

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12684

研究課題名(和文)3次元培養系を利用したがん幹細胞性・薬剤耐性に対する抗がん性高分子の高機能化

研究課題名(英文)Development of functionalized anticancer polymers against cancer stem cells and drug resistant cancer cells utilizing 3D culture system

研究代表者

高橋 治子(Takahashi, Haruko)

広島大学・統合生命科学研究科(理)・助教

研究者番号：70775767

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、固形がんの深部に存在しがんの悪性化(転移や再発等)の原因である、幹細胞性・薬剤耐性のがん細胞に対して効果を示す新規抗がん性高分子の開発を目的とした。生体内のHost Defense Peptide(HDP)の物理化学的性質を模倣した膜活性型合成高分子を設計・合成し、特異的な抗がん活性発現する最適な分子構造を同定した。また、がんスフェロイドの周囲にがん間質細胞を配した3次元in vitro固形がんモデルの確立し、本系を用いて抗がん性高分子有効性の評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生体のペプチドを模倣した設計により、固形がんの深部まで到達し、既存の抗がん薬が効かないがん細胞にも有効な新しい抗がん性高分子の開発を行った。本研究期間で、ポリマーデザインの最適化を行うとともに、ポリマーの有効性を評価するため3次元in vitro固形がんモデルを確立し、画像解析技術と組み合わせることで定量的に評価可能なことを実証できた。本研究で開発した抗がん性ポリマーは従来の抗がん薬とは異なり、がん細胞膜に直接作用する高分子ならではの機能により抗がん活性を示すため、次世代の抗がん剤として利用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop novel anti-cancer polymers that are effective against stem cell- and drug-resistant cancer cells, which are the cause of malignant transformation (metastasis, recurrence, etc.) of solid tumors. We designed and synthesized membrane-active synthetic polymers that mimic the physicochemical properties of host defense peptide (HDP), and identified the optimal molecular structure for specific and selective anti-cancer activity. We also established an 3D in vitro solid tumor model in which cancer stromal cells are co-cultured around cancer spheroids, and evaluated the efficacy of synthesized anticancer polymers using this system.

研究分野：Biofunctional materials

キーワード：抗がん性高分子 3次元in vitroがんモデル

### 1. 研究開始当初の背景

固形がんは、血液以外の様々な臓器において塊をつくりながら増殖するがんの総称であり、がん全体の8割以上を占める。固形がんは遺伝子的・機能的に不均一ながん細胞から成るのに加え、がん間質中に間葉系や血管系など種々の細胞や細胞外基質も存在するため、全体として非常に複雑な組織構造を有している[Curigliano *et al.*, *Cancer Treat. Rev.*, 2018]。また、がん細胞は一般的に異常な増殖能を獲得した細胞であるが、細胞増殖をしない休眠(ドーマント)状態もとることが知られている[Polyak *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, 2012]。従来の抗がん薬は主に活発に増殖を続けるがん細胞を標的とするため、休眠状態のがん細胞に対する奏効性は低いとされている。さらに、休眠状態で存在するがん細胞の一部(がん細胞集団の0.05-1%程度)は、自己複製能と多分化能を特徴とする幹細胞性を発現している(=がん幹細胞)と言われており、分化や異常増殖に伴った形質転換により、化学・放射線療法に対する耐性を獲得する[Longley *et al.*, *Nat. Rev. Cancer*, 2013]。不均一ながん組織の深部にわずかに存在する、幹細胞性や薬剤耐性を獲得した休眠状態のがん細胞は、長期間体内に潜伏した後、再発や転移など悪性化を引き起こすことから、これらのがん細胞に対して有効な抗がん剤の開発が喫緊の課題となっている。これまでに新規抗がん薬や、薬を効率的に送達するドラッグデリバリーシステムの開発研究が精力的に進められているが、固形がんの深部で眠る薬剤耐性・幹細胞性を獲得したがん細胞に対し、高い抗がん活性を示すにはどのようにすればよいか?という困難な課題に対する有用な解決策は、未だ得られていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、上記の課題を解決する①高いがん細胞選択性を示し、②固形がんの深部まで到達可能で、③幹細胞性・薬剤耐性を獲得したがん細胞にも有効な抗がん活性(メカニズム)を示す有効な高分子の設計指針を明らかとし、新規抗がん剤の創出を目的とした。我々はこれまでに、Host Defense Peptide (HDP)の物理化学的性質を模倣した抗がん性高分子が、がん細胞膜特異的に膜破壊を誘導し、抗がん活性を示すこと、この膜破壊機構は細胞の増殖状態に依存しないことから従来の抗がん薬が効かない休眠状態のがん細胞に対しても活性を有することを報告してきた[Takahashi *et al.*, *Sci. Rep.*, 2019]。本研究ではさらに、①がん細胞膜への特異的な標的指向性の向上(=がん組織への集積性向上および正常細胞への毒性の低減)と、②3次元ながん組織に対し、細胞膜を破壊しながら浸透し、深部への到達を達成する抗がん性高分子の高機能化と、3次元培養を利用した評価系の確立を目指した。

### 3. 研究の方法

- ① 内部に薬剤耐性・幹細胞性がん細胞を含有したがんスフェロイド(=がん組織のモデル)と、周囲に間葉系細胞(=がん間質のモデル)を配した**3次元 *in vitro* 固形がんモデルの確立**。本モデルシステムに抗がん性ポリマー(②で合成)を投与し、有効性評価(固形がん深部への到達度、薬剤耐性・幹細胞性がん細胞への抗がん活性、および正常細胞への毒性等の有効性評価を行った。
- ② HDPを模倣・改良した分子設計による、がん選択的に膜破壊可能な**高機能膜活性型高分子の合成と評価**。カチオン性・中性・疎水性モノマーの配合バランスを最適化し、がん細胞膜への標的性向上と正常細胞への毒性の低減への効果を検討した。その後、①での有効性評価を行った。

### 4. 研究成果

#### ①3次元 *in vitro* 固形がんモデルの確立

固形がんの状態をモデル化するためには、がん細胞のスフェロイドを、がん周辺に存在する間葉系細胞の中で共培養する必要がある。そこで、ディスク型のマイクロデバイスチップを用いた**3D *in vitro* がん-間質共培養システム**を開発した(図)。開発したディスクチップを用いて、I型コラーゲンゲル内でヒト肺がん細胞株 A549 細胞のスフェロイドと、正常肺線維芽細胞(NHLF)を共培養した。チップを円盤構造にすることにより、A549細胞のスフェロイドを高濃度の線維芽細胞と共培養することができ、ゲルの収縮は長期間(1ヶ月以上)見られなかった。

がんスフェロイドと共培養することにより、周辺に播種した正常ヒト肺線維芽細胞は、 $\alpha$ 平滑筋アクチン( $\alpha$ SMA)を高発現した活性化筋線維芽細胞(AMF)へと変化したことが、形態学および表現型の変化から示された。 $\alpha$ SMAの高発現は、がん関連線維芽細胞(CAF)の特徴としても良く知られている。CAF様AMFは、がんスフェロイドの境界部に不均一に出現したため、RT-qPCR法を

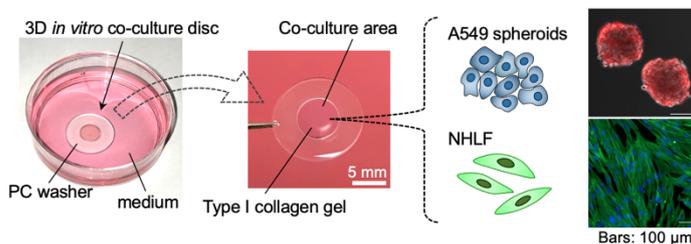


図. 開発した 3D *in vitro* がん-間質共培養システム

用いた標準的な遺伝子発現量評価では検出できなかった。そこで、形態と細胞動態の時空間的変化を、共焦点蛍光顕微鏡を用いた 3D タイムラプスイメージングによって可視化した。得られた画像を解析することで、変化の様子を観察するのみでなく、変化量を定量的に評価可能であることを示した。

さらに、共培養ディスクと画像解析を組み合わせることで、肺がんに関連する発がん物質であるニコチンや、特発性肺線維症の抗線維化・抗炎症剤であるピルフェニドンを添加した影響を定量的に評価し、発がん性物質や医薬品添加物の影響を検査可能な系であることを実証した。本システムは、がん化過程におけるがん組織構成細胞間の複雑なクロストークを解析する新たな可能性を提供し、がん化を誘導する物質の定量的評価や、がん化を予防・抑制する薬剤への応用への知見を提供するものである。

本研究の成果は、*Biomaterials Science* 誌に発表した[Takahashi *et al.*, *Biomater. Sci.*, 2021, 9, 4448]。

## ②高機能膜活性型高分子の合成と評価

メタクリロイル基の可逆的付加開裂連鎖移動(RAFT)重合により、側鎖にカチオン性基、中性基と疎水性基をもつカチオン性両親媒性ランダムコポリマーを合成した。合成したポリマーはヒト由来がん細胞株およびヒト初代正常培養細胞を用いて抗がん活性と毒性試験を行った。カチオン性側鎖の数が多い場合、正常細胞への非特異的な吸着が生じて毒性が見られたため、中性のヒドロキシル基をスペーサーとして挿入し、全体の分子量を維持しつつ、分子内のカチオン性基の数を減らすことで、高い抗がん活性と低い毒性の両立を目指した最適化を行った。

合成したポリマーを、①で開発した 3 次元 *in vitro* 固形がんモデルを用いて評価を行った。培養液中に蛍光標識した抗がん性高分子を添加し、イメージングによりがん組織深部へ浸潤する動態の観察と、画像解析によりがん選択的な縮退効果を定量的に評価した。現在、本研究の成果をまとめて投稿準備中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Haruko Takahashi, Daisuke Kawahara, Yutaka Kikuchi	4. 巻 14
2. 論文標題 Understanding Breast cancers through spatial and high-resolution visualization using imaging technologies	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4080
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14174080	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 Haruko Takahashi, Iva Sovadinova, Kazuma Yasuhara, Satyavani Vemparala, Gregory A. Caputo, Kenichi Kuroda	4. 巻 15
2. 論文標題 Biomimetic antimicrobial polymers - Design, characterization, antimicrobial and novel applications	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 WIREs Nanomedicine & Nanobiotechnology	6. 最初と最後の頁 e1866
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/wnan.1866	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 該当する
1. 著者名 Takahashi Haruko, Kikuchi Yutaka	4. 巻 9
2. 論文標題 3D in vitro co-culture disc for spatiotemporal image analysis of cancer-stromal cell interaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 4448 ~ 4458
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/d1bm00629k	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 Takahashi Haruko, Caputo Gregory A., Kuroda Kenichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Amphiphilic polymer therapeutics: an alternative platform in the fight against antibiotic resistant bacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomaterials Science	6. 最初と最後の頁 2758 ~ 2767
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0BM01865A	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Haruko Takahashi
2. 発表標題 Synthetic anti-cancer polymer therapeutics to target cancer cell membrane
3. 学会等名 3rd International Conference on Materials Science & Engineering (Materials2022) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruko Takahashi
2. 発表標題 Disc-type 3D in vitro cancer modeling system for spatiotemporal visualization of cell-cell interaction
3. 学会等名 2nd International Congress of Asian Oncology Society, Seoul, Korea (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Haruko Takahashi, Yutaka Kikuchi
2. 発表標題 3D in vitro cancer and stromal cell co-culture disc for spatiotemporal image analysis
3. 学会等名 1st JCA-AACR Precision Cancer Medicine International Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋治子, 菊池裕
2. 発表標題 3次元共培養法によるがん 間葉系細胞間相互作用の時空間画像解析
3. 学会等名 第80回日本癌がん学会学術総会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------