

令和元年6月17日現在

機関番号：32676

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15485

研究課題名(和文) 難治がんに対するドラッグリポジショニング創薬

研究課題名(英文) Drug development by drug repositioning for refractory cancer

研究代表者

今井 正彦 (IMAI, Masahiko)

星薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40507670

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)：がんは日本人の死因の第一位であることから新規治療薬が望まれている。近年、既存の医薬品を他の疾患に用いるドラッグリポジショニングによる創薬に注目が集まっている。本研究ではドラッグリポジショニングの観点からがん治療薬の創薬を試みるとともに、天然物由来の化合物の構造活性相関から新たな抗がん剤候補化合物の探索を行った。

まず、脂質異常症治療薬のlovastatinががん細胞の増殖を抑制することを見出した。また、天然物由来候補化合物の探索では、ケイヒ酸誘導体ががん細胞にアポトーシスを誘導することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ドラッグリポジショニングによる創薬は、研究期間の短縮および研究費の削減を行うことが出来るため、新規治療薬を安価にかつ短期間で臨床に用いることが可能となる。本研究で見出したlovastatinは、日本では未承認薬であるが、がんへの適用拡大が期待できる成果を得た。また、ケイヒ酸誘導体による増殖抑制機構を詳細に検討することにより、新規抗がん剤のリードとなることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Since cancer is the leading cause of death in Japan. Recently, drug repositioning using existing drugs for other diseases has attracted attention. In this research, we tried drug discovery of anticancer drugs from the viewpoint of drug repositioning, and searched for new anticancer drug from structure-activity relationship of natural compounds.

First, it was found that lovastatin, a treatment for dyslipidemia, suppresses the growth of cancer cells. In addition, it was found that cinnamic acid derivatives induce apoptosis in cancer cells.

研究分野：細胞生物学、生化学

キーワード：がん ドラッグリポジショニング スタチン ケイヒ酸 細胞死

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

現在、難治がんとして知られている膵臓がんは、早期発見の難しい進行性がんであり、高転移性を示す。治療においては、外科的切除あるいは化学療法が適用されるが、その5年生存率は順に20%あるいは5%程度と非常に低いことから、新たな治療薬の開発が切望されている。現在、フッ化ピリミジン製剤である gemcitabine (GEM) による化学療法が治療に使われ、GEM と vascular endothelial growth factor (VEGF) 阻害剤あるいは epidermal growth factor receptor (EGFR) 阻害剤との併用を指向した臨床試験が行われているが、劇的な治療効果の改善はみられていない。

我々は難治がんの治療薬を開発するにあたり、白血病の分化誘導療法に用いられるレチノイン酸による増殖抑制作用を検討した。その結果、レチノイン酸の水酸化体である retinol が膵臓がん細胞株 (MIA Paca2, JHP-1)、胆管がん細胞株 (HuCCT1) および胆嚢がん細胞株 (NOZ C-1) の増殖を抑制することを報告した [Li, Imai ら (2016)]。しかしながら、retinol に抵抗性を示す細胞株が認められたため、がん遺伝子産物である K-ras の変異およびその発現の解析を行った。その結果、MIA Paca2、JHP-1、HuCCT1 および NOZ C-1 細胞のすべてにおいて、K-ras の異常活性化に関連する Codon 12 に変異が認められた。また、K-ras タンパク質の発現を Western blot 法により解析したところ、NOZ C-1 細胞で K-ras の過剰発現が認められ (図1)、K-ras タンパク質の電気泳動における移動度の違い [(移動度の小さい a、移動度の大きい b (図1)] から翻訳後修飾に違いがあることを見出した。さらに、ファルネシル化の阻害を目的として、lovastatin を難治がん細胞に処理したところ、難治がん細胞に対する増殖抑制作用が新たに見出した。

K-ras を含めた Ras の機能調節には、翻訳後修飾反応であるファルネシル化やパルミトイル化が関与し、それらをターゲットとした医薬品開発も進んでいる。タンパク質のファルネシル化等のプレニル化修飾は、メバロン酸経路を介して基質が合成される。Lovastatin を含む statin 系の薬物は、メバロン酸経路の律速酵素である HMG-CoA 還元酵素 (HMGCR) を阻害する。図2に示すように、statin 系の薬物による HMGCR 阻害はコレステロール合成を低下させるため、脂質異常症の治療に用いられている。HMGCR は同時にタンパク質修飾の一種であるファルネシル化の基質を合成する律速酵素であることから、statin 系薬物は翻訳後修飾阻害剤でもある。そこで本研究では、難治がん治療薬の開発を目指し、既存の薬剤から新規の疾患治療薬を開発するドラッグリポジショニングの観点から、lovastatin を用いて lovastatin のターゲットタンパク質 (K-ras を含む) を見つけ、新しい視点に立った医薬品開発を行うという着想に至った。

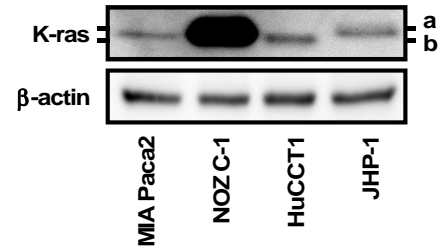


図1. 難治がんにおける K-ras タンパク質発現の比較 (移動度の異なる K-ras)

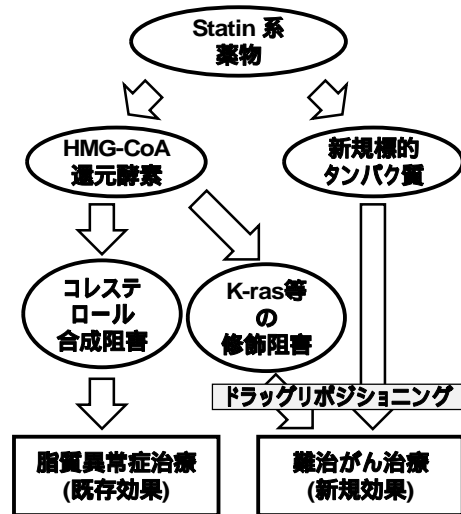


図2. ドラッグリポジショニングによる難治がん治療薬の開発

### 2. 研究の目的

本研究では、難治がんである膵臓、胆嚢および胆管がんあるいは乳がんおよび前立腺がんに対する抗がん剤の創製を目指す。ドラッグリポジショニングでは、既存の医薬品を他の疾患の治療に用いることにより開発期間の短縮および開発費の削減が可能となる。そこで、第一の抗がん剤の候補として、上述の脂質異常症治療薬である lovastatin の抗がん作用を検討する。また、lovastatin による抗がん作用機構を解析する。さらに、天然物由来化合物によるがん細胞増殖抑制作用を検討し、新たな抗がん剤の候補化合物を構造活性相関解析により見出すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

胆嚢がん細胞 (NOZ C-1) および膵臓がん細胞 (JHP-1) は、2 mM Glutamine および 10% FBS を含む William's E Medium を用い、5% CO<sub>2</sub> 中 37 °C で培養した。膵臓がん細胞 (MIA Paca2) および胆管がん細胞 (HuCCT1) は、それぞれ 10% FBS を含む DMEM (Low Glucose) および RPMI 1640 Medium を用い、5% CO<sub>2</sub> 中 37 °C で培養した。乳がん細胞 (MCF-7) および前立腺がん細胞 (PC-3) は、10 mM HEPES および 10% FBS を含む RPMI 1640 Medium を用い、5% CO<sub>2</sub> 中 37 °C で培養した。

## (2) 薬物処理法

細胞 ( $1 \times 10^4$  cells/ml あるいは  $4 \times 10^4$  cells/ml) を播種し、24 時間培養した。薬物を培養液に添加し、一定時間処理した。処理細胞は、増殖抑制、タンパク質発現、遺伝子発現、細胞周期および酵素活性の解析に用いた。

## (3) 細胞増殖抑制作用の解析

薬物処理後の培養液に (3-4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を添加した。生細胞の割合を算出し、未処理細胞の生細胞との割合を解析した。

## (4) タンパク質発現の解析

### 一次元電気泳動 (1D-PAGE)

薬物処理後、細胞を回収し、Lysis Buffer [(25 mM Tris-HCl (pH 8.0) + 150 mM NaCl + 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  + 4 mM NaF + 0.5% NP-40 + 1% Protease inhibitors cocktail)] でタンパク質を抽出した。タンパク質の発現は、SDS-PAGE 後、各種特異抗体を用いた Western Blot 法により解析した。

### 二次元電気泳動 (2D-PAGE)

薬物処理後、細胞を回収し、タンパク可溶化液 (9.5 M Urea + 2% NP-40 + 0.1 M dithiothreitol + 2.5% pharmalyte 3-10 + 1% protease inhibitor cocktail) を加え調製した細胞抽出液を Immobiline™ DryStrip (pH 3-10, 7 cm) を用いて等電点電気泳動後、SDS-PAGE を行った。泳動後、ゲルは SYPRO Ruby 染色によりタンパク質を可視化、あるいは Western Blot 法を行った。

## (5) 遺伝子発現の解析

薬物処理後、細胞を ISOGEN で溶解した。Total RNA を抽出後、cDNA を調製した。Bax、Bcl-2、 $\beta$ -actin 特異的なプライマーを用いて PCR 法により mRNA 発現の変化を解析した。

## (6) 細胞周期の解析

薬物処理後、細胞をトリプシン-EDTA で剥離し、70% エタノールで一晩固定した。細胞を洗浄後、RNase A を 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように添加し、37  $^\circ\text{C}$  で 30 分間処理した。Propidium iodide (PI) を 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように添加し、細胞周期をフローサイトメーターで解析した。

## (7) Caspase 活性の解析

薬物処理後、細胞を回収し、Caspase-3/7 活性を Caspase-3 colorimetric assay kit の添付文書に従い測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 難治がん細胞に対する lovastatin の増殖抑制機構の解析

難治がん細胞に対する lovastatin の増殖抑制作用を検討した。その結果、lovastatin は難治がん (膵臓・胆道がん) 細胞の増殖を濃度依存的に抑制した。図 1 に示したように、NOZ C-1 細胞は、K-ras タンパク質の発現が最も高いが、lovastatin による増殖抑制作用を強く受けることが明らかになった。一方、K-ras の発現量と増殖抑制作用の程度に相関は見られなかった。

NOZ C-1 細胞が lovastatin の増殖抑制作用を強く受けたことから、作用メカニズムの解析を試みた。Lovastatin 処理 72 時間では、Bax および Bcl-2 mRNA 発現に変化は認められず、Caspase-3/7 活性にも変化は認められなかった。よって、NOZ C-1 細胞は、lovastatin 処理によりアポトーシス誘導を起こさないことが示唆された。一方、lovastatin 処理によりオートファジーの指標である LC3 の脂質付加体の量が増加したことから、lovastatin はオートファジー誘導を介して増殖抑制作用を示すことが示唆された。さらに、メバロン酸経路の関与を検討するため、lovastatin とメバロン酸を併用したところ、lovastatin の増殖抑制作用は減弱した。よって、lovastatin による増殖抑制作用は、HMGCR の阻害が関与することが示唆された。

### (2) Ras タンパク質の分離と解析

Lovastatin による増殖抑制作用は、HMGCR 阻害が関与することが示唆されたことから、Ras の翻訳後修飾が増殖抑制作用に関与することが考えられた。そこで、Ras タンパク質 (H-ras、N-ras、K-ras) の翻訳後修飾を解析するため、Ras タンパク質の分離を 2D-PAGE で試みた。まず、H-ras タンパク質の分離のため、pH 3-10 の Dry Strip を用いて 2D-PAGE 後、Western Blot 法で H-ras を検出したところ、pI 5 付近に H-ras タンパク質のスポットが認められた。また、N-ras タンパク質についても同様に、pI 5 付近に N-ras タンパク質のスポットが認められた。一方、K-ras タンパク質についても同様の検討を行ったが、K-ras タンパク質のスポットは検出されなかった (図 3)。K-ras タンパク質は、アミノ酸配列から推定される pI が約 8 であるため、今回用いた Dry Strip での検出範囲

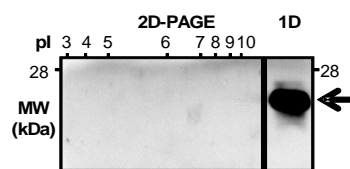


図 3. K-ras タンパク質の分離  
NOZ C-1 細胞からタンパク質を抽出後、2D-PAGE および 1D-PAGE を行い、Western Blot 法により K-ras タンパク質を検出した。

内であることが考えられる。等電点は翻訳後修飾により変化するため、K-ras の翻訳後修飾を解析するために Dry Strip を用いる方法とは別の方法により分離を行う必要がある。現在、陰イオン交換カラム等を用いて K-ras タンパク質の解析を試みている。

### (3) 天然物からの抗がん剤候補化合物の探索

以前の我々は、脂質異常症の改善のため、種々の天然物を用いて解析を行い、プロポリスに含まれる Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) が脂質吸収抑制および脂肪蓄積抑制作用を有することを見出した。また、Caffeic acid (3,4-ジヒドロキシケイヒ酸) と結合する置換基あるいはケイヒ酸に付加する水酸基を変換し、種々のケイヒ酸誘導体を合成した。合成したケイヒ酸誘導体の中に CAPE よりも強い脂質異常症改善作用を有する化合物を見出し報告している [Imaiら (2015)]。本研究では、ケイヒ酸誘導体の高い生理活性に着目し、がん細胞増殖抑制作用に関する検討を行った。

CAPE (1) と誘導体の構造を図 4 に示した。まず、乳がん細胞 (MCF-7) および前立腺がん細胞 (PC-3) に対する 4  $\mu$ M のケイヒ酸誘導体の増殖抑制作用を比較・検討した。ケイヒ酸に水酸基が 2 つ付加したカフェ酸構造を有する化合物 1、3、5 は両細胞に対して増殖抑制作用を示した。また、ケイヒ酸に水酸基が 1 つ付加したクマル酸構造を有する化合物 2、4、7 および 8 は、カフェ酸構造を有する化合物よりも増殖抑制作用が減弱した。一方、ケイヒ酸に水酸基が 3 つ付加した化合物 6

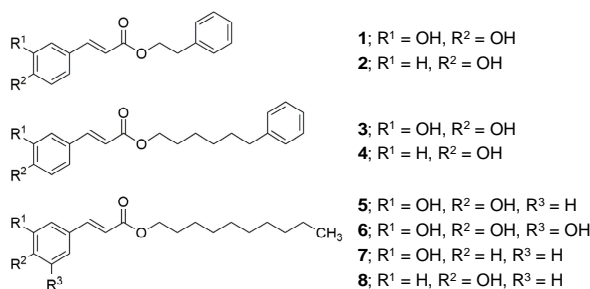


図 4. ケイヒ酸誘導体の構造 [業績 1 より引用・改変]

は、水酸基が 2 つの化合物 5 よりも増殖抑制作用が増強した。以上のことから、ケイヒ酸誘導体は乳がんおよび前立腺がん細胞の増殖を抑制することが示された。

以前の脂質異常症改善作用の検討において、ケイヒ酸に付加する水酸基の数が多い化合物は、改善作用も強いことが示されている。そこで増殖抑制作用においても同様の傾向がみられるか、IC<sub>50</sub> 値を比較した (表 1)。ケイヒ酸に付加する水酸基が 1 つの化合物 2、4、7 および 8 の IC<sub>50</sub> 値は、10  $\mu$ M 以上であった。また、ケイヒ酸に付加する水酸基が 2 つの化合物 1、3、5 は、それぞれ MCF-7 細胞に対して 8.0  $\mu$ M、2.4  $\mu$ M、1.7  $\mu$ M、PC-3 細胞に対して 1.2  $\mu$ M、1.4  $\mu$ M、0.6  $\mu$ M の IC<sub>50</sub> 値で増殖抑制作用を示した。さらに、ケイヒ酸に付加する水酸基の数が 3 つの化合物 6 は、MCF-7 細胞に 0.8  $\mu$ M、PC-3 細胞に 0.6  $\mu$ M の IC<sub>50</sub> 値で作用した。以上の結果は、脂質異常症改善作用と同様の傾向であり、乳がんおよび前立腺がんに対して化合物 6 が最も増殖抑制作用が強い化合物であることを見出した。

表 1. 50% 阻害濃度 [業績 1 より引用]

No.	IC <sub>50</sub> value ( $\mu$ M)	
	MCF-7	PC-3
1	8.0	1.2
2	> 10	> 10
3	2.4	1.4
4	> 10	> 10
5	1.7	0.6
6	0.8	0.6
7	> 10	> 10
8	> 10	> 10

### (4) 化合物 6 による増殖抑制機構の解析

ケイヒ酸誘導体の中で最も増殖抑制活性が高かった化合物 6 による増殖抑制機構を解析した。アポトーシス誘導の関与を明らかにするため、フローサイトメーターを用いた細胞周期の解析を行った。化合物 6 は、MCF-7 細胞および PC-3 細胞共に濃度依存的にアポトーシス細胞を示す Sub-G<sub>1</sub> の集団を有意に増加させた。よって、化合物 6 は、乳がん細胞及び前立腺がん細胞にアポトーシスを誘導することが示唆された。次に、アポトーシス誘導時に活性化される caspase-3 活性について検討した。その結果、化合物 6 は、MCF-7 細胞および PC-3 細胞において、caspase-3 活性を増加させた (図 5)。さらに、アポトーシスの誘導経路を明らかにするため、Bcl-2 ファミリーの発現に及ぼす化合物 6 の影響を検討した。化合物 6 処理により、MCF-7 および PC-3 細胞共に Bax mRNA 発現に変化は認められなかったが、Bcl-2 mRNA 発現は有意に減少した。以上のことから、化合物 6 は、乳がんおよび前立腺がん細胞にミトコンドリアを介したアポトーシスを誘導することが明らかになった。

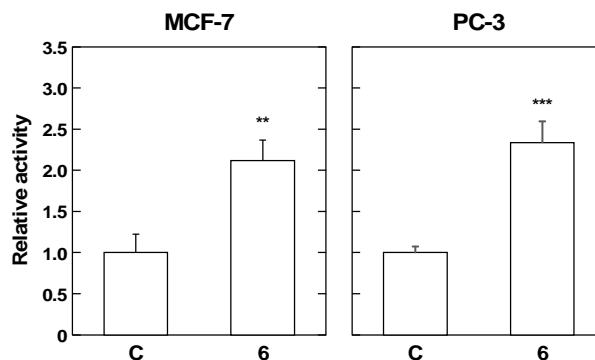


図 5. 化合物 6 による caspase 活性の変化 [業績 1 より引用]

## (5) 総括

本研究では、難治がん治療薬の創薬を目指し、ドラッグリポジショニングの観点から lovastatin を見出した。Lovastatin の増殖抑制機構の一端としてオートファジー誘導とメバロン酸経路の関与を明らかにした。また、天然物由来化合物から化合物 6 を見出した。化合物 6 は乳がんおよび前立腺がん細胞のみならず、難治がん細胞の増殖を抑制することが明らかになりつつある。難治がんに対する創薬を目指し、詳細なメカニズムの検討を今後行う予定である。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 5 件)

- (1) Growth inhibition of human breast and prostate cancer cells by cinnamic acid derivatives and their mechanism of action. Imai M., Yokoe H., Tsubuki M., and Takahashi N., Biol. Pharm. Bull., 査読有, in press (2019). DOI: 10.1248/bpb.b18-01002.
- (2) Transcriptional regulation of acetoacetyl-CoA synthetase by Sp1 in neuroblastoma cells. Hasegawa S., Imai M., Yamasaki M., Takahashi N., and Fukui T., Biochem. Biophys. Res. Commun., 査読有, 495, 652-658 (2018). DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.068
- (3) Anticancer efficacy of p-dodecylaminophenol against high-risk and refractory neuroblastoma cells in vitro and in vivo. Takahashi N., Koyama S., Hasegawa S., Yamasaki M., and Imai M., Bioorg. Med. Chem. Lett., 査読有, 27, 4664-4672 (2017). DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.09.005

### 〔学会発表〕(計 30 件)

- (1) 今井正彦、泉澤友宏、齋藤大輔、高橋典子、抗菌剤によるがん治療薬のドラッグリポジショニング創薬、日本薬学会第 139 年会 (2019)
- (2) 今井正彦、神田純、中澤昂平、大野実沙紀、岸野菜央子、横江弘雅、津吹政可、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子、Caffeic acid phenethyl ester 誘導体によるがん細胞増殖抑制作用、第 41 回日本分子生物学会年会 (2018)
- (3) 今井正彦、小山俊平、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子、MYCN 発現の異なる神経芽腫に対するアミノフェノール誘導体の抗腫瘍作用、第 29 回日本レチノイド研究会学術集会 (2018)
- (4) Takahashi N., Li C., Hasegawa S., Yamasaki M., and Imai M., Anti-cancer activity of vitamin A against refractory cancers, FASEB/The 4th International Conference on Retinoids (2018)
- (5) 今井正彦、小澤翼、高橋典子、脂質異常症治療薬のオートファジー誘導作用、日本薬学会第 138 年会 (2018)
- (6) 高橋典子、小山俊平、長谷川晋也、山崎正博、今井正彦、難治神経芽腫に対する *p*-アミノフェノールの抗腫瘍作用、日本薬学会第 138 年会 (2018)
- (7) Imai M., Rumi Egawa, and Noriko Takahashi, Retinoids induce cell differentiation and cell death in neuroblastoma, JSPS Core-to-core Program Symposium (2018)
- (8) 今井正彦、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子、天然物関連化合物による難治がんに対する抗がん作用、第 28 回日本レチノイド研究会学術集会 (2017)
- (9) 今井正彦、李川、長谷川晋也、山崎正博、高橋典子、難治がんに対するビタミン A の抗腫瘍作用及びそのメカニズムの探索、第 28 回日本レチノイド研究会学術集会 (2017)

### 〔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

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。