

令和元年6月19日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26430140

研究課題名(和文) がんの不均一性・変動性制御にむけた抗がん剤オーダーメイド投薬アプローチ

研究課題名(英文) Tailor-made medicine approach for control of cancer heterogeneity and drug resistance

研究代表者

南雲 陽子 (Nagumo, Yoko)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：70373339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：がんは薬物療法で一度縮退が見られても薬剤耐性化により再発する場合がある。本研究では卵巣がんを対象に、種々抗がん剤が細胞に与える変動を解析することで、感受性を長く維持するオーダーメイド投薬法を導き出す戦略の開発を目的とした。薬剤耐性細胞ライブラリー作成の結果、耐性を得やすい細胞・薬剤に傾向が見られ、耐性薬剤との併用で相乗効果が得られる組み合わせや、他の薬剤に対しより感受性を示すものを見出した。さらにマイクロアレイ解析から、ある遺伝子産物の阻害剤を用いたところ、耐性減弱効果が認められた。以上により、耐性化後処理すべき薬剤の選出、すなわちオーダーメイド投薬法についての情報が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

不均一性が特に高い卵巣がんを対象に、種々の抗がん剤が、個々のがん細胞に与える変動を解析することで、薬剤耐性を得やすい細胞・薬剤や、悪性度に関する情報を得た。次に、耐性化した場合に次に処理すべき薬剤の選出、感受性にシフトさせる投薬法についての情報が得られた。以上の戦略は、実際のがんに応用することで、感受性を維持し悪性度の低い状態に長く留めるためのオーダーメイド投薬法に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：Cancer may recur due to the development of drug resistance, even if the regression is seen in the first drug therapy. In this study, we aimed to develop a strategy to derive a tailor-made medicine that maintains sensitivity for a longer time by analyzing the modulation that various anticancer agents give to ovarian cancer cells.

As a result of creating a drug resistant cell library, we found a tendency for cells and drugs that are easy to obtain resistance, and found a combination that could obtain a synergistic effect when used in combination with resistant drugs, or one that was more sensitive. Furthermore, from the microarray analysis, when an inhibitor of a certain gene product was used, a resistance reducing effect was observed. From the above, selection of drugs to be used for resistant cancer cells, that is, information on tailor-made medicine was obtained.

研究分野：細胞生物学

キーワード：薬剤感受性変動 オーダーメイド治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

抗がん剤開発は従来の化学療法薬から分子標的薬へと大きくシフトし、劇的な治療効果を上げる薬剤も現れてきた。しかしながら薬剤に対する耐性の出現などにより、がん死の大きな要因である再発は防げない場合が多い。そこで近年では、治癒をねらう薬物療法の考え方を見直し、再発に繋がる激しい増殖を抑えることでがんと共存しながら長期生存を得る治療概念がでてきているが、この概念を阻むのもまた、薬剤耐性化である。

薬剤耐性化する原因として、がんがゲノムの不安定性を伴う疾患であることが挙げられる。がん組織の中に様々な性質の細胞が存在し(不均一性)、経時的にその性質が変わっていく(変動性)ため、薬剤が組織内の全てのがん細胞を抑えきれず、生き残ったがん細胞が増殖・耐性化していくのが薬剤耐性化の道筋であると考えられる。したがってこの「不均一性」と「変動性」に対応し、耐性化の制御を含めたがん薬物療法が確立できれば、更なる治療効果の向上が期待できる。そのためには、個々のがんを理解し状態変化に個別に対応していくオーダーメイド治療が必要と考えられる。このような治療法は抗がん剤の種類にかかわらず、また今後どのような抗がん剤が開発されようと必要である。

#### 2. 研究の目的

がんは、発生要因や悪性度が多様で不均一、かつ形質変動も伴うため、化学療法で一度縮退が見られても薬剤耐性化により再発・進行してしまう場合がある。そこで本研究では不均一性が特に高い卵巣がんを対象に、種々の抗がん剤が、個々のがん細胞に与える変動を解析することで、感受性を維持し悪性度の低い状態に長く留めるためのオーダーメイド投薬法を導き出すストラテジーの開発を目的とした。

#### 3. 研究の方法

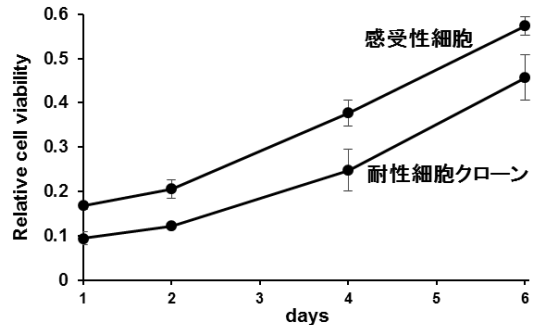
卵巣がん細胞は異なる病理組織型由来の細胞、増殖因子感受性や薬剤感受性が異なることが知られている細胞、卵巣がん発生との関連が示唆されている遺伝子変化が見られる細胞、がん幹細胞様 population が認められる細胞など、性質の異なる細胞を複数用いた。用いる薬剤としては、初回・二次化学療法で用いられる薬剤や、卵巣がん発生との関連が示唆されているシグナル伝達経路を阻害する分子標的薬群を用いた。各細胞に対し、各薬剤を数か月間継続処理し耐性細胞を複数得た。薬剤処理の前後で、50%増殖阻害濃度測定、増殖速度測定、wound healing assayなどを検討した。さらに得られた耐性細胞に対し、各薬剤単独、もしくは耐性化した薬剤との併用で増殖阻害濃度を測定・比較した。最終段階として、耐性や感受性、がん化因子変動の要因となる細胞内の変動を見出すため、マイクロアレイ解析を含む種々解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 薬剤耐性細胞ライブラリーの調製

まず、10種以上の卵巣がん細胞と薬剤を用いて、各細胞に対する各薬剤の細胞毒性(IC<sub>50</sub>)を算出した。その後、IC<sub>50</sub>の値を参考にしながら薬剤を継続処理し、徐々に薬剤濃度を増加させることで耐性細胞の取得を試みた。その結果9種類の細胞において9種類の薬剤のいずれかに耐性となった**薬剤耐性細胞ライブラリー**を得ることができた。

また、いくつかの細胞と薬剤の組み合わせに関しては耐性細胞をクローン化し、各クローンの耐性度合測定のほか、増殖速度測定、wound healing assay や種々分泌因子の測定を行った。その結果、増殖速度が極端に早くなる例が見られなかったこと（右図）、一方でwound healing や種々分泌因子での変動が見られたことから、**悪性度評価については増殖速度以外にもサイトカイン分泌などを指標にすることが示唆された。**



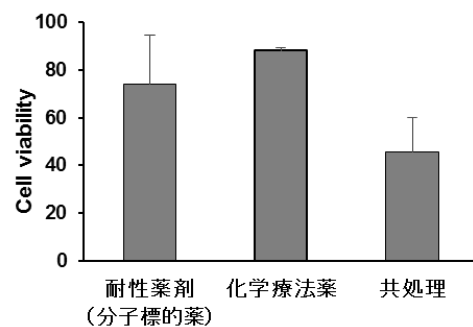
### (2) 薬剤耐性に関する細胞・薬剤毎の情報

以上の結果により、**薬剤耐性を得やすい細胞・薬剤に関する情報**が得られた。より詳細な解析が必要ではあるが、がん幹細胞様 population が存在すると言われている細胞では種々薬剤に対して耐性が得やすい傾向があった。薬剤に関しては、化学療法で使用される薬剤に関しては耐性が得やすい場合が多かったが、分子標的薬群からは、耐性が得られやすいもの、得られなかったものに分かれる傾向があった（下表）。

卵巣がん細胞種	A	B	C	D
耐性獲得薬剤数/ 耐性処理薬剤数	6/12	5/12	0/7	0/7
薬剤種	I	II	III	IV
耐性獲得細胞数/ 耐性処理細胞数	7/11	5/12	0/7	0/7

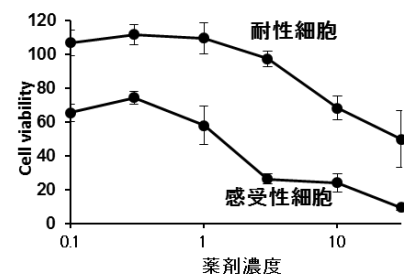
### (3) 耐性細胞に相乗効果を示す薬剤の探索

続いて、得られた耐性細胞に対し、耐性化した薬剤との併用で種々薬剤を処理したところ、**相乗効果が得られる組み合わせ**を見出した。中でもある分子標的薬に対して耐性となった細胞に対して化学療法薬を共処理した際に相乗効果が見られた（右図）。そこで WB 解析を行ったところ、増殖シグナルタンパク質のリン酸化における変動が示唆された。



### (4) 耐性細胞が他の薬剤に対しより感受性を示した例

また、ある薬剤に耐性となった細胞で、**他の薬剤に対しより感受性を示した**ものもあった（右図）。今後マイクロアレイ解析などで感受性の要因を探索し、相関を検討する予定である。



### (5) がん化因子変動薬剤による感受性化

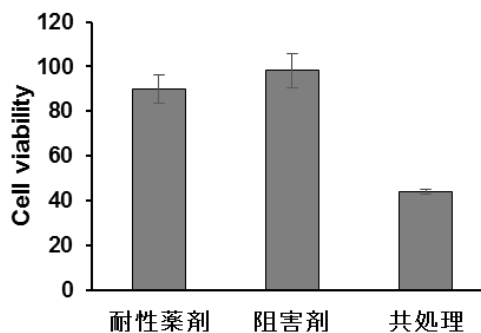
一方で、より効率的に薬剤感受性を保持させるべく、がん化に関わる因子を変動させる薬剤の検討を行った。その結果、卵巣がんのがん化に関わる因子を減少させる薬剤を

見出した。この薬剤をある細胞とその化学療法薬耐性細胞に処理したところ、**耐性細胞でより感受性を示す**ことがわかった。今後詳細を解析する予定である。

#### (6) マイクロアレイの結果全般

最終段階として、上記の耐性や感受性、がん化因子変動の要因となる細胞内の変動を見出すため、種々解析を行った。その一環として、臨床応用されている、もしくは新たな応用が検討されているいくつかの薬剤に耐性になった細胞から total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、いくつかの遺伝子の増減が検出された。

それらを解析したところ、**複数の耐性細胞で同様の変動を示す遺伝子**があった。個別に qRT-PCR を行い、その変動を確認した。そこで、その**遺伝子産物の阻害剤を用いたところ、薬剤耐性を減弱する**効果が認められ(右図)、その効果は耐性を獲得する前の細胞ではみられなかった。詳細をまとめて投稿準備中である。



以上のように、不均一性が特に高い卵巣がんを対象に、種々の抗がん剤が、個々のがん細胞に与える変動を解析することで、薬剤耐性を得やすい細胞・薬剤や、悪性度に関する情報を得た。さらに、耐性化した場合に次に処理すべき薬剤の選出、感受性にシフトさせる投薬法についての情報が得られた。以上の戦略は、実際のがんに応用することで、感受性を維持し悪性度の低い状態に長く留めるためのオーダーメイド投薬法に寄与するものである。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

1. Yusuke Kanda, Youhei Yamasaki, Yoshie Sasaki-Yamaguchi, Noriko Ida-Koga, Shinji Kamisuki, Fumio Sugawara, Yoko Nagumo & Takeo Usui. TRPA1-dependent reversible opening of tight junction by natural compounds with an  $\alpha,\beta$ -unsaturated moiety and capsaicin. *Sci. Rep.* **8**, 2251 (2018), 査読有.
2. Nagumo Y., Motoyama T, Hayashi T, Hirota H, Aono H, Kawatani M, Osada H, and Usui T. Structure-activity relationships of terpendole E and its natural derivatives. *ChemistrySelect*, **2**, 1533-4536 (2017), 査読有.
3. Kanda Y, Yamasaki Y, Shimura S, Kamisuki S, Sugawara F, Nagumo Y., and Usui T. MA026, an anti-hepatitis C virus compound, opens tight junctions of the epithelial cell membrane. *J. Antibiot.* **70**, 691-694 (2017), 査読有.
4. Tuchikawa H, Hayashi T, Shibata H, Murata M, Nagumo Y., and Usui T. Bafilomycin analogue site-specifically fluorinated at the pharmacophore macrolactone ring has potent vacuolar-type ATPase inhibitory activity. *Tetrahedron Lett.* **57**, 2426-2429 (2016), 査読有.
5. Miyamae Y, Nishito Y, Nakai N, Nagumo Y., Usui T, Masuda S, Kambe T, and Nagao M. Tetrandrine causes lipids accumulation through blockage of autophagy in hepatic stellate cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **477**, 40-46 (2016), 査読有.
6. Ota Y, Chinen T, Yoshida K, Kudo S, Nagumo Y., Shiwa Y, Yamada R, Umihara H, Iwasaki K, Masumoto H, Yokoshima S, Yoshikawa H, Fukuyama T, Kobayashi J, and Usui T. Eudistomin C, an antitumor and antiviral natural product, targets 40S ribosome and inhibits protein translation.

*ChemBioChem*, **17**, 1616-1620 (2016), 査読有.

7. Yuko Nishiyama, Tomohiro Ohmichi, Sayaka Kazami, Hiroki Iwasaki, Kousuke Mano, Yoko Nagumo, Fumitaka Kudo, Sosaku Ichikawa, Yoshiharu Iwabuchi, Naoki Kanoh, Tadashi Eguchi, Hiroyuki Osada & Takeo Usui. Vicenistatin induces early endosome-derived vacuole formation in mammalian cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **80**, 902-910 (2016), 査読有.

8. Shun-ichiro Uesugi, Tsubasa Watanabe, Takamichi Imaizumi, Yu Ota, Keisuke Yoshida, Haruna Ebisu, Takumi Chinen, Yoko Nagumo, Masatoshi, Shibuya, Naoki Kanoh, Takeo Usui, and Yoshiharu Iwabuchi. Total Synthesis and Biological Evaluation of Irciniastatin A (a.k.a. Psymberin) and Irciniastatin B. *J. Org. Chem.* **80**, 12333-12350 (2015), 査読有.

9. Akihisa Iida, Takeo Usui, Feten Zar Kalai, Junkyu Han, Hiroko Isoda, Yoko Nagumo. Protective effects of *Nitraria retusa* extract and its constituent isorhamnetin against amyloid  $\beta$ -induced cytotoxicity and amyloid  $\beta$  aggregation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **79**, 1548-1551 (2015), 査読有.

10. Yoko Nagumo, Akiko Iguchi-Manaka, Yumi Yamashita-Kanemaru, Fumie Abe, Gunter Bernhardt, Akira Shibuya, Kazuko Shibuya. Increased CD112 expression in methylcholanthrene-induced tumors in CD155-deficient mice. *PLoS ONE*, **9**, e112415 (2014), 査読有.

11. Takumi Chinen, Yoko Nagumo, Takeo Usui. Construction of a genetic analysis-available multidrug sensitive yeast strain by disruption of the drug efflux system and conditional repression of the membrane barrier system. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **60**, 160-162 (2014), 査読有.

[学会発表](計 13 件)

1. 内海 由佳、工藤 駿、工藤 史貴、江口 正、南雲 陽子、臼井 健郎、Vicenistatin による出芽酵母膜形態異常、日本農芸化学会、2019 年 03 月 24 日、東京農業大学

2. 新谷 佳菜、恵比須 春菜、畑中 大成、坂倉 彰、早川 一郎、南雲 陽子、臼井 健郎、 - チュープリン特異的阻害剤 gatastatin 類縁化合物の構造活性相関検討、日本農芸化学会、2019 年 03 月 24 日、東京農業大学

3. 向山 海凧、山崎 洋平、南雲 陽子、臼井 健郎、TRPV4 agonist による可逆的タイトジャンクション開口機構解析、日本農芸化学会、2019 年 03 月 24 日、東京農業大学

4. Screening of paracellular permeability enhancers revealed the tight junction opening via TRPA1 by  $\alpha,\beta$ -unsaturated carbonyl compounds and capsaicin, Yoko Nagumo, Yusuke Kanda, Youhei Yamasaki, Yoshie Sasaki-Yamaguchi, Noriko Ida-Koga, Shinji Kamisuki, Fumio Sugawara, Takeo Usui, JAACT2018 Tsukuba [The 31st Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology] (国際学会) 2018 年 11 月 07 日、つくば国際会議場

5. 向山海凧 山崎洋平、神田祐輔、南雲陽子、臼井健郎、Tight junction regulation by TRP channels in MDCKII cells、第 2 9 回新薬創製談話会、2018 年 07 月 09 日、静岡県伊豆氏

6. 山崎 洋平、神田 祐輔、志村 聡美、紙透 伸治、菅原 二三男、南雲 陽子、臼井 健郎、MA026 によるタイトジャンクション開口作用機構解析、日本農芸化学会、2017 年 03 月 18 日、京都女子大学、京都府京都市

7. 南雲陽子、本山高幸、林敏明、廣田洋、青野晴美、川谷誠、長田裕之、臼井健郎、Terpendole E 誘導体の構造活性相関研究、第 34 回メディスナルケミストリーシンポジウム、2016 年 12 月 01 日、つくば国際会議場、茨城県つくば市

8. 南雲陽子、可逆的上皮透過性亢進機構の解析、第 2 7 回新薬創製談話会 (招待講演) 2016 年 08 月 31 日、筑波山 江戸屋、茨城県つくば市

9. Yohei Yamasaki, Yusuke Kanda, Yoko Nagumo and Takeo Usui. Analyses of the mechanism of reversible tight junction opening by sialidase, 2016 International Symposium on New Frontiers in Microbiology and Biotechnology, 2016 年 07 月 06 日、筑波大学 (茨城県つくば市)

10. 工藤 駿、吉田 圭佑、南雲 陽子、山田 諒介、海原 浩辰、横島 聡、福山 透、小林 淳一、臼井 健郎、海産生物由来物質 eudistomin C の作用機構解析、日本農芸化学会、2016 年 03 月

28日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

11. 山崎 洋平、神田 祐輔、南雲 陽子、臼井 健郎、Sialidaseによる可逆的Tight junction開口作用機構解析、日本農芸化学会、2016年03月28日、札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

12. 吉田 圭佑、南雲 陽子、臼井 健郎、ミトコンドリア分裂阻害剤の探索、日本農芸化学会、2015年03月27日、岡山大学（岡山県岡山市）

13. 神田 祐輔、南雲 陽子、紙透 伸治、菅原 二三男、臼井 健郎、可逆的tight junction開口物質の探索、日本農芸化学会、2015年03月27日、岡山大学（岡山県岡山市）

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：細胞層透過促進剤、薬剤吸収補助用組成物、及び医薬品組成物  
発明者：臼井健郎、南雲陽子、向山海風、林良雄、谷口敦彦、内山千尋  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：特願 2019-057323  
出願年：2019年  
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/view/usui-lab/>

## 6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。