから、更なる応用研究へと発展させられると考えている。前述したように、がん-間質相互作用は各臓器・がん種によって異なることから、その分子基盤の解明のためには、個々に作用する活性物質が必要不可欠である。従って、本研究では、これまで活性物質が得られていないがん種のがん-間質相互作用を調節する化合物の探索を精力的に行い、動物実験で抗がん活性を示す有益な化合物の発見を目指す。また、最近発見した新規化合物 *intervenolin* は胃がんおよび大腸がんのがん-間質相互作用を調節すると考えられることから、詳細な作用機構を明らかにし、胃がんおよび大腸がんのがん-間質相互作用の実態解明に貢献する。

## 3. 研究の方法

### (1) がん-間質相互作用を調節する活性物質の探索

我々は蛍光タンパク GFP 遺伝子を導入したヒトがん細胞株を約 40 種樹立し、各臓器由来の間質細胞との共培養実験系を既に構築した。共培養は、まず間質細胞を培養し、そこに直接がん細胞を撒きこみ培養した。がん細胞の増殖は細胞を溶解し、GFP の蛍光強度を測定することで求めた。ヒット化合物は、がん細胞および間質細胞のみの培養では増

殖阻害活性を示さないが、共培養した時にがん細胞の増殖を選択的に強く阻害する活性とした。スクリーニング源は、我々の研究機関で分離・培養を行っている微生物の培養液を利用した。

## (2) 活性物質の精製・同定

(1)のスクリーニングで活性を見出した培養液について、活性物質の精製を行った。同定には UV、MS、NMR などの各種スペクトルを測定し化学構造を決定した。

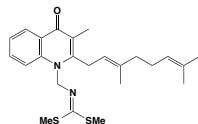
## (3) 活性物質の作用機構の解析

得られた活性物質の作用機構について、活性物質を作用させた間質細胞の培養上清にがん細胞の増殖阻害活性があるかなどについて調べた。培養上清に活性が認められた場合は、その活性が低分子によるものか高分子によるものか分子量カラムなどを利用して見極めそれぞれに適した手法で精製した。高分子の場合は活性を指標に粗精製し、2次元電気泳動などで候補分子を特定し、MS など各種スペクトルの測定から同定した。同定因子がタンパクである場合はリコンビナントタンパク、中和抗体、などを用いて検証した。

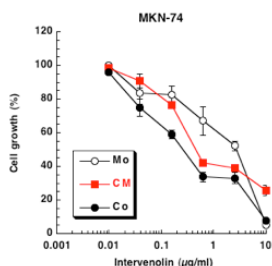
## 4. 研究成果

### (1) Intervenolin の作用機構の解析

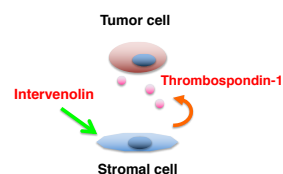
がん-間質相互作用を調節する活性物質として先行している intervenolin (右図)の作用機構について検討した。Intervenolin



は胃癌細胞株 MKN-74 単独培養に比べて、胃由来間質細胞 Hs738 と共培養した際により低濃度で MKN-74 の増殖を阻害した。一方、Intervenolin を予め添加して培養した間質細胞 Hs738 細胞の培養上清を MKN-74 細胞に加えても低濃度で増殖を阻害することがわかった (右図 CM)。この結果から、Hs738 細胞から何らかの液性因子が分泌され MKN-74 細胞の増殖が強く抑制されると考えられた。そこで、この液性因子の同定を目指して、Hs738 培養上清のプロテオーム解析を行った。その結果、Hs738 から分泌される液性因子の1つとして thrombospondin-1 が候補となった。Thrombospondin-1 の recombinant タンパクおよび thrombospondin-1 が結合すると予想されるがん細胞側のレセプターへの中和抗体などを用いた結果、Hs738 細胞から分泌されるがん細胞の増殖抑制因子の1つは

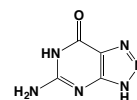


thrombospon  
din-1 である  
ことが示唆さ  
れた。しかし  
ながら、これ  
だけでは

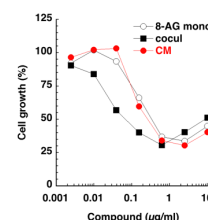


Hs738 細胞の培養上清中のがん細胞の増殖抑制活性を完全に説明できないことから、別の液性因子が存在していることが示唆された。

(2) 8-azaguanine の再発見と作用機構の解析  
肺がん細胞や膵がん細胞などを中心に対応する間質細胞との共培養実験系を用いて放線菌やカビなどの微生物培養液にがん-間質相互作用を調節する活性物質の探索を行った。いくつかの培養液に活性を見出したが、その中で肺がんの共培養実験系で、がん細胞および間質細胞のみの培養に比べて共培養した時にがん細胞の増殖を強く阻害する活性に着目した。活性物質を精製し、MS、NMR、結晶構造解析等の結果から活性物質は 8-azaguanine と同定した



(右図)。8-azaguanine を予め添加して培養した肺間質細胞 NHLF の培養上清ではがん細胞への強い増殖阻害活性は見られず、前述の intervenolin とは異なり、肺がん細胞と肺間質細胞の直接的な接着が活性に必須であることがわかった (右図 CM)。



また、肺がん細胞 6 株について共培養系で 8-azaguanine の活性を検討したが、NCI-H460 および NCI-H522 の肺がん細胞 2 株のみ共培養で強く増殖が抑制されることがわかった。さらに、同じプリン類縁体である 6-thioguanine および 6-mercaptopurine についても検討したが、8-azaguanine と同様な活性は見られなかった。これらの結果から、代謝阻害とは別な 8-azaguanine に特徴的な作用機構が存在することが示唆された。

## 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 18 件)

- ① Kawada, M. Small molecules modulating tumor-stromal cell interactions: new candidates for anti-tumor drugs. *J. Antibiot.* 査読有り, 69, 411-414 (2016). Doi: 10.1038/ja.2016.37.
- ② Kawada, M., Inoue, H., Ohba, S., Yoshida, J., Masuda, T., Yamasaki, M., Usami, I., Sakamoto, S., Abe, H., Watanabe, T.,

Yamori, T., Shibasaki, M., Nomoto, A. Stromal cells positively and negatively modulate the growth of cancer cells: stimulation via the PGE2-TNF $\alpha$ -IL-6 pathway and inhibition via secreted GAPDH-E-cadherin interaction. **PLoS One** 査読有り, 10, e0119415 (2015). Doi:10.1371/journal.pone.0119415

[学会発表] (計 28 件)

- ① Yoshida, J., Abe, H., Tatsuda, D., Amemiya, M., Watanabe, T., Kawada, M. Intervenin induces the negative regulation of gastric cancer cell growth via interactions with stromal cells. 第 76 回日本癌学会学術総会 (2017)
- ② Kawada, M., Amemiya, M., Sakamoto, S., Ohishi, T., Yoshida, J., Tatsuda, D. Modulation of the lung tumor-stromal cell interactions by 8-azaguanine. 第 76 回日本癌学会学術総会(2017)
- ③ 川田学、雨宮昌秀、坂本修一、大石智一、吉田潤次郎、立田大輔「8-azaguanine による肺がん-間質相互作用を介した肺がん細胞の増殖阻害」第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会 (2017)
- ④ Yoshida, J., Amemiya, M., Masuda, T., Kawada, M. Intervenin, a novel compound, induces the suppression of gastric cancer cells by stromal cells via secreted factors. 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016)
- ⑤ 吉田潤次郎、雨宮昌秀、大庭俊一、増田徹、川田学「新規化合物 intervenin による間質細胞の分泌因子を介した胃がん細胞の増殖抑制」第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会(2016)

[図書] (計 2 件)

- ① 川田 学、吉田潤次郎「がん微小環境を制御する低分子化合物」別冊 **BIO Clinica** 5, 106-111 (2016).
- ② 川田 学、吉田潤次郎「がんと間質の相互作用を利用したがんの抑制」**実験医学** 33, 859-863 (2015).

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

川田 学 (KAWADA, Manabu)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化

学研究所第 1 生物活性研究部・部長  
研究者番号：20300808

### (2)連携研究者

井上 裕幸 (INOUE, Hiroyuki)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所沼津支所・研究員

研究者番号：50601548

雨宮 昌秀 (AMEMIYA, Masahide)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所第 1 生物活性研究部・研究員

研究者番号：10232000

吉田 潤次郎 (YOSHIDA, Junjiro)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所第 1 生物活性研究部・上級研究員

研究者番号：20712706