

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15619

研究課題名(和文) Sphere破壊能を指標とした難治性悪性腫瘍に対する薬剤スクリーニングの創成

研究課題名(英文) Drug screening for refractory malignant tumors based on sphere destructive potency

研究代表者

米満 吉和 (Yonemitsu, Yoshikazu)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：40315065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：およそ3,000種の化合物群から2段階のスクリーニングを経て、極めて難治性である腹膜播種に対して高い有効性が期待出来るPD0325901を得た。既存の抗がん剤Paclitaxelを対照に用いてマウス腹膜播種モデルでの治療効果の確認を行った。その結果、驚くべき事に、PD0325901は劇的に奏功し、播種結節の縮小・貯留腹水の低減・著明な生存期間の延長を示した。一方で、同モデルにおいてはPaclitaxelは播種結節、貯留腹水を僅かに減少させるに留まり、生存期間の延長は見られたものの長期生存個体はみられなかった。固形腫瘍を悪性たらしめているメカニズムの解明の糸口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We obtained PD0325901 which can be expected to have high efficacy against peritoneal dissemination which is extremely refractory through a two-stage screening from approximately 3,000 compound groups. Using the existing anticancer agent Paclitaxel as a control, the therapeutic effect in the mouse peritoneal dissemination model was confirmed. As a result, surprisingly, PD0325901 has shown reduction of nodules and ascites, and has prolonged survival time. On the other hand, in the same model Paclitaxel remained only slightly reducing the disseminated nodules and ascites, and although the survival time was prolonged, long-term survivors were not observed. It is expected to be a clue to elucidating the mechanism of making solid tumors malignant.

研究分野：血管外科学、病理学、腫瘍免疫学

キーワード：腹膜播種 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

がんは国民死亡原因の第1位であり、このがん死亡率を低下させると共にがん患者のQOLの向上に主眼を置いた治療戦略を構築することは、極めて重要である。近年の医学の進歩により、手術は安全に行われるようになり、また分子標的薬や抗体医薬の登場によって、その予後も目覚ましく改善してきた。一方で、既存の手術、放射線療法、化学療法に抵抗性であるがん種も依然存在しており、特に消化器がん腹膜播種に対しては標準的治療技術が確立されていない。

本研究組織はこれまでがん難治化メカニズムの解明に取り組み、『Sphere形成』に着目、消化器がん発生学会理事長直轄プロジェクトとしても“Sphere Biology”研究を推進してきた。中でも極めて悪性で、有効な治療方法が確立されていない腹膜播種の研究を進め、これまで謎とされてきたその形成過程並びに難治化メカニズムを解明するに至った (Kasagi Y, et al. *Cancer Res*, 76:347-357, 2016)。Sphereを形成した腫瘍細胞はその内部への薬剤浸透効率が極端に低下する上に、幹細胞様の特徴をも有するようになる。つまり、Sphere形成とそれに起因する微小環境との相互作用が存在することで、各種化学療法剤に対する抵抗性が極めて高く、現行の治療法が生命予後の改善に繋がっていないことが明らかになった。

以上のことから、Sphereの形成阻害・破壊を指標とした化合物スクリーニングのための洗練されたシステム構築が必要であり、またそこで得られた化合物を用いたバイオリジカルな解析を通じて固形腫瘍の治療技術開発に繋げることが求められている。

2. 研究の目的

東大創薬機構のValidated libraryを対象に行った試験的スクリーニングにより、既知の化合物の中から腹膜播種に有効と考えられる化合物を複数得ることに成功したが、そのターゲット分子は多岐に渡り、抗腫瘍効果発揮のメカニズムは不明のままである。そこで、それら化合物の作用プロファイルを解き明かし、腹膜播種治療薬候補が奏功するメカニズムを明らかにするとともに、より効率化された汎用性のあるスクリーニングシステムを完成させることを目的とする。

3. 研究の方法

このスクリーニングによって得られた化合物について、特に*in vivo*での妥当性検証を実施すると共に、さらにスクリーニング技術そのものについて、精緻なシステムへのブラッシュアップを行う。

(1)「化合物X1及びX2」の*in vivo*における「sphere破壊効果」に関する検証

1)「化合物X1」について、単剤投与ならびに標準治療剤パクリタキセル併用投与(用量依存性)による、a) 生存期間延長効果の確認、

b) 腹水貯留抑制効果の確認、を実施する。2)「化合物X2」についても同様に、単剤投与ならびに標準治療剤パクリタキセル併用投与(用量依存性)による、a) 生存期間延長効果の確認、b) 腹水貯留抑制効果の確認、を実施する。

(2)さらに鋭敏かつ短時間でのスクリーニングが可能な検出系の構築

現在のスクリーニング系は、sphere形成開始より48時間で判定することが多い。この系は開始後12時間程度よりクラスター形成が始まるが、これまでの検討からCollagen type IV(Coll-IV)並びにplasma fibronectin (pFN)が共存すると、これが大幅に促進することを明らかとしており、これこそが腹腔内でがん細胞が速やかにsphereを形成して転移に至るメカニズムであった。この研究ではこの知見を応用し、a) アッセイを短時間にするための、適量のColl-IV並びにpFNの添加および細胞の組合せの最適化、b) Coll-IV並びにpFNの添加が検出系に及ぼす影響の検討、を行うことにより、より鋭敏かつはイスループットなシステムへと進化させることを目指す。

4. 研究成果

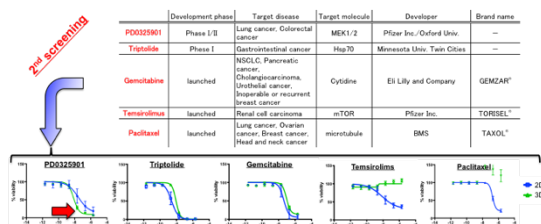
Sphereを用いて薬物のスクリーニングを行うに際しては、大量の候補化合物を精度よく評価する必要がある。その際には均質なSphereが必要となるが、従来の形成方法ではこの点が多分ではなかった。

本研究ではその解決を図ると共に、sphereを形成する位置をwell中心に固定出来るため、イメージング装置を用いた単独のsphereの高速撮像が実現される。Sphereはwellの中心に整列し、その大きさや蛍光強度は極めて均質である。従って、撮像の際に行うオートフォーカス機能によるピント調整時間も短縮される。1つのwellに1つのSphereを形成させることはScaffoldタイプでは困難であり、そのサイズ設定も理論的に不可能であった(細胞が接着する足場がある限りコントロール不能)が、それを可能としている。さらにその精度は極めて高く、蛍光を用いたViability測定と試薬を用いたATP assayを経時的に行うと、均一なデータを取得可能である。さらに、ハンギングドロップ方式(液滴下部にSpheroidを形成)では1つのwellに1つのSphereを形成させることは可能であるが、試薬や化合物等を途中で添加すると液滴のサイズが変化し、場合によっては液滴が落下するため調節が難しかった。本研究ではその点も考慮し、well当たり培養液の3倍程度までの試薬添加を可能としており、化合物の溶媒であるDMSOの濃度調整にも対応している。すなわち、現存する技術で唯一、均質なsphereを対象としたHTSに対応可能である。

腹膜播種形成過程でキーとなる生体内現象はこのsphere形成であることから、sphereをターゲットとした化合物スクリーニングシ

システムの開発を開始、これまでにその基礎開発を実施してきた。具体的には、U底の低接着 384 well plate を用いて必要に応じた種々のサイズの均質な sphere を作製し、アッセイ用にマーカー遺伝子を導入した腫瘍細胞株を組み合わせることで、細胞の viability を非破壊的に、簡便かつ経時的に計測可能な評価システムを構築した。

すなわち、単一の分子標的に対する、或いは 2D 培養法を用いたフェノタイプアッセイに基づく化合物スクリーニングでは進行がん組織の特性を反映しておらず、in vivo 及び臨床フェーズにおいて期待される十分な薬効が発揮されない場合がある。そこで、従来の標的分子に対する活性評価や立体構造を伴わずに薬効を評価する 2D 培養法とは異なり、“次世代型”とも呼べる腫瘍組織に対する活性を評価する 3D 培養法でのスクリーニング（本開発対象シーズ）の実用化を目指すこととした。2段階のスクリーニングを経て、腹膜播種に対して高い有効性が期待出来る PD0325901 と、2D 培養では抗腫瘍活性の高い既存の抗がん剤 Paclitaxel を用いてマウス腹膜播種モデルでの治療効果の確認を行った。



その結果、驚くべき事に、PD0325901 は劇的に奏功し、播種結節の縮小・貯留腹水の低減・著明な生存期間の延長(一部は長期生存、腫瘍特異的免疫の成立も確認:2nd challengeで生着率 0%)を示した。一方で、現在臨床で腹膜播種の治療目的で用いられることもある Paclitaxel は播種結節、貯留腹水を僅かに減少させるに留まり、生存期間の延長は見られたものの長期生存個体はみられなかった。また、もう一つの 2nd スクリーニング Hit 化合物である Triptolide はミネソタ大学のグループにより研究が進められており、マウスを用いた腹水貯留を来す腺がん腹膜播種モデルに著効することが確認されている（※ Minnelide: 活性体は Triptolide、下図）。

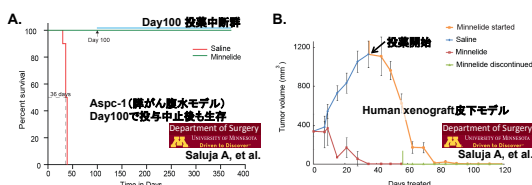


図: Hit化合物によるマウスモデルでの評価
A. 腹膜播種, B. 皮下腫瘍 (Human xenograft)
<https://www.pancan.org/wp-content/uploads/2014/05/Saluja-Research.pdf>

Sphere の破壊を指標にして得られる結果と、腹膜播種に対する有効性については類似性が高いものの、その作用メカニズムについては未だ未解明な部分が多い。今後は本研究成果を基盤とし、それらの解明を通じた腹膜播

種に対する創薬ターゲット発見が期待される。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

1. Peritoneal dissemination requires an Spl-dependent CXCR4/CXCL12 signaling axis and sphere formation
Harada Y, Kasagi Y, Morodomi Y, Yonemitsu Y.
The 75th Japanese Cancer Association, 2016、第 75 回 日本癌学会 (横浜)
2. MEK 1/2 inhibition might be a potential strategy to treat peritoneal dissemination by inhibiting MDSCs
Harada Y, Teraishi K, Yonemitsu Y.
The 27th Annual Meeting of the Japanese Society for Gastroenterological Carcinogenesis, 2016、第 27 回 日本消化器がん発生学会 (鹿児島)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米満 吉和 (YONEMITSU, Yoshikazu)
九州大学大学院薬学研究院・教授
研究者番号: 40315065

(2) 研究分担者

原田 結 (HARADA, Yui)
九州大学大学院薬学研究院・助教
研究者番号：00608507

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者
()