

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16800

研究課題名(和文) インフルエンザ治療薬のシアリダーゼ阻害効果に着目した腎細胞癌の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Growth inhibition effect of the sialidase inhibitor of influenza antiviral drugs in cancer cell lines.

研究代表者

泉 恵一朗 (IZUMI, KEIICHIRO)

琉球大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30790737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：シアリダーゼは、腎癌患者組織において増加しており、癌細胞内のシグナル経路を活性化してアポトーシスの抑制と増殖・転移の促進に働くため、新たな治療標的となり得る。そこで、インフルエンザ治療薬のウイルスシアリダーゼ阻害作用を利用した、腎細胞癌の細胞株に対する増殖抑制効果を解析した。ウイルスシアリダーゼ阻害剤を添加して短期間培養した結果、高濃度下において細胞の増殖抑制が認められた。低濃度の長期投与や間欠投与等、更なる解析によりシアリダーゼ活性を標的とした治療法の開発につながる事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

進行した腎細胞癌の生存期間は免疫療法や分子標的療法により格段に延長しているが、長期生存率は依然として低く、新たな治療薬の開発が急務である。本研究では、既存のウイルスシアリダーゼ阻害剤を腎細胞癌のシアリダーゼに応用することで、新たな治療法としての可能性が示された。今後、シアリダーゼの関連因子を解明することで標的対象が広がり、より効果的な分子標的薬の開発へと展開出来ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aberrant expression of sialidases has been reported in various human cancers including renal cell carcinoma (RCC). Plasma membrane-associated Neu3 sialidase induced suppression of apoptosis and enhanced both cell invasion and migration by activating signaling molecules via PI3K/Akt cascade. To clarify the usefulness of sialidase as potential therapeutic target for RCC, we analyzed the effect on tumor cell viability using two kinds of sialidase inhibitors utilized for the treatment of influenza in daily practice. In this study, we demonstrated that a sialidase inhibitor induced the growth arrest and apoptotic morphology in cancer cell lines in short term culture conditions. The functional significance of sialidase inhibitor and the growth inhibition effect on lower concentration remains unclear, and further studies are needed.

研究分野：泌尿器科学

キーワード：シアリダーゼ シアリダーゼ阻害薬 腎細胞癌 前立腺癌 インフルエンザ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

進行した腎細胞癌の無増悪生存期間は免疫療法や分子標的治療により、格段に延長している。しかし、長期生存率は依然として低く、新たな視点での治療薬の開発が急務である。そのため、DNA や蛋白に次ぐ第三の生命鎖といわれる糖鎖に着目した。

細胞表面を覆う多くの糖鎖の末端は酸性の糖(シアル酸)が占めており、結合する糖鎖・糖鎖の構造・修飾の違いにより多様性がある。糖鎖は細胞接着・分子認識・免疫応答・シグナル伝達など重要な役割を担っており、シアル酸転移酵素によるシアル酸結合と4種類のシアリダーゼによるシアル酸脱離とによって制御されるが、不明な点が多い。

申請者はこれまでに、腎癌患者組織におけるシアル酸転移酵素の mRNA 量について解析し、その一つが亢進していることを明らかにした<sup>1,2)</sup>。一方、シアリダーゼの一つ NEU3 も腎癌患者において、mRNA 量と活性が亢進していることも明らかとなった<sup>3)</sup>。これらの結果から、腎癌ではシアル酸転移酵素とシアリダーゼとが複合的に作用していると考えられた。NEU3 は主に PI3K/Akt 経路を活性化し、IL-6 シグナリングを活性化して抗アポトーシスを誘導し、増殖・転移の促進に働く。さらに、NEU3 は PI3K/Rho 経路も活性化し、がん細胞の運動能および浸潤能を亢進する<sup>3)</sup>。これらの活性化は NEU3 による EGFR のリン酸化制御と Ras の活性化によることも報告され<sup>4)</sup>、NEU3 が癌細胞の制御に関わる重要な分子であることを示している。すなわち、シアリダーゼが癌の新たな治療標的となり得る。

現在臨床で使用できるシアリダーゼ阻害剤としてインフルエンザ治療薬のタミフル、リレンザ、イナビル、ラピアクタがある。これらは A 型と B 型のインフルエンザウイルスのシアリダーゼを選択的に阻害する。その機序は、感染細胞の中で新しく形成されたウイルスが感染細胞から遊離する際にウイルスのシアリダーゼを阻害することで遊離を抑制し、結果、ウイルスの増殖を抑制する。

このウイルスシアリダーゼ阻害剤がヒトのシアリダーゼにも選択的に作用すれば、がん細胞における NEU3 活性を阻害でき、アポトーシスの促進と増殖抑制を可能にすると考えられる。そこで、シアリダーゼを腎細胞癌の治療標的として、インフルエンザ治療薬の新規抗癌剤への応用を案出した。

### 2. 研究の目的

インフルエンザ治療薬のヒトシアリダーゼ阻害効果を明らかにし、腫瘍抑制効果とそのメカニズムの解明を目的とする。ウイルスシアリダーゼ阻害剤がヒトのシアリダーゼにも選択的に作用すれば、癌細胞における NEU3 活性を阻害でき、アポトーシスの促進と増殖抑制を可能にすると考えられる。腎細胞癌において増殖抑制に対するシアリダーゼ阻害剤の有効性が明らかとなれば、その結合糖鎖の解析により、より特異性の高い阻害剤の開発や、従来のがん治療との併用等展開できる可能性がある。

### 3. 研究の方法

#### (1) 腎細胞癌由来細胞株におけるインフルエンザ治療薬のシアリダーゼ阻害効果の解析

ヒト腎細胞癌由来細胞株 ACHN、Caki-1、OS-RC-2、VMRC-RCW を用いた細胞毒性試験を行い、インフルエンザ治療薬による腎癌細胞の増殖抑制能を評価する。ウイルスシアリダーゼ阻害活性を持つインフルエンザ治療薬の主成分にはオセルタミビルリン酸塩、ザナミビル水和物、ラニナミビルオクタン酸エステル水和物、ペラミビル水和物がある。本解析では、まず試薬として入手可能なオセルタミビルリン酸塩とザナミビル水和物を用いる。種々の濃度のオセルタミビルリン酸塩もしくはザナミビル水和物を培養液中に添加し、腎癌細胞株を一定期間培養後、WST-8 を用いて生細胞数を測定し、シアリダーゼ阻害効果と増殖抑制能を評価する。

#### (2) シアリダーゼ阻害活性の血清による影響評価

細胞毒性試験では、培養液中の血清の影響を受けることが考えられる。そこで、無血清培養下においても同様の解析を行い、シアリダーゼ阻害剤のより直接的な作用を評価する。

#### (3) 前立腺癌由来細胞株におけるインフルエンザ治療薬のシアリダーゼ阻害効果の解析

NEU3 は前立腺癌においても高発現し、前立腺癌の悪性度と相関する。さらに、NEU3 は前立腺癌においても腎細胞癌同様 PI3K や MAPK を活性化し、癌細胞の増殖促進に関わっていることが報告されている<sup>5,6)</sup>。そこで、ヒト前立腺癌由来細胞株 DU145、PC-3、LNCaP.FGC、22RV1 についてもシアリダーゼ阻害効果を解析し、腎細胞癌と比較検討する。

#### (4) シアリダーゼ阻害剤が細胞形態に及ぼす影響評価

インフルエンザ治療薬添加後の細胞の形態的变化を観察する。

### 4. 研究成果

#### (1) ザナミビル水和物の細胞増殖抑制能

腎癌細胞株4株に対し、終濃度0~5mMのザナミビル水和物を添加し、培養した結果、明らかな増殖抑制は認められなかった(図1)。無血清培地においても、同様の実験を行ったが、血清の有無による大きな違いは認められなかった。また、前立腺癌細胞株4株に対しても細胞毒性試験を行ったが、腎癌細胞株と同様、増殖抑制は認められなかった(図2)。

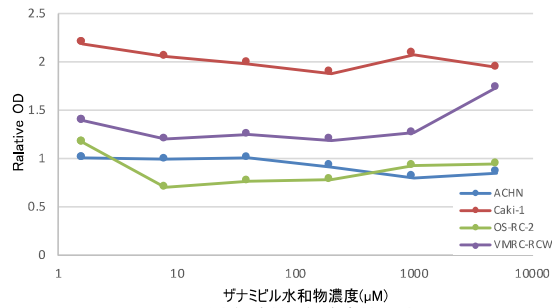


図1. 腎癌細胞株の細胞毒性試験

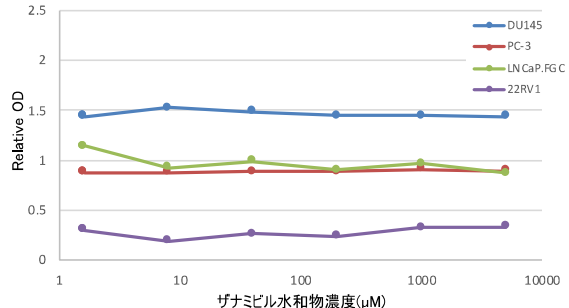


図2. 前立腺癌細胞株の細胞毒性試験

### (2) 腎癌細胞株におけるオセルタミビルリン酸塩の細胞増殖抑制能

腎癌細胞株 4 株に対し、オセルタミビルリン酸塩を添加培養した結果、終濃度 200 $\mu$ M 以上の濃度において増殖抑制が認められた ( 図 3 )。終濃度 5mM の添加条件下では添加 2 日後において多くの細胞がアポトーシス様形態を示し、増殖をほぼ停止した。同様の解析を無血清培地においても行った結果、血清含有下と比べより低濃度において増殖抑制を示す傾向が認められた ( 図 4 )。一方、オセルタミビルリン酸塩 1.6 $\mu$ M~8 $\mu$ M の低濃度添加下では、むしろ増殖を促進する細胞株が認められた。このメカニズムは明らかになっていないが、これまでの報告とは異なるシグナル経路の活性化による可能性がある。

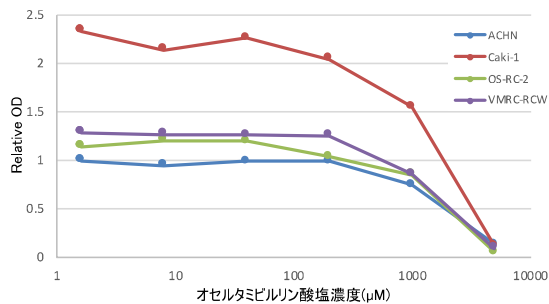


図3. 腎癌細胞株の細胞毒性試験

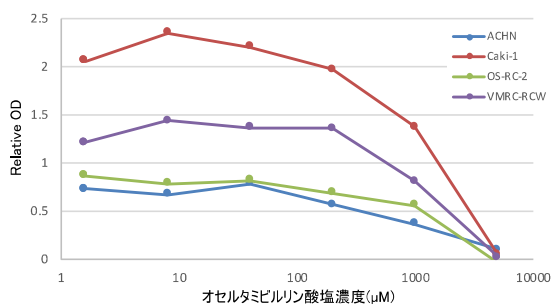


図4. 腎癌細胞株の細胞毒性試験 (無血清)

### (3) 前立腺癌細胞株におけるオセルタミビルリン酸塩の細胞増殖抑制能

前立腺癌細胞株 4 株においても種々の濃度のオセルタミビルリン酸塩を添加し、一定期間培養後の増殖抑制能を解析した。その結果、前立腺癌細胞株においても腎癌細胞株と同様、200 $\mu$ M 以上の濃度において増殖抑制が認められた ( 図 5 )。

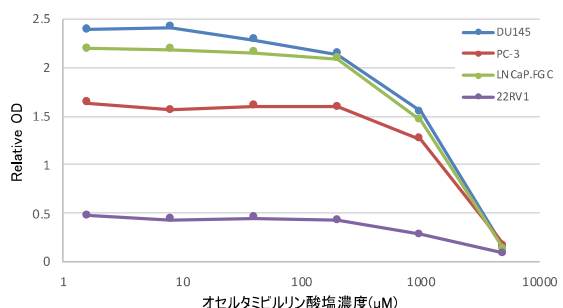


図5. 前立腺癌細胞株の細胞毒性試験

### 新たな知見、今後の展望

本研究により、インフルエンザ治療薬の主成分であるウイルスシアリダーゼ阻害剤のオセルタミビルリン酸塩が、腎癌細胞株と前立腺癌細胞株の増殖を抑制することが明らかとなった。また、ウイルスシアリダーゼ阻害剤の違いにより、癌細胞の増殖抑制能は大きく異なることが明らかになった。しかし、本解析はシアリダーゼ阻害剤の短期暴露による増殖への影響評価を目的としたため、IC50 の濃度はインフルエンザ治療における血中濃度よりはるかに高濃度で、臨床応用には課題が残る。多くの抗癌剤では減量長期投与やパルス療法により効果が認められていることから、本薬剤においても低濃度長期暴露や間欠的な暴露による解析を進めることにより、腫瘍抑制効果の向上が期待される。そこで現在、より生理的な条件下で、かつ、長期的な腫瘍抑制効果を明らかにするため、腫瘍細胞のマウス皮下移植モデルによるウイルスシアリダーゼ阻害剤の治療効果について、他機関と共同で研究を進めている。

本解析により、ウイルスシアリダーゼ阻害剤の短期的な低濃度添加培養はむしろ増殖を促進することが明らかになり、これはシアリダーゼの新たな細胞内機能と推測される。しかし、そのメカニズム等多くは不明のままである。また、培養液中への阻害剤添加量とシアリダーゼ活性量との関連性やアポトーシス誘導機序の解明等、課題が残る。今後、今回使用できなかった別のウイルスシアリダーゼによる解析や、マウス皮下移植モデルによる解析により、癌細胞のシアリダーゼ活性を標的とした新たな治療法の開発につながることを期待される。

- 1) *Oncol Rep.* 2002, 9:1251-1255
- 2) *J Biol Chem.* 2003, 278:267474-26479
- 3) *J Biol Chem.* 2006, 281:7756-7764
- 4) *PLoS One.* 2015,10:e0120578
- 5) *Cell Death Differ* 2012,19:170-179.
- 6) *Trends Glycosci. Glycotechnol.* 2004, 16:371-381

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
研究協力者	斎藤 誠一  (SAITO SEIICHI)  (80235043)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (18001)	
研究協力者	須田 哲司  (SUDA TETSUJI)  (40423347)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教   (18001)	