

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11306

研究課題名（和文）子宮頸癌におけるイトラコナゾールの抗腫瘍効果解析及びレスポンダーの同定

研究課題名（英文）Identification of anticancer mechanism of itraconazole and its clinical responders

研究代表者

井上 佳代（Inoue, Kayo）

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：80594754

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：イトラコナゾールの子宮頸癌由来細胞に対する抗がん作用について、マイクロアレイによる遺伝子発現解析及びWestern blotを行いAkt、Hedgehog、Wnt-cateninの複数のシグナル伝達系の抑制を介していることを明らかにした。この上流を探索するため、網羅的リン酸化蛋白質質量分析、網羅的生理活性脂質メディエーター分析を行い、これまで抗がん作用が報告されていない炎症収束性の新規脂質メディエーターを同定した。以上から、ドラッグリポジショニングを用いて創薬につながる新規治療ターゲットを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規がん治療薬の開発費が高騰し、抗がん治療薬による本邦の国民皆保険制度の破綻が危惧されていることから、ドラッグ・リポジショニングによるがん治療薬開発が期待されている。イトラコナゾールは安価で副作用が少ない抗真菌薬として広く使用されているが、抗腫瘍効果があることが報告されている。我々もこれまで複数のがん腫の患者についてイトラコナゾールの臨床的有効性を報告してきた。本研究では、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームについてそれぞれ網羅的に解析を行い、新規作用機序及びがん治療ターゲットを同定した。

研究成果の概要（英文）：Microarray analysis and Western blots demonstrated that the anticancer activity of itraconazole was mediated by the downregulation of Akt/mTOR, Hedgehog, and Wnt/catenin signal transduction in cervical cancer cells. To investigate the upstream regulation, comprehensive analysis of phosphoproteins and bioactive lipid mediators were conducted. The novel therapeutic target of lipid mediators was identified, which resulted from the study of drug repositioning.

研究分野：がん創薬

キーワード：ドラッグリポジショニング

1. 研究開始当初の背景

【イトラコナゾールの既知の抗腫瘍作用機序】

1990年代より奥村らによって、タキサン系抗がん剤に耐性を獲得した腫瘍細胞に対してイトラコナゾールによる P-gp 蛋白を介した薬剤耐性の解除が報告された(Takara K et al. Biol Pharm Bull. 1999)。一方で、新規分子標的薬剤の開発には膨大な時間と費用がかかり薬剤費の高騰が問題となっていることから、Johns Hopkins 大学(JH)のグループは3,000以上のFDA認可薬剤の抗腫瘍効果を網羅的に検討し、2007年にイトラコナゾールが最も血管新生阻害作用が強い薬剤であったことを報告し(Chong CR et al. ACS Chem Biol.)、以降ヘッジホッグシグナル伝達経路の抑制(Hh,; Kim J et al. Cancer Cell. 2010)やオートファジーの抑制(Liu R et al. Autophagy. 2014)を介した腫瘍増殖抑制効果が報告された。

【他施設の臨床研究】

JHグループにより再発非小細胞性肺癌に対して pemetrexed にイトラコナゾールを上乗せするランダム化第2相試験が行われた。イトラコナゾール併用により無病生存期間(PFS)は延長しなかったが、全生存期間(OS)は有意に延長した(HR=0.194, $p=0.012$, Rudin CM et al. J Thorac Oncol. 2013)。続いてイトラコナゾール単剤による前立腺癌や皮膚基底細胞癌に対する臨床的有効性が報告された(Antonarakis ES et al. Oncologist. 2013; Kim DJ et al. J Clin Oncol. 2014)。

【申請者らによる臨床研究】

多剤耐性がん患者に対して化学療法中にイトラコナゾールを投与した患者を後方視的に検討した(施設倫理審査承認 No.1519)。卵巣癌 refractory disease に対して Cox 比例ハザードモデルによる解析を行ったところ、イトラコナゾール投与群の OS は HR=0.27 ($p=0.006$)であった(Tsubamoto H et al. Anticancer Res. 2014)。本研究でも PFS の延長以上に OS が延長した。また、乳癌(TNBC)、膵癌、胆嚢・胆管癌についても検討し、historical control と比べ OS の延長を認めた(Tsubamoto H et al. Anticancer Res, 2014, 2015, 2015)。

【子宮頸がんに対する治療開発状況】

子宮頸癌は先進国では公費によるワクチン接種により天然痘同様に根絶されると予想され、子宮頸癌の治療開発は進んでいない。一方で、本邦では社会的事情から今後も罹患者が増加することが予想されていた。申請者らが2015年より開始した特定臨床研究(window of opportunity 試験、現在は iRCTs051190006)では、2~4週間イトラコナゾールを内服投与し経時的にがん組織や血液を採取するトランスレーショナル研究である。既に、子宮頸癌患者の半数程度において、性器出血や疼痛軽減などの症状改善と肉眼的腫瘍縮小を認めていた。

2. 研究の目的

子宮頸がんについて、イトラコナゾールの抗がん治療薬としてのバイオマーカーを同定することは、安価で毒性が少なく効果的な治療法の開発につながる。また、その新規作用機序を同定することは副作用の少ない有効な創薬の基盤につながる。また、日常診療の範囲で肉眼的に治療効果を判定することができ、外来で容易に経時的組織生検が可能な癌腫は極めて限られている。従って、子宮頸がんを得られた知見は、多癌腫に応用可能で癌腫を問わな

い創薬へと展開できる。

以上の展望により、子宮頸がん細胞株を用いてイトラコナゾールの抗腫瘍効果のメカニズムを検討することにした。

3. 研究の方法

1. 複数の頸癌細胞株を用いてイトラコナゾールの以下の抗腫瘍効果を検討する。

(ア) 増殖抑制、浸潤抑制効果を検証する。

(イ) 他癌腫細胞株で報告された hedgehog、Wnt/ β -catenin への作用を、頸癌細胞株で検証する。

(ウ) mTOR-オートファジーへの作用を検証する。

(エ) 転移に関わる EMT 関連分子、接着因子への作用を検討する。

(オ) 網羅的遺伝子発現解析を行う。

(カ) 網羅的リン酸化タンパク質量分析を行う。

(キ) 網羅的生物活性脂質メディエーター質量分析を行う。

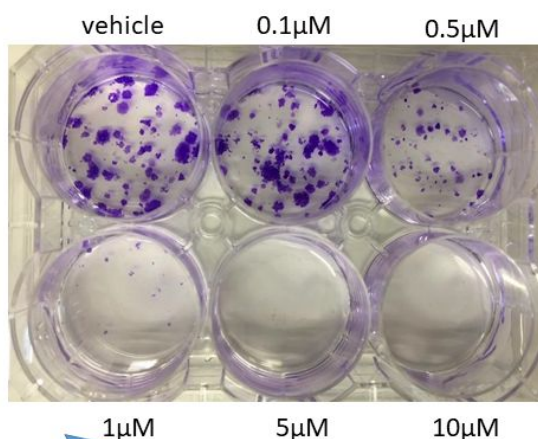
4. 研究成果

最も抗腫瘍効果を認めた頸癌細胞株は、CaSki cells であった。CaSki 細胞は、HPV-16 感染を起源とする、PIK3CA 変異, sonic hedgehog 変異を有する子宮頸がん細胞株であるが、イトラコナゾールの抗真菌薬としての血中濃度の培養液にて著名に腫瘍増殖を抑制した。網羅的遺伝子発現解析及び Western blot を行い、Akt/mTOR、hedgehog、Wnt/ β -catenin の複数のシグナル伝達経路を抑制することがわかった。

頸癌細胞株を用いたイトラコナゾールの抗腫瘍効果の検討

CaSki Cells

HPV-16+, PIK3CA (E545K), sonic Hedgehog (D154E)



抗真菌薬として内服時の血中濃度

A. Growth Inhibition of CaSki cells

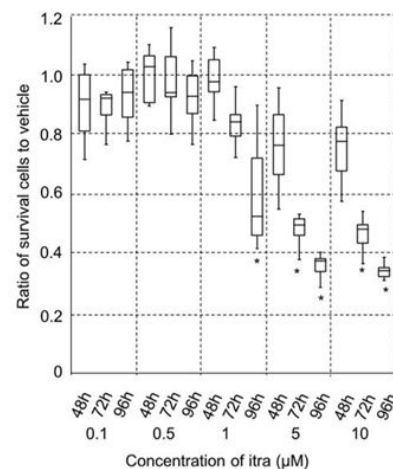
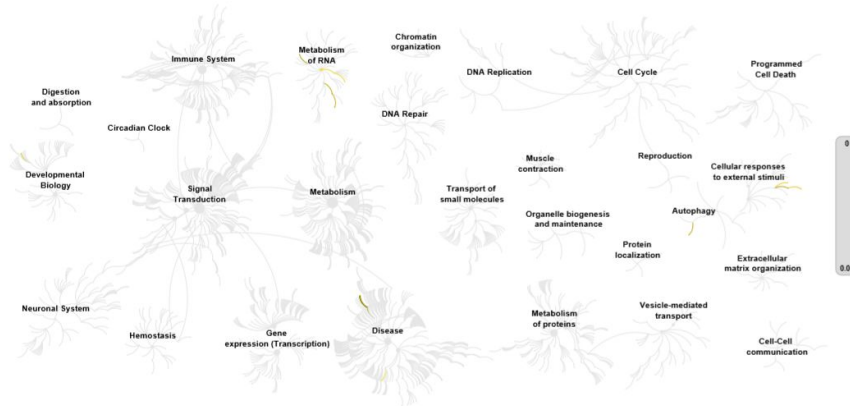


Table 1. *cDNA microarray analysis of Hh signalling after treatment with itraconazole.*

Log ₂ ratio	CaSki/HeLa			HeLa		CaSki	
	Vehicle	48 h	96 h	48 h/vehicle	96 h/vehicle	48 h/vehicle	96 h/vehicle
GLI1	4.3	-0.08	1.94	-0.07	-0.18	-4.44	-2.54
GLI2	-3	-2.56	-1.9	-0.16	-0.44	0.04	0.36
GLI3	-1.98	-1.23	-1.84	-0.46	-0.39	0.3	-0.25
sHh	0.01	-0.8	0.32	0.39	0.34	-0.41	0.65
dHh	3.34	-0.79	2.17	-0.68	-0.82	-4.8	-1.99
lHh	0.31	0.9	1.91	-1.45	-0.71	-0.85	0.89
PTCH2	0.21	0.3	0.21	0.1	0.63	0.26	0.23
SMO	-1.13	0.2	-0.85	-1.18	0.24	0.15	0.52

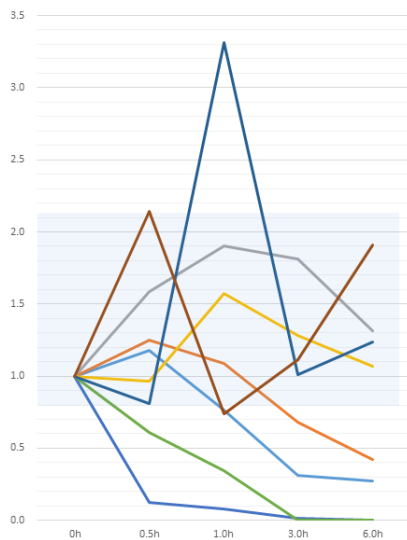
GLI1 expression was higher in CaSki cells than in HeLa cells. In addition, it was significantly down-regulated by itraconazole in the CaSki cells. The coloured cells indicate >4-fold changes in transcription. dHh, Desert hedgehog; GLI, glioma-associated oncogene homolog; iHh, Indian hedgehog; PTCH, patched family hedgehog receptor; sHh, sonic hedgehog; SMO, smoothened.

次に、その上流にあると推定されるイトラコナゾールのターゲットを同定するため、CaSki細胞株を用いて、網羅的リン酸化タンパク質量分析を行ったが、下記のように明瞭なシグナル系の同定は不可能であった。



次に、網羅的生物活性脂質メディエーター質量分析を行った。これにより、これまで抗腫瘍効果が報告されていない、炎症収束性脂質メディエーターがイトラコナゾール投与早期に関与することが判明した。(Unpublished)。

Downstream metabolites of bioactive lipid mediators



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Inoue Kayo, Tsubamoto Hiroshi, Isono-Nakata Roze, Sakata Kazuko, Nakagomi Nami	4. 巻 18
2. 論文標題 Itraconazole treatment of primary malignant melanoma of the vagina evaluated using positron emission tomography and tissue cDNA microarray: a case report	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 630-635
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-018-4520-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ueda T, Tsubamoto H, Inoue K, Sakata K, Shibahara H, Sonoda T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Itraconazole Modulates Hedgehog, WNT/ -catenin, as well as Akt Signalling, and Inhibits Proliferation of Cervical Cancer Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Anticancer Res	6. 最初と最後の頁 3521-3526.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.11720	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiroshi Tsubamoto, Tomoko Ueda, Kayo Inoue, Kazuko Sakata, Hiroaki Shibahara and Takashi Sonoda	4. 巻 14
2. 論文標題 Repurposing itraconazole as an anticancer agent: A review	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncol Lett.	6. 最初と最後の頁 1240-1246
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2017.6325.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鏗本 浩志 (TSUBAMOTO HIROSHI) (80340975)	兵庫医科大学・医学部・教授 (34519)	