

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：35403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09904

研究課題名(和文) 三次元腫瘍オルガノイド評価系により見出された新規癌転移抑制化合物の創薬展開

研究課題名(英文) Development of novel cancer metastasis-suppressing drugs identified using a three-dimensional tumor organoid evaluation system

研究代表者

十川 千春 (Sogawa, Chiharu)

広島工業大学・生命学部・教授

研究者番号：10253022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：癌の悪性化には癌細胞を取りまく腫瘍微小環境が影響するといわれ、癌細胞のみならず腫瘍関連細胞から放出されるエクソソームを含む細胞外小胞が細胞間情報伝達の担い手として注目されている。本研究では、これまでに独自の多元薬物評価系によって見出したヒット化合物のさらなるブラッシュアップのため、ヒット化合物の標的分子の探索と、癌細胞あるいは免疫系細胞が放出するEV動態を評価可能なアッセイ系の開発を行った。蛍光および発光レポーター細胞を用いたEVモニタリングを検討し、EV動態に影響を及ぼす薬剤のスクリーニングのために有用なEV定量化につながる標識EVアッセイ系を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腫瘍微小環境を構成する線維芽細胞や免疫系細胞と癌細胞とのコミュニケーションの担い手としてエクソソームは注目されている。また、近年、患者の血液を献体とするリキッドバイオプシーが、頻回且つ簡単に腫瘍の状態を評価できるとして注目されており、その対象として、エクソソームの解析が盛んである。本研究において開発に着手した、エクソソームを含む細胞外小胞の動態を評価可能なアッセイ系は今後さらに確認と改良が必要であるが、癌細胞のみならず腫瘍微小環境に対する効果を検討可能とした点において学術的意義および社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：The tumor microenvironment surrounding cancer cells influences the malignant progression of cancer. Extracellular vesicles (EVs), including exosomes released from cancer and tumor-related cells, have attracted attention as carriers of intercellular signaling. In this study, we explored the target molecules to evaluate the antitumor drugs discovered by our drug evaluation system. We also developed an assay system capable of evaluating the dynamics of EVs released by cancer cells or immune cells. We investigated EV monitoring using fluorescent and luminescent reporter cells. The labeled EV assay system we developed was considered to be useful for screening drugs that affect EV dynamics.

研究分野：薬理学

キーワード：抗腫瘍薬 細胞外小胞 エクソソーム 腫瘍オルガノイド MMP9 三次元培養 薬剤スクリーニング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本人の半数が一生に一度は癌に罹患し、三分の一は癌で死亡する。癌の悪性化、転移および再発を制御することが可能となれば、癌患者の QOL および生存率は飛躍的に向上すると考える。抗腫瘍薬は、近年、様々なタイプの分子標的薬が新薬として承認されてきており、臨床で優れた効果を示している。しかしながら、現存の抗腫瘍薬では治療しきれっていないのが現状であり、癌の悪性化、転移および再発を制御するには、それらの分子機序の解明と有効な抗腫瘍薬の開発が不可欠である。

さらに、近年、癌の悪性化には癌細胞を取りまく腫瘍微小環境が影響するといわれている。エクソソームは直径 50-200 nm の細胞外小胞 (Extracellular vesicle: EV、以下 EV) の一種で、腫瘍微小環境を構成する癌関連性線維芽細胞や癌関連性マクロファージなど腫瘍微小環境を構成する細胞と癌細胞とのコミュニケーションの担い手となっているとの報告が多数ある。このような腫瘍微小環境を制御する因子も抗腫瘍薬の標的分子の候補に入れた検討が必要であり、エクソソームを含む EV の動態へ影響を与える因子はその候補の一つと考えられる。

2. 研究の目的

これまで、癌細胞浸潤・遊走、血管新生を促進する癌転移促進因子である Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9) プロモーター誘導性蛍光レポーター細胞を三次元腫瘍オルガノイドモニタリング¹⁾に応用することで、癌幹細胞性と癌浸潤転移能が同時に評価可能な独自の多元薬物評価系を確立し、既存薬スクリーニングを実施してきた^{1), 2)}。本研究では、先の研究において腫瘍転移抑制効果を確認したヒット化合物のさらなるブラッシュアップのため、ヒット化合物の作用機序解明による標的分子の同定と、癌細胞あるいは腫瘍微小環境を構成する細胞から放出されるエクソソームを含む細胞外小胞動態に対する効果を評価可能な高次アッセイ系を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) データベースを用いたヒット化合物の標的分子探索

先の研究において抗腫瘍効果を報告してきた **Benztropine** について Web 公開データベース (KEGG, Drug Bank, Binding DB, ChEMBL, STRING) を用いてターゲット分子の探索を行った。ターゲットとして挙げられた分子について、様々な癌臨床データのゲノムや変異情報などを公開している The Cancer Genome Atlas を収載し遺伝子ごとの解析が可能なデータベースである cBioPortal にて癌との関連性を調査した。さらに、**Benztropine** とターゲット分子の結合は、myPresto portal (分子シミュレーション計算ソフトウェア) を用いて検討した。

(2) 腫瘍細胞および免疫系細胞が分泌する細胞外小胞 (Extracellular Vesicles: EV) モニタリングのためのアッセイ系の開発

(i) 蛍光およびルシフェラーゼ発現細胞の作製

放出あるいは取込み EV を定量可能な標識 EV を得るために、Dr.C.P.Lai より提供を受けたレンチウイルスレポーターコンストラクトを用いて、脂質膜結合性の高いパルミトイル化シグナルを GFP 及び Tomato 直列二量体の N 末端に融合させることで、細胞及び細胞外小胞の脂質膜を蛍光標識した³⁾。また、*Gaussia* ルシフェラーゼを細胞膜および小胞膜に発現させることにより、EV のルシフェラーゼ標識を行った^{4), 5)}。レンチウイルスレポーターコンストラクトは HEK293T 細胞に導入し、さらにスピニング法によって癌細胞 (HSC-3-M3: ヒト舌癌由来細胞株) と免疫系細胞 (THP-1: ヒト白血病細胞由来単球細胞株) に対して遺伝子導入を行った。定常発現細胞を得るため、ピューロマイシンによる選別と限界

希釈法により、シングルセルクローンから定常発現細胞を得た。

(ii) EV の精製

HSC-3-M3 は通常培地で培養後 80%コンフルエントに達した後、無血清培地に置換し 2 日間培養後に培養上清を回収した。THP-1 は PMA でマクロファージ様細胞へと分化させた後、無血清培地で 2 日間培養後に細胞培養上清を回収した。回収培養上清をポアサイズ 200 nm のフィルターを通すことで直径 200nm 以上の小胞を除き、次いで限外濾過カラムを用いて濃縮した。培養上清濃縮液からエクソソーム抽出試薬(Thermo)を用いて EV を沈殿させ、PBS(-)に懸濁して EV 画分とした。EV 画分に含まれる小胞の形態は透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて確認した。さらに EV 精製カラム(qEVoriginal70: IZON Science)を用いて粒子径サイズにより分画した。

(iii) 放出 EV の定量

放出 EV に由来するルシフェラーゼ活性は、*Gaussia luciferase glow kit* (Pierce)を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) データベースを用いたヒット化合物の標的分子探索

これまでに見出したヒット化合物 *Benztropine* の作用として、 β カテニン不安定化、NF- κ B 及び STAT3 のリン酸化抑制による MMP9 発現抑制ならびに癌幹細胞マーカー CD326 発現抑制を報告してきたが、その細胞膜タンパク質のターゲット候補として SLC6A3(dopamine transporter)を有力候補としてきた²⁾。ChEMBL の解析結果により、これまで報告のある *Benztropine* のターゲットの他ニコチン性アセチルコリン受容体サブタイプなどが挙げられ、ターゲット候補 17 分子のうちで上皮癌の臨床データにおいて増幅変異率が比較的高い分子は SLC6A3 の他、CHRNA4 (neuronal acetylcholine receptor protein alpha-4)と HTR2A (serotonin 2a receptor)であった。しかしながら分子ドッキング法では、*Benztropine* への結合は CHRM3(muscarinic acetylcholine receptor M3)以外確認できなかった。また、STRING による解析や KEGG パスウェイに照らし合わせた解析より SLC6A3 および、CHRNA、HTR2A とタンパク質相互作用のある候補分子として JAK や CAMK が挙げられ、これらの分子を介する MMP9 の発現制御が細胞内シグナル伝達経路として推測された。

(2) 腫瘍細胞および免疫系細胞が分泌する EV モニタリングのためのアッセイ系の開発

樹立したレポーター細胞において、蛍光標識 EV の確認と蛍光 EV の細胞内への取り込みが確認さ

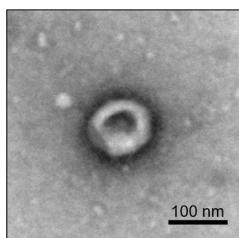


図1 EVのTEM画像

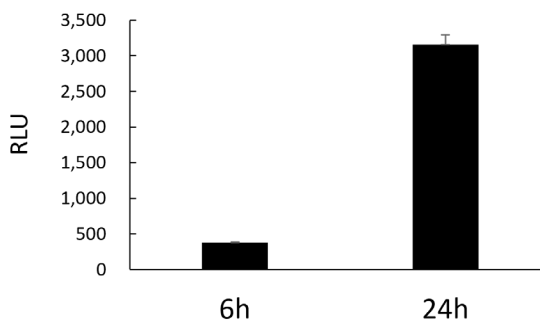


図2 培養上清中のルシフェラーゼ活性経時変化

れた。HSC-3-M3 細胞から放出される EV 画分の TEM 画像を確認した。粒子径 50-200nm 付近の細胞外小胞が TEM により観察された。代表的な EV 像を図1に示した。ルシフェラーゼ標識した HSC-3-M3 培養上清中 (20 μ L) のルシフェラーゼ活性は培養時間に依存して上昇していた(図2)。ルシフェラーゼ標識 EV は EV モニタリングアッセイ系に適していると考えられ、さらに放出 EV の定量化を検討した結果、精製 EV 画分におけるルシフェラーゼ活性は検出限界以下であった。THP-1 細胞の培養上清についても培養時間に依存してルシフェラーゼ活性の上昇がみられたが、精製 EV 画分においてルシフェラ

ーゼ活性を測定することができなかった。さらに、EV 精製カラムを用いて粒子径サイズにより細かく分画し、画分毎にルシフェラーゼ活性を測定したところフラクション (Fr.) 13~22 にルシフェラーゼ活性がみとめられ(図3)、粒子径解析によりそれらのフラクションには径 10-70nm の小胞が含まれることがわかった。腫瘍細胞同様 EV 精製過程においてルシフェラーゼが EV から外れた可能性と、EV が放出後に切断された可能性が考えられた。

一方、興味深いことに、マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞由来 EV 画分では、粒子径 80-300 nm の CD9 陽性の large exosome (Exo-L) と、粒子径 10-70 nm の CD63/HSP90 陽性の small exosome (Exo-S) が得られ、それらは HSC-3 ヒト舌癌細胞の生存率を低下させた⁶⁾。以上のことから、マクロファージ様細胞における Exo-L あるいは Exo-S の分泌を促進する薬剤が抗腫瘍作用を発揮する可能性が高く、Exo-L および Exo-S のモニタリングが重要であると考えられる。本研究で取組んだルシフェラーゼ標識 EV によるアッセイ系はさらなる確認と改良が必要であるが、Exo-S 画分の定量化に有用である可能性が示唆された。さらに Exo-L を定量可能なアッセイ系の検討が必要である。EV モニタリングのためのアッセイ系の開発が研究期間内に完了できず、薬剤評価まで着手することが出来なかった。

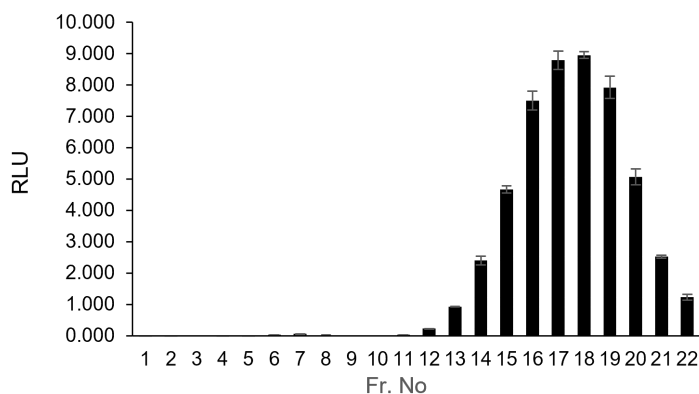


図3 EV精製カラム溶出フラクション(Fr.)毎のルシフェラーゼ活性

参考文献

- 1) Sogawa C, Eguchi T, Okusha Y, *et al.*: *Tissue Engineering Part A*, 25(19-20):1413-1425 (2019)
- 2) Sogawa C, Eguchi T, Tran MT, *et al.*: *Cancers (Basel)*, 12: 523 (2020)
- 3) Lai CP, Kim EY, Badr CE, *et al.*: *Nat Commun*, 13(6):7029 (2015)
- 4) Lai CP, Mardini O, Ericsson M, *et al.*: *ACS Nano*.28; 8(1):483-494 (2014)
- 5) Zaborowski MP, Cheah PS, Zhang X, Bushko I, *et al.*: *Sci Rep*, 9 (1): 17387 (2019)
- 6) Lu Y, Eguchi T, Sogawa C, *et al.*: *Cells*,10:1328 (2021)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Feng Y, Tran MT, Lu Y, Htike K, Okusha Y, Sogawa C, Eguchi T, Kadowaki T, Sakai E, Tsukuba T, Okamoto K.	4. 巻 40 (3)
2. 論文標題 Rab34 plays a critical role as a bidirectional regulator of osteoclastogenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Biochem Funct	6. 最初と最後の頁 267-277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbf.3691	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tran MT, Okusha Y, Feng Y, Sogawa C, Eguchi T, Kadowaki T, Sakai E, Tsukuba T, Okamoto K	4. 巻 40 (8)
2. 論文標題 HSP90 drives the Rab11a-mediated vesicular transport of the cell surface receptors in osteoclasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Biochem Funct	6. 最初と最後の頁 838-855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cbf.3745	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Lu Y, Eguchi T, Sogawa C, Taha EA, Tran MT, Nara T, Wei P, Fukuoka S, Miyawaki T, Okamoto K	4. 巻 10
2. 論文標題 Exosome-Based Molecular Transfer Activity of Macrophage-Like Cells Involves Viability of Oral Carcinoma Cells: Size Exclusion Chromatography and Concentration Filter Method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10061328	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tran MT, Okusha Y, Feng Y, Sogawa C, Eguchi T, Kadowaki T, Sakai E, Tsukuba T, Okamoto K	4. 巻 1868
2. 論文標題 A novel role of HSP90 in regulating osteoclastogenesis by abrogating Rab11b-driven transport	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Res	6. 最初と最後の頁 2384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbamcr.2021.119096	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 -

1. 著者名 Sogawa C, Eguchi T, Namba Y, Okusha Y, Aoyama E, Ohyama K	4. 巻 10
2. 論文標題 Gel-free 3D tumoroids with sm cell properties modeling drug resistance to cisplatin and imatinib in metastatic colorectal cancer.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 344
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10020344	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	岡元 邦彰 (Okamoto Kuniaki) (10311846)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究分担者	江口 傑徳 (Eguchi Takanori) (20457229)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究分担者	河合 穂高 (Kawai Hotaka) (10803687)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究分担者	青山 絵理子 (Aoyama Eriko) (10432650)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------