

令和元年6月7日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07169

研究課題名(和文) Drs癌抑制蛋白の機能をペプチド模倣する新しい抗腫瘍分子標的薬の探索

研究課題名(英文) Development of novel antitumor peptidomimetic drugs targeting Drs/SRPX tumor suppressor

研究代表者

旦部 幸博 (Yukihiro, Tambe)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：50283560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Drsタンパクは、ヒト癌の悪性化と密接に関連している癌抑制遺伝子産物である。本研究では、Drsの部分立体構造をミミック(分子模倣)する低分子化合物(MI化合物)の抗腫瘍活性を解析した。DrsのSushiドメインをミミックする候補化合物を用いたスクリーニングから、膵臓癌、大腸癌、膀胱癌等のヒト癌細胞株に対して10-40 μ Mで活性を示す複数のMI化合物を見出した。また、それらがアポトーシス誘導や浸潤抑制などのメカニズムを介して抗腫瘍作用を発揮することを明らかにし、Drsがヒト癌治療の新しい分子標的になる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、抗癌剤の進歩によって癌の治療成績は大幅に改善した。しかし再発や転移の問題、K-ras変異のある膵臓癌などの難治性癌、耐性獲得、抗癌剤の副作用など解決すべき課題は多く、従来とは異なる機構の抗癌剤開発の必要がある。本研究の成果はDrsが癌治療のための新しい分子標的になる可能性を示唆している。また、Sushiドメインを分子模倣することの有効性を見出したことから、他のSushiドメインを有するタンパク質(IL受容体やセレクチンなど)についても同様のアプローチが有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Drs protein is the tumor suppressor gene product that is closely associated with the malignant transformation of human cancers. In this study, we examined the antitumor activity of MI compounds, which are the small molecular compounds that mimic the partial conformation of Drs. Screening with candidate compounds mimicking the Sushi domain of Drs led to the discovery of MI compounds suppressing human cancer cell lines such as pancreatic, colorectal, and bladder cancers at 10-40 micromolar. These compounds exerted antitumor effects through mechanisms such as apoptosis induction and invasion suppression. These results suggest that Drs may be a new molecular target for human cancer therapy.

研究分野：実験病理学

キーワード：分子標的薬 抗腫瘍活性 ペプチド模倣 drs/SRPX sushiモチーフ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

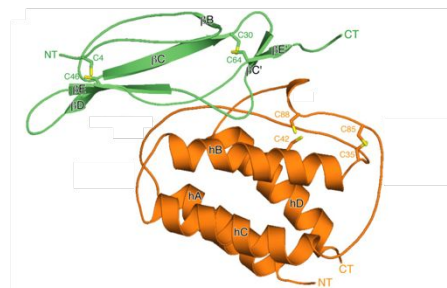
1. 研究開始当初の背景

(1) 癌の進行過程では、いくつかの遺伝子変異が段階的に生じることで、細胞増殖の亢進や不死化、エネルギー代謝の変化、アポトーシスの回避、浸潤転移など、さまざまな悪性化形質を順次獲得していく。初期の抗癌剤は細胞の分裂増殖を阻害するものが主流であったが、近年はこうした悪性化の過程に着目し、その進行に関わる癌遺伝子産物などの分子を標的とする抗癌剤(分子標的薬)が開発されている。そのいくつかは既に臨床でも使われはじめているが十分ではなく、膵臓癌などの難治性癌や再発癌などに対する新たな分子標的薬が望まれている。

(2) Drs 遺伝子はウイルス癌遺伝子 v-src や活性化 K-ras 遺伝子など各種の癌遺伝子によって発現抑制される性質を持ち、ヒト大腸癌や肺腺癌、成人 T 細胞白血病など多くの癌組織においても、その悪性化に伴って遺伝子発現が抑制されている。申請者は、これまでに Drs を発現消失した癌細胞にレトロウイルスベクターを用いて再導入すると、足場非依存性増殖やヌードマウスでの in vivo 造腫瘍能などの悪性化形質が抑制されることを明らかにしてきた。これは Drs を遺伝子治療に応用できる可能性を示したが、実際の臨床適用を考えた場合、分子メカニズムを解明して低分子化合物を用いた化学療法を検討することが現実的であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、Drs の機能を分子模倣する新しい抗腫瘍化合物を探索することを目的とする。Drs 蛋白は、N 末端側に Sushi モチーフと呼ばれるユニークなドメイン構造を 3 つ有しており、抗腫瘍作用をはじめとする生理活性にはこの領域が必要である。近年、Sushi モチーフを含む蛋白質の立体構造解析が進められており、リガンドとの結合にはモチーフ内のループ領域の一部が関与することが報告されている。そこでこの領域(右図)を模倣する低分子化合物(以下 MI 化合物)の抗腫瘍作用とそのメカニズムを解析し、新たな分子標的治療法の確立を目指して研究を行なった。



Sushiモチーフ(上)とリガンド(下)結合領域の立体構造予測
本研究は、Drsとリガンドの結合に関わるSushiモチーフのループ領域をミミックする低分子化合物から抗腫瘍活性成分を探索する

3. 研究の方法

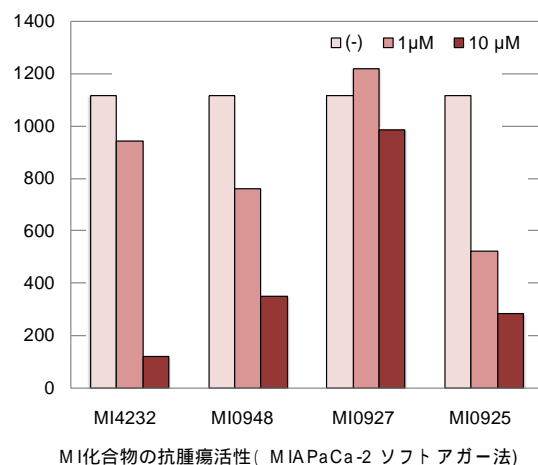
(1) 抗腫瘍活性スクリーニング: 抗腫瘍性 MI 化合物のスクリーニングのために、大腸癌(DLD-1、HCT116)、膵臓癌(MIAPaCa-2、Panc-1)、膀胱癌(HT1197、UMUC-3)の各ヒト癌細胞株を用いて、ソフトアガー法または三次元スフェロイド形成能試験を行なった。対照群に対し、各種 MI 化合物(10~60 μM)を培地に添加したときのコロニー形成能(ソフトアガー法)および ATP 活性(三次元スフェロイド)を測定して、その抑制率を抗腫瘍能の指標とした。

(2) 急性毒性試験: 上記スクリーニングで選抜された MI 化合物について、線虫 *C. elegans* 急性毒性試験法により、線虫活動抑制を指標として毒性の確認を行なった。

(3) 抗腫瘍メカニズムの解析: MI 化合物処理をした癌細胞株における、各種の癌関連タンパク(シグナル伝達分子、幹細胞マーカー分子、アポトーシス関連分子など)の発現量やリン酸化の変化について、ウエスタンブロッティング法を用いて解析した。また、マトリゲル・アッセイ法を用いて癌細胞の浸潤能に対する MI 化合物の効果を検討した。

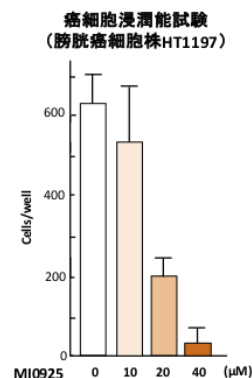
4. 研究成果

(1) 一次スクリーニングとして、12 種類の MI 化合物について、大腸癌細胞株 DLD-1、膵臓癌細胞株 MIAPaCa-2 などのソフトアガーコロニー形成抑制能を指標に、選抜を行なった。この結果、10 μM オーダーで活性を示し、かつ正常細胞への毒性が比較的低いものが数種類確認できた。このとき、MI 化合物に対する感受性が高かった MIAPaCa-2 細胞を中心に、また近年、癌細胞の幹細胞性を踏まえて確立された三次元スフェロイド形成法を指標としたスクリーニング系を使って、二次(15 化合物)、三次(15 化合物)、四次(6 化合物)スクリーニングを順次実施した。最終的にこれらのスクリーニングの中から、比較的高い抗腫瘍活性を持つ MI4232、MI0925、MI0948 の 3 化合物を見出した(右図)。



(2)なかでも MI4232 は強い抗腫瘍活性を示したが、他の化合物と比べると正常細胞に対する毒性がやや強く、40-60 μM でアポトーシスを誘導することが判明した。我々はこれまでの研究で、Drs にアポトーシス誘導能があることを報告している。細胞が癌化する途中でアポトーシスが誘導されることは、発癌防止のための生体防御機構として重要であり、MI4232 はこの活性をミミックする可能性が示唆された。ただし *C. elegans* での急性毒性も比較的高く、臨床応用上のデメリットになることが考えられた。

(3) 3 化合物はいずれも癌幹細胞マーカー CD44 のタンパク発現を抑制し、癌細胞の幹細胞性を抑制することが示唆された。また MI0925 を中心にして、さらに検討を行なった結果、Ras 下流で細胞増殖などに関与する MEK、Erk など MAPK 経路タンパクのリン酸化を MI0925 が抑制することを見出した。MI0925 は Kras 変異型の膵臓癌や大腸癌細胞株だけでなく Hras 変異型の膀胱癌細胞株に対しても抗腫瘍性を示し、この膀胱癌細胞株の浸潤能を抑制することをマトリゲル・アッセイ法により明らかにした(右図)。このとき、上皮間葉転換のマーカーである E-カドヘリンの減少も認められ、MI0925 が癌細胞の転移浸潤に対しても抑制的に働くことが示唆された。



以上の結果から Sushi モチーフをミミックする MI 化合物が、癌治療のための創薬シーズになる可能性が示唆された。なかでも MI0925 は有望だと考えられたが、*in vivo* 実験に進めるためには、本化合物の構造をモデルにして低毒性かつ高活性の新規 MI 化合物を探索していくことが有用であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. [Tambe Y](#), Terado T, Kim CJ, Mukaisho K, Yoshida S, Sugihara H, Tanaka H, Chida J, Kido H, Yamaji K, Yamamoto T, Nakano G, Omura S, Inoue H. Antitumor activity of potent pyruvate dehydrogenase kinase 4 inhibitors from plants in pancreatic cancer. *Molecular Carcinogenesis* 2019 年 (in press)
2. Kim CJ, Terado T, [Tambe Y](#), Mukaisho K, Suguhara H, Kawauchi A, Inoue H. Anti-oncogenic activities of cyclin D1b siRNA on human bladder cancer cells via induction of apoptosis and suppression of cancer cell stemness and invasiveness. *International Journal of Oncology* 52 231-240 2018 年
3. Kim CJ, [Tambe Y](#), Mukaisho K, Sugihara H, Kageyama S, Kawauchi A, Inoue H. Periostin suppresses *in vitro* invasiveness via PDK1/Akt/mTOR signaling pathway in a orthotopic model of bladder cancer. *Oncology Letters* 13 4276-4287 2017 年
4. Kim CJ, [Tambe Y](#), Mukaisho K, Sugihara H, Kawauchi A, Inoue H. Akt-dependent activation of Erk by cyclin D1b contributes to cell invasiveness and tumorigenicity. *Oncology Letters* 12 4850-4856 2016 年

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 向所賢一, [旦部幸博](#), 金哲將, 園田寛道, 清水智治, 谷眞至, 杉原洋行, 井上寛一
Cyclin D1b トランスジェニックマウスには SSA/P 類似直腸腫瘍が発生する
第 86 回大腸癌研究会 (2017 年、盛岡)
2. [旦部幸博](#), 寺戸勅雄, 金哲將, 中野洋文, 向所賢一, 杉原洋行, 井上寛一
ヒト膵臓癌細胞株の *in vivo* 造腫瘍能と癌幹細胞性に対する PDK4 阻害剤の作用
第 76 回日本癌学会学術総会 (2017 年、横浜)
3. 金哲將, 寺戸勅雄, [旦部幸博](#), 中野洋文, 河内 明宏, 井上 寛一
新規 PDK4 阻害剤による H-Ras と癌幹細胞性の抑制を介した膀胱癌に対する抗腫瘍活性
第 77 回日本癌学会学術総会 (2018 年、大阪)
4. [旦部幸博](#), 寺戸勅雄, 金哲將, 中野洋文, 向所賢一, 杉原洋行, 井上寛一
膵臓癌における KRAS 発現抑制を介した新規 PDK4 阻害剤 cryptotanshinone の抗腫瘍活性
第 77 回日本癌学会学術総会 (2018 年、大阪)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：井上 寛一、金 哲蔭、寺戸 勅雄、中野 洋文

ローマ字氏名：INOUE Hirokazu, KIM Chul-Jang, TERADO Tokio, NAKANO Hirofumi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。