

マッチングイベント●

多層オミックス情報のある腹膜再発がん患者腹水から樹立された 137 種の PDC (Patient-derived cell line) とその高い有用性

佐々木 博己

国立がん研究センター先端医療開発センター
バイオマーカー探索 TR 分野 分野長
研究所・基盤的臨床開発研究コアセンター
創薬標的・シーズ探索部門・部門長

公的データベースから、約 1000 種のがん細胞株について、主ながん関連遺伝子の変異情報を得ることができる。しかし、アジアに多いがん（食道扁平上皮がん、胃がん、肝・胆・膵がんなど）のラインアップは不十分で、病理組織型が不明なものも多い。例えば、胃がんは分化型と未分化型の 2 種に大別される。びまん性に増殖する未分化型は、ピロリ菌感染のない胃粘膜峡部から直接発生し、男女差、民族差は小さいとされている。その特徴的な再発形式は腹膜播種である。この未分化型胃がんに限ると 10 株程度である。

この 5 年間で、多くのがんの原発巣の遺伝子異常リストが公開されるようになった。しかし、ドライバー遺伝子変異頻度は数%以下のものが多く、内在性変異株を既存のバンクから見つけることは難しい。その際、同種のがん細胞株で遺伝子改変を行って機能を調べようとすると、その細胞に同一分子経路内の別の遺伝子に異常がもともとあれば、改変遺伝子の機能は打ち消される。また、仮に機能が出たとしても、強制的なものであり、元来患者のがんでの機能を示していることにはならない。従って、患者由来の遺伝子異常をもつ細胞株があれば、siRNA 導入やゲノム編集のみでがん遺伝子としての働きや依存性を簡単に知ることができる。当然、検体当たり 50-300 程度見つかる変異遺伝子の網羅的機能解析も可能である。このようにゲノム解析対象試料から直接樹立された細胞株 (PDC, Patient-derived cell line) は極めて有用である。

当センターでは、上記の理由に加え、転移性のアジアがんオミックス解析を可能にするため、がん患者腹水から新たな細胞株の樹立を行ってきた。2010 年から開始し、未分化型胃がん患者 53 例から亜株を含め 90 細胞株 (NCC Stomach Cancer: NSC シリーズ) の樹立に成功した(17 例 21 既存株と合わせると 111 株を保有)。同様に、膵がん 27 例 34 株、卵巣がん 8 例 9 株、および胃-食道接合部がん、胆管がん、中皮腫、脂肪肉腫、各 1 例 1 株(合計 4 株)の樹立に成功している。これら自家樹立株の主なものには、in vitro/in vivo イメージングのためのルシフェラーゼや GFP 遺伝子の導入の他、Affymetrix Genechip U133 v2、SNP アレイ、NCC Oncopanel v4 の基本情報を付加している。また、免疫不全マウスの腹腔に接種し、形成された腫瘍について HE 染色、Ki-67 染色、AZAN 染色 (間質評価)、PAS 染色等 (粘液形質評価) を行い病理組織学的プロファイルの蓄積と同時に、腫瘍形成能、悪疫質の評価を進め、CDX (Cell-derived xenograft) モデルの構築も継続している。これらの情報を基に、病院での治験導出を推進するため、国内外の製薬会社との共同研究を遂行している。

マッチングイベント●

新規薬剤開発での利用をめざした国立がん研究センターにおける胃癌 patient derived xenograft (PDX) および細胞株の樹立

桑田 健

国立がん研究センター東病院

病理・臨床検査科 科長

【背景】国立がん研究センター東病院では、特に欧米よりも日本を含むアジア地域での発生頻度の高いいわゆるアジア癌に対する新薬開発に資するバイオリソース整備の目的で、2013年5月より胃癌、特に分化型胃癌を対象にヒト患者由来ゼノグラフト (PDX) および新規細胞株樹立を行ってきた。

【方法と結果】国立がん研究センター東病院および中央病院にて、新包括的同意を取得済み 233 例胃癌手術検体より癌部組織を採取し NOG (NOD/Shi-scid-IL2R γ null) マウス皮下への移植を行った。36 例について継代移植可能な PDX、23 例で継代可能な細胞株が作製された。このうち 19 例については PDX と細胞株の両者が存在する。また 17 例の胃癌 CART (Cell-free and Concentrated Ascites Reinfusion Therapy) 検体より細胞を回収し、NOG マウスへの移植ないし直接培養系での培養を行った。1 例で PDX、8 例で細胞株が樹立された。うち 1 例は PDX と細胞株の両者が存在する。PDX については胃癌由来腫瘍であることが病理組織学的に確認できている。またその内訳として 8 割以上が分化型胃癌であった。免疫組織学的検討では HER2 過剰発現が複数含まれている。PDX・細胞株に対する遺伝子変異解析では 2 つ以上の株で変異を認めたものとして KRAS, PIK3CA, PTEN などが確認されている。また同一症例における原発巣・PDX・細胞株での遺伝子変異プロファイルの比較から、いわゆるドライバー変異とされる遺伝子変異のほとんどは原発巣・PDX・細胞株間で保存されていた。

【今後の予定】原発巣および臨床情報が付加された胃癌 PDX および細胞株を利用した前臨床研究の実施と、新規薬剤の有効性が期待されるバイオマーカー検索などを実施してゆきたい。

マッチングイベント●

不溶性フィブリン抗体・抗腫瘍剤複合体は破壊性の強い固形がん組織中のフィブリン塊上でのみ抗腫瘍剤をリリースすることができる

松村 保広

国立がん研究センター先端医療開発センター

新薬開発分野分野 分野長

正常血管から漏出せず、網内系に捕獲されない高分子物質は選択的にがんを集積するという Enhanced permeability and retention (EPR)効果の提唱 (Cancer Res 1986) 以来、世界の薬学、有機化学、材料工学の研究者による抗がん剤や遺伝子核酸の Drug Delivery System (DDS)の創製につながった。高悪性度のがんは、周囲組織への浸潤性が強く、血管の破壊、出血、血液凝固亢進が起き、著しいフィブリン沈着が永続的かつ無症候性におこり、フィブリン塊に富むがん間質が形成される。腫瘍血管はがん間質に存在するので、高分子の ADC を含む DDS のがん細胞への到達が阻まれ、臨床では十分な抗腫瘍効果が得られない。

我々は、不溶性フィブリンのみを認識する（前駆体のフィブリノゲンにもフィブリン分解産物 FDP にも結合しない）抗体樹立に世界で初めて成功した。エピトープは不溶性フィブリンの形成時のみに露出する β 鎖と γ 鎖でできる凹み構造の中にあることを発見した (Scientific Reports 2013)。エピトープはマウスからヒトまで保存されているので、他の抗体医薬と違い、マウスのデータはヒトに外挿できると考える。また、放射性ラベル抗不溶性フィブリン抗体はフィブリン塊に富むがん間質に集積することが分かった。以上から、抗がん剤を抗不溶性フィブリン抗体に結合した ADC を作製し、それを間質のフィブリンに届け、そこで足場を形成し、フリーの抗がん剤をリリースさせる Cancer stromal targeting (CAST)療法を提唱した。加えて、ADC からリリースされた抗がん剤は腫瘍血管も傷害するという二重の効果も見込める。心筋梗塞などの非悪性疾患でも不溶性フィブリンは病変部に形成されるが、2-3 週以内に病変部からフィブリンは消失すること、及び無症候性の持続的不溶性フィブリン沈着は浸潤がん特異的であるため、本療法は浸潤性の固形腫瘍全体に適応可能である。

(参考文献)

1. Prince R, Matsumura Y, Angelillo-Scherrer A. et al Targeting anticoagulant protein S to improve hemostasis in hemophilia. Blood 131, 1360-1371 (2018).
2. Fujiwara Y, et al. Imaging mass spectrometry for the exquisite design of antibody-drug conjugates. Sci. Rep. 6, 24954 (2016).
3. Obonai T, et al Tumour imaging by detecting fibrin clots in tumour stroma with anti-fibrin Fab fragment. Sci. Rep. 6, 23613 (2016).
4. Hisada Y, et al Discovery of an uncovered region in fibrin clots and its clinical significance. Sci. Rep. 3, 2604 (2013)
5. Matsumura Y. Cancer stromal targeting (CAST) therapy Adv. Drug Deliv. Rev. 64, 710-719 (2012) .
6. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res. 46, 6387-6392 (1986).

マッチングイベント●

がん治療における新規転写因子療法の開発

小林 進

国立がん研究センター先端医療開発センター
ゲノムトランスレショナルリサーチ分野 分野長

がんはわが国の死因の第一位を占め、その一刻も早い撲滅が求められている。今世紀に入り、主に進行がんに対して分子標的療法や免疫療法が導入され、目覚ましい効果を挙げているが、その多くはやがて再発し、根治までには至っていない。従って、がんの完全治癒を目指すためには、全く新しいコンセプトの治療が必要である。

我々は、細胞の分裂、分化をつかさどる転写因子のひとつである CCAAT/enhancer-binding protein alpha (C/EBPa) に注目し、そのがん発生における役割を検討してきた。C/EBPa は、様々ながんで発現の低下が認められている。我々はこれまでの検討から、白血病細胞や肺がん細胞に C/EBPa を発現させると増殖停止、分化をひきおこし、最終的に細胞死に陥ることを示した。そこで、C/EBPa 活性を上昇させる低分子化合物をスクリーニングするために、C/EBP 結合部位を持つレポーターを恒常的に発現した白血病細胞株を作成し、これを用いて High-Throughput スクリーニングを行った。総計 67,837 の化合物のうち、quinazolinone 誘導体である 2-[(E)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)vinyl]-3-(2-methoxyphenyl)-4(3H)-quinazolinone が白血病細胞株や肺がん細胞株の増殖抑制、細胞分化、さらに細胞死を誘導した。ICCB280 は白血病細胞株のみならず、白血病患者から分離された細胞も分化、細胞死を誘導した。さらに、ICCB280 は ATRA 耐性の急性前骨髄性白血病細胞の分化も促すことから、既存薬の耐性克服にも期待できる。

今後は、ICCB280 の作用機序を明らかにし、その薬効を確認するとともに、構造活性相関分析を用いたより効果的な低分子化合物の探索を進めていく。

参考文献

1. Radhakrishnan S, Takei H, Syed R, Kobayashi SI, Hui LB, Kamal A, Tenen DG, Kobayashi S. Styryl quinazolinones as potential inducers of Myeloid Differentiation via upregulation of C/EBPa. *Molecule*. 2018 (in press)
2. Radomska HS, Jernigan F, Nakayama S, Jorge SE, Sun L, Tenen DG, Kobayashi SS. A cell-based high-throughput screening for inducers of myeloid differentiation. *Journal of Biomolecular Screening*. 2015 Oct;20(9):1150-9.

マッチングイベント●

ペプチドホルモンの受容体同定や膜タンパク質相互作用を検出する新たな手法から考える創薬展開

岸田 昭世

鹿児島大学 医歯学総合研究科 教授

浅川 明弘

鹿児島大学 医歯学総合研究科 教授

上園 保仁

国立がん研究センター先端医療開発センター

支持療法開発分野 分野長

2003 年にヒトゲノム解読が終わり、ポストゲノム時代は個々の分子の働きの解明が一層重要になっている。ヒトゲノムに含まれるタンパク質をコードする 25000 個の遺伝子のうち、膜タンパク質はその 30% を占め、市販されている医薬品の 6 割以上が膜タンパク質をターゲットとしている状況を考えると、膜上での分子間相互作用の解析は今後も創薬のための重要な手法と考えられる。膜タンパク質は、細胞膜に局在することで生理的な構造をとると考えられるが、組換えたんぱく質作成や発現などが難しく、相互作用の解析が困難なことも多い。そこで、我々は従来の酵母を用いた手法を改良した新しい分子間相互作用の解析法を考案した。本法は膜タンパク質やリガンドの解析が行えなかった酵母 2hybrid 法の欠点を解消したものである。この手法を用いることにより、従来報告されていない神経ペプチド-受容体/他の分泌タンパク質間の相互作用を 3 種類以上見出すことができた。

したがって、本法により神経ペプチドと相互作用する膜タンパク質やこれまでに受容体が判明していなかったペプチドホルモン、神経ペプチドなどの受容体を効率よく同定できる可能性があると考えられる。これらの受容体同定からそのシグナル伝達、アゴニスト、アンタゴニストなどを開発できる可能性を秘めている。

現在、グレリンなど幾つかのペプチドホルモンについて、その新規受容体探索と機能の解明を進めており、さらにペプチド以外のホルモンや膜タンパク質の相互作用の検出にも適応可能な方法の開発を目指している。

我々がすでに見出しているリガンド-受容体相互作用解析を発展させてアゴニスト、アンタゴニスト開発、特許出願に関心がある企業や、オーファンリガンドやオーファンレセプターのカウンターパートを同定したい企業との共同研究を希望する。