

令和 2 年 4 月 6 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15125

研究課題名(和文) Amigo2を標的とした肝転移予防薬の決定

研究課題名(英文) Determination of Amigo2 targeting preventive agents for liver metastasis

研究代表者

神田 裕介 (Kanda, Yusuke)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・特任研究員(シニア・リサーチフェロー)

研究者番号：80803949

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)：がん転移予防薬の開発はがん患者の予後改善に繋がることが期待される。以前に、細胞間接着分子のAmigo2が肝転移のドライバー遺伝子として機能することを報告している。そこで、Amigo2発現に必要なシグナル分子に対する阻害剤は肝転移を予防できるとの着想に基づき、既に先行研究により見出していたAmigo2発現を減少させる6種類の阻害剤を用いて、肝転移予防効果を検討した。その結果、いずれの阻害剤も肝転移を抑制した。これらの成果は、Amigo2発現を減少させるシグナル分子阻害剤によって肝転移を予防できることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝転移予防薬の開発は、がん患者の予後を改善する上で重要な課題である。本研究で得られた成果は、Amigo2発現を抑制する複数種類のシグナル分子阻害剤が肝転移を抑制することを見出したものであり、既に承認済みの分子標的薬を活用したドラッグリポジショニングによる臨床応用への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：Development of preventive drugs for metastasis is expected to improve the prognosis of cancer patients. Previously, we identified Amigo2 as a driver gene involved in liver metastasis. Based on the idea that the signaling pathway-inhibitors required for Amigo2 expression may prevent liver metastasis, we evaluated the preventive effect of six kinds of Amigo2 inhibitors, which were found in our previous study, on liver metastasis. Each inhibitor decreased the metastasis. These results suggest that signaling molecule inhibitors, which decrease Amigo2 expression, could prevent liver metastasis.

研究分野：がん転移

キーワード：肝転移予防 Amigo2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん転移患者の半数以上に肝臓への転移が認められる。肝転移は肝機能を損なうのみならず、生命維持を司る脳や肺への転移の要因となるため、患者の予後は一般に不良である。従って、肝転移を予防することができれば予後改善に結びつくことが期待される。しかし、現在までに肝転移の予防法は確立されていない。その理由としては治療標的となり得る肝臓への転移を決定するドライバー遺伝子が同定されていなかった背景がある。

そこで、肝転移のドライバー遺伝子の同定を試みた。肝転移の乏しいマウス線維肉腫細胞(親株)を脾臓内移植し形成される肝転移結節からの細胞樹立と樹立株の脾臓への再移植を12回行った。その結果、高い肝転移能を有するLV12細胞を取得した。LV12細胞は親株と比較して細胞間接着分子のAmigo2が高発現していた。Amigo2のノックダウンにより、肝血管内皮細胞への接着性が低下し、肝転移も減少した。親株にAmigo2を強制発現させると肝転移能が亢進したため、Amigo2は肝血管内皮細胞への接着を介して、肝転移を引き起こすドライバー遺伝子であることを報告した(Kanda et al. Sci Rep 2017)。

Amigo2を標的とした肝転移予防薬の開発に向けて、平成29年度に研究活動スタート支援の採択を受け、Amigo2発現を減少させるシグナル分子阻害剤の探索を行った。新学術領域研究の先端モデル動物支援プラットフォーム・分子プロファイリング支援活動班より提供された標準阻害剤キットを用いて、培養条件下でLV12細胞のAmigo2発現を減少させた候補阻害剤を6種類選択した。

候補化合物を処理したLV12細胞の肝血管内皮細胞への接着アッセイを行い、接着阻害効果を検討した結果、いずれの化合物もLV12細胞の血管内皮細胞への接着を抑制した。既報の成果(Kanda et al. Sci Rep 2017)を勘案すると、Amigo2発現かつ肝血管内皮細胞への接着を抑制する薬剤は、肝転移を減少させることが想定されることから、6種類の候補化合物の中から真の肝転移予防薬を決定することを計画した。

2. 研究の目的

先行研究において見出したAmigo2発現を減少させる6種類の候補化合物がそれぞれ肝転移を抑制できるか否かをマウスモデルを用いて検討する。現在までにシグナル阻害分子標的薬による転移阻止の実証がなされていないため、当該研究により世界に先駆けた肝転移阻害剤を提示する意義は大きい。

3. 研究の方法

(1)細胞傷害を与えない添加濃度の検討

LV12細胞を96-well plateに播種した翌日に各候補化合物を8点の濃度範囲で添加した。添加24時間後から72時間後まで24時間毎にグルタルアルデヒド固定を行った。クリスタルバイオレット染色後に酢酸抽出バッファーで溶出し、各wellの595nmの吸光度を測定した。

(2)候補化合物のLV12細胞の脾臓内移植による肝転移の抑制効果の評価

肝転移の評価は、既に作製済みのルシフェラーゼ遺伝子を導入したLV12細胞(LV12-Luc細胞)を用いた。LV12-Luc細胞に細胞傷害を与えない濃度で候補化合物を添加し、24時間培養した。候補化合物を処理したLV12-Luc細胞(1×10^6 個)を脾臓内に移植した。移植後に脾臓内での腫瘍増殖を防ぐために摘脾した。移植7日目において、ルシフェリン投与後に肝臓を摘出し、転移の程度をIVIS imaging systemを用いて発光量を測定した後、肝表面の転移結節数を測定した。

さらに、肝組織切片を作製しH&E染色を行った。得られた組織切片をオールインワン蛍光顕微鏡(キーエンス)で撮影し、その画像をキーエンス社製の解析アプリケーション(ハイブリッドセルカウントBZ-H3C)で解析した。1切片当たりの転移巣数を求めた後に、その数を肝組織切片全

体の面積で割り、単位面積当たりの転移巣数の割合を算出した。

(3)HCT116 ヒト大腸がん細胞株へのルシフェラーゼ遺伝子の導入

HCT116 細胞にルシフェラーゼ遺伝子を強制発現させた(HCT116-Luc 細胞)。ルシフェラーゼの遺伝子発現を検討するためにプレートリーダーを用いて発光を確認した後、細胞保存を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞傷害を与えない添加濃度の検討

LV12 細胞に各候補化合物につき 8 点の濃度範囲で添加培養を行った。添加 72 時間後も細胞傷害性が認められなかった濃度を決定し、以後の移植実験には決定した濃度を用いた。

(2) 候補化合物の LV12 細胞の脾臓内移植による肝転移の抑制効果の評価

LV12-Luc 細胞に各候補化合物を添加した 24 時間後に細胞を回収し、C57BL/6 マウスの脾臓内に移植した。移植 7 日後において肝臓を摘出し、IVIS imaging system によって肝臓の ex vivo imaging を行った。その結果、非添加群では高い発光が観察されたが、候補化合物で処理した LV12-Luc 細胞ではほとんど観察されなかった。発光シグナルを定量したところ、非添加群と比較して各候補化合物の添加群では約 75-87%低下していた。肝表面の転移結節数についても候補化合物の添加群では約 50-75%の減少が認められ、ex vivo imaging と同様の結果が得られた。

さらに、肝組織切片を作製し、H&E 染色像を観察した。組織学的に、LV12-Luc 細胞は肝実質内に浸潤性の転移巣を多数形成していた。一方、候補化合物を添加した LV12-Luc 細胞の転移巣は門脈壁周辺にごく僅かにしか形成されていなかった。1 mm² 当たりの転移巣数を測定した。その結果、非添加の LV12-Luc 細胞では約 2.3 個であるのに対し、候補化合物で処理した LV12-Luc 細胞では、約 0.3-0.6 個であり、有意に転移巣数が減少していた。

(3) HCT116 ヒト大腸がん細胞株へのルシフェラーゼ遺伝子の導入

胃がんおよび大腸がん患者の Amigo2 高発現は、共通して予後不良と関連するのみならず、原発組織と比較して肝転移組織で増加しているため、マウスのみならずヒトにおいても肝転移を決定する分子であることが予想される (Kanda et al. Sci Rep 2017)。従って、ヒト胃がん細胞および大腸がん細胞の自然肝転移モデルを用いることで、候補化合物の肝転移予防効果について種を越えて実証することが可能となる。

ヒトがん細胞の移植実験には、KKLS 胃がん細胞株と HCT116 大腸がん細胞株を用いる。KKLS 胃がん細胞と HCT116 大腸がん細胞は同所移植によりそれぞれ 100%および 53%の頻度で肝転移することが知られており (Cancer 77 Suppl: 1676-1680, 1996., Oncogene 33: 5332-5340, 2014.)、本研究で見出した候補化合物の肝転移抑制効果を評価する実験系に適していると考えられる。

肝転移を定量的に評価するためにルシフェラーゼ遺伝子を、HCT116 細胞に導入した(HCT116-Luc 細胞)。細胞保存は完了している。

今後の予定としては、取得した HCT116-Luc 細胞の免疫不全マウスの盲腸壁内への移植による肝転移実験を行い、各候補化合物の転移抑制効果を評価する。さらに、KKLS 胃がん細胞についてもルシフェラーゼ遺伝子を導入した後に、胃壁内への同所移植による肝転移実験を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kanda Yusuke, Kawaguchi Tokuichi, Osaki Mitsuhiko, Onuma Kunishige, Ochiya Takahiro, Kitagawa Tomoyuki, Okada Futoshi	4. 巻 67
2. 論文標題 Fascin protein stabilization by miR-146a implicated in the process of a chronic inflammation-related colon carcinogenesis model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Inflammation Research	6. 最初と最後の頁 839 ~ 846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00011-018-1175-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神田裕介
2. 発表標題 肝転移のドライバー分子の決定（第22回研究奨励賞受賞記念講演）
3. 学会等名 第27回 日本がん転移学会 学術集会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 神田裕介、塩川大介、酒井宏晃、岡本康司
2. 発表標題 ヒト大腸がんオルガノイドにおける休止型がん幹細胞の発現プロファイルの解析
3. 学会等名 第3回がん三次元培養研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----