

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700960

研究課題名(和文)化学療法効果増強に向けた微小管動態細胞活性を指標とするがん幹細胞標的治療法

研究課題名(英文)Development of cancer stem cell targeting chemotherapy by evaluating microtubule dynamics

研究代表者

濱中 洋平 (Hamanaka, Yohei)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：10463788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：GFP融合EB1発現ヒト乳癌細胞を作成し、その培養細胞に各種抗がん剤を投与して増殖阻害濃度を決定した。それら各条件におけるGFP融合EB1発現ヒト乳癌細胞の微小管伸長速度を共焦点レーザー顕微鏡を用いて計測した。抗がん剤の濃度が高くなるにつれて微小管伸長速度が遅くなり、微小管伸長端の追跡可能時間も短くなることを見出した。高濃度の抗がん剤投与下でも生存している細胞に対して、微小管の動態変化を観察しながら最適な死滅条件を検討することが可能であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We prepared and cultured GFP-fused EB1-expressing human breast cancer cells, and treated the cultured cells with various anti-cancer drugs to determine the growth-inhibitory concentrations. Microtubule growth rates of the cells were measured by confocal laser-scanning microscopy. Microtubule growth rates slowed and trackable times of microtubule growth ends shortened as the concentrations of the anti-cancer agents increased. The results suggest that an optimum drug administration condition to eradicate living cancer cells even under high concentrations of the anti-cancer agents can be ascertained by evaluating microtubule dynamics.

研究分野：化学療法

キーワード：抗腫瘍効果 微小管伸長速度

1. 研究開始当初の背景

がん治療において化学療法は集学的治療の一翼を担う重要な治療法である。現在本邦では 100 余りの抗腫瘍薬が認可され、多様な固形がんや造血器腫瘍の治療に用いられている。抗がん剤は、DNA の複製阻害を引き起こしたり、微小管の機能阻害をすることで抗腫瘍効果を発揮するが、いかに優れた抗腫瘍効果をもつ抗がん剤であっても、すべての標的細胞にその影響が十分に及ばないかぎり完全寛解を達成することはできない。近年、がん幹細胞を標的とした薬剤や、従来型の抗がん剤の標的指向性を改善した Drug delivery system(DDS)の研究開発はめまぐるしく、化学療法は将来的には、抗がん剤複合 DDS 製剤やがん幹細胞標的薬などの組み合わせによるものが重要な位置を占めると考えられる。

がん幹細胞は、その全容はまだ明らかになってはいないが、近年様々な研究報告がその存在を支持し、メカニズムの解明が進められている。これまでの化学療法は、がん幹細胞についてはほとんど考慮されなかったが、抗がん剤ががん幹細胞以外の大部分の細胞に影響を及ぼしたとしても、一部のがん幹細胞が生き残ることで再発を引き起こすことが示唆されており、むしろ短期間での腫瘍縮小効果は得られなくても、がん幹細胞を標的にした化学療法の方が長期的な腫瘍退縮・消失効果を得られる可能性がある (Dean M, Nat. Rev. Cancer. 5, 275-84, 2005)。つまり、たとえ今後効果的な DDS によって抗がん剤を腫瘍組織へ送り届けることができたとしても、がん幹細胞を根絶できなければ完全寛解は得られない。化学療法治療効果増強を目指すにあたって、がん幹細胞の根絶ストラテジーの構築を行うことは避けては通れない課題といえる。

従来より抗がん剤の抗腫瘍効果は、*in vitro* における 50%阻害濃度(IC50)および *in vivo* における腫瘍体積変化が最も直接的で重要な指標である。また、*in vivo* における薬物の最高血中濃度(Cmax)、最高血中濃度到達時間 (Tmax)、半減期 (t1/2)、血中濃度 - 時間曲線下面積 (AUC)、クリアランス (CL)、平均滞留時間 (MRT)、定常状態分布容積 (Vss) などは、薬物の吸収、分布、代謝、排泄を評価するために重要な指標である。しかし、薬物を投与後、任意の時間における個々の標的細胞の活性を評価する方法は確立されていない。

申請者はこれまで腫瘍細胞の生死や細胞活性を細胞レベルでリアルタイムに評価する方法についての検討を行ってきた。そして、微小管の動態変化を細胞活性の指標にする方法を考案した。微小管は細胞骨格の一つで、チューブリン二量体の付加と解離によって活発に伸長と短縮が行われ、細胞分裂時には紡錘体として重要な働きを担う。微小管は生細

胞内で絶えず形態変化を起こしており、微小管機能が停止した細胞は死細胞とみなすことができる。そこで、微小管の動態を細胞活性の指標にする方法を考えた。微小管は数～数 10 μm の長さで細胞質内に存在するため、微小管そのものを可視化すると微細な変化を捉えることができないため、微小管の伸長端のみに集積する微小管プラス端集積因子 (plus-end tracking proteins, +TIPs) の一つである end-binding protein 1 (EB1)に注目した。EB1 に green fluorescent protein (GFP)を結合した細胞株を作製し、レーザーで励起させることで、生細胞内で常に動いている微小管の伸長端のみを蛍光として観察することができ、その動態変化を計測することで、個々の細胞活性が評価可能となる。

2. 研究の目的

本研究は、将来的にがん幹細胞を根絶させる標的治療の探索を行うことを目標に、抗がん剤の抗腫瘍効果をリアルタイムで鋭敏に評価するための手段として、細胞内の微小管伸長速度を用いることの妥当性を検討するとともに、抗がん剤を各種条件で投与後の微小管の動態変化を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 実験材料および実験機器

EB1-GFP 発現ヒト乳癌細胞株の作製

ヒト乳癌細胞株 KPL-4 に EB1-GFP 遺伝子の導入を行い、EB1-GFP を安定発現する KPL-4 細胞を構築した (図 1)。形質転換細胞は、クローン化した後、抗生剤 G418 (400 μg/ml) と 10 % FBS を添加した Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 中で培養した (37 °C, 5 % CO₂)。

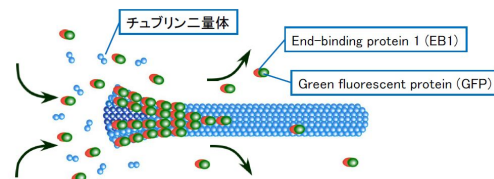


図 1. EB1-GFP 発現ヒト乳癌細胞の微小管

抗がん剤

パクリタキセル (タキソール, プリストル・マイヤーズ), ドセタキセル (タキソテル, サノフィ), ビノレルビン (ナベルピン, 協和発酵キリン), エリブリン (ハラヴェン, エーザイ), エピルピシン (ファルモルピシン, ファイザー), シスプラチン (ランダ, 日本化薬) を 10 % FBS 添加 DMEM を用いて任意の濃度に調整した。

共焦点レーザー顕微鏡システム
倒立顕微鏡 (IX71, Olympus), 60 倍油浸

対物レンズ (UPLSAPO 60XO, Olympus), 共焦点スキャノユニット (CSU10, Yokogawa), Electron multiplying charge coupled device camera (EMCCD camera, iXonEM+ DU-897, ANDOR Technology) から構成した共焦点レーザー顕微鏡システムを用いた。GFP は 488 nm ダイオードレーザー (Spectra-Physics) で励起し, その蛍光を 500 ~ 540 nm のバンドパスフィルター (520DF40, Omega Optical) を通して観察した。バックグラウンドは各イメージから自動的に差し引いた。

撮影画像は専用ソフト (solis, Andor Technology) で, 512 × 512 ピクセル, 各ピクセル 216 (= 65536) グレー階調で取得し, SIF format で保存した。撮影画像の 1 ピクセルはスケールを用いた測定で 264 nm に相当した。

(2) 実験方法

細胞増殖抑制試験

96 ウェルプレート (BioCoat コラーゲン I マルチウェルプレート, BD) の各ウェルに EB1-GFP 発現ヒト乳癌細胞を 5×10^3 個ずつ 10 % FBS 添加 DMEM 100 μ l とともに入れ, インキュベータに留置した。48 時間後に各種抗がん剤を各濃度で添加し, さらにインキュベータに留置した。48 時間後に生細胞数測定キット (Cell Counting Kit-8, 同仁化学) を 10 μ l ずつ添加し, その 1 時間後にマイクロプレートリーダー (Multi-spectrophotometer Viento XS, 大日本住友製薬) で吸光測定を行った。コントロール条件を基準に, 各抗がん剤における IC25, IC50, IC75 を算出した。

EB1-GFP 集積部移動速度 (微小管伸長端移動速度) の計測

ガラス底培養皿 (P35G-0-14-C, MatTek) のガラス部分を 2 % マトリゲル DMEM 0.5 ml でコーティングを行った。各ボトムに EB1-GFP 発現ヒト乳癌細胞を 1×10^5 個ずつ 10 % FBS 添加 DMEM 2 ml とともに入れ, インキュベータ (37 °C, 5 % CO₂) に留置した。48 時間後に培地を交換するとともに各種抗がん剤を各 IC25, IC50, IC75 の濃度で加え 48 時間後に, 488 nm レーザーを目的細胞へ照射し, 透過域 500 ~ 540 nm のバンドパスフィルターを通して 0.2 秒 × 300 フレーム, 計 60 秒の動画を取得した。観察面は細胞核直下にすることで, 細胞質の自家蛍光による影響を減らし, EB1 の動きが大きく垂直方向に変位することなく水平面の動きとして捉えられるようにした (図 2)。

各条件において 25 細胞ずつ選択し, 細胞核直下で 10 秒以上観察し得た EB1-GFP 集積部についてその移動速度を計測した。微小管伸長端を EB1-GFP 集積部の最も蛍光強度の高いピクセルと定義し, その位置 (X,Y) および時間 (T) を抽出した (図 3)。EB1-GFP 集積部移動速度 V nm/s は, 始点 (X1,Y1,T1) と

終点 (X2,Y2,T2) により,

$$V \text{ nm/s} = 264 \{ (X2 - X1)^2 + (Y2 - Y1)^2 \}^{1/2} / (T2 - T1) \text{ nm/s}$$
 の計算式より Excel を用いて算出した。

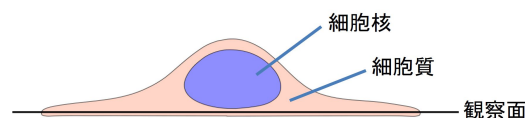


図 2. 培養細胞における微小管の観察面

最大輝点座標 (X,Y) = 微小管伸長端位置

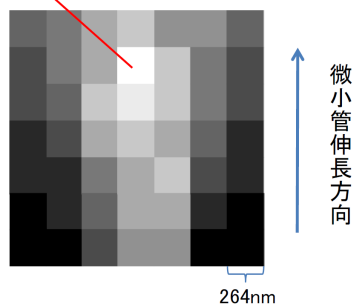


図 3. 微小管伸長端の同定

4. 研究成果

(1) 培養細胞における EB1-GFP 集積部の蛍光観察

作製した EB1-GFP 発現ヒト乳癌細胞内において, EB1-GFP 集積部の蛍光は, 共焦点レーザー顕微鏡システムで良好に経時観察することができ, その速度を計測することが可能であった (図 3)。

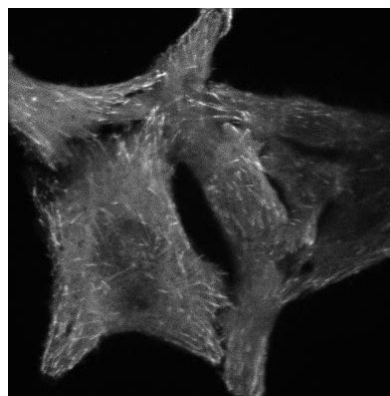


図 4. EB1-GFP 発現ヒト乳癌細胞の共焦点レーザー顕微鏡画像

(2) 細胞増殖抑制試験

作製した EB1-GFP 発現 KPL4 細胞において, パクリタキセルの IC25 は 3.46nM, IC50 は 4.71nM, IC75 は 6.42nM であった (図 5)。ビノレルピンの IC25 は 0.91nM, IC50 は 1.55nM, IC75 は 2.66nM であった。エリブリンの IC25 は 7.50nM, IC50 は 9.34nM, IC75 は 12.30nM であった。同様にその他の抗がん剤の阻害濃度も決定した。

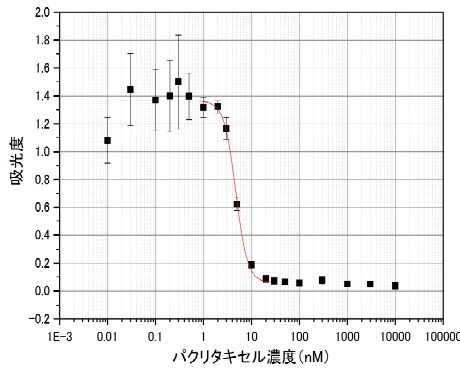


図 5. 細胞増殖抑制試験 (パクリタキセル)

(3) EB1-GFP 集積部移動速度(微小管伸長端移動速度)の計測

細胞増殖抑制試験で得られた, 各種抗がん剤における IC25, IC50, IC75 およびコントロール条件において, 各 25 細胞内の観察可能な微小管伸長速度を計測した. 1 条件につき約 100 本の微小管伸長速度を計測した. 微小管伸長速度は, パクリタキセルの IC25 で平均 342nm/sec, IC50 で 323nm/sec, IC75 で 281nm/sec と, パクリタキセル濃度が高くなるにつれて微小管伸長速度が遅くなり, 微小管伸長端の追跡可能時間が短くなった. その他の抗がん剤においても同様の傾向を認めた.

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)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

瀧中洋平, 角川陽一郎. 癌性心タンポナーデを良好にコントロールし得た再発乳がんの 2 例. 癌と化学療法, Vol.41, No.1, 2014, pp.91-93, 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

瀧中洋平, 天野吾郎. HER2 陽性進行再発乳癌に対するペルツズマブおよび T-DM1 による治療戦略. 第 12 回日本乳癌学会東北地方会. 2015 年 3 月 7 日, 仙台国際センター(仙台市)

天野吾郎, 瀧中洋平. エリブリン投与症例の検討. 第 22 回日本乳癌学会総会. 2014 年 7 月 10-12 日, 大阪国際会議場(大阪市)

瀧中洋平, 天野吾郎. 乳癌脳転移の検討. 第 11 回日本乳癌学会東北地方会. 2014 年 3 月 1 日, 仙台国際センター(仙台市)

瀧中洋平, 多田寛, 石田孝宣, 甘利正和, 鈴木昭彦, 渡部剛, 大内憲明. 転移再発乳癌に対する化学療法併用トラスツズマブ療法の有効性の検討. 第 10 回日本臨床腫瘍学会

学術集会. 2012 年 7 月 26-28 日, 大阪国際会議場(大阪市)

瀧中洋平, 石田孝宣, 甘利正和, 鈴木昭彦, 多田寛, 渡部剛, 大内憲明. 転移再発乳癌に対する nab-paclitaxel 投与例の検討. 第 20 回日本乳癌学会総会. 2012 年 6 月 28-30 日, 熊本市民会館(熊本市)

瀧中洋平, 石田孝宣, 渡部剛, 多田寛, 鈴木昭彦, 甘利正和, 大内憲明. 転移性乳癌に対するトラスツズマブ投与と脳転移の検討. 第 112 回日本外科学会定期学術総会. 2012 年 4 月 12-14 日, 幕張メッセ(千葉市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

研究代表者

瀧中 洋平 (HAMANAKA, Yohei)

東北大学・大学院医学系研究科・大学院非常勤講師

研究者番号: 10463788