

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501310

研究課題名(和文)単層培養からの自然発生スフェロイドの特性解明と阻害剤の探索研究

研究課題名(英文) Study of inhibitors and characterization of naturally occurring spheroids from monolayer culture

研究代表者

上原 至雅 (UEHARA, YOSHIMASA)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：50160213

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：乳がん細胞株を高密度培養することにより生じた自然発生浮遊細胞塊では、がん幹細胞マーカーのCD133の発現が上昇した。次世代シーケンサーで遺伝子発現パターンを解析したところ、WntやTGF-βシグナルに關与する遺伝子群の発現変動が見られた。また、アルデヒドデヒドロゲナーゼ(ALDH)活性の上昇が観察された。一方、自発的浮遊細胞はドキソルビシンなどの抗がん剤に対して抵抗性を示すが、HER2のリン酸化が亢進しており、2種類のHER2阻害剤に対してnMオーダーの感受性を示した。

研究成果の概要(英文)：In naturally occurring floating cell mass (spheroids) caused by the high-density culture of a breast cancer cell line, expression of CD133 cancer stem cell marker is increased. Analysis of the gene expression pattern using the next generation sequencers, expression variation of genes involved in the TGF-β and the Wnt signaling were detected. Increase of aldehyde dehydrogenase activity was also observed. Although, the spheroids are resistant to anti-cancer agents such as doxorubicin, phosphorylation of HER2 is enhanced, and showed a sensitivity of nM order for HER2 inhibitors, such as lapatinib and capecitabine.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学、臨床腫瘍学

キーワード：乳がん幹細胞 CD133 ALDH Her2 ドキソルビシン TGF-β Wntシグナル 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年の研究の進展により、白血病だけでなく乳がんや脳腫瘍等の固形がんにも、がん細胞中に自己複製能と多分化能、及び無限に分裂可能な能力をあわせもつ細胞集団が見出され、がん幹細胞と定義された。がん幹細胞は抗がん剤耐性および腫瘍形成能を有する細胞集団からなることが明らかにされ、抗がん剤治療で治癒が達成できない要因ととらえられている。従って、がん幹細胞はがんの再発を防ぐ鍵をにぎると考えられ、根治を目指すがん治療にとって重要な標的として認識されてきている。

(2) がん幹細胞の性質の解明が進んでいるが、これまでの一般的ながん幹細胞の分離方法として、(1) CD133 や CD44 などの細胞表面マーカーなどの陽性細胞を濃縮する方法、(2) 成長因子 (bFGF と EGF) を添加した無血清培地で浮遊細胞塊を形成し、増殖・維持する方法、(3) DNA 結合色素であるヘキスト 33342 排出能力を有する side population (SP) を濃縮する方法などにより、腫瘍形成能の高い細胞が同定されている。

(3) 正常の乳腺の幹細胞/前駆細胞が非接着性培養でスフェロイド (mammosphere) を形成し増殖することで分離されたように、乳がんでも同様の方法でスフェロイドを形成する細胞が分離された。得られた細胞は、成熟した乳腺上皮の分化マーカー陰性の未分化な細胞であり、CD44⁺、CD24⁻、Oct4⁺、survivin⁺ であり、1000 個程度の細胞で NOD/SCID マウスで腫瘍を形成する能力を保持していた (Ponti, et al. Cancer Res. 65, 5506-11, 2005)。だが、依然としてがんはどの細胞から発生するのか (幹細胞から発生するのか、それとも一時的な幹細胞様の能力を得た細胞からなのか)、細胞周囲の微小環境がどのように相互作用しているのかなど不明な点も多く、多方面から活発な研究がなされている。

(4) 申請者は、ヒト乳がん細胞株を培養中に、接着細胞の密集した集団から浮き上がってスフェロイドを形成しながら増殖してくる細胞があることを見出した。このような性質を示すがん細胞株は、調べた 7 種類の乳がん細胞株のうち 1 株のみであったが、この自然発生の細胞集団の増殖様式ががん幹細胞に類似していることに興味をもち、培養を継続した。その結果、スフェロイド形成細胞は接着細胞群に比べ、CD133 の発現が有意に上昇している事を蛋白レベル (ウェスタンブロット) で確認する事ができた。以上の結果を背景に、新しい抗がん剤創薬の基礎研究を行うことを目的に本研究を計画した。

2. 研究の目的

がん幹細胞は、*in vitro* 培養系ではスフェロ

イド (細胞塊) を形成しながら増殖するという特徴をもつ。申請者は、これまで細胞接着を阻止した培養器を使い、がん細胞の足場非依存性のスフェロイド増殖を簡便・迅速に定量する方法を開発し、この増殖阻害を指標に抗がん剤を探索し、足場非依存性の増殖、生存シグナルを解析してきた。今回、ヒト乳がん細胞株を通常の培養器で培養中に、スフェロイドを形成しながら増殖する細胞集団が現れ、それらにがん幹細胞マーカーが有意に発現することを見出した。本研究では、まず細胞培養中に自然発生したスフェロイドの性質を明らかにする。さらに、これまでに見出した足場非依存性増殖に選択的な阻害剤の効果を検証するとともに、新たな阻害剤の探索と作用機序解明から、がんの再発を防ぐ新しい治療法の確立を目指した抗がん剤創薬の基礎的研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

「接着細胞面から浮遊し自然にスフェロイドを形成した細胞は真のがん幹細胞が濃縮された細胞集団である」という仮説の検証と抗がん候補物質の効果を調べるために以下の実験を行った。

1. スフェロイド細胞の濃縮と幹細胞マーカー等の発現解析 (平成 23 年度)

薬剤感受性試験及び *in vivo* 実験に供するために必要な数のスフェロイド細胞を培養、維持するための基礎的検討を行った。

2. 軟寒天培地中でのコロニー形成の測定 (平成 23 年度)

造腫瘍性との相関性が高い事が知られている軟寒天培地中でのコロニー形成能を調べた。

3. 薬剤感受性試験 (平成 23、24、25 年度)

これまでに足場非依存増殖阻害を指標に見出した物質と既存の抗がん剤の活性評価及び新たな阻害剤の探索を行った。

4. 免疫不全マウスを用いた造腫瘍能の解析と抗腫瘍効果の検定 (平成 23、24、25 年度)

がん幹細胞の最も重要な性質である造腫瘍能とスフェロイド形成阻害剤の抗腫瘍効果を NOD/SCID マウスを用いて調べた。

【平成 23 年度】

1. スフェロイド細胞の濃縮と幹細胞マーカー等の発現解析

薬剤感受性試験及び *in vivo* 実験を行うために、相当数の細胞が必要となる。そのためにまず、継代維持するための培養法を確立し、スフェロイドの分散法と正確な細胞数の計測、凍結保存法を確立した。

スフェロイドの継代培養に使用するプレートは通常の付着性のある細胞培養プレートを用い、浮遊増殖する細胞を集めることで濃縮維持できる。以降の実験に供するために、正確な細胞数の計測と保存のための基礎的検討を行った。

(1) スフェロイド分散と細胞数の計測

従来のトリプシンによる細胞塊の分散では凝集沈澱が生じるなどの問題もあることから、SCIVAX 社から発売されている spheroid dispersion solution を用いて比較検討する。細胞数は、血球計算板とコールターカウンターを用いて計測した。

(2) 長期保存法の検討

従来の Cell Banker を用いる方法と、ES/iPS 細胞凍結保存用に開発された Stem Cell Keep を用いる方法を比較し、解凍後の生存細胞数、幹細胞マーカー、分化マーカー等の発現の変動等を比較し、高い生存率と性質が維持できる保存方法を検討した。

(3) 幹細胞マーカーの発現解析

CD133、CD44、CD24、Oct4、Nanog などの幹細胞マーカーの発現を FACS、免疫染色等の方法により解析し、マーカー発現細胞のポピュレーションの変動や細胞内局在等に特徴的な変化があるかないかを解析した。

2. 軟寒天培地中でのコロニー形成

造腫瘍性と最も相関性が高い事が知られている軟寒天培地中でのコロニー形成能を調べた。コロニー形成は、細胞を 0.5% 程度の軟寒天中に浮遊させ培養した。炭酸ガス培養器中で 2 週間程度の培養時間を要するが、定量化が可能である事から、スフェロイド形成細胞と接着細胞の比較に重要である。

3. 薬剤感受性試験とスクリーニング

これまでに足場非依存増殖阻害を指標に見出した物質の活性評価と新たな阻害剤の探索を行った。これらの評価に供する化合物として、NA22598、U0126、hypothemycin、spicamycin 類縁化合物、brefeldin、anicequol などがある。いずれも polyHEMA コートプレートを用いた 3 次元培養で選択性を示した化合物であり、乳がん細胞株のスフェロイド形成を阻害する可能性がある。これらの化合物以外に、通常の抗がん剤に対する感受性試験を行い、96 穴プレートを用いた MTT アッセイにより評価を行った。また、所有の化合物ライブラリーを用いて、スフェロイドの増殖を選択的に阻害する化合物のスクリーニングを行った。

4. 免疫不全マウスを用いた造腫瘍能の解析

がん幹細胞の最も重要な性質である造腫瘍能と阻害剤の抗腫瘍効果を 6-8 週令雌の NOD/SCID マウスを用いて調べた。27G 針を使ってマウスの体側部皮下に移植するが、細胞数を 10^7 から 100 まで 10 倍希釈ごとに減らし、スフェロイド細胞がどの程度少数の細胞で腫瘍を形成するかどうか検討した。

【平成 24、25 年度】

薬剤感受性試験とスクリーニングの継続

現時点では、スフェロイド形成に、自然発生のスフェロイド、人為的に形成させたスフェロイド (polyHEMA 培養法) 及び無血清培地での浮遊培養法による方法の 3 つがある。これらスフェロイド形成の薬剤感受性を比較する事で、がん幹細胞を異なる段階に分けることができる可能性がある。このような観点からの薬剤感受性比較試験を行うとともに、新たな抗がん剤の探索を継続した。

4. 研究成果

(1) 乳がん細胞株を高密度培養することにより生じた自然発生浮遊細胞塊を回収し、がん幹細胞マーカーの発現、軟寒天培地中でのコロニー形成能を解析した。CD133、CD44、CD24、Oct4、Nanog などの幹細胞マーカーの発現をウェスタンブロット法により解析したところ、スフェロイドでは CD133 の発現が優位に上昇することが分かったが、継代によって発現が変動し、経過とともに低下する傾向が見られた。一方、造腫瘍性と最も相関性が高い事が知られている軟寒天培地中でのコロニー形成能を調べたところ、コロニー形成率はむしろ低下した。

(2) 乳がん細胞株を高密度培養することにより生じた自発的浮遊細胞の遺伝子発現パターンを次世代シーケンサーで解析した。自発的浮遊細胞は、通常モノレイヤー培養、強制的浮遊培養とは大きく異なる遺伝子発現パターンを示し、特に Wnt や TGF- β シグナルに關与する遺伝子群の発現変動が大きかった。中でも、*DKK1* 遺伝子の発現上昇は再現性が良く、自発的浮遊細胞のマーカーとして使える可能性が示された。幹細胞では、Aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性が上昇していることが知られている。Aldefluor 試薬を用いて、自発的浮遊細胞の ALDH 活性を解析したところ、顕著な活性上昇が観察された。

(3) がん幹細胞様スフェロイド集団を用いて各種抗がん剤に対する感受性を比較したところ、ドキシソルピシン、エトポシド、マイトマイシン C に対して耐性を示した。一方、微生物等天然物由来の化合物の中にスフェロイドに選択性を示す化合物の探索を行い、いくつかのヒット化合物を見出した。今後、それらの化合物の作用機序を解明する。

(4) 乳がん幹細胞のマーカー候補として、ALDH 活性のほか HER2 などが知られている。そこで、HER2 発現やそのリン酸化状態について検討した。その結果、自発的浮遊細胞では HER2 のリン酸化が亢進していることが明らかとなった。そこで、乳がん幹細胞の抗 HER2 療法を想定し、2 種類の低分子量 HER2 阻害剤 (Lapatinib と Canertinib) の自発的浮遊細胞の増殖への影響を検討した。自発的浮遊細胞がドキシソルピシンなどの抗がん剤に対

して抵抗性を示すのに対して、2種類のHER2阻害剤は本細胞の増殖をnMオーダーの濃度で顕著に阻害した。HER2に加えて、Wntシグナル経路も幹細胞性維持に重要なことが広く知られている。次世代シーケンサーを用いた自発的浮遊細胞の遺伝子発現プロファイルの結果からWntシグナル経路の関与が示唆されたため、Wntシグナル阻害剤の影響も検討した。我々が開発したWntシグナル阻害剤IMU-1003を添加することによって、自発的浮遊細胞の増殖が阻害された。HER2阻害剤とWntシグナル阻害剤は、通常培養した細胞に比較して自発的浮遊細胞の増殖を特異的に強く阻害することも明らかとなった。

(5) ノードマウス皮下への造腫瘍性についても検討を加えたが、がん幹細胞様集団は親株細胞に比較して造腫瘍性が低いことが明らかとなった。低い造腫瘍性は、がん幹細胞のDormancyを反映する結果と解釈することもできるため、今後の検討課題とした。また、NSGマウス(NOD-scid, IL2 receptor gamma chain knockoutマウス)の皮下へ自発的浮遊細胞を移植し、造腫瘍性を解析したところ、モノレイヤー培養の細胞に比して造腫瘍性が高いことを示唆する結果を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

1. Oku Y, Tareyanagi C, Takaya S, Osaka S, Ujiie H, Yoshida K, Nishiya N, Uehara Y. Multimodal Effects of Small Molecule ROCK and LIMK Inhibitors on Mitosis, and Their Implication as Anti-Leukemia Agents., PLoS One, 9(3):e92402. (2014) doi: 10.1371/journal.pone.0092402. eCollection 2014.
2. Nishiya N, Oku Y, Kumagai Y, Sato Y, Yamaguchi E, Sasaki A, Shoji M, Ohnishi Y, Okamoto H, Uehara Y. A Zebrafish Chemical Suppressor Screening Identifies Small Molecule Inhibitors of the Wnt/ -catenin Pathway., Chem. Biol., 21: 530-540. doi:10.1016/j.chembiol.2014.02.015. [Epub ahead of print] (2014)
3. Tanaka AR, Noguchi K, Fukazawa H, Igarashi Y, Arai H, Uehara Y. p38MAPK and Rho-dependent kinase are involved in anoikis induced by anicequol or 25-hydroxycholesterol in DLD-1 colon cancer cells. Biochem Biophys Res Commun 430: 1240-1245, 2013. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.067. Epub 2012 Dec 22.
4. Tsuda K, Nishiya N, Umeyama T and Uehara Y. Identification of LY83583 as a specific inhibitor of *Candida albicans* MPS1 protein kinase. Biochem Biophys Res Commun. 409: 418-423, 2011. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.010. Epub 2011 May 8.
5. Kikuchi M, Mano N, Uehara Y, Machida K, Kikuchi M. Cytotoxic and EGFR tyrosine kinase inhibitory activities of aglycone derivatives obtained by enzymatic hydrolysis of oleoside-type secoiridoid glucosides, oleuropein and ligustroside. J Nat Med. 65: 237-240, 2011. doi: 10.1007/s11418-010-0476-8. Epub 2010 Nov 2

〔学会発表〕(計17件)

1. Nishiya, N., Kawano, T., Uehara, Y. (招待講演): A phenotype-based screening for chemical suppressors of the Wnt/beta-catenin pathway in zebrafish. The 18th Japanese Foundation for Cancer Research-International Symposium on Cancer Chemotherapy, Tokyo, 2013年12月4日
2. 西谷直之、河野富一、上原至雅(招待講演): ゼブラフィッシュ胚を用いたWnt/-catenin経路ケミカルサプレッサーの探索、日本薬学会生薬天然物部会主催・第5回食品薬学シンポジウム、京都、2013年11月2日
3. Nishiya, N., Oku, Y., Uehara, Y. : Geranylgeranyltransferase as a potential molecular target for Wnt/beta-catenin pathway inhibitors. 日本癌学会第72回総会、横浜、2013年10月3日
4. 西谷直之、奥 裕介、上原至雅: ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ阻害剤による -catenin核移行の阻害、第17回日本がん分子標的治療学会学術集会、京都、2013年6月13日
5. 奥 裕介、西谷直之、上原至雅: ROCK-LIMK1はAurora Aを活性化し、中心体の恒常性維持に寄与する、第17回日本がん分子標的治療学会学術集会、京都、2013年6月13日
6. Nishiya, N., Abe, S., Iwaoka, S., Ohmori, N., Ohnishi, Y., Sasaki, A., Shoji, M., Oku, Y., Uehara, Y. : Geranylgeranyltransferase inhibitors attenuate the Wnt/beta-catenin signaling pathway. FAOBMB mini symposium 2013、矢巾、2013年4月6日
7. Oku, Y., Tareyanagi, C., Ujiie, H., Takaya, S., Yoshida, K., Nishiya, N., Uehara, Y. : ROCK-LIMK1 axis activates Aurora A and participates in centrosome integrity. FAOBMB mini symposium 2013、矢巾、2013年4月6日
8. 大森紀和、阿部早織、岩岡ささの、大西亨美、佐々木朱里、庄司桃子、奥 裕介、西谷直之、上原至雅: Wnt/ -catenin経路

- 阻害活性をもつ GGT1-286 の作用機序の解析、第 132 年会日本薬学会、横浜、2013 年 3 月 28 日
9. 垂柳智秋、氏家悠貴、高谷真一、吉田健太郎、奥 裕介、西谷直之、上原至雅：Rho-associated coiled coil kinase (ROCK) 阻害剤による染色体不安定性の誘導、第 132 年会日本薬学会、横浜、2013 年 3 月 28 日
 10. 上原至雅、奥 裕介、西谷直之：がん細胞と微小環境との相互作用の薬理的制御、日本農芸化学会 2013 年度大会シンポジウム「細胞骨格とシグナル伝達の理解からがんにつながる」、仙台、2013 年 3 月 27 日
 11. Nishiya, N., Kawano, T., Uehara, Y. : IMU14 derivatives as novel Wnt/beta-catenin signaling inhibitors、日本癌学会 第 71 回総会、札幌、2012 年 9 月 21 日
 12. 西谷直之、奥裕介、上原至雅：タンパク質脂質修飾による選択的 Wnt/ -catenin シグナル制御。未来医療開発プロジェクト研究成果発表会 岩手医科大学矢巾キャンパス 2012 年 8 月 9 日
 13. 西谷直之、奥 裕介、上原至雅：タンパク質の脂質修飾制御による選択的 Wnt/ -catenin シグナル阻害、第 16 回日本がん分子標的治療学会学術集会、北九州、2012 年 6 月 29 日
 14. 小松豊徳、三田地沙織、河野富一、西谷直之、上原至雅：新規 Wnt/ -catenin シグナル阻害剤 IMU1003 の 同定、第 132 年会日本薬学会、札幌、平成 24 年 3 月 29 日
 15. 及川慎吾、加藤大器、今野拓哉、白鳥裕佳、森岡広記、吉池比香里、奥裕介、津田香代子、西谷直之、上原至雅：カンジダ Mps1 キナーゼを標的とする新規抗真菌薬の探索、第 132 年会日本薬学会、札幌 2012 年 3 月 29 日
 16. 山口英美、熊谷裕介、佐藤佑樹、西谷直之、上原至雅：ゼブラフィッシュ胚を用いた Wnt/ -catenin 経路阻害剤探索系の構築、第 132 年会日本薬学会、札幌、2012 年 3 月 29 日
 17. 西谷直之、河野富一、津田香代子、上原至雅：ゼブラフィッシュ胚を用いた Wnt/ -catenin シグナル阻害剤の探索、日本がん分子標的治療学会第 15 回学術集会、東京、2011 年 9 月 22 日

〔産業財産権〕

出願状況（計 2 件）

特許出願

名称：W n t シグナル阻害剤

発明者：西谷直之、上原至雅

権利者：同上

所有権の種類：特許

出願番号：特願 2013-141555

出願年月日：2013 年 7 月 5 日

国内

名称：胚の発生および/または分化を制御する方法

発明者：西谷直之、河野富一、畠中 稔、上原至雅

権利者：同上

工業所有権の種類、番号：PCT/JP2012/054585

出願年月日 or 取得年月日：2012 年 3 月 13 日

国外：PCT

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

上原至雅 (UEHARA, Yoshimasa)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：50160213

(2) 研究協力者

西谷直之 (NISHIYA, Naoyuki)

岩手医科大学・薬学部・講師

研究者番号：10286867

奥 裕介 (Oku, Yusuke)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：50626843