

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16563

研究課題名(和文) レドックス制御に着目した膵臓がん代謝機構の解明と新規抗がん剤の創出

研究課題名(英文) Study on small-molecule modulators of pancreatic cancer metabolism

研究代表者

河村 達郎 (Kawamura, Tatsuro)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・協力研究員

研究者番号：60528561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓がん細胞の代謝制御機構を標的とした新たな抗がん剤シーズを探索し、ミトコンドリアの呼吸鎖複合体IIIを阻害する化合物Aおよび解糖系を阻害する化合物Bを取得した。また、酸化ヌクレオチド加水分解酵素であるMTH1の新規阻害剤を見出した。MTH1はがん治療の新たな分子標的として近年着目されていたが、我々が行ったMTH1阻害剤の作用解析により、MTH1ががん細胞の増殖・生存に必須ではない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is a highly aggressive disease, and development of more effective therapy is desired. In the present study, we identified two compounds which modulate metabolism of pancreatic cancer cells. Compound A inhibits mitochondrial respiration chain complex III, and Compound B inhibits glycolysis. On the other hand, MTH1 is a hydrolase of oxidized purine nucleoside triphosphates, which attracted attention as a potential cancer therapeutic target. Recently, we identified new MTH1 inhibitors by chemical array screening. Proteomic profiling of small-molecule inhibitors revealed mechanistic differences among chemically distinct MTH1 inhibitors. In addition, overexpression of MTH1 did not rescue cells from MTH1 inhibitor-induced cell death, and siRNA-mediated knockdown of MTH1 did not suppress cancer cell growth. Taken together, we conclude that the cytotoxicity of MTH1 inhibitors is attributable to off-target effects and that MTH1 is not essential for cancer cell survival.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：すい臓がん 代謝 活性酸素種 MTH1

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは早期発見が難しい上に化学療法などの治療に対して抵抗性を示す難治性の疾患であり、新たな治療法の開発が望まれている。(1)膵臓がん細胞は血管の乏しい微小環境で生存するために代謝制御機構をリプログラミングさせており、膵臓がん特異的な代謝制御機構は新たな治療標的になると考えられた。(2)また、膵臓がんを含めたがん細胞は正常な細胞に比べて活性酸素種(ROS)の基礎レベルが高く、ROSにより生じた酸化ヌクレオチド(8-oxo-dGTP や 2-OH-dATP)の加水分解酵素 MTH1 の阻害に対して脆弱であることが近年報告された(Gad H. *et al.*, *Nature* 508, 215-221, 2014)。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、膵臓がんの代謝制御機構を標的とした新たな抗がん剤シーズの取得とその作用解析を目的とした。(2) MTH1 が膵臓がんを含めたがん治療の新たな分子標的になる可能性を考え、新規 MTH1 阻害剤の取得と有用性の検証も本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 化合物の細胞毒性試験には WST-8 法を用いた。また、細胞の代謝制御機構に及ぼす影響を調べるために、細胞外フラックスアナライザーを用いて酸素消費速度(OCR)および細胞外酸化速度(ECAR)の測定を行った。(2) MTH1 と強固に結合する化合物のスクリーニングには所属研究室で開発された化合物アレイを用い、MTH1 阻害活性は *in vitro* の酵素アッセイにより評価した。さらに、取得した MTH1 阻害剤の作用解析にはプロテオーム解析に基づくプロファイリングを行った。

4. 研究成果

(1) 膵臓がん細胞の代謝制御機構を標的とした新規抗がん剤シーズの取得

膵臓がん細胞の代謝機構に作用し、なおかつ細胞の増殖・生存を抑制する化合物を得るため、まずはヒト膵臓がん細胞株を用いた細胞毒性試験により、理研天然化合物バンク(NPDepo)の 16,064 化合物をスクリーニングした。次に、細胞毒性を示した化合物の 2 次評価として、細胞の酸素消費速度(OCR)および細胞外酸化速度(ECAR)の変化を測定し、これらのいずれかに影響を及ぼす 2 化合物(化合物 A, B)を見出した。

化合物 A は細胞の OCR の低下を誘導したことから、ミトコンドリアの呼吸鎖を阻害する可能性が示唆された。そこで、セミインタクト細胞を用いた評価系により検証した結果、化合物 A がミトコンドリア呼吸鎖の複合体 III の機能を阻害することを明らかにした。さらに化合物 A は、ヒト膵臓がん細胞株の MIA PaCa-2 (IC₅₀: 1.7 μM)や PANC-1 (IC₅₀: 4.5 μM)に加え、線維肉腫 HT-1080 (IC₅₀: 1.8 μM)、

胃がん MKN74 (IC₅₀: 3.6 μM)、子宮頸がん HeLa (IC₅₀: 1.7 μM)の各ヒトがん細胞株に対してもほぼ同程度の細胞毒性を示すことを見出した。

一方、化合物 B は ECAR の低下を誘導したことから、解糖系を阻害する可能性が示唆された。化合物 B の標的分子や抗腫瘍活性については現在も解析中である。

(2) 新規 MTH1 阻害剤の取得・作用解析

新たな MTH1 阻害剤の取得のため、まずは化合物アレイを用いることにより、理研 NPDepo の 29,809 化合物の中から、MTH1 と強固に結合する化合物のスクリーニングを行った(図 1a)。ヒットした 20 化合物に対して、次に *in vitro* の酵素アッセイを行い、MTH1 阻害活性を示すプリン誘導體 NPD15095 を得た(図 1b)。さらに、理研 NPDepo が保有する 131 種類の類縁体の活性を評価した結果、より強い MTH1 阻害活性を示す 2 化合物 NPD7155, NPD9948 を見出した(図 1b; K_i 値はそれぞれ 0.10 μM, 0.13 μM)。次に選択性の評価を行い、両化合物が 100 μM の濃度においても、他のヌクレオチドを基質とする加水分解酵素 ITPA や DCTPP1 の機能にほとんど影響を与えないことを見出した。

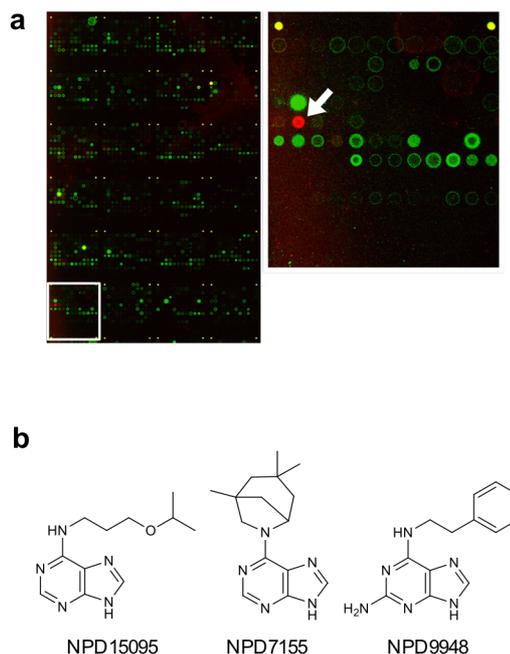


図 1. (a) 化合物アレイを用いた MTH1 阻害剤のスクリーニング結果の一例。各スポットには異なる化合物が固定化されており、赤色のスポットは MTH1 と強く結合する化合物を示す。左図の白枠部分の拡大図を右側に示しており、矢印は NPD15095 のスポットを示す。(b) 本研究で見出した新規 MTH1 阻害剤の構造。

NPD7155, NPD9948 は *in vitro* で sub μM レベルの強い MTH1 阻害活性を示し、なおかつ細胞内の MTH1 にも作用することを確認した。し

かし一方で、膵臓がん細胞の MIA PaCa-2 や PANC-1 を含め、細胞レベルではがん細胞に微弱な毒性を示すのみであった。そこで、プロテオーム解析に基づくプロファイリングを行い、我々が見出した MTH1 阻害剤 NPD7155, NPD9948 と既知の 3 系統の MTH1 阻害剤 (TH287, (S)-crizotinib, SCH51344) の作用の比較を行った。その結果、予想に反してこれら 3 系統の既知 MTH1 阻害剤はいずれも異なる作用プロファイルを示した。特に、*in vitro* で nM レベルの強力な MTH1 阻害活性を示す TH287 の細胞毒性は、tubulin の重合阻害により引き起こされる現象であることを見出した。

そこで次に、MTH1 ががん治療の標的分子として妥当であるのか、遺伝学的手法を用いて検証した。まず、我々が見出した阻害剤を含め試験した全ての MTH1 阻害剤が誘導する細胞毒性は、細胞に MTH1 を過剰発現させても減弱しなかった (図 2)。また、MTH1 をノックダウンしてもがん細胞の増殖や生存への影響は見られなかった (図 3)。

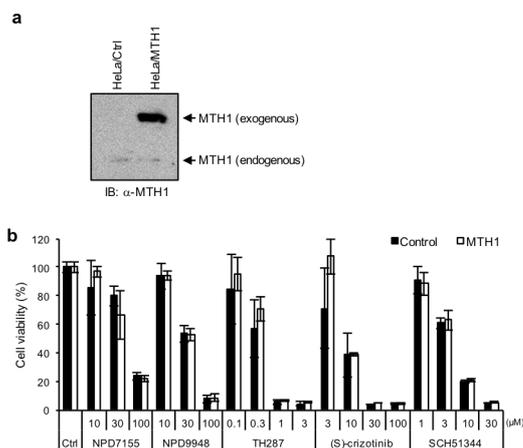


図 2. (a) MTH1 過剰発現細胞 (HeLa/MTH1) とコントロール細胞 (HeLa/Ctrl) の MTH1 タンパク質発現量の比較。(b) MTH1 阻害剤が両細胞に対して示す細胞毒性の強さに有意な差は認められなかった。

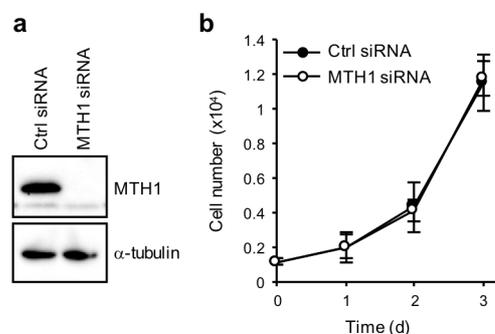


図 3. (a) MTH1 をノックダウンした HeLa 細胞 (MTH1 siRNA) とコントロール細胞 (Ctrl siRNA) の MTH1 タンパク質発現量の比較。(b) MTH1 の発現量の違いにかかわらず、両細胞の増殖速度に有意な差は認められなかった。

2014 年の Gad らの先行研究以来、がん治療の新たな標的分子として MTH1 が脚光を浴びてきたが、本研究の我々の発見から、MTH1 はがん細胞の増殖や生存に必須ではなく、先行研究で示された「MTH1 阻害による抗腫瘍効果」はオフターゲットへの作用により引き起こされた現象である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Ashutosh Kumar, Tatsuro Kawamura, Makoto Kawatani, Hiroyuki Osada, Kam Y. J. Zhang: Identification and structure-activity relationship of purine derivatives as novel MTH1 inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* (査読有) 89, 862-869 (2017)
doi: 10.1111/cbdd.12909
- ② Tatsuro Kawamura, Makoto Kawatani, Makoto Muroi, Yasumitsu Kondoh, Yushi Futamura, Harumi Aono, Miho Tanaka, Kaori Honda, Hiroyuki Osada: Proteomic profiling of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival. *Sci. Rep.* (査読有) 6, 26521 (2016)
doi: 10.1038/srep26521

[学会発表] (計 7 件)

- ① 室井誠、川谷誠、河村達郎、近藤恭光、二村友史、田中美帆、青野晴美、本田香織、長田裕之「ChemProteoBase を用いた MTH1 阻害剤の作用解析」日本農芸化学会 2017 年度大会: 2017 年 3 月 18 日: 京都女子大学 (京都府・京都市)
- ② Tatsuro Kawamura, Makoto Kawatani, Makoto Muroi, Yasumitsu Kondoh, Yushi Futamura, Harumi Aono, Miho Tanaka, Kaori Honda, Hiroyuki Osada, "Proteomic profiling of small-molecule inhibitors reveals dispensability of MTH1 for cancer cell survival": 28th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics: Nov. 30th, 2016: Munich (Germany)
- ③ 河村達郎、川谷誠、室井誠、青野晴美、二村友史、長田裕之「酸化ヌクレオチド加水分解酵素 MTH1 はがん細胞の生存に必須でない」第 75 回日本癌学会学術総会: 2016 年 10 月 7 日: パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ④ 川谷誠、河村達郎、室井誠、青野晴美、二村友史、田中美帆、長田裕之「酸化ヌクレオチド加水分解酵素 MTH1 阻害剤の作用解析」2016 年 5 月 31 日: 別府国際コンベンションセンター (大分県・別府市)

- ⑤ Tatsuro Kawamura, Makoto Kawatani, Yasumitsu Kondoh, Makoto Muroi, Yushi Futamura, Harumi Aono, Miho Tanaka, Kaori Honda, Hiroyuki Osada, “Identification of MTH1 inhibitors by chemical arrays” : RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology - The 5th Symposium: Apr. 18th, 2016: Berlin (Germany)
- ⑥ 河村達郎、川谷誠、長田裕之「化合物アレイを用いた新規 MTH1 阻害剤の探索」第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会:2015 年 6 月 12 日:松山全日空ホテル(愛媛県・松山市)
- ⑦ Tatsuro Kawamura, Yasumitsu Kondoh, Makoto Muroi, Makoto Kawatani, Hiroyuki Osada, “A small molecule that induces reactive oxygen species via cellular glutathione depletion” : RIKEN-Max Planck Joint Research Center for Systems Chemical Biology - The 4th Symposium: May 13th, 2015: Kobe (Japan)

[図書] (計 1 件)

- ① 河村達郎、近藤恭光、長田裕之「疾患診断のための化合物アレイの活用」メディカルドゥ、遺伝子医学 MOOK29、100-104 (2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 達郎 (KAWAMURA, Tatsuro)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・協力研究員

研究者番号 : 60528561