

令和元年6月19日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18460

研究課題名(和文)キナーゼ活性化剤が導く癌治療への新たな展望

研究課題名(英文)A novel vision for cancer treatment by a kinase activator

研究代表者

田中 義久(Tanaka, Yoshihisa)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：20648703

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)：低分子化合物CMB-236は、キナーゼプロファイルの取得により様々なチロシンキナーゼを活性化させることが示された。CMB-236による受容体型チロシンキナーゼの恒常的な活性化は、細胞内環境におけるホメオスタシス機構を破綻させ、カスパーゼ依存性の細胞死を引き起こすことが示された。さらにin vivoにおいて腫瘍増殖の抑制作用も示した。本研究の結果より、チロシンキナーゼ活性化剤は抗癌剤としての可能性を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの多様性により臓器ごとではなく患者一人一人のがん細胞の特徴にマッチした抗がん剤を選択する時代が到来しつつある。抗癌剤の開発においてキナーゼ阻害剤が多く占めている中、キナーゼ活性化剤による抗癌活性はほとんど報告されていない。本研究において抗癌活性を持つキナーゼ活性化剤が同定された意義は大きく、新たな視点での創薬が期待され、抗癌剤としての選択の幅が広がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We identified novel small molecule compound CMB-236 during anticancer drug screening. Our studies found that 1) CMB-236 markedly induced elevation of kinase activity of a variety of tyrosine kinase receptors. 2) Cell death induced by CMB-236 was strongly dependent on caspase activity. 3) PI3K activated by CMB-236 treatment caused swelling of endosomes. Hence, we assumed that unusual activation of tyrosine kinase by small molecule compound disturbed cell homeostasis resulting in induction of cell death. In addition, in vivo studies showed that CMB-236 treatment in mice suppressed tumor growth. These findings suggested that such compounds can be considered as potential drug targets.

研究分野：解剖学

キーワード：抗癌剤 キナーゼ活性化剤

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

キナーゼは、自己免疫疾患、癌、細胞死を伴う多くの疾患の薬剤の標的である。一般的にキナーゼの中でもチロシンキナーゼによるリン酸化の促進は、癌細胞の悪性化と非常に相関している。そのため現在世界で約 300 種のキナーゼ阻害剤が臨床試験されており、また 20 を超えるキナーゼ阻害剤が抗癌剤として承認されている。京都大学薬学部が保有する化合物ライブラリーより乳癌細胞株 MDA-MB231 に対して細胞死を誘導する低分子化合物のスクリーニングを行った結果、受容体型チロシンキナーゼ活性を阻害ではなく活性化しているにもかかわらず、細胞死を誘導している非常に興味深い活性を持つ新規低分子化合物 CMB-236 (IC50 値は 5 μ M) を得た。キナーゼを活性化する低分子化合物は 1999 年にインスリン受容体の活性化剤が報告され (Zhang et al. Science, 1999) 現在では糖尿病治療薬としてグルコキナーゼ活性化剤が臨床応用されている。一方、抗癌活性を示すキナーゼ活性化剤は AMP キナーゼやピルビン酸キナーゼを標的としたものはあるが (Anastasiou et al. Nat Chem Biol, 2012)、チロシンキナーゼの活性化剤での報告はない。そこで本研究では、低分子化合物によるチロシンキナーゼの活性化がどのように細胞死を誘導するのかそのメカニズムを解析し、さらに抗癌剤としての有用性を評価した。

2. 研究の目的

キナーゼ阻害剤による癌細胞死に関する研究はさかんであるが、キナーゼ活性化剤による癌細胞死に関する研究は、キナーゼ阻害剤と比較してほぼ皆無に等しい状況である。よって本研究によって受容体型チロシンキナーゼ活性の阻害だけでなく、活性化によっても細胞死が誘導できることを解明できれば、癌細胞に対して新たな視点での創薬の可能性を示すことができる。また、キナーゼ活性化剤は細胞シグナルネットワークを理解する上でも有用なツールとなり、阻害剤だけではなく活性化剤が加わることで薬剤の選択の幅が広がると考えられる。そして癌だけでなく神経変性疾患など様々な病態の解明にも応用できる可能性を秘めている。そのため、まず本薬剤のキナーゼ活性化剤の薬理作用を知ることは一つの重要な課題である。さらに in vivo の実験系より抗腫瘍効果が示されれば抗癌剤として臨床面への応用も可能と考えられる。

3. 研究の方法

(1) CMB-236 のキナーゼプロファイリングの取得

CMB-236 のターゲットを明確にするために、カルナバイオサイエンス社に委託し、CMB-236 の直接キナーゼに対する活性変化を網羅的に解析した。

(2) CMB-236 による乳癌細胞株の分子生物学的変化の解析

CMB-236 によるチロシンリン酸化の変化の解析

CMB-236 によってもたらされる細胞死のタイプの同定

CMB-236 による細胞死のメカニズム解析

(3) In vivo における CMB-236 の抗腫瘍効果の検証

4. 研究成果

(1) CMB-236 のキナーゼプロファイリングの取得

約 500 種のキナーゼの中から 196 種のキナーゼを選別し、Mobility Shift Assay によるキナーゼ活性の測定を行ったところ、CMB-236 (5 μ M) 添加により多数のチロシンキナーゼに活性化作用があることが示された。(図 1)

(2) CMB-236 による乳癌細胞株の分子生物学的変化の解析

乳癌細胞株 MDA-MB231 に CMB-236 (20 μ M) を添加し、ウエスタンブロット解析によるリン酸化タンパクの検出を経時的に観察したところ、受容体型チロシンキナーゼである EGFR および EphA2 のリン酸化が徐々に亢進されていた。また蛍光免疫染色により EGFR の局在を観察したところ、CMB-236 によりエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれている様子が観察された。

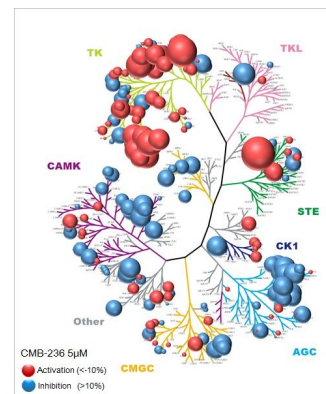


図1 CMB-236 キナーゼプロファイリング

CMB-236 による乳癌細胞株の細胞死を検証するため、CMB-236 添加による Caspase-3, 8, 9 および 4 の活性変化を測定したところ、CMB-236 の添加によって Caspase-3, 8 および 9 の上昇が有意に観察された。マルチなカスパーゼ阻害剤である Z-VAD-FMK の同時添加によって CMB-236 による細胞死が有意に抑制されたことから CMB-236 による細胞死はカスパーゼ依存性の細胞死であることがわかった。

EGFR がエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれていたため、エンドソームのマーカーである Rab5 および Rab9 を用いて蛍光免疫染色によりエンドソームを観察したところ、CMB-236 添加によりエンドソームの肥大化が観察された。PI3K の阻害剤である 3-Methyladenine の同時添加はエンドソームの肥大化を抑制し、さらに Caspase 依存性の細胞死も抑制した。透過型電子顕微鏡による観察では、過剰なエンドサイトーシスおよび多数の空胞が観察された。(図 2)

これらの結果は、低分子化合物による持続的かつ過剰なチロシンリン酸化はエンドサイトーシスの亢進など癌細胞においても大きな負荷がかかると考えられる。結果的に癌細胞の細胞内環境におけるホメオスタシス機構は破綻し、カスパーゼ活性を伴う細胞死を誘導したのではないかと推察された。

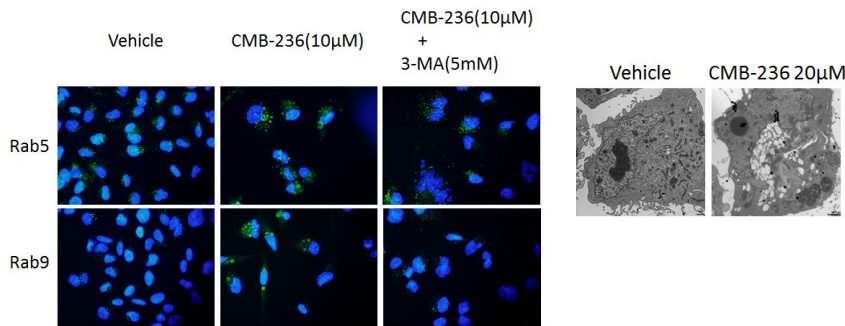


図2 CMB-236によるエンドソームの肥大化および3-MAによる肥大化の抑制

(3) In vivo における CMB-236 の抗腫瘍効果の検証

免疫不全マウスである SCID マウスの左肩胛部皮下に MDA-MB236 を 5×10^6 個移植し、腫瘍径が 2 mm ほどに成長したところで、1 群を 10 匹として 3 群に分け、0 mM, 2.5 mM, 10 mM の濃度の CMB-236 をインスリンシリンジを用いて直接腫瘍内に投与した。事前の検証により、化合物の皮下投与もしくは腹腔内投与では化合物の浸透性や輸送などの問題により、劇的な変化が認められそうになかったため、直接腫瘍内に投与を行うこととなった。投与は週 3 回行い、毎週 1 回、体重および腫瘍体積を測定し、投与開始から 8 週経過後にマウスを屠殺・剖検した。8 週後の腫瘍体積は、2.5 mM 投与群 $33.2 \pm 24.7 \text{ mm}^3$ 、10 mM 投与群 $45.3 \pm 49.0 \text{ mm}^3$ 、対照群 $123.0 \pm 93.7 \text{ mm}^3$ と統計学的な有意差を認めた。(図 2) 摘出したそれぞれの腫瘍組織の切片を作製し、中心性壊死の割合を解析したところ、投与群で上昇傾向にあった。CMB-236 の抗腫瘍効果は劇的ではなかったが、本研究の結果より、チロシンキナーゼ活性化剤は抗癌剤としての可能性を見出すことができた。

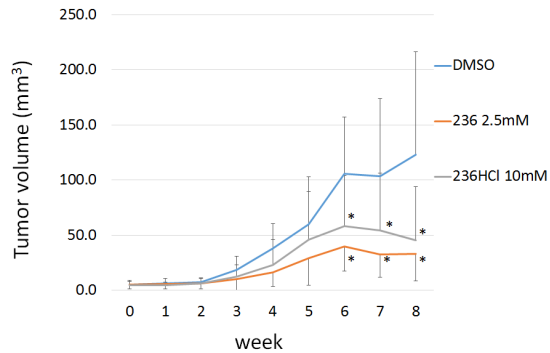


図3 CMB-236投与による腫瘍体積の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

田中義久、低分子キナーゼ活性化剤 CMB-236 の癌細胞に及ぼす生理活性および細胞死の解析、第 123 回日本解剖学会総会、2018 年

田中義久、キナーゼ活性化剤 CMB-236 による癌細胞死誘導、第 122 回日本解剖学会総会、2017 年

田中義久、受容体型チロシンキナーゼ活性化剤による癌細胞死誘導、日本臨床分子標的学会、2016 年

田中義久、低分子キナーゼ活性化剤による癌細胞死誘導、第 121 回日本解剖学会総会、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.osaka-med.ac.jp/class/an1.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：濱岡仁美

ローマ字氏名：Hamaoka Hitomi

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。