

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15051

研究課題名(和文)新規蛍光ヒトがん幹細胞阻害薬の発見とin vivo作用機構解明

研究課題名(英文)in vivo Mechanisms of Novel Selective Fluorescent Leukemia Stem Cell Inhibitor

研究代表者

田中 利男(Tanaka, Toshio)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00135443

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)：我々が発見した選択的ヒトがん幹細胞阻害薬の中で、in vitroとin vivoにおいてヒトがん幹細胞に対して最も選択性が高く、かつ蛍光特性のある特徴的新規化合物ZM-B708を中心に、がん幹細胞に選択性の無いimatinib等の臨床分子標的抗がん剤等の作用機序を解析し、ヒトがん幹細胞に対する独自の選択的阻害薬ZM-B708の選択性の分子基盤を解明した。その成果より、独自の選択的ヒトがん幹細胞阻害薬ZM-B708の最大の特徴である蛍光特性を活用し、ヒトがん幹細胞に対する選択性の分子機構を解明し、ヒトがん幹細胞に対するin vitro及びin vivo選択的増殖阻害の分子機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：Elimination of leukemia stem cells is necessary for the destruction of malignant cell populations. Using the LSC-xenograft zebrafish screening method we previously developed, we found that the fluorescent compound DiOC5(3) selectively marked LSCs and suppressed their proliferation in vivo and in vitro. DiOC5(3) had no obvious toxicity to human umbilical cord blood CD34+ progenitor cells and normal zebrafish. It accumulated in mitochondria through organic anion transporter polypeptides that are overexpressed in the plasma membrane of LSCs, and induced apoptosis via ROS overproduction. DiOC5(3) also inhibited the nuclear translocation of NF- κ B through the downregulation of LSC-selective pathways, as indicated from DNA microarray analysis. In summary, DiOC5(3) is a new type of anti-LSC compound available for diagnostic imaging and therapeutics that has the advantage of being a single fluorescent chemical.

研究分野：システムズ薬理学

キーワード：ヒトがん幹細胞阻害薬 ZM-B708 悪性腫瘍治療抵抗性 ヒトがん幹細胞治療薬 ゼブラフィッシュ 免疫不全マウス 蛍光試薬 がん幹細胞選択性

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍は、我が国における死因第一位であり、その治療抵抗性は、世界における最大の医療問題であり、アンメットメディカルニーズの代表である。特に悪性腫瘍の「治療抵抗性」の克服における中心的課題がヒトがん幹細胞治療薬である。一方、がん幹細胞研究の歴史は、特に最近 *in vivo* 研究が不可欠であり、免疫不全マウス開発史であることは、国際的にも明らかである。しかしながら免疫不全マウスによる選択的ヒトがん幹細胞治療薬の *in vivo* 探索研究は、そのスループットの低さや重症の免疫不全マウスから、多くの困難を抱えている。そこで我々は、約10年前からヒトがん幹細胞移植モデルとしてゼブラフィッシュを導入し(PLOS ONE 2014;9(1):e85439 特願 2013-217315, 2012-235286)多くの基盤技術を開発し、多数の特許を取得し、ようやく選択的ヒトがん幹細胞治療薬の *in vivo* 探索研究が可能となったので提案する。

2. 研究の目的

悪性腫瘍の治療抵抗性における中心的課題が、がん幹細胞であることは、世界的共通認識である。具体的には、悪性腫瘍に含まれる少数のがん幹細胞が、現在の化学療法や放射線療法に対して治療抵抗性であるため、再発や転移の問題が困難を極めてるのが現状である。がん幹細胞研究は従来より免疫不全マウス開発無しには成立しないことから、NOG マウス等を活用している。一方、我々は新しい脊椎動物モデルであるゼブラフィッシュを導入し、免疫抑制しないヒトがん幹細胞移植モデル(PLOS ONE 2014;9(1):e85439, Tumor Biology 2014 Sept 11, 特願 2013-217315, 2012-235286)を創成し、選択的 *in vivo* ヒトがん幹細胞阻害薬(特願 2012-236977, 2012-236981)を発見したので、その *in vivo* 薬理作用のオミックス機構を解明する。

3. 研究の方法

ヒトがん幹細胞治療機構研究において、不可欠な独自のヒトがん幹細胞移植モデル(PLOS ONE 2014;9(1):e85439, Tumor Biology 2014 Sept 11, Methods in Molecular Biology, Vol. 1165 Robles-Flores, Martha (Ed.) 2014, 223-238, Humana Press, 特願 2012-234617 異種細胞移植モデル動物の作製方法、特願 22012-235286 透明ゼブラフィッシュの作製方法、及び当該方法によって作製されたゼブラフィッシュを用いた生体イメージング評価法)を創成し、その結果新規選択的ヒトがん幹細胞阻害薬 ZM-B708 等(特願 2012-236977, 2012-236981 がん細胞阻害薬、がん幹細胞検出用プローブ)を多数発見して

いる。そこで、MZ-B708 等を活用し、ヒトがん幹細胞選択性の分子基盤を解明する。

(1) 選択的がん幹細胞阻害薬アフィニティークロマトグラフィーにより結合タンパク質を同定。

更なるスクリーニングにより、*in vitro* と *in vivo* においてヒトがん幹細胞に対する選択性が最大の誘導体を選択し、これをリガンドとする薬物アフィニティークロマトグラフィーにより、選択的がん幹細胞阻害薬結合タンパク質を精製し、質量分析から各タンパク質を同定する。

同定された各選択的がん幹細胞阻害薬結合タンパク質のヒト組み換えタンパク質を製造し、代表的選択的がん幹細胞阻害薬の結合親和性や結合特性を解析する。

(2) 同定された各選択的がん幹細胞阻害薬結合タンパク質の細胞生物学的機能を解明する。

各選択的がん幹細胞阻害薬結合タンパク質発現を siRNA によりノックダウンしたり、TALEN/CRISPR でノックアウトしたり、Tol2 により過剰発現することにより、がん幹細胞機能に及ぼす効果を解析し、細胞生物学的役割を明らかにする。

各選択的がん幹細胞阻害薬結合タンパク質発現を siRNA によりノックダウンしたり、TALEN/CRISPR によるノックアウトや過剰発現したヒトがん幹細胞を移植し、生体レベルでの機能を解明する。

各選択的がん幹細胞阻害薬結合タンパク質に対する抗体を作製し、ヒトがん幹細胞移植モデルやヒト臨床癌組織における発現解析から、病態生理学的役割を明らかにする。

各選択的がん幹細胞阻害薬結合タンパク質発現を siRNA によりノックダウンしたり、TALEN/CRISPR によるノックアウトや Tol2 により過剰発現したヒトがん幹細胞を移植し、現在の臨床分子標的抗がん剤や独自の選択的ヒトがん幹細胞阻害薬に対する薬効応答を解析する。

(3) 独自の選択的ヒトがん幹細胞阻害薬 ZM-B708 等の蛍光特性を活用して、分子作用機構解析。

ヒトがん幹細胞阻害薬 ZM-B708 等の選択性の分子機構を、薬物動態学と薬力学の両面から解析する。

ヒトがん幹細胞阻害薬 ZM-B708 のヒトがん幹細胞選択性に関する薬物動態学的解析
ハイコンテツイメージャー Image XpressMicro XL により、*in vitro* 及び *in vivo* 薬物動態学的解析により、ヒトがん幹細胞阻害薬 ZM-B708 は *in vitro* 及び *in vivo* イメージングにおけるヒトがん幹細胞選択性が認められるが、その分子機構に關与する分子群を探索する。

ヒトがん幹細胞阻害薬 ZM-B708 動態関連遺伝子を、siRNA によりノックダウンしたり、TALEN/CRISPR によるノックアウトや Tol2 に

よる過剰発現により、invitro イメージングによる動態変化を解析し、**in vitro がん幹細胞選択性動態遺伝子を決定する。**

ヒトがん幹細胞阻害薬 ZM-B708 動態関連遺伝子を、siRNA によりノックダウンしたり、TALEN/CRISPR によるノックアウトや Tol2 により過剰発現したヒトがん幹細胞を移植し、in vivo イメージングによる動態変化を解析し、**in vivo がん幹細胞選択性動態遺伝子を決定する。**

各選択的がん幹細胞阻害薬結合タンパク質発現を siRNA によりノックダウンしたり、TALEN/CRISPR によるノックアウトや Tol2 により過剰発現したヒトがん幹細胞を移植し、独自の選択的ヒトがん幹細胞阻害薬に対する薬効応答を解析し **in vitro 及び in vivo がん幹細胞選択的薬効遺伝子を決定する。**本研究ではこれら独自の新規蛍光性選択的ヒトがん幹細胞阻害薬の作用機構を解析する事により、今後の悪性腫瘍の医療において中心となるヒトがん幹細胞治療薬のオミックス機構を解明し、近未来の臨床がん治療の基盤を確立する。

4 . 研究成果

悪性腫瘍は、我が国における死因第一位であり、その治療抵抗性は、世界における最大の医療問題であり、アンメットメディカルニーズの代表である。特に悪性腫瘍の「治療抵抗性」の克服における中心的課題がヒトがん幹細胞治療薬である。一方、がん幹細胞研究の歴史は、特に最近 in vivo 研究が不可欠であり、免疫不全マウス開発史であることは、国際的にも明らかである。しかしながら免疫不全マウスによる選択的ヒトがん幹細胞治療薬の in vivo 探索研究は、そのスループットの低さや重症の免疫不全マウスから、多くの困難を抱えている。そこで我々は、約 10 年前からヒトがん幹細胞移植モデルとしてゼブラフィッシュを導入し(PLOS ONE 2014;9(1):e85439 特願 2013-217315, 2012-235286)多くの基盤技術を開発し、多数の特許を取得し、ようやく可能となった選択的ヒトがん幹細胞治療薬の in vivo 作用機構を解析した。

その結果、我々が発見している選択的ヒトがん幹細胞阻害薬の中で、in vitro と in vivo においてヒトがん非幹細胞に比較してヒトがん幹細胞に対して最も選択性が高く、かつ蛍光特性のある特徴的新規化合物 ZM-B708 を中心に、がん幹細胞に選択性の無い imatinib 等の臨床分子標的抗がん剤等の作用機序を解析し、ヒトがん幹細胞に対する独自の選択的阻害薬 ZM-B708 の選択性の分子基盤を解明した。

その成果より、ヒトがん幹細胞とは何かに関する薬理学的分子基盤を確立した。

具体的には、独自の選択的ヒトがん幹細胞阻害薬 ZM-B708 の最大の特徴である蛍光特性を活用して、ヒトがん幹細胞に対する選択性の分子機構を解明した。

さらに独自の選択的ヒトがん幹細胞阻害薬 ZM-B708 のヒトがん幹細胞に対する in vitro 及び in vivo 選択的増殖阻害の分子機構を解明した。

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7件)

Novel immunologic tolerance of human cancer cell xenotransplants in zebrafish. Zhang B, Shimada Y, Hirota T, Ariyoshi M, Kuroyanagi J, Nishimura Y, Tanaka T. Transl Res. 2016 Apr;170:89-98.e3. doi: 10.1016/j.trsl.2015.12.007.Epub 2015 Dec 18. 査読有

Comparative study of the zebrafish embryonic toxicity test and mouse embryonic stem cell test to screen developmental toxicity of human pharmaceutical drugs.

Atsuto Inoue, Yuhei Nishimura, Norihito Matsumoto, Noriko Umemoto, Yasuhito Shimada, Toru Maruyama, Kana Kayasuga, Motohiko Morihara, Jun Katagi, Tsutomu Shiroya, Yasushi Hirota, Soonih Kim, Toshio Tanaka Fundamental Toxicological Sciences Vol. 3 No. 2 March 26, 2016 p.79-87 査読有

DNA Damage Response Is Involved in the Developmental Toxicity of Mebendazole in Zebrafish Retina.

Shota Sasagawa, Yuhei Nishimura, Tetsuo Kon, Yukiko Yamanaka, Soichiro Murakami, Yoshifumi Ashikawa, Mizuki Yuge, Shiko Okabe, Koki Kawaguchi, Reiko Kawase and Toshio Tanaka Front Pharmacol. 2016 Mar 14;7:57. 査読有

Using zebrafish in systems toxicology for developmental toxicity testing.

Nishimura Y, Inoue A, Sasagawa S, Koiwa J, Kawaguchi K, Kawase R, Maruyama T, Kim S, Tanaka T. Congenit Anom (Kyoto). 2016 Jan;56(1):18-27. doi: 10.1111/cga.12142. Review. 査読有

In Vivo Detection of Mitochondrial Dysfunction Induced by Clinical Drugs and Disease-Associated Genes Using a Novel Dye

ZMJ214 in Zebrafish.
Sasagawa S, Nishimura Y, Koiwa J, Nomoto T, Shintou T, Murakami S, Yuge M, Kawaguchi K, Kawase R, Miyazaki T, Tanaka T.
ACS Chem Biol. 2016 Feb 19;11(2):381-8.
Epub 2015 Dec 8. 査読有

Pharmacological profiling of zebrafish behavior using chemical and genetic classification of sleep-wake modifiers.
Nishimura Y, Okabe S, Sasagawa S, Murakami S, Ashikawa Y, Yuge M, Kawaguchi K, Kawase R, Tanaka T.
Front Pharmacol. 2015 Nov 3;6:257. doi: 10.3389/fphar.2015.00257. eCollection 2015. 査読有

Systems pharmacology of adiposity reveals inhibition of EP300 as a common therapeutic mechanism of caloric restriction and resveratrol for obesity.
Nishimura Y, Sasagawa S, Ariyoshi M, Ichikawa S, Shimada Y, Kawaguchi K, Kawase R, Yamamoto R, Uehara T, Yanai T, Tanaka T.
Front Pharmacol. 2015 Sep 15;6:199. doi: 10.3389/fphar.2015.00199. eCollection 2015. 査読有

〔学会発表〕(計9件)

International Meeting on Aquatic Mosel Organisms for Human Disease and Toxicology Reserch 「Zebrafish-Drug Discovery and Systems Pharmacology」田中利男
2016.3.18(岡崎コンファレンスセンター/愛知県岡崎市)

第89回日本薬理学会「トランスレーショナル薬理学とゼブラフィッシュ創薬」田中利男
2016.3.9-3.11(パシフィコ横浜/神奈川県横浜市)

第1回ゼブラフィッシュ創薬研究会「ゼブラフィッシュ創薬の新しい展開」田中利男
2015.11.6(三重大学/三重県津市)

第2回 Onco-Cardiology Meeting 「分子標的薬の心毒性に関するシステムズ薬理学」田中利男
2015.10.17(ソラシティーカンファレンスセンター/東京都千代田区)

第21回小型魚類研究会「システムズ薬理学とゼブラフィッシュ創薬」田中利男
2015.9.19.-9.20(大阪大学銀杏会館/大阪府吹田市)

ZDM8 「Hight Throughput Forward and Reverse Screen for Cardiotoxicology of

Anticancer Drugs in Zebrafish」田中利男
2015.8.21-8.28(ボストン/アメリカ合衆国)

第42回日本毒性学会「ゼブラフィッシュ創薬の国際的展開」田中利男
2015.6.29-7.1(石川県立音楽堂/石川県金沢市)

第62回日本実験動物学会「ゼブラフィッシュ創薬と個別化医療の新展開」田中利男
2015.5.28-5.30(京都テルサ/京都府京都市)

第69回日本栄養・食料学会「ゼブラフィッシュによるシステムズ栄養学のグローバル展開」田中利男
2015.5.16-5.17(パシフィコ横浜/神奈川県横浜市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
田中利男 (Tanaka Toshio)
三重大学大学院医学系研究科
教授
研究者番号：00135443

(2)研究分担者
西村有平 (Nishimura Yuhei)
三重大学大学院医学系研究科
准教授
研究者番号：30303720

(3)研究分担者
川瀬玲子 (Kawase Reiko)

三重大学大学院医学系研究科
助教
研究者番号：50746740