

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15029

研究課題名(和文) リボヌクレアーゼを利用した抗がん剤開発

研究課題名(英文) Development of new anticancer agents utilizing ribonucleases

研究代表者

立田 岳生 (Tatsuta, Takeo)

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：70438563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：新規抗がん剤候補として期待される抗腫瘍性リボヌクレアーゼである、ウシガエル卵由来シアル酸結合性レクチン(cSBL)の抗腫瘍効果を *in vitro* および *in vivo* で解析した。cSBLは、既存の抗がん剤と比較しても高いがん細胞選択性を示し、強い細胞増殖抑制効果を示した。また、cSBLは悪性中皮腫異種移植マウスに対しても、有害作用が認められない条件下、抗腫瘍効果を示した。さらに、cSBLの抗腫瘍効果は、HERファミリー分子の発現低下を伴う細胞死誘導に起因することや、種々の薬剤との併用解析の結果から、cSBLと pemetrexed の併用が有用である可能性などが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

cSBLは、効力やがん細胞選択性の観点から有効ながん治療薬になりうる知見が得られた。またその効果はマウスを用いた実験においても確認された。さらに、その作用機序が明らかになりつつあり、機序の観点も含め有用な併用の組合せなど、新しい知見が得られた。cSBLは、RNA分解に起因するアポトーシス誘導効果を示すという、新しい作用機序で抗腫瘍作用を示すことも明らかになっている。これらの知見は、これまでにない新領域の抗がん剤の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The antitumor effect of bullfrog egg-derived sialic acid-binding lectin (cSBL), a promising antitumor ribonuclease, was analyzed *in vitro* and *in vivo*. cSBL showed a high cancer cell selectivity and a strong cytostatic effect even when compared with existing anticancer agents. In addition, cSBL also showed an antitumor effect on malignant mesothelioma xenograft mice under the condition that no adverse effect was observed. Furthermore, it was indicated that the antitumor effect of cSBL is due to the induction of apoptosis accompanied by decreased expression of HER family molecules, and the results of combined analysis with various drugs suggested that the combination of cSBL and pemetrexed may be useful option for the cancer treatment.

研究分野：生化学

キーワード：リボヌクレアーゼ アポトーシス 抗腫瘍効果

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

リボヌクレアーゼはあらゆる生物に存在し、RNAの成熟などに重要な酵素であるが、一部のリボヌクレアーゼは、抗菌、抗ウイルスあるいは抗腫瘍作用を有する。本研究室では、リボヌクレアーゼの抗腫瘍作用に関する研究を行ってきており、抗腫瘍性リボヌクレアーゼの抗がん剤としての応用は“RNAを標的とする”新しいがん治療戦略となりうることや、リボヌクレアーゼが既存の抗がん剤よりも優れた抗腫瘍活性を示す可能性を得てきた。

本研究室で発見されたウシガエル卵由来シアル酸結合性レクチン (cSBL) は、リボヌクレアーゼ活性とレクチン活性を併せ持つ多機能性タンパク質であり“Leczyme (Lectin+enzyme)”とも呼ばれ、がん細胞に選択的な細胞毒性を示すことが明らかにされている。その詳細な作用メカニズムは不明な点が多かったが、申請者はこれまでに、cSBLの抗腫瘍作用について検討を行い、(1) cSBLが多剤耐性細胞を含む種々の白血病細胞に対しアポトーシスを誘導し、その機序にミトコンドリア障害の誘因が関与すること、(2) cSBL誘導アポトーシスに小胞体ストレス経路が関与すること、(3) cSBLのがん細胞内への取り込みに Hsp 70 が関与し、cSBLのがん細胞選択性に関与する可能性、(4) 近年アスベスト禍で注目される悪性中皮腫に対し、cSBLが有効性(がん細胞選択的なアポトーシス誘導効果)を示し、その効果は TRAIL との併用で相乗的に増強され、その機序に Bid 切断上昇を介したミトコンドリア障害の増強が起因することなどを見出してきた。一方で、cSBLの臨床応用へ向けては、さらなる作用機序の解明、*in vivo* における有効性・安全性、既存薬剤との比較等の課題が残っている。

2. 研究の目的

本研究では、これまで得られた知見を基に cSBL の有効性を *in vitro* および *in vivo* で行う。さらに、他の薬剤との併用効果等の解析や、作用機序解析を通し、抗がん剤としてのリボヌクレアーゼの可能性を展開し、リボヌクレアーゼを基にした新領域のがん治療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) *In vitro* における悪性中皮腫細胞に対する cSBL の効果および pemetrexed との併用

上皮性中皮腫細胞 (H2452, MESO-1, および MESO-4), 二相性中皮腫細胞 (MSTO), 肉腫性中皮腫細胞 (H28), および正常中皮細胞 (MeT5A) の生存率に対する cSBL, pemetrexed および cisplatin それぞれの効果を WST-8 法を用いて評価した。薬剤併用時の相乗効果の有無を判定するため、Combination index (CI) 値を算出した。薬剤処理による細胞周期の変化は、CycleTEST™ Plus DNA Reagent Kit (BD Biosciences 社製) を用いて評価した。細胞周期関連タンパク質の発現レベルおよび Akt のリン酸化レベルをウェスタンブロット法で評価した。

(2) *In vivo* における cSBL の抗腫瘍効果の検討

H28, MESO-1, および MESO-4 細胞は、ヌードマウスにおいて腫瘍を形成しなかったため、移植可能であった H2452 および MSTO 細胞を用いて異種移植モデルマウスを作製した。がん細胞移植 (day1) より 2~4 週後、腫瘍体積が 100-150 mm³ に達したところで、マウスを 10 匹ずつ、3 群にランダムにグループ分けした。Group 1 はコントロール群として 1 mL/kg vehicle (PBS) を腫瘍内投与した。Group 2 は既報の濃度および投与経路を参考に滅菌済み PBS で溶解した pemetrexed (100 mg/kg) を days 1-5 および 15-19 に腹腔内投与した。Group 3 は cSBL (2.5 mg/kg) を週 2 回、4 週間腫瘍内投与した。体重および腫瘍径は週 2 回測定し、以下の計算式より腫瘍径を用いて腫瘍体積を算出した。腫瘍体積 (mm³) = 0.4 × A × B² (A, B はそれぞれ腫瘍の長径 [mm] および短径 [mm] を示す)。腫瘍体積変化および体重変化は、day1 を基準として算出した。

(3) 悪性中皮腫細胞に対する多剤併用効果の検討および pemetrexed 耐性細胞に対する効果

新規悪性中皮腫治療薬の候補として cSBL, 腫瘍壊死因子関連アポトーシス誘発リガンド (TRAIL) および EGFR-TKIs (erlotinib, gefitinib, vandetanib) に着目し、それらの有効性を検討した。また、臨床で治療を行う際の障壁の一つとなる悪性中皮腫の pemetrexed 耐性に対する知見を得るため、この薬物に対する耐性細胞を新規に樹立、または入手し、耐性化した細胞に対する各薬剤の効果についても確認した。本研究では、3 剤併用レジメンとして、pemetrexed + cisplatin + cSBL (PCS), pemetrexed + cisplatin + TRAIL (PCT), pemetrexed + cisplatin + erlotinib (PCE), および pemetrexed + cSBL + TRAIL (PST) の 4 パターンでの解析を行った。それぞれの効果を WST-8 法を用いて評価した。薬剤併用時の相乗効果の有無を判定するため Combination index (CI) 値および薬剤用量減少効果 (Dose Reduction Index, DRI) を算出した。

(4) ER, PgR および HER ファミリー分子に着目した乳がん細胞に対する cSBL の効果

各種乳がん細胞 [Luminal A (ZR-75-, MCF7), Luminal B (BT-474), HER2 陽性 (SK-BR-3), トリプルネガティブ (MDA-MB-231, MDA-MB-231) と正常乳腺細胞 (MCF-10A) に cSBL を処理し、WST 法により細胞増殖活性を測定した。cSBL 処理細胞の核の形態学的変化を Hoechst 染色法により評価した。さらに、cSBL を処理細胞の細胞内情報伝達系におけるタンパク質および乳がん関連分子 (ER, PgR および HER2) の発現変動をウェスタンブロット法で測定した。

4. 研究成果

(1) cSBL はがん細胞選択的高腫瘍作用を示し, pemetrexed と相乗効果を示す

cSBL は 最大濃度 (20 μ M) においても, 正常細胞 (MeT5A) の生存率を 40% 程度 しか低下させず, 一方で, pemetrexed は 10 nM で 50%, cisplatin は 10 μ M で 70% 低下させたことから, cSBL が高いがん細胞選択性を持つことが示された. さらにがん細胞選択性の指標として, 相対的感受性 (RS, がん細胞での IC_{50} 値と MeT5A での IC_{50} 値の比) を算出した.

RS>1 あるいは <1 のとき, がん細胞選択性がそれぞれ高い, あるいは低いことを示す. H2452, MESO-1 および MESO-4 は pemetrexed (RS: 0.37, 0.06 および 0.06) に対し, また H28, H2452, および MESO-1 は cisplatin (RS: 0.66, 0.24, および 0.26) に対し, それぞれ抵抗性を示したが, これらの細胞株は, cSBL に対して高い感受性を示した. H28 における 2 剤併用効果について検討したところ, pemetrexed + cSBL が既存レジメンと同等以上の抗腫瘍作用および相乗効果を示した. 併用時の抗腫瘍メカニズムの検討では, アポトーシスマーカーの増減に有意差はなく, 一方で pemetrexed + cSBL では他の併用と比較すると死細胞数が顕著に増加することが明らかになった. そこで細胞周期解析を行ったところ, pemetrexed および cisplatin は細胞周期を停止させ, 細胞増殖抑制的に作用するのに対し, cSBL はアポトーシスによる細胞死を誘導していることが示された. 併用時にはこの作用はそれぞれ独立して奏効し, ウェスタンブロット法による解析からも pemetrexed の持つ cyclin A の持続的活性化による細胞周期停止作用と cSBL の持つ caspase-3 の活性化を介したアポトーシスの誘導作用が協働していることを示す結果が得られた.

(2) cSBL は *in vivo* において腫瘍増殖抑制効果を示す

In vivo における cSBL の効果検討では, 通常動物実験に用いられる濃度の pemetrexed と比較すると, cSBL 処理群でより早期に腫瘍の増殖抑制が引き起こされた (H2452 移植マウス: pemetrexed, 47 日目; cSBL, 36 日目, MSTO 移植マウス: pemetrexed, 有意な変化なし; cSBL, 29 日目). 同時に腫瘍増殖抑制が観察される濃度においてマウスの有意な体重変化は見られず, 生体への影響 (有害作用) は小さいことが示唆された (Fig. 1).

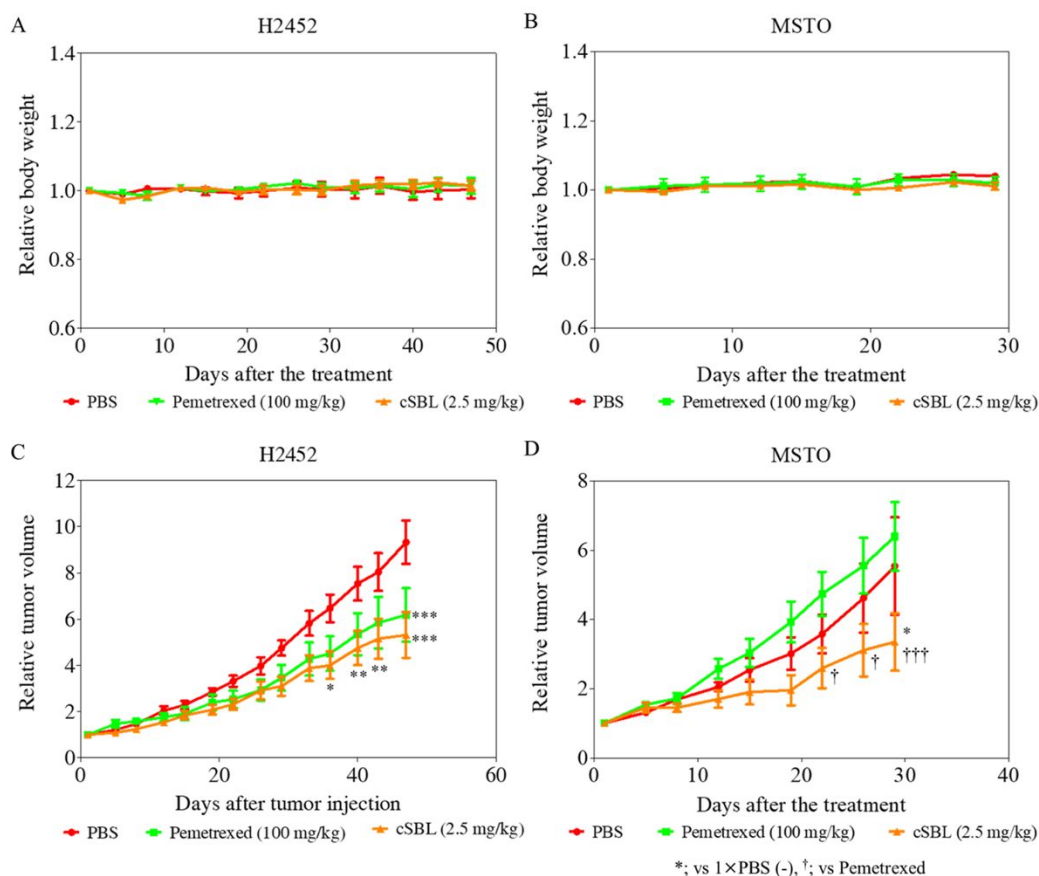


Fig. 1 cSBL showed *in vivo* cytotoxicity without inducing loss of body weight.

Mice were randomly divided into 3 groups with 10 mice in each group. Groups 1, 2, and 3 were injected PBS, pemetrexed (100 mg/kg, intraperitoneally), and cSBL (2.5 mg/kg, intratumorally), respectively. Body weights and tumor sizes were measured twice per week. Tumor volumes were calculated as follows: $0.4 \times A \times B^2$, where A and B represent the long and short diameters (in mm) of the tumor, respectively. Relative body weight (A, B) and relative tumor volume (C, D) are plotted as the mean of each group \pm SD at each timepoint. The statistical significance of these experiments compared with PBS (*) or pemetrexed (†) is shown as follows: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, †P<0.01, †††P<0.001

(3) cSBL と pemetrexed および cisplatin または TRAIL の併用が有効である

悪性中皮腫に対する効果が報告されている TRAIL および上皮成長因子受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKIs) と、cSBL との併用効果の検討ならびに治療障壁の一つとなっている pemetrexed 耐性株への各薬剤の効果を比較した H28 および H2452 に対する効果を検討した結果、pemetrexed および cisplatin と比較し、cSBL, TRAIL, および EGFR-TKIs はいずれも悪性中皮腫細胞に対して高い選択性を示した。また、cSBL および EGFR-TKIs は、細胞株の違いによる増殖抑制効果にほとんど差がないことが明らかとなった。Pemetrexed 耐性株に対して交叉耐性 (H2452-PR に対する cisplatin, cSBL など) が認められたが、H28-PR に対する cisplatin および cSBL, あるいは H2452-PR に対する TRAIL など、耐性株においてより強い細胞増殖抑制効果が認められたケースもあり、耐性克服への糸口がつかめる知見が得られた。また併用効果の検討では、耐性細胞において pemetrexed + cSBL が既存レジメンと比較し pemetrexed の DRI が 2 倍以上高く、耐性細胞株に対しても有効なレジメンとなる可能性が示された。また、3 剤併用では、CI および DRI の観点から、pemetrexed + cisplatin + cSBL が最も有効な組み合わせであることが示された。さらに、各薬剤の抗腫瘍メカニズムへの関与が報告されているタンパク質 (p21, cyclin A, Bid, および cleaved caspase 3) についてウェスタンブロット法による解析を行ったところ、pemetrexed + cSBL + TRAIL が、それぞれの薬剤の抗腫瘍メカニズムが相反することなく作用していることが示され、こちらも有望な治療レジメンとなりうる可能性が示された。

(4) cSBL は ER, PgR および HER ファミリー分子の発現を減少させる

これまでに報告のある ER や Bcl-2 および MAPK の発現・活性化に対する cSBL の効果に着目し、cSBL 処理乳がん細胞における、鍵分子 (ER, PgR および HER ファミリー分子) や Bcl-2 ファミリー分子および MAPK の発現・活性化の調査を行った。その結果、p38 の活性化は、cSBL を処理した乳がん細胞で強く観察され、cSBL の抗腫瘍作用に深く関与していることが考えられた。Bcl-2 ファミリー分子に対する cSBL の影響は細胞の種類によって異なる可能性があると考えられた。乳がん関連分子 (ER, PgR および HER2) の発現は、いずれも cSBL 処理により減少した。さらに、多数の細胞において、それぞれに発現する全ての HER ファミリー分子が減少し、cSBL は細胞種に関わらず HER ファミリー分子の発現を全般的に低下させる可能性が示唆された。HER ファミリーを標的とした分子標的薬では、EGFR の変異によって耐性を獲得したり、HER1 および HER3 を活性化したりすることが問題となっている。したがって、それらの薬剤と cSBL の併用をすることで、有用な治療法につながる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Tatsuta T., Satoh S., Sato T., Sugawara S, Suzuki T., Hara A., Hosono M.	4. 巻 23 (10)
2. 論文標題 Sialic Acid-Binding Lectin from Bullfrog Eggs Exhibits an Anti-Tumor Effect Against Breast Cancer Cells Including Triple-Negative Phenotype Cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules23102714	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 Satoh Toshiyuki, Tatsuta Takeo, Sugawara Shigeki, Hara Akiyoshi, Hosono Masahiro	4. 巻 8
2. 論文標題 Synergistic anti-tumor effect of bullfrog sialic acid-binding lectin and pemetrexed in malignant mesothelioma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 42466-42477
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.17198	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 佐藤稔之、立田岳生、菅原栄紀、原明義、細野雅祐	4. 巻 64
2. 論文標題 新規抗がん剤候補としてのレクザイムを用いた悪性中皮腫細胞に対する多剤併用効果の検討	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 東北医科薬科大学研究誌	6. 最初と最後の頁 65-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Tatsuta Takeo, Satoh Toshiyuki, Sugawara Shigeki, Hara Akiyoshi, Hosono Masahiro	4. 巻 13
2. 論文標題 Sialic acid-binding lectin from bullfrog eggs inhibits human malignant mesothelioma cell growth in vitro and in vivo	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0190653 ~ 0190653
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0190653	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9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 立田岳生, 佐藤稔之, 菅原栄紀, 細野雅祐
2. 発表標題 新規悪性中皮腫治療薬の開発を目指したウシガエル卵由来シアル酸結合性レクチン (cSBL) の応用研究
3. 学会等名 生化学会東北支部第84回例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立田岳生, 佐藤祥子, 佐藤稔之, 菅原栄紀, 鈴木常義, 細野雅祐
2. 発表標題 Sialic Acid-Binding Lectin from Bullfrog Eggs Exhibits an Anti-Tumor Effect Against Breast Cancer Cells
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 立田岳生, 佐藤稔之, 細野雅祐
2. 発表標題 悪性中皮腫に対するレクザイムの <i>in vivo</i> における抗腫瘍効果およびペメトレキセドとの併用効果
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤稔之, 立田岳生, 菅原栄紀, 原明義, 細野雅祐
2. 発表標題 悪性中皮腫に対するシアル酸結合性レクチン (cSBL) と他剤との併用効果
3. 学会等名 第90回日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤稔之, 立田岳生, 菅原栄紀, 原明義、細野 雅祐
2. 発表標題 シアル酸結合性レクチン (cSBL) のEGFR pathwayへの影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tatsuta T., Sato S., Sugawara S., Hosono M.
2. 発表標題 Bullfrog sialic acid-binding lectin reduces the expression of EGF receptors in cancer cells
3. 学会等名 25th International Symposium on Glycoconjugates (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立田岳生, 菅原 栄紀, 細野 雅祐
2. 発表標題 cSBL 耐性細胞における遺伝子発現変化
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 祥子, 立田 岳生, 佐藤 稔之, 菅原 栄紀, 鈴木 常義, 細野 雅祐
2. 発表標題 シアル酸結合性レクチン (cSBL) は乳がん細胞に ER, PgR および HER family タンパクの減少を伴う細胞死を誘導する
3. 学会等名 第40回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 立田 岳生, 菅原 栄紀, 細野 雅祐
2. 発表標題 cSBLはAKR1B10 の発現を減少させる
3. 学会等名 日本薬学会年会第140年会
4. 発表年 2019年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----