

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462034

研究課題名(和文) 薬剤耐性コロニーをモデルとした癌再発抑制へ繋がる化合物同定に関する研究

研究課題名(英文) Identification of compounds to suppress post-chemotherapeutic cancer relapse using drug-tolerant cancer subpopulations

研究代表者

西塚 哲(Nishizuka, Satoshi)

岩手医科大学・医学部・講師

研究者番号：50453311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：術後化学療法後再発癌は、生存に有利な薬剤寛容性細胞集団(DTC)が選択された結果と考えられる。独自に開発したCoLA法によりDTCをプロファイリングすると幹細胞または上皮性タンパクを発現する2群に分けられた。DTC特有の発現遺伝子としてTAF15を同定し、胃癌細胞株MKN45でノックダウンするとRNA polymerase阻害時と同様の形態学的変化を示した。DTC形成抑制を指標としてII型RNA polymerase阻害剤alpha-amanitin(alpha-AMA)が同定された。マウス癌性腹膜炎モデルへのalpha-AMAとCDDP併用投与で腹膜結節数減少、生存期間延長が認められた。

研究成果の概要(英文)：Post-chemotherapeutic cancer relapse has been considered a result of population selection of drug-tolerant colonies (DTCs). The originally developed CoLA technology revealed that DTCs are of two distinct subpopulations expressing either stem cell- or epithelia-associated proteins. The TAF15 gene was identified as one of the uniquely expressed genes in DTCs. Subsequent TAF15 gene knockdown demonstrated a similar morphological change that was seen when RNA polymerase inhibitors were administered. An RNA polymerase inhibitor, alpha-amanitin (alpha-AMA) was identified for suppression of DTCs in vitro. Concurrent administration of alpha-AMA/CDDP suppressed peritoneal dissemination and prolonged survival in a mouse model.

研究分野：腫瘍外科、薬剤耐性、化学療法

キーワード：化学療法 薬剤耐性 RNAポリメラーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

術後化学療法後の再発癌への治療は未確立である。今まで「腫瘍を構成する一部の細胞集団が再発に大きく関与している」という仮説が提唱されていたが、再発に関わる細胞集団がどのように生じるのか、抗癌剤治療後の選択にはどのような機構が存在するのかなどのメカニズムは明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

術後化学療法後の再発癌は、薬剤存在下で生存に有利な細胞集団が選択された結果と考えられる。本研究では、タンパク発現および異種移植による薬剤寛容性細胞集団 (Drug Tolerant Colonies, DTCs) の phenotyping、DTC 遺伝子発現解析、DTC 抑制標的分子同定、および術後化学療法後再発抑制へ繋がる低分子化合物同定、を最終目標とした。

### 3. 研究の方法

DTC phenotyping: 逆相タンパクアレイを基に独自に開発した Colony Lysate Array (CoLA) 法により個々の DTC についてタンパク定量解析を行った。DTC をヌードマウス皮下に移植した。

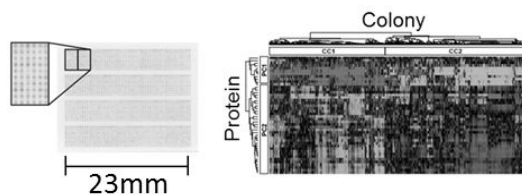
DTC 遺伝子発現解析: DNA マイクロアレイおよび Colony-RT-PCR により、探索的および選択的解析を行った。

DTC のタンパクおよび遺伝子発現解析から DTC 形成における分子標的を同定する。

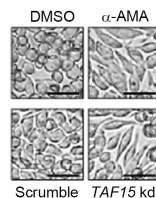
化合物および「化学療法支援基盤活動」より恵与された「標準阻害剤キット」を用いて DTC 抑制に関与する化合物同定を行った。

### 4. 研究成果

CoLA 法により個々の DTC をプロファイリングした (下図左)。クラスター解析により DTC は幹細胞または上皮タンパク優位の 2 群に分けられた (下図右)。薬剤の種類や濃度のパラメータに関連なしに発生していた。薬剤接触のない細胞と比較して、明らかな腫瘍形成能亢進は認められなかった。

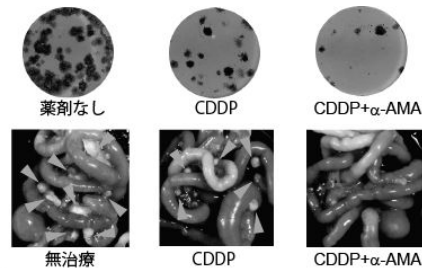


DTC の DNA マイクロアレイ解析から DTC 特有の発現遺伝子として RNA polymerase と協調して作用するタンパクをコードする *TAF15* が同定された。*TAF15* をヒト胃癌細胞株 MKN45 でノックダウンすると RNA polymerase 阻害剤と同様の形態学的変化を示した。



TAF15 遺伝子をノックダウン (kd) した MKN45 細胞

DTC 形成抑制および *TAF15* 発現抑制の観点から、II 型 RNA polymerase 阻害剤  $\alpha$ -amanitin ( $\alpha$ -AMA) が同定された。マウス癌性腹膜炎モデルに  $\alpha$ -AMA と CDDP を併用投与すると腹膜結節数の減少、生存期間の延長が認められた。



[上段] 薬剤抵抗性微小細胞集団 Drug Tolerant Colonies (DTCs)。[下段] 癌性腹膜炎モデル。CDDP+ $\alpha$ -AMA 群で生存期間の延長を認めた。矢頭は腫瘍結節。

### <引用文献>

Kume et al, *Sci Rep*, 2016.

### 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 14 件)

Kume K, Ikeda M, Miura S, Ito K, Sato KA, Ohmori Y, Endo F, Katagiri H, Ishida K, Ito C, Iwaya T, Nishizuka SS.  $\alpha$ -Amanitin Restrains Cancer Relapse from Drug-Tolerant Cell Subpopulations via TAF15. *Sci Rep*. 2016 May 16;6:25895. doi:10.1038/srep25895.

Koeda K, Chiba T, Noda H, Nishinari Y, Segawa T, Akiyama Y, Iwaya T, Nishizuka S, Nitta H, Otsuka K, Sasaki A. Intracorporeal reconstruction after laparoscopic pylorus-preserving gastrectomy for middle-third early gastric cancer: a hybrid technique using linear stapler and manual suturing. *Langenbecks Arch Surg*. 2016 May;401(3):397-402. doi:10.1007/s00423-016-1378-3.

Katagiri H, Kushida Y, Nojima M, Kuroda Y, Wakao S, Ishida K, Endo F, Kume K, Takahara T, Nitta H, Tsuda H, Dezawa M, Nishizuka SS. A Distinct Subpopulation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Muse Cells, Directly Commit to the Replacement of Liver Components. *Am J Transplant*. 2016 Feb;16(2):468-83. doi:10.1111/ajt.13537.

Nishizuka SS, Mills GB. New era of integrated cancer biomarker discovery using reverse-phase protein arrays. *Drug Metab Pharmacokin*. 2016 Feb;31(1):35-45. doi:

10.1016/j.dmpk.2015.11.009.

Kume K, Ishida K, Ikeda M, Takemoto K, Shimura T, Young L, Nishizuka SS. Systematic Protein Level Regulation via Degradation Machinery Induced by Genotoxic Drugs. *J Proteome Res.* 2016 Jan 4;15(1):205-15. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00759.

Sato KA, Hachiya T, Iwaya T, Kume K, Matsuo T, Kawasaki K, Abiko Y, Akasaka R, Matsumoto T, Otsuka K, Nishizuka SS. Individualized Mutation Detection in Circulating Tumor DNA for Monitoring Colorectal Tumor Burden Using a Cancer-Associated Gene Sequencing Panel. *PLoS One.* 2016 Jan 4;11(1):e0146275. doi: 10.1371/journal.pone.0146275.

Hasegawa Y, Nitta H, Sasaki A, Takahara T, Itabashi H, Katagiri H, Otsuka K, Nishizuka S, Wakabayashi G. Long-term outcomes of laparoscopic versus open liver resection for liver metastases from colorectal cancer: A comparative analysis of 168 consecutive cases at a single center. *Surgery.* 2015 Jun;157(6):1065-72. doi:10.1016/j.surg.2015.01.017.

Ito N, Iwaya T, Ikeda K, Kimura Y, Akiyama Y, Konosu M, Ishida K, Fujiwara H, Otsuka K, Nitta H, Kashiwaba M, Koeda K, Nishizuka S, Mizuno M, Sasaki A, Wakabayashi G. Hyperglycemia 3 days after esophageal cancer surgery is associated with an increased risk of postoperative infection. *J Gastrointest Surg.* 2014 Sep;18(9):1547-56. doi: 10.1007/s11605-014-2587-0.

Makabe K, Nitta H, Takahara T, Hasegawa Y, Kanno S, Nishizuka S, Sasaki A, Wakabayashi G. Efficacy of occlusion of hepatic artery and risk of carbon dioxide gas embolism during laparoscopic hepatectomy in a pig model. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014 Aug;21(8):592-8. doi: 10.1002/jhbp.103.

Akbani R, Becker KF, Carragher N, Goldstein T, de Koning L, Korf U, Liotta L, Mills GB, Nishizuka SS, Pawlak M, Petricoin EF 3rd, Pollard HB, Serrels B, Zhu J. Realizing the promise of reverse phase protein arrays for clinical, translational, and basic research: a workshop report: the RPPA (Reverse Phase Protein Array) society. *Mol Cell Proteomics.* 2014 Jul;13(7):1625-43. doi: 10.1074/mcp.0113.034918.

Endo F, Nishizuka SS, Kume K, Ishida K, Katagiri H, Ishida K, Sato K, Iwaya T, Koeda K, Wakabayashi G. A compensatory role of NF- $\kappa$ B to p53 in response to 5-FU-based chemotherapy for gastric cancer cell lines. *PLoS One.* 2014 Feb 27;9(2):e90155. doi: 10.1371/journal.pone.0090155.

Iwaya T, Fukagawa T, Suzuki Y, Takahashi Y, Sawada G, Ishibashi M,

Kurashige J, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Endo F, Katagiri H, Ishida K, Kume K, Nishizuka S, Iinuma H, Wakabayashi G, Mori M, Sasako M, Mimori K. Contrasting expression patterns of histone mRNA and microRNA 760 in patients with gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2013 Dec 1;19(23):6438-49. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3186.

Hasegawa Y, Nitta H, Sasaki A, Takahara T, Ito N, Fujita T, Kanno S, Nishizuka S, Wakabayashi G. Laparoscopic left lateral sectionectomy as a training procedure for surgeons learning laparoscopic hepatectomy. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2013 Jun;20(5):525-30. doi: 10.1007/s00534-012-0591-x.

Sasaki A, Nitta H, Otsuka K, Nishizuka S, Baba S, Umemura A, Koeda K, Mizuno M, Wakabayashi G. Laparoendoscopic single site adrenalectomy: initial results of cosmetic satisfaction and the potential for postoperative pain reduction. *BMC Urol.* 2013 Apr 12;13:21. doi: 10.1186/1471-2490-13-21.

[学会発表](計6件)

Nishizuka, et al. Differential Anticancer Drug Response by High-Dimensional Protein Monitoring. *American Association for Cancer Research*, April 8, 2013, Washington DC, USA.

Nishizuka, et al. Identification of relapse prediction marker for advanced gastric cancer using reverse-phase protein arrays. *American Association for Cancer Research*, April 9, 2014, San Diego, USA.

Nishizuka, et al. Prevention of peritonitis carcinomatosa after adjuvant chemotherapy by the inhibition of RNA polymerase in drug-tolerant subpopulations. *American Association for Cancer Research*, April 22, 2015, Philadelphia, USA.

Nishizuka, et al. Systems-Level Analysis for Differential Anticancer Drug Response, 第72回日本癌学会, 10月5日, 2013, パシフィコ横浜・神奈川県横浜市

Nishizuka, et al. Identification of therapeutic target molecule for cancer relapse suppression after 5-FU-based adjuvant chemotherapy, 第73回日本癌学会, 9月25日, 2014, パシフィコ横浜・神奈川県横浜市

Nishizuka, et al. 癌関連遺伝子パネルを用いた体内腫瘍量モニタリングのための腫瘍由来DNA中個別変異検出, 第74回日本癌学会, 10月8日, 2015, 名古屋国際会議場・愛知県名古屋市

[図書](計1件)

西塚 哲, 逆相タンパクアレイ技術のがん研究への応用, p91-95. 臨床プロテオミク

入・別冊・医学のあゆみ、近藤 格編、医歯薬出版株式会社、2015年

岩手医科大学・医学部外科・講師  
研究者番号：70405801

〔産業財産権〕

出願状況（計3件）

名称：腫瘍の再発を抑制する医薬(AMA)

発明者：西塚 哲、久米浩平

権利者：学校法人岩手医科大学

種類：特許

番号：特願 2015-175211

出願年月日：平成 27.9.4.

国内外の別： 国内

名称：腫瘍の再発を抑制するための標的分子としての TAF15 遺伝子およびその産物 (TAF15)

発明者：西塚 哲、久米浩平

権利者：学校法人岩手医科大学

種類：特許

番号：特願 2015-175212

出願年月日：平成 27.9.4.

国内外の別： 国内

名称：微小細胞集団の発現プロファイル法 (CoLA)

発明者：西塚 哲、久米浩平

権利者：学校法人岩手医科大学

種類：特許

番号：特願 2015-175213

出願年月日：平成 27.9.4.

国内外の別： 国内

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

[www.nishizukalab.org](http://www.nishizukalab.org)

Facebook: Nishizuka lab

6. 研究組織

(1)研究代表者

西塚 哲 (NISHIZUKA, Satoshi)

岩手医科大学・医学部外科・講師

研究者番号：50453311

(2)研究分担者

久米 浩平 (Kume, Kohei)

岩手医科大学・医歯薬総合研究所・神経科学研究部門・助教

研究者番号：10609663

(3)連携研究者

岩谷 岳 (Iwaya, Takeshi)