

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591924

研究課題名(和文)食道癌に対する相互マシンラーニング法による Hedgehog 新規阻害剤の開発

研究課題名(英文) Analysis of novel Hedgehog inhibitors for esophageal cancer

研究代表者

深谷 昌秀 (FUKAYA, MASAHIDE)

名古屋大学・医学部附属病院・病院講師

研究者番号：10420382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：相互マシンラーニング法により同定した候補化合物は増殖抑制能と細胞死誘導能を有していた。候補化合物はマウス皮下発癌モデルにおいて腫瘍の増殖を抑制した。ヒト食道癌組織からの In vivo 細胞株の樹立をおこなったが、十分に成長しなかった。またヒト膵癌でも樹立できなかった。しかし共同研究施設において大腸癌組織ではあるが、In vivo 細胞株が樹立できた。マウス皮下発癌モデルでの候補化合物の網羅的遺伝子解析を行なった。候補化合物の投与群において lincRNA (long intergenic noncoding RNA) の発現を認め、lincRNA の候補化合物の作用機序への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Several chemical compounds were identified for cancer therapy using the machine learning method. These compounds inhibited the proliferation and induced the cell death in cancer cell lines. The chemical compound suppressed the tumor growth in the xenograft mouse mode. As the tumor did not grow up in the femoral region of nude mouse, in vivo cell strain was not established from the esophagus cancer tissue. We challenged the establishment of in vivo cell strain using other cancer cell lines. However it was not able to establish using even pancreatic cancer. In the collaborative institute, in vivo cell strain was established in SCID mouse using the colon cancer tissue. Furthermore, DNA array revealed the expression of lincRNA (long intergenic noncoding RNA) in the mouse tumor treated by chemical compound. This data suggested that lincRNA was related to the mechanism of the chemical compound.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：食道癌 Hedgehog 相互マシンラーニング法

1. 研究開始当初の背景

食道癌において化学療法・放射線療法と手術療法との併用により一定の治療効果が認められている。しかし、化学療法や放射線療法に抵抗性の症例も多く存在し、食道癌の根治切除例の5年生存率は30-40%である。現在の食道癌の治療には限界があり、新たな治療法の開発が必要である。

個体発生の過程で重要な役割を持つ遺伝子として同定されたHedgehogは、癌研究の分野においても重要なメディエーターであると報告されている (Thayer S. P. Nature 2003)。われわれもHedgehogシグナルの研究を行い、胃癌における重要性を報告しており (Fukaya M, Gastroenterology. 2006)、科学研究費補助金(基盤研究 C-2)平成19~20年度、「胆道癌におけるHedgehogシグナル系の発現解析」により胆道癌でのHedgehogに関する研究も行ってきた。

癌周囲の間葉系細胞からなる微小環境における上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) は上皮細胞が間葉系様細胞に形態変化する現象 (Hay E.D, J. Cell. Biol. 1982) で、上皮間葉移行 (EMT) の獲得が運動性の亢進に関与することから、癌細胞の浸潤との関連が示唆されている (Thiery J.P, Nat. Rev. Cancer 2002)。我々の検討でもHedgehogシグナルが食道癌の上皮間葉移行 (EMT) において重要な役割を果たしていることを認めている (Isohata N, Fukaya M, Int J Cancer. 2009)。Hedgehogを標的とした阻害剤は癌だけでなく、微小環境にも作用する阻害剤となる可能性がある。Hedgehog阻害剤の開発は行われているが、いまだ実用化されたものはなく、新たなアプローチによるHedgehog阻害剤の開発が必要である。

2. 研究の目的

Hedgehog は、微小環境における上皮間葉移行 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) との関連も報告され、標的分子として注目さ

れている。相互マシンラーニング法によるHedgehog新規阻害剤の開発および *in vivo* 細胞株による担癌動物モデルでの機能解析によりHedgehog新規阻害剤の有効性を検討し新規治療法を開発する。

本研究の目的は、食道癌に対するHedgehog新規阻害剤による新たな癌治療法により治療成績を向上させることである。

3. 研究の方法

(1) Hedgehog 新規阻害剤の開発

相互マシンラーニング法による小分子化合物のスクリーニングを行った。相互マシンラーニング法は、ケミカルゲノミクス情報を用いた標的タンパクに対する候補化合物の *in silico* スクリーニング法である。これまでのドッキングシュミレーション法と比較して標的タンパクの立体構造が不要でこれまで報告されていない新規の骨格を持つ化合物の探索に適しており、計算時間も3ヶ月から2-3週間に短縮可能である。400万種類の小分子化合物から候補化合物を探索し、既知化合物との類似度 (Tanimoto 係数の最大値)、LogP などによりスコア化し、上位150種類の化合物を選択する。

(2) Hedgehog 新規阻害剤の機能解析

コントロールとして用いる胆管癌細胞株 CCKS1、RBE における Hedgehog の発現を検討した。また胆管癌細胞株 RBE に既存の Hedgehog 阻害剤である Cyclopamine を投与し、増殖抑制を検討した。

候補化合物を胆管癌細胞株に導入し、増殖能 (MTT アッセイ法)、細胞死誘導能 (トリパンブルー色素排出法) を検討した。また抗腫瘍効果を有する候補化合物に関し、投与濃度を変更して増殖能、細胞死誘導の検討を行う。

(3) Hedgehog 新規阻害剤の基礎的研究

-作用機序の解明-

Hedgehog 阻害剤である Cyclopamine をヒト癌細胞株に投与し Hedgehog に関するシグナル伝達系 Gli1、Gli2、FOXM1、FOXA2 の発現に

ついて検討した。また増殖因子である FGF、VEGF を検討した。

(4) 動物モデルの作成

ヒト食道癌患者から切除した癌細胞を直接ヌードマウス大腿皮下に移植する。この腫瘍を切除しヌードマウス大腿皮下に再移植し、継代可能なヒト食道癌の *in vivo* 細胞株を樹立する。また共同研究施設において大腸癌組織の SCID マウス皮下への移植による *In vivo* 細胞株の樹立を行った。

(5) 担癌動物実験モデルを用いた Hedgehog 新規阻害剤の機能解析

in vivo 細胞株樹立に時間がかかったため、ヒト膀胱癌のマウス皮下発癌モデルに候補化合物 A を経口にて週 1 回で 3 週連続投与による抗腫瘍効果を検討した。候補化合物 A の投与量を増量し、投与期間も延長による抗腫瘍効果についても検討した。副作用について検討した。

また *in vivo* 細胞株ではないが膀胱癌のマウス皮下発癌モデルに化合物 B の経口投与を行い、DNA アレイ法による網羅的遺伝子解析を行なった。

4. 研究成果

(1) Hedgehog 新規阻害剤の開発

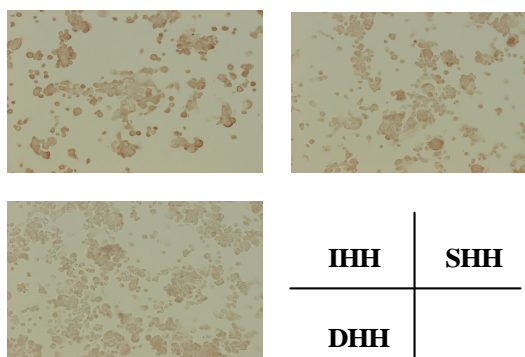
選択した 150 種類の化合物のうち、入手可能であった 142 種類を化合物の候補とした。

(2) Hedgehog 新規阻害剤の機能解析

142 種類の候補化合物のうちヒト癌細胞株において、多くの化合物が増殖抑制能、細胞死誘導能を有していた。このうち 100nM にて増殖抑制能を有した候補化合物 A に関して、投与濃度を変更して増殖能の検討を行い濃度依存的であることを明らかにした。

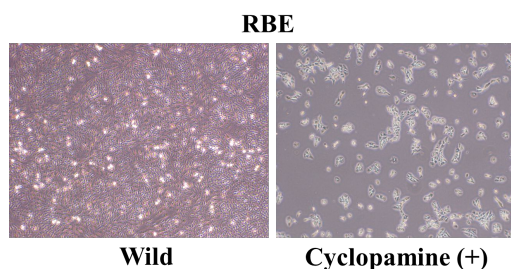
胆管癌細胞株 CCKS1 (図 1)、RBE において Hedgehog は発現していた。

図 1



Hedgehog 阻害剤である Cyclopamine は、癌細胞株 RBE の増殖を抑制した (図 2)。

図 2



(3) Hedgehog 新規阻害剤の基礎的研究

-作用機序の解明-

Hedgehog 阻害剤である Cyclopamine はヒト癌細胞株 HuCCT1、TFK-1、ETK、RBE、CCKS1 において Hedgehog に関するシグナルである Gli1、Gli2、FOXM1、FOXA2 の発現を抑制した。また Cyclopamine はヒト癌細胞株 HuCCT1、RBE、TFK-1 において増殖因子である FGF、VEGF の発現を抑制した。

(4) 動物モデルの作成

切除したヒト食道癌組織のヌードマウスへの皮下移植による *In vivo* 細胞株の樹立をおこなったが、生着せず十分に成長しなかった。これまでの膀胱癌における検討では生着率約 40%で腫瘍を形成可能であった。癌腫を変えヒト膀胱癌組織でも同様の検討をおこなった。しかし十分に生着できず樹立できなかった。共同研究施設に *In vivo* 細胞株の樹立を依頼したところ、ヒト大腸癌組織の SCID マウス皮下への移植により移植後約 3 ヶ月で生着し *In vivo* 細胞株が樹立できた。

(5) 担癌動物実験モデルを用いた Hedgehog 新規阻害剤の機能解析

マウス皮下発癌モデルでの候補化合物 A の経口による週 1 回で 3 週連続投与では抗腫瘍効果を認めなかったが、候補化合物 A の投与量の増量により候補化合物投与群において腫瘍の増殖抑制効果を認めた。軽度の体重減少を認めたが、候補化合物投与に伴う死亡例などは認めなかった。

また、膀胱癌のマウス皮下発癌モデルでの化合物 B の網羅的遺伝子解析の結果、化合物 B 投与群において lincRNA(long intergenic noncoding RNA)の発現を認めた。これら lincRNA が化合物 B の作用機序への関与が示唆された。

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)

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

深谷 昌秀 (FUKAYA MASAHIDE)

名古屋大学 医学部附属病院 病院講師

研究者番号：10420382

(2)研究分担者

榑野 正人 (NAGINO MASATO)

名古屋大学 医学系研究科 教授

研究者番号：20237564

横山 幸浩 (YOKOYAMA YUKIHIRO)

名古屋大学 医学部附属病院 講師

研究者番号：80378091

國料 俊男 (KOKURYO TOSHIO)

名古屋大学 医学系研究科 特任講師

研究者番号：60378023

(3) 連携研究者

なし