

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461863

研究課題名(和文)がん個別の最適治療薬・PETモニタリング薬を選定するスクリーニング系の開発と評価

研究課題名(英文)Development of a screening system to select the personalized anti-cancer drugs and diagnostic probes for PET monitoring

研究代表者

吉井 幸恵 (Yoshii, Yukie)

国立研究開発法人放射線医学総合研究所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号：10397242

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：従来のがん化学療法においては、患者に最適な治療薬を治療前に知ることは難しく、画一的な治療薬選択・治療計画の策定が行われてきた。一方、我々は最近、生体内腫瘍の特徴を忠実に再現する新規三次元がん細胞培養法を研究開発してきた。当該研究では、本三次元培養法を応用し、がん個別の最適治療薬・PETモニタリング診断薬を選定する新規スクリーニング系の開発を行った。その結果、本法を用いることで、対象となるがん細胞に対し、生体内で効果の高い治療薬を選定し、かつその治療効果判定を行うことができる最適なPETモニタリング診断薬を選択できることを明らかにした。本システムは、個別化医療の実現に資すると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the cancer treatment, selection of appropriate therapeutic drugs for the patients is difficult and then the standardized treatment is undertaken. Recently, we have developed an innovative 3D culture method of cancer cells to simulate in vivo conditions. This technique allows for the creation of uniform spheroids with easy handling, which would be useful for a drug selection (Yoshii et al. Biomaterials 2011). In this study, using this 3D culture method, we developed a novel drug screening system to select the personalized therapeutic drugs and diagnostic probes for positron emission tomography (PET) monitoring. As a result, we demonstrated that this 3D culture screening system can find drugs that effectively inhibit cancer growth in vivo. This system can also select the appropriate accompanying PET probes for therapy monitoring. Therefore, this 3D culture screening system could be a useful platform to realize precision medicine.

研究分野：がん生物学 核医学

キーワード：PET 三次元培養 治療薬選択 治療モニタリング

1. 研究開始当初の背景

これまでのがん化学療法においては、患者に最適な治療薬を治療前に知ることは難しく、画一的な治療薬選択が行われており、実際に治療を開始するまで患者個別のがんに対して治療効果があるか否か予測することは困難であった。そのため、治療前に予め個別のがんに対する治療効果を予測し、治療薬を選択する「オーダーメイド型がん治療」が実現できれば、がん医療において有効性の高い治療法が提供できると期待される。また、オーダーメイド型がん治療の達成のためには、個々のがんに最適な治療薬を選択することに加え、その治療薬が個別のがんに対し示す反応を鋭敏に検出(モニタリング診断)し、その結果に応じて治療量や治療期間といった治療戦略を決定していく必要がある。一方、これまで様々なPETプローブが化学療法後のモニタリング診断薬として報告されているが、その診断能は腫瘍の個性や抗がん剤の種類により大きく異なる(Moroz et al. 2012 Clin Cancer Res; Sugiyama et al. 2004 J Nucl Med)。そのため、オーダーメイド型がん治療の実現のためには、個別の腫瘍において最適とされた治療薬剤に対して最適なモニタリング診断用PETプローブを選択する必要がある。

一方、申請者は最近、ナノプリント表面加工プレートを用いることにより、簡便に・均一に・再現性よく、生体内腫瘍の持つ特徴的な性質を培養器上で再現できる新規三次元がん細胞培養法を研究開発した(ナノプリント三次元がん細胞培養法)(Yoshii et al. 2011 Biomaterials)。本法は既存法に比べ、均一性・再現性に優れるため、容易に薬剤スクリーニングに適用できる。さらに、本法を用い、患者生検検体から容易にスフェロイド形成できることもこれまでに明らかになっている。こうしたことから、ナノプリント三次元がん細胞培養法を用い、個別がん由来のスフェロイドに対し抗がん剤スクリーニングを行うことで、患者個人に最適な抗がん剤を治療開始前に選定できるものと期待できる。また、それによって得られた候補薬剤によって対象となるスフェロイドを治療した際に、その効果を鋭敏に検出できるPETプローブを探索することも、本法の応用によって可能であると考えられる。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、ナノプリント三次元がん細胞培養法を用いた個別のがんに最適な治療薬・PETモニタリング診断薬を選定する新規スクリーニング系を開発し、オーダーメイド型がん治療の実現に資する新システムの提供を目指す。

3. 研究の方法

(1) ナノプリント三次元がん細胞培養法を用いた個別のがんにおける有効がん治療薬

の選定

ヒトがん細胞(HT-29, HCT-116)をnano-culture plate(NCP)(SCIVAX Life Sciences)を用いて、一週間培養し、ナノプリント三次元がん細胞培養スフェロイドを形成した。培養したスフェロイドに対し、標準阻害剤キット(SCADS inhibitor kit I、既存の抗がん剤・有用な分子標的薬、約100種類からなる化合物ライブラリー、「文部科学省科学研究費補助金・がんの特性等を踏まえた総合支援活動・化学療法基盤支援活動」提供)を適用し、有効な治療薬剤をスクリーニングした。具体的には、各薬剤を1 μ M添加し、その後3日間培養し細胞活性を評価し、候補薬剤を選定した。比較として、2D培養細胞を用いた薬剤スクリーニングも同様に行った。また、その結果得られた有効治療薬剤を、各対象がん細胞を移植した担がんマウスにそれぞれ投与し、治療した。

(2) ナノプリント三次元がん細胞培養法による個別がんの最適PETモニタリング診断薬の選定—in vivoとの比較

また、本研究では、がん治療の効果を早期に判定するPETモニタリング診断薬の選択におけるナノプリント三次元がん細胞培養法の有用性についても検討した。一般に、がんの治療後、その効果をモニタリングし、早期に治療効果の有無を診断することは、がんの治療戦略を検討する上で重要である。近年、PET検査は、がん治療の早期治療効果判定に有効であるとして用いられるようになってきた。しかし、使用される薬剤や、対象となるがん種によって、適切なPETプローブが異なるため、最適なPETモニタリング診断薬の選定が必要とされている。本研究では、ナノプリント三次元がん細胞培養スフェロイドが治療効果判定用PET診断薬の選定に有用かどうか、HT-29細胞を用いて検証した。本検討では、HT-29細胞由来のスフェロイド並びに腫瘍移植マウスに対し、治療薬として項目(1)の薬剤スクリーニングで選定されたMG132の投与を行い、その後の両者の各種PETプローブの取込みを検討した。PETプローブには、グルコース代謝を反映する¹⁸F-FDG、アミノ酸代謝を反映する¹¹C-メチオニン、酢酸・脂肪酸代謝を反映する¹¹C-酢酸、核酸代謝を反映する¹⁸F-FLT並びに¹¹C-4-DSTの5種類を使用した。取り込み量の変化は、スフェロイド並びに移植腫瘍それぞれのMG132非投与群の各種PETプローブの取込み量と比較し算出した。

4. 研究成果

(1) ナノプリント三次元がん細胞培養法を用いた個別のがんにおける有効がん治療薬の選定
結果を図1に示す。今回用いたHT-29,

HCT-116において、2D細胞培養薬剤スクリーニングでは、今回用いた化合物ライブラリーの中から5種類の薬剤 (doxorubicin, scriptaid, trichostatin A, cantharidin, MG132) が有効薬剤として選択された。一方、3D培養スフェロイドでは、唯一MG132が選択され、その他の薬剤は治療効果があまり見られなかった (図1a)。次に、3D並びに2D細胞培養薬剤スクリーニングで選定された薬剤を用い、腫瘍移植動物に対する治療実験を行った。その結果、3Dスフェロイドで選定された薬剤 (MG132) は、移植腫瘍に対し、高い治療効果を示したのに対し、2D細胞で選択された薬剤 (doxorubicin, scriptaid, trichostatin A, cantharidin) は、顕著な治療効果が見られなかった (図1b)。なお、HT-29細胞並びにHCT-116細胞はほぼ同じ結果を示した。このことから、ナノプリント三次元がん細胞培養薬剤スクリーニングは、従来の2D細胞培養薬剤スクリーニングよりも、高効率に、実際に生体内腫瘍に効果的な薬剤を選択できることが明らかとなった。また、本法で得られたスフェロイドは、生体内腫瘍で治療抵抗性に関わるとされる薬剤の低浸透性や低酸素領域形成といった性質を有していることも明らかになっており、これらのスフェロイドは生体内腫瘍の特性を培養器内で再現することにより、治療効果の高い薬剤を選択できると考えられた。

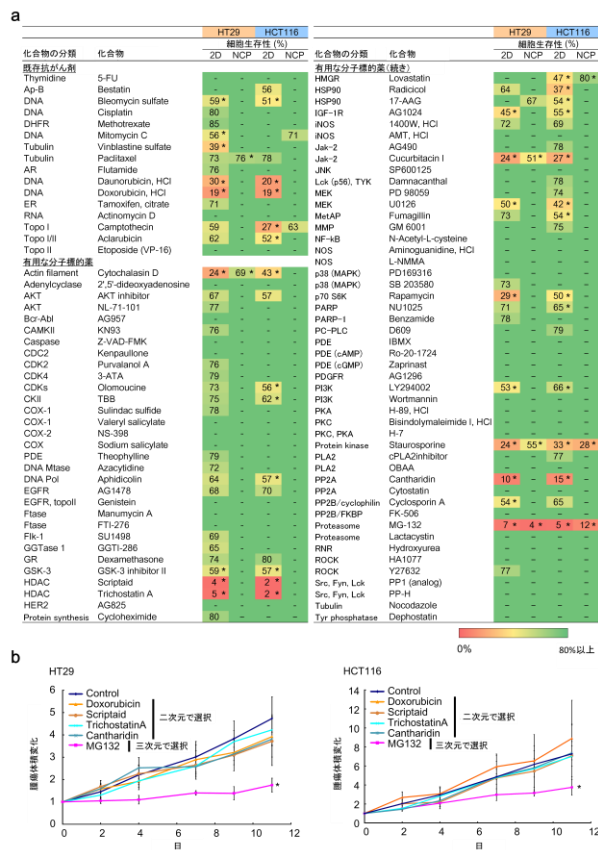
図2 細胞株 (HT-29, HCT116) を用いた薬剤スクリーニングと治療実験
a: 2種のヒト大腸がん細胞 (HT-29, HCT116) を用い、ナノプリント三次元がん細胞培養法並びに2D培養で薬剤スクリーニング法を施行した。図中の*で示された薬剤は、コントロールと比較して有意に細胞生存率が低下している ($P < 0.05$)。ここでは、細胞生存率が20%未満になった薬剤を選択した。
b: 腫瘍移植モデルマウス (HT-29 腫瘍, HCT116 腫瘍) を用いた治療実験。ナノプリント三次元がん細胞培養法で選択された薬剤では高い治療効果が見られた一方、2D培養で選択された薬剤は治療効果があまりなかった。図中の*で示された薬剤は、コントロールと比較して有意に腫瘍増殖が抑制されている ($P < 0.05$)。

(2) ナノプリント三次元がん細胞培養法による個別がんの最適PETモニタリング診断薬の選定 - in vivoとの比較

結果を図2に示す。スフェロイド・移植腫瘍は共に、FLT・4DSTでは取込みの著しい減少が、MET・ACEでは取込みの緩やかな減少が、FDGは逆に取込みの上昇が観察され、両者におけるPETプローブ集積パターンが一致することが明らかとなった。本結果から、ナノプリント三次元がん細胞培養スフェロイドと生体内腫瘍の代謝特性は類似していることが示され、本法はPETモニタリング診断薬の選択にも応用が可能であることが示唆された。

【結論】
本研究では、従来法と比べて効率よく、実際に生体内腫瘍で治療効果の高い薬剤を選択できるナノプリント三次元がん細胞培養薬剤スクリーニング法を開発した。本法は、生体内の腫瘍特性を非常によく模倣するスフェロイドを用いることで、従来法に比べ効率よく生体内腫瘍に効果的な薬剤をあぶり出すことができると考えられ、今後がん治療薬開発の上で開発時間やコストを削減する画期的な技術になり得ると期待される。

また、本研究では、ナノプリント三次元がん細胞培養法による最適PETモニタリング診断薬の選定が可能であることを明らかにした。ナノプリント三次元がん細胞培養法は、患者由来がん細胞にも適用可能であるため、本研究で開発した三次元培養薬剤スクリーニング法は、患者個別の薬剤選択を可能にすると期待され、今後オーダーメイド型がん治療の推進につながるものと期待される。



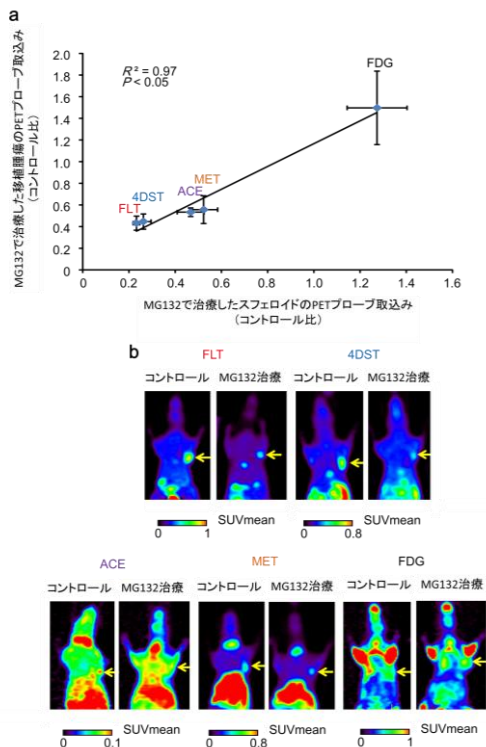


図2 MG132 治療後のスフェロイドと移植腫瘍におけるの PET プローブ取込み
 a HT-29 スフェロイドと移植腫瘍における MG132 治療後の各種 PET プローブの取込みの比較。FDG: ^{18}F -FDG、MET: ^{11}C -メチオニン、ACE: ^{11}C -酢酸、FLT: ^{18}F -FLT、 ^{11}C -4-DST: 4DST。b: HT-29 腫瘍移植モデルマウスの MG132 治療後の各種 PET プローブ取込みを示す PET 画像。

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 2 件)

1. Yoshii Y, Furukawa T, Aoyama H, Adachi N, Zhang MR, Wakizaka H, Fujibayashi Y, Saga T. Regorafenib as a potential adjuvant chemotherapy agent in disseminated small colon cancer: Drug selection outcome of a novel screening system using nanoimprinting 3-dimensional culture with HCT116-RFP cells. *International Journal of Oncology*. 2016. 48:1477-1484.
2. Yoshii Y, Furukawa T, Waki A, Okuyama H, Inoue M, Itoh M, Zhang MR, Wakizaka H, Sogawa C, Kiyono Y, Yoshii H, Fujibayashi Y, Tsuneo Saga. High-throughput screening with nanoimprinting 3D culture for efficient drug development by mimicking the tumor environment. *Biomaterials*. 51:278-289. 2015.

[学会発表] (計 3 件)

1. Yoshii Y, Furukawa T, Aoyama H, Adachi N, Zhang MR, Wakizaka H, Fujibayashi Y, Saga T. Selection of effective adjuvant therapy agent for colon cancer with a novel 3D culture screening system: evaluation with molecular imaging technique. 2015 Pacificchem (The meeting of International Chemical Congress of Pacific Basin Societies) 2015.12. (Hawaii, USA)
2. Yoshii Y, Furukawa T, Waki A, Itoh M, Zhang MR, Wakizaka H, Kiyono Y, Fujibayashi Y, Saga T. Development of drug screening system with nanoimprinting 3D culture to provide effective drugs in vivo and the accompanying PET probes for therapy monitoring. The Society of Nuclear Medicine (SNM) annual meeting 2015. 2015.6. (Baltimore, USA).
3. 吉井幸恵, 古川高子, 脇厚生, 伊藤学, 張明榮, 脇坂秀克, 清野 泰, 藤林靖久, 佐賀恒夫. 効果的ながん治療薬・PET モニタリング診断薬を効率よく選択できる三次元がん細胞培養ハイスループット薬剤スクリーニング法の開発. 第 10 回日本分子イメージング学会. 2015. 5. (東京).

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ等

プレスリリース

http://www.nirs.qst.go.jp/information/press/2014/02_20.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉井 幸恵 (YOSHII, Yukie)

国立研究開発法人 放射線医学総合研究

所・分子イメージング研究センター・主任研究員

研究者番号: 10397242

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし