

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670559

研究課題名(和文)化合物スクリーニングによる子宮頸癌の癌幹細胞を標的とした新規放射線増感剤の探索

研究課題名(英文) Identification of radiosensitizers targeting cancer stem cells in cervical cancer by using high throughput screening

研究代表者

玉利 慶介 (Tamari, Keisuke)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任助教(常勤)

研究者番号：30718995

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：放射線増感剤は癌の放射線感受性を高める薬剤である。近年、癌幹細胞という治療抵抗性の細胞集団の存在を示す報告が数多くなされており、この癌幹細胞を標的とした薬剤スクリーニングを行って、幾つかの候補化合物と放射線を併用したが、必ずしも放射線治療効果を高めるわけではなかった。ここで方針を変え、低酸素状態は癌幹細胞が好む環境かつ、放射線が効きにくい環境として知られているため、低酸素細胞を標的としたスクリーニングも行った結果、幾つかの低酸素放射線増感剤を同定することができた。本研究成果としては、放射線増感剤スクリーニングの方法論を確立したことである。

研究成果の概要(英文)：Cancer recurrence and metastases can be due to a subpopulation of cells with stem-like characteristics, cancer stem cells (CSCs) which maintain the capacity to regenerate entire tumors. We suspected that CSC-specific compounds had radiosensitizing effects in parental cells. To accomplish this purpose, we performed high throughput screening (HTS) to identify compounds that specifically act CSCs. Finally, we found five CSC-specific compounds. However, these compounds had no significant radiosensitizing effects for parental HeLa cells. We also performed cell-based high throughput screening to study new radiosensitizers targeting hypoxic tumor cells. We identified 22 compounds as candidate. Clonogenic survival assay showed their significant radiosensitizing effect in hypoxic condition. In conclusion, we identified new radiosensitizers by high throughput screening. This is a possible method for identifying radiosensitizers targeting hypoxic cancer cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線増感剤 化合物スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

子宮頸癌は放射線治療の役割が大きいですが、特に進行期においての治療成績は改善の余地が残されている。最近、基礎研究において癌幹細胞とよばれる放射線治療抵抗性、抗癌剤抵抗性を示す、癌細胞の中でも1%程度の細胞集団の存在を示す報告が数多くなされ、放射線治療後の再発に深く関わっていると考えられるようになってきている。従って、放射線治療成績のさらなる改善には、この癌幹細胞を根絶するようなアプローチでの研究も重要である。

放射線増感剤は癌の放射線治療への感受性を高める薬剤で、古くから研究されているが、臨床応用まで至ることはほぼなかった。今後は低毒性かつ放射線増感効果の高い化合物をさらに探索する必要があり、その探索の効率化が急務である。我が国でも文部科学省を中心に「化合物ライブラリーを活用した創薬等最先端研究・教育基盤の整備」により、大阪大学を含め7大学に創薬スクリーニング拠点が近年ようやく整備され、大学でもスクリーニングがしやすくなった。

海外ではこの新たな創薬手段を用いた放射線増感剤のスクリーニング研究は既にいくつか報告がある(Cancer Res 2007, Transl Oncol 2013)。また、癌幹細胞を標的とした化合物スクリーニング研究も既に報告がある(Cell 2009)。しかし、癌幹細胞を標的とする放射線増感剤の研究についてはこれまで報告がない。

2. 研究の目的

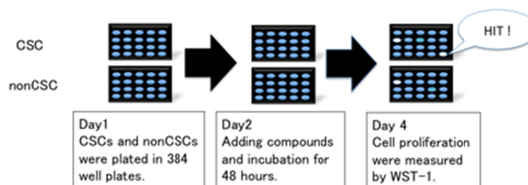
まず放射線増感剤の化合物スクリーニング法の最適な条件を確立し、申請者らが作成した子宮頸癌の癌幹細胞を用いてスクリーニングする。そのヒット化合物の放射線増感効果を *in vitro*, *in vivo* で確認し、創薬に最適な化合物を同定する。

3. 研究の方法

癌幹細胞を標的とした放射線増感剤スクリーニング

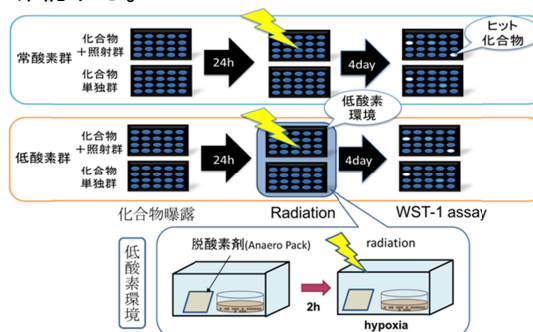
まず継代している子宮頸癌の培養皿が80%コンフルエントの状態、トリプシン処理し細胞を回収する。その後、フローサイトメトリーによるセルソーティングを行って、癌幹細胞を回収する。その後、500個/well ずつ、96 well plate へまき、10 μM の化合物へ24時間暴露した後、照射群に8 Gy の照射を行った後に培地交換し、その4日後に MTS アッセイにて cell viability を測定する。control 群(化合物+0 Gy)と照射群(化合物+8 Gy)とを比較し、照射群で control 群よりも viability が低いものをヒット化合物とする。化合物スクリーニングで同定したヒット化合物を用いて、まず *in vitro* で実際に癌幹細胞への放射線増感作用の確認を行う。その後、ヒット化

物の濃度をふって Cell Viability アッセイを行い、最適な化合物濃度を確認する。その後 Clonogenic Survival アッセイでの放射線増感作用を確認する。



低酸素細胞への放射線増感剤スクリーニング

低酸素環境は、HeLa 細胞を播種したプレートに密閉タッパー内にアネロバックと封じ込め、十分に細胞を低酸素にした後に、control 群(化合物+0 Gy)と照射群(化合物+8 Gy)とを比較し、照射群で control 群よりも viability が低いものをヒット化合物とする。ヒット化合物の濃度をふって Cell Viability アッセイを行い、最適な化合物濃度を確認する。その後 Clonogenic Survival アッセイでの放射線増感作用を確認する。

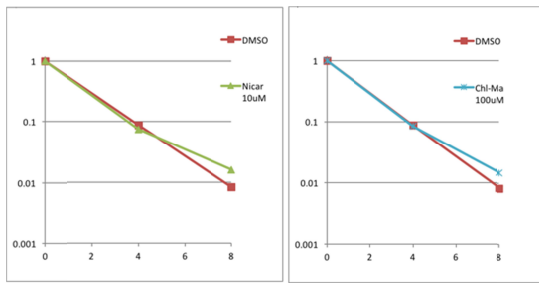


4. 研究成果

癌幹細胞を標的とした放射線増感剤スクリーニング

スクリーニングの結果、幾つかの化合物は癌幹細胞に特に殺細胞効果を持つことがわかった。しかし、それらと放射線を併用した場合、癌細胞全体の放射線照射後の生存率を有意に低下させるわけではなかった





(図1,2)。

図 1. 癌幹細胞特異的化合物スクリーニング

図 2. ヒット化合物の放射線増感効果検証

低酸素細胞への放射線増感剤スクリーニング

低酸素状態は癌幹細胞が好む環境かつ、放射線が効きにくい環境として知られているため、低酸素細胞を標的としたスクリーニングも行ったところ、幾つかの低酸素放射線増感剤を同定することができた。これらは、低酸素増感剤として確かに放射線の効果を増強することを確認した(図3)。

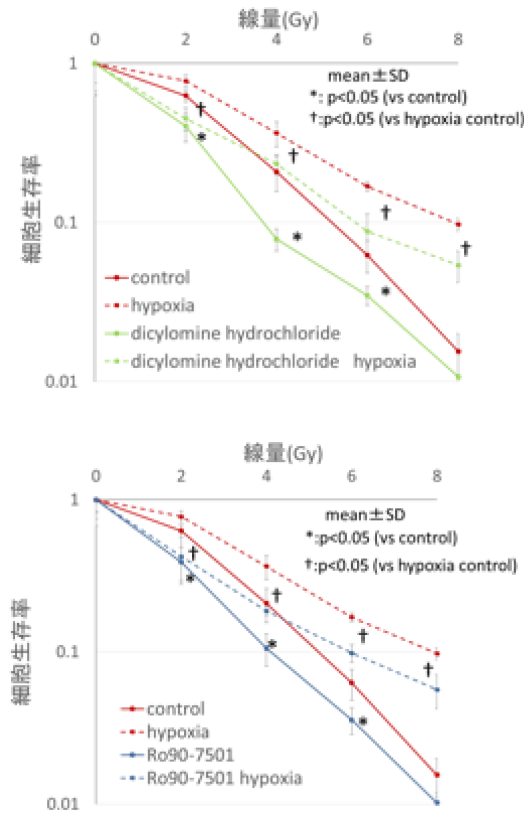


図 3 . 低酸素増感剤スクリーニングによる候補化合物の放射線増感効果の検証

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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

Tamari K, Ishii H, Konno M, Nishida N, Kawamoto K, Koseki J, Beak SJ, Taketo K, Doki Y, Mori M, Ogawa K. Identification of radiosensitizers targeting cancer stem cells in cervical cancer by using high throughput screening. ポスター発表、名古屋国際会議場、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月

Tamari K, Seo Y, Takahashi Y, Suzuki O, Isohashi F, Yoshioka Y, and Ogawa K. Identification of novel radiosensitizers targeting hypoxic cancer cells by high throughput screening. Poster presentation in Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, Feb 2016, Hyatt Regency Maui Maui, Hawaii, USA.

Tamari K, Seo Y, Takahashi Y, Suzuki O, Isohashi F, Yoshioka Y, and Ogawa K. A novel method to identify radiosensitizers targeting hypoxic cancer cells by high throughput screening. Poster presentation in AACR Annual Meeting 2016, Apr. 2016, Ernest N. Morial Convention Center New Orleans, Louisiana, USA

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

玉利慶介 (TAMARI Keisuke)
大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)
研究者番号：30718995

(2)研究分担者

瀬尾雄二 (SEO Yuji)
大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)
研究者番号：00302000

磯橋文明 (ISOHASHI Fumiaki)
大阪大学・医学系研究科・特任准教授(常勤)
研究者番号：00448036

小川和彦 (OGAWA Kazuhiko)
大阪大学・医学系研究科・教授
研究者番号：40253984

林和彦 (HAYASHI Kazuhiko)
大阪大学・医学系研究科・招へい教員
研究者番号：70718981

(3)連携研究者

石井秀始 (ISHII Hideshi)

大阪大学・医学系研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：10280736

金允政 (Yoon-Jeong Kim)

大阪大学・産学連携本部・教授

研究者番号：40574330