

令和元年6月17日現在

機関番号：82713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18468

研究課題名(和文)新規化合物の卵巣がん腹膜播種に対する治療薬としての臨床応用に向けた研究

研究課題名(英文) Analysis of a novel PACMA compound as a candidate drug for ovarian cancer

研究代表者

室井 敦 (Muroi, Atsushi)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・技師・研究員

研究者番号：60609402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣がんは早期発見が困難であり治療成績は芳しくない。そのため、新たな治療法の開発が求められている。PACMAは毒性、疎水性等の予測に基づいて化合物ライブラリーからスクリーニングされた一群の化合物である。我々はこれまでに、新規PACMA化合物であるPACMA-Xが卵巣がん細胞を含む様々な腫瘍細胞株に強い殺細胞効果を示すことを明らかにしてきた。そこで本研究ではPACMA-Xの詳細な作用メカニズムの解明を試みた。その結果、PACMA-X結合タンパク質Protein1を同定し、細胞死における役割について解析を行った。また、PACMA-Xによる細胞死が一般的な細胞死とは異なる様式である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、卵巣がん腹膜播種に対する新規治療薬候補化合物について作用メカニズムの詳細な解明を試みた。その結果、ターゲットタンパク質および細胞死におけるその機能について明らかにした。更に、本化合物によって引き起こされる細胞死が一般的ながん治療薬とは異なる形式のものである可能性を示唆する結果を得た。これらの結果は、本化合物を新たな卵巣がん治療薬として臨床応用する上で重要であるだけでなく、既存のがん治療薬に対し耐性を示す他のがん種への応用の可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Since ovarian cancer is difficult to be detected early, therapeutic outcomes are poor. Therefore, development of novel therapeutic treatments against it is necessary. PACMAs belong to a grope of compounds selected from chemical libraries based on their characteristics including toxicity and hydrophobicity. So far, we have shown that a novel PACMA compound, PACMA-X, specifically kills various kinds of tumor cells including ovarian ones. In this study, we aimed to clarify mechanisms underlying the cell death. We found that a novel PACMA-X-binding protein, protein1, was involved in ROS production in mitochondria of PACMA-X-treated ovarian cells, which was essential for PACMA-X-induced cell death. Furthermore, we showed that the cell death had characteristics different from those of apoptosis or necroptosis.

研究分野：生化学

キーワード：卵巣がん 分子標的治療薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 卵巣がんは年間約 8,000 人の罹患が報告され、4,000 人以上の患者が死亡する。早期発見が困難であることから発見時に既に進行していることが多く約 50%が進行がんとして発見される。そのため治療成績は芳しくない。現在はパクリタキセルおよびプラチナ製剤による治療が標準化学療法として行われているが、進行卵巣がんの 10 年生存率は約 10%とされる。その一因は、卵巣がんが腹膜に転移した状態である腹膜播種を引き起こすことであり、根本的な治療法が存在しない。腹膜播種は胃がんや大腸がんでも問題となっており、有効な治療法の開発が求められている。PACMA (propynoic acid carbamoyl methyl-amides) は約 50,000 種の化合物ライブラリーから、毒性、疎水性等の予測に基づいてスクリーニングされた一群の「臨床薬として有望な」化合物であり、共通の基本骨格を持つ様々な化合物が含まれる。既に一部の PACMA 化合物が大腸がん細胞や乳がん細胞などに対する強い殺細胞効果を示すことが報告されており (Yamada, 2011; Xu, 2012) 他 PACMA 化合物についても同様の作用が期待される。本研究室ではこれまでに、新規 PACMA 化合物である PACMA-X が卵巣がん細胞を含む様々な腫瘍細胞株に極めて強い殺細胞効果を示し、なおかつ正常細胞には作用しないことを明らかにしてきた。また、ヒト卵巣がん由来培養細胞株である ES-2 細胞を腹腔内接種したマウスに PACMA-X を投与すると腫瘍の増殖が抑制されたことから、PACMA-X が実際に卵巣がん腹膜播種に有効である可能性が示された。そのため、PACMA-X の作用機序の解明など、PACMA-X の臨床応用に向けた情報の収集が必要である。

### 2. 研究の目的

PACMA-X による卵巣がん細胞の細胞死誘導に関わる詳細な分子メカニズムの解明を試みる。これにより、卵巣がん腹膜播種治療における PACMA-X の臨床応用に向けた情報を得るとともに、新たな治療薬開発の基盤となる情報の収集を行う。

### 3. 研究の方法

本研究では PACMA-X 結合タンパク質の同定を含む、PACMA-X 作用メカニズムの解析を行った。ビオチン標識を行った PACMA-X を用いて卵巣がん細胞株 ES-2 の細胞抽出液をから PACMA-X 結合タンパク質を回収し、質量分析によって標的タンパク質候補 Protein1 を同定した。このタンパク質の活性部位変異体を合成し、PACMA-X との結合能が低下していることをプルダウンアッセイによって確認した。更に、細胞免疫化学染色による細胞内発現部位の同定、Protein1 欠損細胞を用いた FACS 解析による活性酸素種 (ROS) 定量により、Protein1 が PACMA-X による細胞死誘導に関与する可能性を示した。その後、阻害剤を用いた解析、および顕微鏡による形態変化の観察から、PACMA-X による細胞死が一般的ながん治療薬によって誘導されるものとは異なる様式である可能性を示した。

### 4. 研究成果

新たながん分子標的治療薬を開発において、結合タンパク質の同定を含めた作用メカニズムの解明は重要である。これまでの研究から、PACMA-X による細胞死において、ROS 産生が重要なシグナル伝達となる可能性が示されていた。そこで、本研究では PACMA-X 感受性卵巣がん細胞株 ES-2 の細胞抽出液を用い、PACMA-X 標的タンパク質の同定を試みた。ビオチン標識した PACMA-X を用いて結合タンパク質の回収を行い、電気泳動後に CBB 染色を行ったところ、PACMA-X 画分に特異的なバンドが確認された。この領域のゲルを切り出し、質量分析によるタンパク質同定を行ったところ、2 種類のタンパク質が新たに同定された (Protein1、Protein2 と呼称)。Protein1、2 は同一ファミリーに属するタンパク質であり、高い配列相同性を示す。また、これらのタンパク質は細胞における酸化還元反応への関与が既に報告されており、PACMA-X による細胞死の過程で ROS 産生が重要なシグナルとなることと合致する結果であった。実際に、Protein1 の酸化還元機能に重要であると報告されているアミノ酸残基を変異させるとビオチン化 PACMA-X との結合能が著しく低下した (図 1)。続いて、Protein1 の細胞内局在部位の同定を試みた。阻害剤を用いたこれまでの解析から、PACMA-X 処理後に誘導される ROS はミトコンドリア由来である可能性が示されていた。ES-2 細胞から遠心分離によってミトコンドリア画分を生成し、ウェスタンブロットによって Protein1 の局在部位を確認したところ、Protein1 がミトコンドリアに局在することが確認された (図 2)。更に、ミトコンドリア移行シグナルを付与した GFP を恒常的に発現する ES-2 細胞を作成し、細胞免疫化学染色によって Protein1 の細胞内局在部位を確認したところ、GFP との共局在が見られた。そこで、CRISPR/Cas9 システムによって

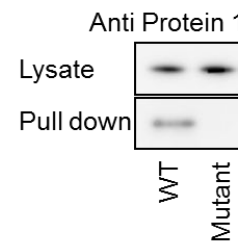


図 1 . ビオチン標識 PACMA-X を用いた Protein 1 のプルダウンアッセイ。野生型および変異型の Protein 1 を無細胞合成しビオチン標識 PACMA-X を用いてプルダウン後、抗 Protein 1 抗体を用いてウェスタンブロットを行った。

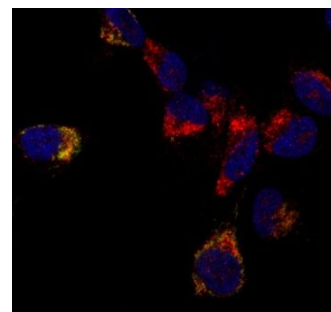


図 2 . 免疫染色による Protein1 細胞内局在部位の同定。ミトコンドリア移行シグナルを付与した GFP を発現する ES-2 細胞を用いて免疫染色により Protein1 を検出した。赤: Protein1、緑: GFP、青: 核。

Protein1 を欠損した ES-2 細胞を作成し PACMA-X 処理後の ROS 産生量を FACS によって定量したところ、Protein1 ノックアウト細胞では ROS 産生が減少していた。これらの結果から、Protein1 および Protein2 が PACMA-X による ROS 産生およびその後の細胞死誘導に与える可能性は高いと考えられる。

続いて、PACMA-X によって誘導される細胞死のメカニズムについて更に解析を行った。一般的に、がん治療薬を処理したがん細胞で誘導される細胞死として、アポトーシスやネクロプトーシスが知られていることから、PACMA-X 処理後の ES-2 細胞においてこれらの細胞死の有無について検証を行った。アポトーシス阻害剤である z-VAD、ネクロプトーシス阻害剤である Nec1 を前処理した ES-2 細胞に PACMA-X を処理し、その後の細胞死および ROS 産生について確認したところ、いずれの阻害剤も PACMA-X の効果に影響を及ぼさないことが明らかになった。また、顕微鏡観察による PACMA-X 処理後の細胞の形態変化の確認からも、PACMA-X によって誘導される細胞死がこれまでにあまり報告のない形式のものである可能性が示された。

以上の結果から、PACMA-X の臨床応用において重要になる細胞死誘導のメカニズムについて一端が明らかになったが、今後更に解析を進める必要がある。また、一般的ながん治療薬とは異なる様式の細胞死が誘導されることから、既存の治療に抵抗性を示す症例にも効果を発揮する可能性が期待される。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔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：山田六平

ローマ字氏名：Yamada, Roppei

研究協力者氏名：宮城洋平

ローマ字氏名：Miyagi, Yohei

研究協力者氏名：澤崎達也

ローマ字氏名：Sawasaki, Tatsuya

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。