

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「がん幹細胞を標的とした根治療法の開発」

(乳がん幹細胞維持の鍵シグナルを標的とする革新的分子標的薬の開発)

2. 研究開発代表者： 後藤 典子 (国立大学法人金沢大学・がん進展制御研究所)

3. 研究開発の成果

乳がんは、女性の罹患数が最も多いがんである。比較的予後が良いタイプも多い一方で、**luminal type B** や **triple negative type** の症例の中には、再発しやすく、予後の悪い症例が存在するため、依然として死亡数は増加傾向にある。再発の原因として、がん幹細胞の残存が問題であることが指摘されている。がんを根治するには、がん幹細胞を根絶することが重要であり、がん幹細胞が維持されているシグナルに関わる分子は、重要な標的となりえる。しかしその実体は未だ不明な点が多い。本研究では、研究開発代表者が見いだした乳がん幹細胞維持シグナルに関わる新規分子標的候補 **X** の創薬への実用化を加速させることを大きな目標とした。また、研究開発代表者は乳がん幹細胞の機能評価系として、臨床検体の初代培養細胞を用いたスフィア培養と、**patient derived xenograft (PDX)**モデルを所有している。乳がんのスフィア培養および **PDX** モデルの構築は技術的に困難であるため、特に日本では立ち後れている。そこで、これを拡充することとした。

X は細胞内分子で、構造解析シミュレーションより低分子化合物が入り込むポケットが存在することがわかっている。低分子化合物のハイスループットスクリーニング(**HTS**)系を構築するため、乳がん細胞株 **MCF** 細胞と **BTB474** 細胞に **X** を過剰発現させた。同時に、**in vitro** の **HTS** 系も構築するため、大腸菌を用いて **GST** 融合蛋白質として **X** 分子の酵素活性を持つドメインを発現させ、**GST** 部分を切断、**X** の酵素活性ドメインのみの精製に成功した。**HTS** 系としては、**in vitro** のほうがより多くの低分子化合物をスクリーニングできるため便利であるので、こちらを利用することにした。技術支援基盤の協力を得て、**in vitro HTS** のための条件検討を行った。

X をがんの新規分子標的とする特許出願を行った。

X の阻害剤の評価をするため、下流分子 **Y** を用いた **Fluorescence resonance energy transfer (FRET)** の構築を試みた。**Y** の二量体形成に関わるドメインを **cDNA** としてタンデムにつなぎ、この融合タンパク質の **N** 末と **C** 末に蛍光タンパク質をつないだ形で、細胞内で発現させる **1** 分子型 **FRET** バイオセンサーを作製した。乳癌細胞株 **MCF7** にて発現を確認し、**Y** の二量体形成条件で顕微鏡下に観察した。陽性コントロールとしてリン酸化酵素 **ERK** の活性を検出する **FRET** バイオセンサーを用いた実験を同時に行った。陽性コントロールは **FRET** 効率が刺激によって増加したが、今回作製した **FRET** 効率の変化は観察されず、コンストラクトの改変が必要と考えられた。

乳がん臨床検体 2 検体分をエクソームシーケンスに供したところ、**X** および **Y** の変異は見出されなかった。またプロテオミクスにてオートファジーとの関連について解析を行った。

乳がん手術検体は、新鮮のまま供与を受け、全検体を培養し、**PDX** 構築のため組織片を凍結保存した。免疫不全マウスに適宜移植し **PDX** 構築を試みた。8 1 検体の供与を受け、培養は 4 2 検体成功、**PDX** は 1 0 検体構築できた。