

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 「がん微小環境を標的とした革新的治療法の実現」
(ARHGAPを標的としたがん細胞浸潤を抑制する新規治療法の開発)
2. 研究開発代表者： 石井 優 (国立大学法人大阪大学大学院医学系研究科 教授)
3. 研究開発の成果

近年、生体内の癌細胞の動態を細胞レベルで可視化する生体イメージングの技術が癌研究で注目されている。我々はこの技術を利用して癌細胞の細胞周期と浸潤の関係にせまり、関連分子の抽出とその分子に対して血中投与でも安定性の高い人工核酸を用いた新規分子標的治療法の開発を試みた。細胞は増殖する時に細胞周期と呼ばれる一定のプロセスを経る。すなわち、細胞はG1期(gap1)→S期(DNA synthesis)→G2期(gap2)→M期(mitosis)→G1期という順序で規則正しく細胞周期を繰り返して増殖してゆく。細胞周期の進行にとってひとつの重要な時期がG1期とS期の境目に存在する。その時期は哺乳動物培養細胞ではR点(restriction point)と呼ばれる。一旦、R点を通ると、細胞周期は進行するように方向づけられて速やかにS期に進入し、続けてG2期、M期へと進んでいってG1期へ戻ってくる。細胞が増殖しない環境にあるときは、S期に進まずにそのままG1期にとどまるか、あるいは細胞周期からはずれて静止期(resting state; G0期)と呼ばれる特別な状態に入り休止状態となる。がん細胞は細胞周期制御が異常となり、周りの細胞から来る分裂停止のシグナルを無視して増殖を続けてゆく細胞である。がん細胞は際限なく増殖し、浸潤・転移によりやがて全身の臓器の機能不全をもたらす患者を死に至らしめる。当研究では、この細胞周期を2色の蛍光プローブ(G1期-赤、S/G2/M期-緑)でリアルタイムに可視化するFucci(Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)をヒト大腸癌細胞株に遺伝子導入し安定株を作成した。この細胞株をマウスの皮下に移植し、二光子顕微鏡を用いた状態でがん細胞の挙動を時空間的に観察した。G1期-赤とS/G2/M期-緑の細胞の動きを追跡した結果、平均速度は緑の細胞の方が速いことが判明した。そこで、癌細胞を赤(G1)と緑(S/G2/M)に分離し、マイクロアレイで細胞周期と動きに関連ある分子を探索し、ARHGAP11Aを同定した。この分子は、PubMed上機能について未報告の分子であり、細胞周期依存的に発現が制御されていた。マトリゲル浸潤試験において過剰発現株で浸潤を促進し、抑制株で浸潤を抑制していた。浸潤メカニズムに関わるRhoファミリーのうち、RhoAとRac1活性に関与し、また細胞骨格と接着斑の制御にも関与していた。ARHGAP11Aを標的とした新規治療法の開発を目標として、核酸医薬の開発を行うために安定的な人工核酸を用いたARHGAP11Aを標的とするアンチセンス核酸を作成・選定し、がん細胞を移植したマウスにこれらを投与した治療実験を行ったところ、腫瘍進展抑制効果が確認された。さらに、これらのアンチセンス核酸が腫瘍進展に対する効果だけでなく、腫瘍の転移抑制効果の有無についても検討した。またARHGAP11Aを標的とした低分子化合物薬を開発するため、細胞を用いた2次スクリーニングを行い、化合物の絞り込みを行うことができた。さらにはマウスを用いた治療実験による高次スクリーニングを行い、がん転移の抑制に効果的な薬剤候補化合物の選定を行った。ARHGAPが創薬標的として適正であるかどうかを検討するため、ノックアウトマウスを用いて生体内でARHGAP11Aを阻害した際に重篤な事象や副作用が出現しないかどうかを確認した。ARHGAP11Aノックアウトマウスでは胎生致死も目立たず、病的な表現型を呈することなく成体まで成長することが確認できた。このことから、ARHGAP11Aを標的とした悪性新生物に対する治療法はがん進展を抑制する極めて有効な新規治療法の一つとなりうることを示された。