

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10074

研究課題名(和文)新規合成KSP阻害剤を用いた乳癌治療の開発

研究課題名(英文)Potential new chemotherapy for breast cancer therapy with a novel KSP inhibitor

研究代表者

太田 有紀(Ohta, Yuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：60387066

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：新規合成KSP阻害薬のうち、KPYB10602はヒト乳癌細胞株に対する細胞増殖抑制力が最も高く、その効果はMDA-MB-231細胞で最も高かった。細胞周期の解析において、KPYB10602は、G2/M期の割合を増加させ、sub-G1細胞を出現させた。また、ヒストンDNA断片化の増加がみられ、アポトーシスを誘導したものと考えられた。担がんマウスにKPYB10602を腹腔内投与したところ、有害作用を示すことなく腫瘍体積増加速度を抑制した。従って、ヒト乳癌細胞に対して、in vitroおよびin vivoで増殖抑制効果を示した新規KSP阻害薬は、新たな抗腫瘍薬の候補になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Among the novel synthetic KSP inhibitors, KPYB 10602 has the highest inhibitory effect on cell proliferation against human breast cancer cell lines, and its effect was highest in MDA-MB-231 cells. The KPYB10602 treatment was shown to result in induction of mitotic arrest with distinct monopolar spindle formation and then apoptotic cell death. KPYB10602 also effectively suppressed tumor growth in a subcutaneous xenograft model. In conclusion, KSP is a good target for breast cancer chemotherapy, and KPYB10602 has a potential as a novel anti-cancer agent for breast cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：kinesin spindle protein 乳癌 微小管阻害薬 末梢神経障害

1. 研究開始当初の背景

乳癌の薬物治療において、微小管阻害薬はよく使われている薬物である。しかしながら、神経細胞の微小管機能をも阻害するため、副作用として末梢神経障害を生じることが弊害となっている。一方、微小管と同様に有糸分裂に関わる kinesin spindle protein (KSP)は、細胞分裂時に微小管に沿って移動するモータータンパク質の一つであるが、神経細胞には発現していないことから、その阻害薬では神経障害などの副作用が少ないことが期待されている。しかしながら、これまで臨床適用された例はない。

藤井、大石らは、KSP 阻害活性を示す天然物や類縁化合物の構造共通性から候補化合物の合成を試み、KSP ATPase 阻害活性が高く、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞増殖抑制活性の高いカルバゾール誘導体を見出した (Takeuchi T, et al. 2011, *J. Med. Chem.* 54: 4839-4846)。これらの化合物は、KSP 以外のモータータンパク質に対する ATPase 阻害活性を示さず、高い KSP 選択性があることが確認された。

以上から、新規合成 KSP 阻害薬の乳癌細胞に対する有用性を示すことは、既存薬剤の問題点を克服するだけでなく、これまでには効果が乏しかった癌に対しても新しい治療薬選択の提唱につながると期待でき、将来的に乳癌治療の飛躍に貢献できるものと考え、本研究を実施するに至った。

2. 研究の目的

新規合成 KSP 阻害薬のヒト乳癌細胞の増殖に対する効果、ならびにヒト乳癌細胞接種免疫不全マウスに対する抗腫瘍効果を検討し、その有用性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 化合物

藤井、大石らが合成した3種の KSP 阻害薬 (カルバゾール誘導体、図 1) 既存の KSP 阻害薬である S-(methoxytrityl)-L-cystein (S(MeO)TLC)、および微小管阻害薬 paclitaxel を使用した。

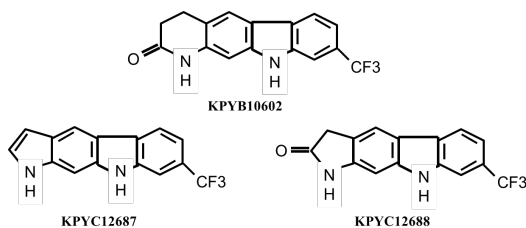


図 1. 新規合成カルバゾール誘導体

(2) ヒト乳癌細胞株

ヒト乳癌細胞は、MCF-7、MDA-MB-231 お

よび HCC1937 を用いた。

MCF-7 は、10%牛胎児血清 (FBS) および 1% 抗生物質混合溶液含有ダルベッコ変法イーグル培地、MDA-MB-231 は、15% FBS、2mM L-グルタミン、1%炭酸水素ナトリウムおよび 1% 抗生物質混合溶液含有 L-15 培地、HCC1937 は、10% FBS および 1% 抗生物質混合溶液含有 RPMI-1640 培地を用いて、37°C、飽湿、5% CO₂ 条件下にて培養した。

(3) 細胞増殖抑制試験

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromide (MTT)法を用いて、3 種の新規合成 KSP 阻害薬、S-(methoxytrityl)-L-cystein (S(MeO)TLC)、および paclitaxel による細胞増殖抑制効果を評価した。

(4) 免疫細胞染色

MCF-7 および MDA-MB-231 をガラスディッシュ上で培養し、KPYB10602 添加 24 時間後、4%パラホルムアルデヒドにて固定した。一次抗体として α -actin、二次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated antibody を用い、Hoechst 33342 で核染色後、蛍光顕微鏡にて観察した。

(5) 細胞周期解析

MCF-7 および MDA-MB-231 を培養し、KPYB10602 添加 12、24 および 48 時間後に細胞を回収した。70%エタノール固定後、RNase 処理とともに propidium iodide (PI)にて細胞内 DNA を染色した。DNA 量は、フローサイトメーター (LSR II) および FACSDiva software を用いて解析した。

(6) DNA 断片化の定量

MCF-7 および MDA-MB-231 を培養し、KPYB10602 添加 12、24 および 48 時間後の DNA 断片化を Cell Death Detection ELISA kit により測定した。

(7) 酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)

MCF-7 および MDA-MB-231 を培養し、KPYB10602 添加 12、24 および 48 時間後、lysis buffer にて細胞を溶解した。その上清中タンパク質濃度を測定し、Bax および Survivin の発現量を ELISA kit により測定した。

(8) Western blot 法

上記 (7) と同様に細胞溶解液上清を調製し、SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。Caspase-3 ならびに β -actin を Western blot 法により検出した。

(9) 担癌モデルマウスにおける抗腫瘍性試験

免疫不全マウス Balb/c-nu マウスの背部皮下に MDA-MB-231 を接種 (1×10^7 cells/0.1 mL) し、担癌マウスを作製した。接種 7 日後から KPYB10602 (20 mg/kg) paclitaxel (25 mg/kg) あるいは vehicle (DMSO in olive oil、

0.1 mL) の皮下投与を開始し、経時的に体重および腫瘍径を測定した。また、以下の式より腫瘍体積を算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = \{(\text{長径}) \times (\text{短径})^2\} / 2$$

(10) 安全性に関する検討

ヒト脂肪組織から間質細胞(adipose-derived stromal cells: ASCs)を分離・培養し、MTT法を用いて細胞増殖に対するKSP阻害薬の影響を検討した。

(11) 統計解析

データは mean + standard error で示し、統計解析には JMP 12 を用いた (in vitro 試験および体重: Dunnett's control-comparison test、腫瘍体積増加速度: analysis of covariance)。

全ての動物実験は、聖マリアンナ医科大学動物実験指針等を遵守し、動物実験委員会からの承認を得て実施した(承認番号: 第1112005号)。

ヒト脂肪組織は、聖マリアンナ医科大学臨床試験部会の承認後(承認番号: 第2494号) 文書にて同意が得られた患者から手術時に余剰となった脂肪組織の提供を受けて実施した。

4. 研究成果

ヒト乳癌細胞に3種のカルバゾール誘導体ならびにS(MeO)TLCを48時間暴露し、細胞増殖に対する効果を検討した。その結果、どちらの細胞においても濃度依存的な細胞増殖抑制効果を示し、その効果はKPYB10602で最も高かった(図2A, B)。また、その増殖抑制効果は暴露48時間後に比較して、72時間後において顕著であった(図2C)。以上の結果から、以降の検討にはKPYB10602を使用した。

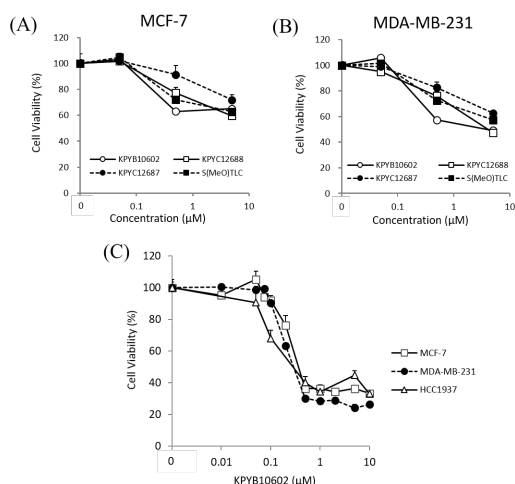


図2. KSP阻害薬による細胞増殖抑制効果の検討

また、その増殖抑制効果は、既存の微小管阻害薬 paclitaxel と同等であった(図3A, B)。

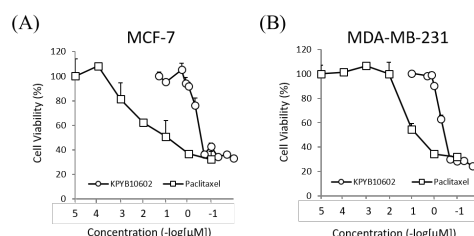


図3. 細胞増殖抑制効果の比較

モータータンパク質であるKSPは、細胞分裂期において正常な2極の紡錘体を形成させる。そのためKSPを阻害すると、中心体は分離できず、単極の紡錘体が形成される。そこで、KPYB10602処理24時間後のMCF-7およびMDA-MB-231における紡錘体の形態に対する影響を評価した。その結果、分裂期細胞において、コントロール細胞では双極紡錘体(図4、白矢印)が観察されたのに対し、KPYB10602処理細胞では単極紡錘体(図4、赤矢印)が観察された。

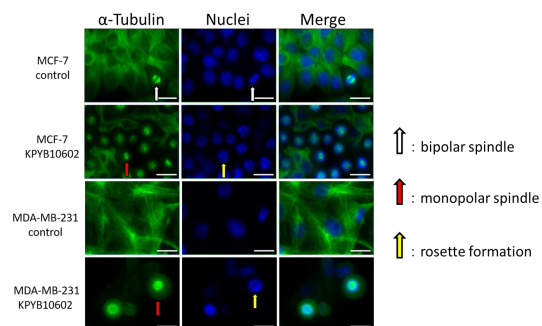


図4. KPYB10602による紡錘体の形態変化

次に、細胞周期への影響を検討した。KPYB10602非添加群のG₂/M期は20%前後であったのに対し、KPYB10602添加群では、24時間後をピークとしてG₂/M期の割合は増加した(MCF-7: 77.3%、MDA-MB-231: 73.7%、図5)。また、MDA-MB-231への添加48時間後には、SubG₁期細胞が観察された(図5)。

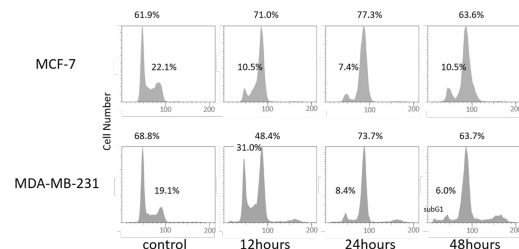


図5. KPYB10602の細胞周期への作用

KPYB10602は、細胞周期をG₂/M期に集積させ、SubG₁期細胞を出現させた。すなわち、分裂期で停止させ、アポトーシスの誘導が示唆された。そこで、KPYB10602のアポトーシ

ス誘導能を評価するために、ヒストン DNA の断片化を経時的に評価した。その結果、MCF-7 および MDA-MB-231 とともに KPYB10602 添加 24 時間後、さらに 48 時間後において多くのヒストン DNA 断片が検出された (図 6)。

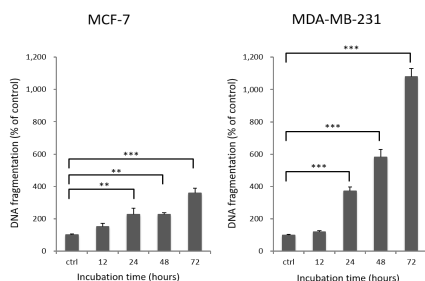


図 6. KPYB10602 による DNA 断片化の誘導

KPYB10602 により、ヒストン DNA 断片化の増加、すなわち、アポトーシスの誘導が認められた。さらに、KPYB10602 によりアポトーシス促進因子である Bax の増加 (図 7A) およびアポトーシス抑制因子である Survivin の減少が認められた (図 7B)。

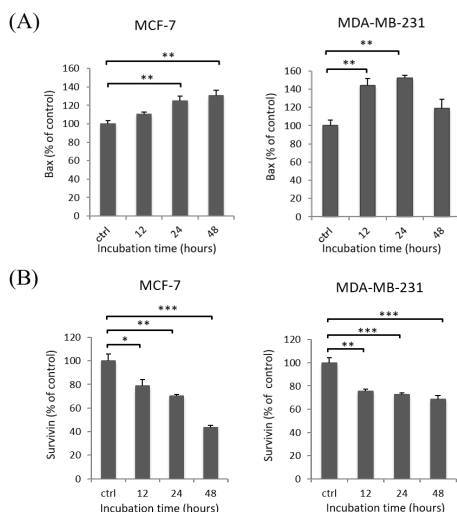


図 7. アポトーシス関連因子の発現

アポトーシス実行因子として Caspase-3 に着目したが、MCF-7 ではその発現がなく、MDA-MB-231 では活性型が検出されなかった (図 8)。従って、両細胞におけるアポトーシスの誘導に対して Caspase-3 は関与しない可能性が示唆された。

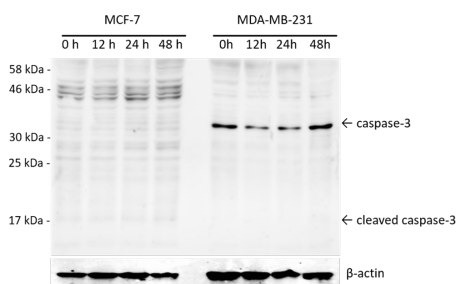


図 8. MCF-7 および MDA-MB-231 における

Caspase-3 の発現

KPYB10602 の抗腫瘍効果を検討するために担癌マウスの作製を試みところ、MCF-7 に比較して MDA-MB-231 でより安定的に作製することができた。

免疫不全マウスへ MDA-MB-231 皮下接種 7 日後、腫瘍体積は概ね 120 mm³ に達した。その時点から KPYB10602、paclitaxel、あるいはコントロールとして溶媒を腹腔内投与したところ、いずれの群においても腫瘍体積に増加がみられたが、コントロール群に比較して、KPYB10602 投与群は paclitaxel 群と同様に腫瘍体積増加速度を有意に抑制した (図 9、 $p < 0.001$)。

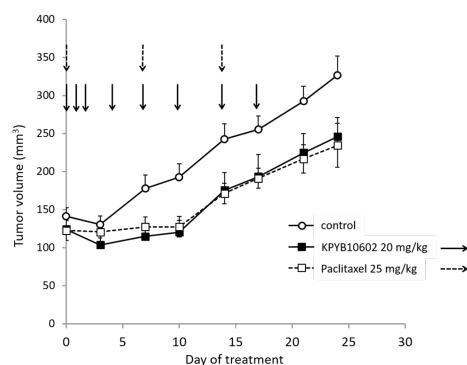


図 9. 腫瘍体積に対する KPYB10602 の効果

上記観察期間において、体重減少等の有害作用は認められなかったが、安全性の検討として、ヒト正常細胞に対する影響を検討した。ヒト正常細胞として、ヒト ASCs を用いて、細胞増殖に対する KPYB10602 の効果を検討した。その結果、ヒト乳癌細胞株で観察された濃度依存的な細胞増殖の抑制は認められなかった。

本研究から、新規合成カルバゾール誘導体は、乳癌細胞の細胞増殖を濃度依存的に抑制し、その活性は KPYB10602 で最も高いこと、また、paclitaxel と同等の効果を示すことが明らかになった。その作用は、細胞周期を分裂期で停止させ、アポトーシスを誘導したものと考えられた。担癌マウスへの KPYB10602 の腹腔内投与は、腫瘍体積増加速度を抑制した。末梢神経障害や正常細胞への毒性が少ない KPYB10602 は、剤型等の工夫を加えることで、標的臓器への到達性が上がり、効果の増大をもたらす可能性も考えられる。

以上のことから、KPYB10602 は乳癌治療に対して新たな抗腫瘍薬の候補になりうることが期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Seiko Kojima-Tsuchiya, Yuki Ohta, Mitsuko

Takenaga, Jun Niimi, Daiki Watanabe, Satoshi Tsunoda, Masanori Ootaki, Shinya Oishi, Nobutaka Fujii, Naoki Matsumoto, Koichiro Tsugawa, A Novel KSP Inhibitor, KPYB10602, Induces Mitotic Arrest and Cell Death in Breast Cancer Cells, Journal of St. Marianna University, 査読有, Vol. 7, 2016, pp. 105-116, DOI : <https://doi.org/10.17264/stmarieng.7.105>

〔学会発表〕(計 4 件)

太田 有紀、土屋 聖子、武永 美津子、新美 純、渡邊 大輝、大滝 正訓、大石 真也、藤井 信孝、津川 浩一郎、松本 直樹、新規 KSP 阻害薬のヒト乳癌細胞に対する効果、第 138 年会日本薬学会、2018 年

太田 有紀、土屋 聖子、武永 美津子、角田 智志、大滝 正訓、新美 純、大石 真也、藤井 信孝、渡辺 実、武半 優子、飯利 太朗、松本 直樹、ヒト乳癌細胞に対する新規 KSP (kinesin spindle protein) 阻害薬の効果、第 37 回日本臨床薬理学会学術総会、2016 年

土屋 聖子、太田 有紀、武永 美津子、大滝 正訓、新美 純、大石 真也、藤井 信孝、松本 直樹、津川 浩一郎、新規合成 KSP (kinesin spindle protein) 阻害剤のヒト乳癌細胞に対する抗腫瘍効果に関する研究、第 24 回日本乳癌学会学術総会、2016 年

太田 有紀、土屋 聖子、武永 美津子、大滝 正訓、渡辺 実、武半 優子、飯利 太朗、松本 直樹、癌細胞に対する新規 KSP 阻害薬の効果、第 36 回日本臨床薬理学会学術総会、2015 年

〔その他〕

ホームページ

<http://www.marianna-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 有紀 (OHTA, Yuki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・講師

研究者番号：60387066

(2) 研究分担者

武永 美津子 (TAKENAGA, Mitsuko)

聖マリアンナ医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：10236490

大滝 正訓 (OOTAKI, Masanori)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：20612683

(3) 連携研究者

藤井 信孝 (FUJII, Nobutaka)

京都大学・薬学部・教授

研究者番号：60109014

大石 真也 (OISHI, Shinya)

京都大学・薬学部・准教授

研究者番号：80381739

(4) 研究協力者

土屋 聖子 (TSUCHIYA, Seiko)

新美 純 (NIIMI, Jun)