

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20879

研究課題名(和文)細胞競合を標的とした新規がん治療薬・診断マーカーの開発

研究課題名(英文)The development of novel cancer therapeutic/diagnostic drugs targeting cell competition.

研究代表者

森田 智子(Morita, Tomoko)

北海道大学・遺伝子病制御研究所・客員研究員

研究者番号：10767750

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)：本研究は正常上皮細胞に囲まれた変異細胞が積極的に排除されるメカニズムである Epithelial Defense Against Cancer (EDAC)を促進する低分子化合物を同定することで、初期のがん治療につなげることを目的としている。本研究の結果、スクリーニングによって得られたヒット化合物(抗炎症薬)は既知の標的タンパク質を抑制することで産生物質を減少させ、EDACを促進していることが示唆された。また、抗炎症薬を投与した細胞競合モデルマウスでは、膵管上皮に留まるRasV12変異細胞が減少することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Epithelial Defense Against Cancer (EDAC) is a mechanism by which normal epithelial cells actively exclude transformed cells developed among them. This study aims to identify small molecule compounds that promote EDAC, leading to the treatment of early stages of cancer. In this study, we conducted high-throughput screening and discovered that several hit compounds (anti-inflammatory drugs) that promote EDAC. We also found that these drugs potentiate EDAC by inhibiting known target molecules. Furthermore, we revealed that the administration of anti-inflammatory drugs to cell competition mouse model resulted in the decrease of RasV12 transformed cells remaining in the pancreatic duct epithelium.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞競合 抗がん物質探索 創薬 癌 細胞・組織 スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

がんの80%以上が肺・胃・大腸など上皮細胞において生じ、その発生はがん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異を伴い、多段階的に移行する。がん発生の超初期段階において、変異細胞は正常細胞に囲まれた状態で成長するが、正常細胞と変異細胞の境界で何が起きているのかに関してはほとんど解明されていない。近年の研究から、正常細胞と変異細胞で生存を争う現象「細胞競合」が起こり、勝者が敗者を組織から排除することが明らかになってきた。例えば、がんタンパク質 RasV12 変異細胞が正常上皮細胞に囲まると RasV12 変異細胞のシグナル伝達に様々な変化が生じて上皮細胞層から排出される(Hogan, C. et al. Nature Cell Biology, 2009)。また、がんタンパク質 v-Src 変異細胞と正常上皮細胞の間でも同様の競合現象が起きる(Kajita, M. et al. Journal of Cell Science, 2010)。さらに、当研究室は免疫細胞を介さず、正常細胞が隣接するがん変異細胞を積極的に排除する現象を Epithelial Defense Against Cancer (EDAC) と名付け、その分子メカニズムを解明してきた。しかしながら、ごく初期のがん治療に有効であると考えられる EDAC を誘導する分子は未知のままである。

2. 研究の目的

上述したように、EDAC を促進することで正常細胞のがん変異細胞排除能を亢進させる効果、あるいは、がん変異細胞の防御機能を減退させることが出来れば、従来とは全く作用機序の異なる、ごく初期のがん治療・増悪化の予防につながると考えられる。そこで、当研究室で確立したハイスループットスクリーニングのシステムを応用して、EDAC を促進する低分子化合物を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ハイスループットスクリーニングによる低分子化合物の探索

正常上皮細胞としてイヌ腎臓尿管上皮細胞である非形質転換型 MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞、蛍光標識変異細胞としてテトラサイクリン発現誘導性 MDCK-pTR GFP-RasV12 細胞を用いる。この2種類の細胞をそれぞれ 10:1 の割合で混合し、一層の細胞層を形成した後にテトラサイクリンを添加してがんタンパク質 RasV12 の発現を誘導する。これにより、新たに生じた変異細胞が正常細胞に囲まれているというがん発生初期の環境を模倣した条件を構築する。正常細胞と変異細胞をマイクロプレート上で共培養し、一定時間後にハイコンテツ細胞イメージングシステムにて、蛍光顕微鏡像から GFP 蛍光強度を測定することにより、正常細胞に囲まれた変異細胞への影響を調べる。本研究では段階的にヒ

ット化合物を選抜することで、多量の低分子化合物を効率良く網羅することができる。最終的にヒットとする化合物は、細胞イメージングシステムにて得られた GFP 蛍光強度がコントロールの平均と比較して 20%以上減弱すること、正常細胞と変異細胞の混合培養時に特異的に作用することとした。また、再現性を確認し擬陽性や非特異性作用を持つ化合物は排除した。

(2) 低分子化合物ライブラリーと誘導体の新規合成

東京大学 創薬機構のフルライブラリー(約 170,000 化合物)、金沢大学 がん進展制御研究所の薬剤ライブラリー(約 2,200 化合物)、北海道大学 創薬科学研究教育センターの化合物ライブラリー(約 3,000 化合物)を用いてスクリーニングを行った。ヒット化合物に関しては、北海道大学 創薬科学研究教育センターと連携し、類縁体化合物の新規合成を行った。

(3) *in vitro* におけるヒット化合物の EDAC 促進効果の検討

ヒット化合物の標的タンパク質ノックアウト細胞を作製し、Ras 変異細胞の排除効率を計測した。さらに、標的タンパク質が産生する物質は ELISA 法を用いて培養上清中の濃度を測定すること、あるいは細胞培養時に添加実験を行うことで EDAC 誘導への関与を検討した。

(4) *in vivo* におけるヒット化合物の Ras 変異細胞の排除効率の検討

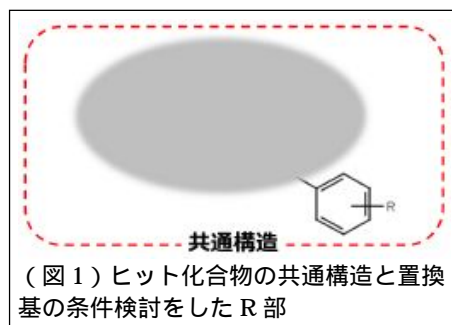
当研究室で確立した膵臓・腸管・肺気管上皮においてタモキシフェン投与によりモザイク状に RasV12 変異細胞を発現する「細胞競合モデルマウス」を用いて、膵管上皮の Ras 変異細胞排除効率を計測した。

4. 研究成果

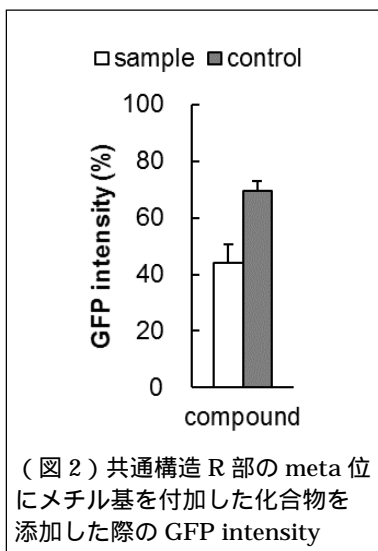
(1) ハイスループットスクリーニングによって得られたヒット化合物群

約 180,000 化合物のスクリーニングを終了し、得られたヒット化合物は機能未知化合物群、抗炎症薬群、脂質異常症治療薬群の大きく 3 群に分類できた。機能未知化合物群は共通する構造を有していたことから、この共通構造を基に誘導体を合成し、EDAC 促進効果

の検討を行った (図 1、未発表データ)。



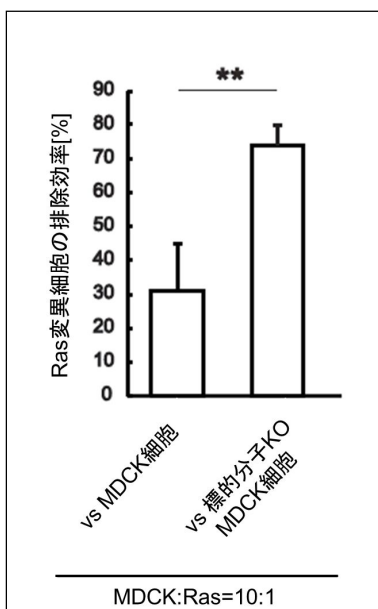
MDCK 細胞とテトラサイクリン発現誘導性 MDCK-pTR GFP-RasV12 細胞を 10:1 の割合で混合し、単層の細胞層を形成した後にテトラサイクリンと同時に新規に合成した誘導体を添加した。最も効果的に GFP-RasV12 細胞を減少させたのは、共通構造 R 部の meta 位にメチル基を付加した化合物であり、コントロールと比較して、GFP-RasV12 細胞を約 25% 減少させる効果を有することが明らかになった(図 2、未発表データ)。この結果をもとに、今後 *in vivo* の系でも EDAC 促進効果を発揮するのか検討する。



(2) ヒット化合物として同定された抗炎症薬を介した標的タンパク質とその産生物質の EDAC への関与の検討

ヒット化合物として同定された抗炎症薬は標的既知の化合物であったため、標的タンパク質が EDAC に関与するか当研究室の佐藤がノックアウト細胞を作製して検討を行った。すると、MDCK 細胞と Ras 変異細胞の混合条件と比較して、標的タンパク質のノックアウト MDCK 細胞

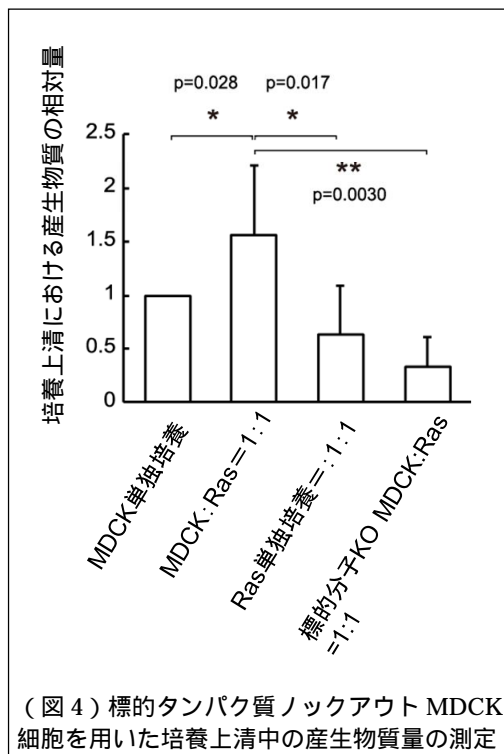
と Ras 変異細胞の混合条件では Ras 変異細胞の排除効率が約 30% から約 70% に増加していることが明らかとなった(図 3、未発表データ)。この結果から、抗炎症薬が標的タンパク質を抑制することで EDAC を誘導している可能性が示唆された。さらに、標的タンパク質が産生する物質の量が EDAC 亢進時にどのように変化するのか、



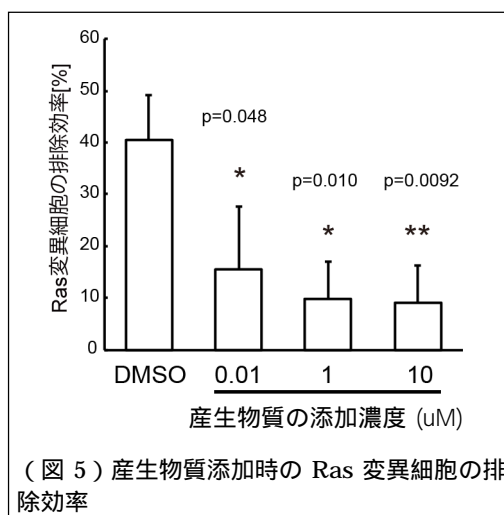
(図 3) 抗炎症薬の標的タンパク質ノックアウト細胞を用いた Ras 変異細胞の排除効率の評価

培養上清サンプルを用いて

ELISA 法で計測した。標的タンパク質が産生する物質は、MDCK 細胞単独培養時と比較して、MDCK 細胞と Ras 変異細胞の混合培養時に約 1.5 倍増加することが明らかになった。また、標的タンパク質ノックアウト MDCK 細胞と Ras 変異細胞の混合培養時に



は約 3/10 量に減少することが明らかになり、EDAC 亢進時には標的タンパク質が産生する物質が減少していることが示された(図 4、未発表データ)。これらの結果から、産生物質を培養上清に添加することで EDAC が抑制されるかを確認するための実験を行った。すると、産生物質 0.01 μ M 添加時にコントロールと比較して Ras 変異細胞の排除効率が



約 40% から約 15% と優位に低下することが明らかになった(図 5、未発表データ)。これらの結果から、抗炎症薬が標的タンパク質を抑制することで、標的タンパク質が産生する物質量が減少し、EDAC が亢進する可能性を

見出した。

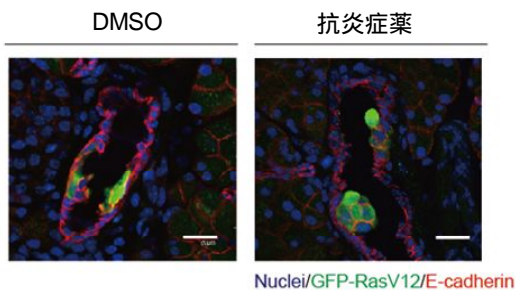
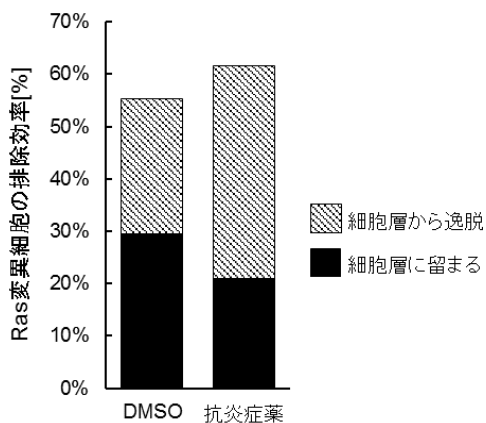
(3) *in vivo*における抗炎症薬のRas 変異細胞の排除亢進効果

*in vitro*で得られた抗炎症薬のEDAC 促進効果が、*in vivo*にも応用できるか細胞競合モデルマウスを用いて検討を行った(図6)。タモキシフェンを投与した3日後、モザイク状にGFP-RasV12 変異細胞を発現させた状態で



(図6) 細胞競合モデルマウスの模式図

抗炎症薬 0.5 mg/ml in 0.5% DMSO を飲水に混ぜて投与し、4 日後に膵臓を採取して膵管上皮における変異細胞の排除効率を計測した。コントロール群と比較して、抗炎症薬を投与したマウス群では細胞層に留まる Ras 変異細胞が約 30%から約 20%へと優位に減少し、Ras 変異細胞の排除が亢進していることが明らかになった(図7、未発表データ)。*in vitro*と*in vivo*の実験で得られた結果から、ヒット化合物として得られた抗炎症薬は細胞競合モデルマウスにおいても標的タンパ



(図7) 細胞競合モデルマウスの膵管上皮におけるRas 変異細胞の排除効率と組織切片像

ク質を抑制することで、標的タンパク質が産生する物質量を抑制し、EDAC 促進による

Ras 変異細胞の排除を亢進している可能性が示唆された。

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0件)

[学会発表](計2件)

1. 森田 智子, 山岡明広, 菅沼瞳, 丸山剛, 藤田 恭之. “正常細胞の抗腫瘍能を促進する低分子化合物の探索” 第6回細胞コキウム, 札幌, 2017年3月. (ポスター発表・査読なし)

2. Morita, T., Fujita, Y. “The development of new cancer drugs that target the cell competition.” 2nd International Symposium on Cell Competition, Kyoto, Japan, Apr., 2016. (口頭発表・査読なし)

[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

<http://www.igm.hokudai.ac.jp/oncology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森田 智子 (MORITA, Tomoko)
北海道大学・遺伝子病制御研究所・
客員研究員
研究者番号: 10767750

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者
該当なし