

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03533

研究課題名(和文) 抗真菌薬を基盤とした胆道・膵臓がんに対する新規治療薬の創製

研究課題名(英文) Discovery of novel therapeutic agents for biliary tract and pancreatic cancer based on antifungal agents

研究代表者

齋藤 義正 (Yoshimasa, Saito)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・教授

研究者番号：90360114

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：胆道・膵臓がんオルガノイドを用いた既存薬スクリーニングにおいてヒット化合物として特定された抗真菌薬について、抗腫瘍効果の分子機序を解明すると共に、実験動物を用いてin vivoでの抗腫瘍効果について検証した。フェンチコナゾールなどのアゾール系抗真菌薬の構造を基盤として50化合物を超える新規誘導体を設計し合成した。オルガノイドを用いた活性評価と同時に、物性およびADME特性も評価したところ、フェンチコナゾールと同程度の増殖抑制活性を有し、代謝安定性、水溶性およびCYP阻害を改善した有力な化合物を見出すことができた。さらにこれらの化合物にカルボキシ基を導入したプロドラッグの合成にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、抗真菌薬が β -catenin経路を抑制することにより、胆道・膵臓がん細胞の増殖を抑制することが明らかになった。また、胆道がんを移植したマウスを用いた検討において、経口抗真菌薬であるイトラコナゾールがin vivoで抗腫瘍効果を示した。さらに、既存の抗真菌薬をリード化合物として構造展開を行うことにより、胆道・膵臓がんに対する新たな低分子化合物を創出した。今後はPOCの取得、医師主導治験などを目指している。これらの新規化合物が手術適応のない胆道・膵臓がんの患者に対して最小限の副作用で腫瘍全体を退縮させ、生存期間を延長させる革新的な治療薬となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We have elucidated the molecular mechanisms of antitumor effects of antifungal agents identified as hit compounds in the screening of existing drugs using biliary tract and pancreatic cancer organoids, and verified their antitumor effects in vivo using experimental animals.

Furthermore, we designed and synthesized more than 50 new derivatives based on the structures of azole antifungals such as fenticonazole. Evaluation of physical properties and ADME properties as well as activity using organoids led to the discovery of promising compounds with growth inhibitory activity comparable to that of fenticonazole, with improved metabolic stability, water solubility, and CYP inhibition. Furthermore, we succeeded in synthesizing prodrugs of these compounds by introducing carboxy groups.

研究分野：分子腫瘍学

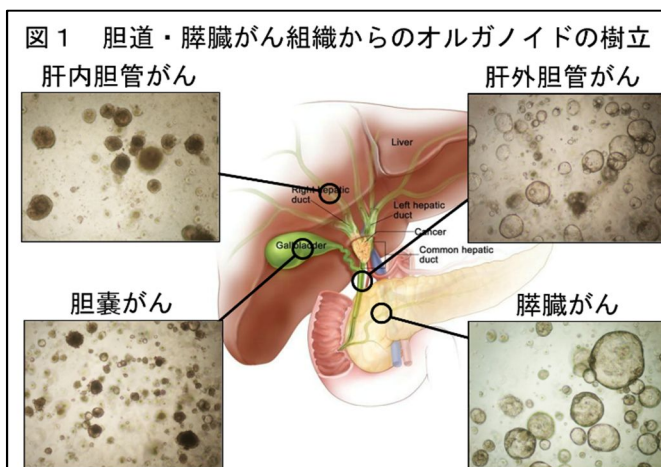
キーワード：胆道がん 膵臓がん オルガノイド 抗真菌薬

1. 研究開始当初の背景

(1) 難治性がんの代表である胆道がんならびに膵臓がんは、近年増加傾向を示しており、現在日本のがん死亡数の膵臓がんは第4位、胆道がんは第6位を占めている。早期発見が難しく、外科的切除による治療が困難な症例に対しては、抗腫瘍薬による化学療法が行われている。胆道・膵臓がんに対する化学療法には、ゲムシタピン（ジェムザール®）やプラチナ製剤であるシスプラチンを含むレジメンが標準治療となっているが、5年生存率は20%以下とその成績は十分ではない。多くの胆道・膵臓がんが現行の抗腫瘍薬に抵抗性を示し、化学療法による根治はほとんど望めないのが現状である。また、これらの抗腫瘍薬は骨髄抑制、消化管障害、脱毛、腎機能障害、肝機能障害などの細胞毒性が強く、重篤な副作用が患者のQOLを著しく低下させている。胆道・膵臓がんの本態を十分に反映した明確なモデルが存在しなかったことが、効果的な新薬の開発を妨げている要因として考えられている。

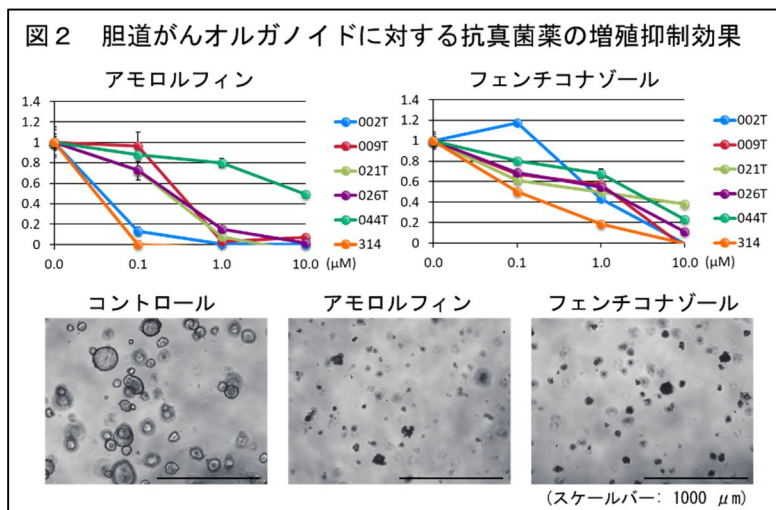
(2) 近年、組織幹細胞を3次元で培養することで、生体内の組織構造体を *in vitro* で再現するオルガノイド培養技術が開発された。

これまでに我々は、胆道がん（肝内胆管がん、肝外胆管がん、胆嚢がん）および膵臓がんの患者より提供されたがん組織を用いてオルガノイドを樹立し、1年以上にわたり安定的に培養・維持することに成功した（図1）。これらの患者由来の胆道・膵臓がんオルガノイドは、生体内の腫瘍と組織学的にも機能的にも極めて高い類似性を示すことを確認している（Saito Y *et al. Cell Rep.* 27, 1265, 2019）。このオルガノイドはヒトの腫瘍を *in vitro* で再現したものと考えられており、薬剤の抗腫瘍効果を評価する上で極めて優れたモデルといえる。



(3) 樹立した胆道・膵臓がんオルガノイドを用いて、東京大学創薬機構から提供された Validated Compound Library（既存薬ライブラリー）を使ってスクリーニングを行った。ヒット化合物の多くはゲムシタピンなどの既存の抗腫瘍薬であったが、興味深いことに、ヒット化合物の中に、これまでに抗腫瘍作用が報告されていないアモロルフィンやフェンチコナゾールなどの抗真菌薬が含まれていた。WST アッセイにより増殖能を検討したところ、図2に示す通り、樹立した胆道がんオルガノイド（9T, 21T, 26T, 314）および膵臓がんオルガノイド（2T）に対して、アモロルフィンはゲムシタピンと同等の増殖抑制効果を示し、さらに正常胆管細胞に対してはほとんど毒性を示さないことを発見した（Saito Y *et al. Cell Rep.* 27, 1265, 2019）。

これらの抗真菌薬は、白癬菌（水虫）に対する治療薬として使用されており、市販化合物なので既に安全性が確認されているため、胆道・膵臓がんに対する安全かつ有効な抗腫瘍薬となる可能性が期待される。しかし、なぜ抗真菌薬がこのような抗腫瘍効果を示すのかは不明であり、また、臨床応用に展開するためには、これらの抗真菌薬の *in vivo* での増殖抑制効果を確認することが不可欠である。



2. 研究の目的

(1) フェンチコナゾールは、本来は白癬菌（水虫）の治療薬であるが、ドラッグ・リポジショニングにより、胆道がんや膵臓がんを最小限の副作用で効率的に抑制する新たな予防・治療薬の強力な候補になると考えられる。国内外の報告を見ても、ドラッグ・リポジショニングにより、スタチン系高脂血症治療薬による抗腫瘍効果に関しては既に報告があるが、抗真菌薬による胆道・膵臓がんに対する抗腫瘍効果の報告はない。さらに、これらの抗真菌薬をリード化合物として、合成化学的に構造展開することで、より安全で効果の高い新たな抗腫瘍薬を創製することが

できると考えている。

(2) 本研究では、ヒット化合物である抗真菌薬をリード化合物として構造展開を行うことで、胆道・膵臓がん細胞の増殖をより強力に抑制する画期的かつ安全性の高い低分子医薬品を開発することを目的とする。これらの新規化合物が、手術適応のない胆道・膵臓がんの患者さんに対して、最小限の副作用で腫瘍全体を退縮させ、生存期間を延長させる革新的な治療薬となることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 胆道・膵臓がん患者由来オルガノイドの樹立

国立がん研究センター中央病院ならびに慶應義塾大学病院にて、胆道・膵臓がんの診断で外科手術を受けた患者より、十分なインフォームド・コンセントのもとに提供された腫瘍組織ならびに非腫瘍組織を使用した。これらの組織を細かく処理した後、マトリゲルで包埋し、その上に R-spondin 1、EGF、Noggin をはじめとする幹細胞の維持に必須な因子のみを添加した無血清培地を加えて 3 次元培養を行うことで、患者組織由来のオルガノイドを樹立した。

(2) 抗真菌薬の抗腫瘍効果に関する分子生物学的検討

アモロルフィン、フェンチコナゾール、イトラコナゾールはいずれも真菌細胞膜の主成分であるエルゴステロールの生合成に関わる酵素を阻害することによって真菌の膜機能を障害し、抗真菌作用を示す。しかし、胆道・膵臓がん細胞の増殖を抑制する分子メカニズムについては、明らかになっていない。Buczacki らは、イトラコナゾールが大腸がん細胞において Wnt シグナルやヘッジホッグシグナルを抑制することで細胞周期を停止させ、大腸がん細胞の増殖を抑制することを報告している(Buczacki SJA *et al. J Exp Med.* 215, 1891, 2018)。

樹立した胆道・膵臓がんオルガノイドにアモロルフィン、フェンチコナゾール、イトラコナゾールを添加し、抗真菌薬投与後のマイクロ RNA などのノンコーディング RNA を含む全遺伝子の発現変化をマイクロアレイおよび RNA シークエンスによって網羅的に解析した。発現変化が認められた遺伝子および Wnt シグナル、ヘッジホッグシグナル、細胞周期に関連する遺伝子に特に注目し、タンパク質レベルでの発現変化を確認した。

(3) 抗真菌薬の合成展開および誘導体の薬物動態評価

フェンチコナゾールなどのアゾール系抗真菌薬をリード化合物として構造展開を行った。アゾール系抗真菌薬は毒性や薬物代謝酵素 (CYP) 阻害が強い化合物なので、毒性回避や CYP 阻害を抑える構造をデザインし、新規化合物を合成した。

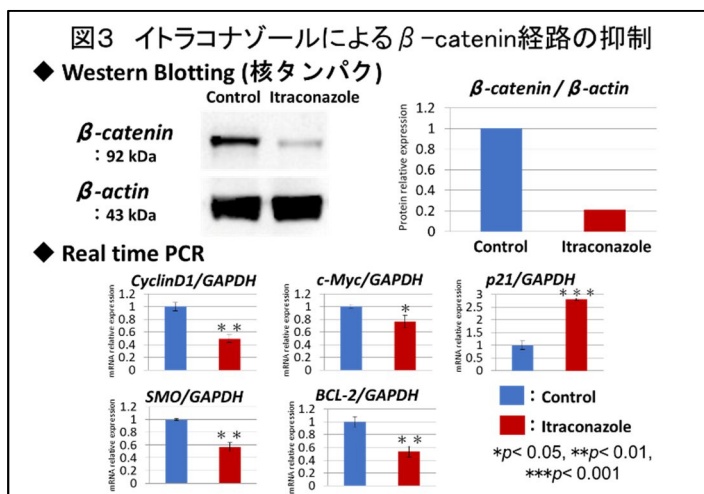
合成した化合物について、オルガノイドを用いた活性評価を WST アッセイにより行った。肝ミクロソーム中代謝安定性、水溶性、膜透過性など基本的な物性・薬物動態評価を行うと同時に、特にアゾール系に関しては CYP に対する阻害活性も確認した。優れた特性を示した化合物については、動物を用いた動態および薬効評価を進め、最終的に開発候補品を選定した。

(4) 胆道・膵臓がんオルガノイドの *in vivo* モデルの作製と抗真菌薬の抗腫瘍効果の検証

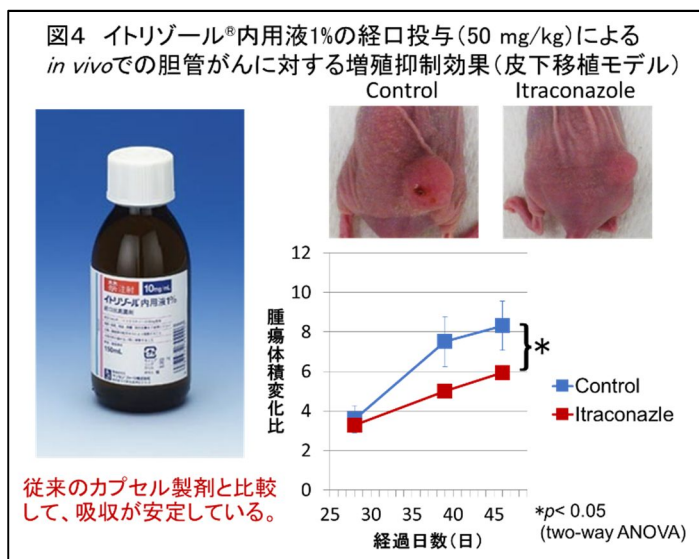
臨床応用に展開するため、抗真菌薬の *in vivo* での抗腫瘍効果を検証した。胆道・膵臓がんオルガノイドを免疫不全マウスの皮下に移植したマウスを用いて、経口抗真菌薬であるイトラコナゾールを投与し、*in vivo* での抗腫瘍効果を検証した。

4. 研究成果

(1) 抗真菌薬の抗腫瘍効果の分子機序を解明するため、胆道がんオルガノイドにイトラコナゾールを添加し、Wnt シグナルにおいて重要な役割を果たす β -catenin 経路の発現について検討を行った。図 3 に示す通り、胆道がんオルガノイドにおける β -catenin の核内の発現は、イトラコナゾールの添加によって著明に抑制されることが明らかになった。その他、イトラコナゾールの添加により、*CyclinD1*、*c-Myc*、*SMO*、*BCL2* の発現が抑制され、*p21* の発現が上昇することが確認された。以上から、抗真菌薬の抗腫瘍効果に関する分子機序として、 β -catenin の抑制が重要な役割を果たしていることが示唆された。

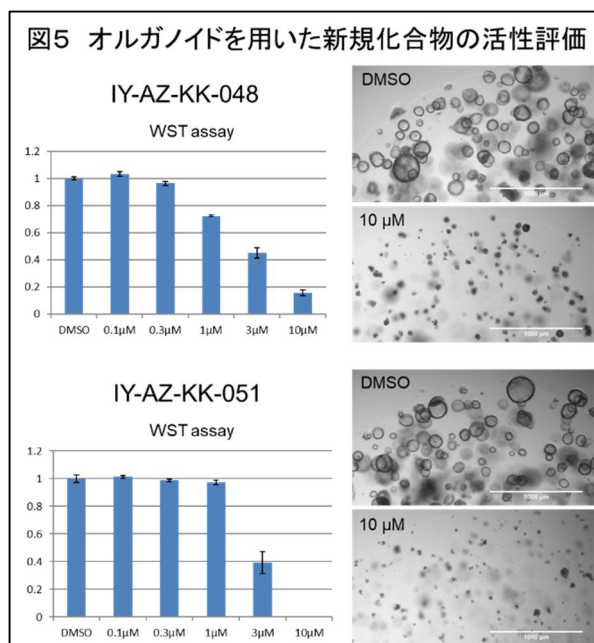


(2) 臨床応用に展開するため、経口抗真菌薬であるイトラコナゾール(イトリゾール)を用いて、*in vivo*での抗腫瘍効果を検証した。図4に示す通り、胆道がんオルガノイドを皮下に移植したマウスを用いて、イトリゾール(50 mg/kg)を投与し、*in vivo*での抗真菌薬の抗腫瘍効果を検証した。イトリゾールは、従来のカプセル製剤と比較して、吸収が安定している。図4のグラフは腫瘍体積変化比と投与経過日数を示したものであるが、イトリゾール投与群において、腫瘍体積の有意な減少が認められた。以上から、*in vivo*における検討においても、イトラコナゾールの胆道がんに対する抗腫瘍効果が確認された。



(3) 胆道・膵臓がん細胞の増殖をより強力に抑制する画期的かつ安全性の高い低分子医薬品を開発することを目指し、新規化合物の合成を行った。フェンチコナゾールなどのアゾール系抗真菌薬の構造を基盤に、50化合物を超える新規誘導体を設計し合成した。オルガノイドを用いた活性評価と同時に、物性およびADME特性も評価し、フェンチコナゾールと同程度の増殖抑制活性を有し、代謝安定性、水溶性およびCYP阻害を改善した化合物を合成した。合成した新規化合物のうち、図5に示す通り、IY-AZ-KK-048, IY-AZ-KK-050, IY-AZ-KK-051, IY-AZ-KK-052が強力に胆道がんオルガノイドの増殖を抑制していることを確認した。

(4) 肝臓に特異的に発現しているトランスポーターの基質にすることで肝臓・胆道への移行性を向上させることおよび水溶性を改善させることを目的に、上述の化合物にエステル結合やアミド結合を介してカルボキシ基を導入したプロドラッグの創製に着手し、現在までに4化合物の合成に成功した。ヒトおよびマウス肝S9における代謝評価より、エステル型では部分構造が切れて親化合物を十分に放出した一方、アミド型では部分構造が切れず親化合物は放出されなかった。水溶性試験では、全てのプロドラッグは親化合物に比べて水溶性が10倍程度増大し、カルボキシ基を含む部分構造を結合させることで水溶性の向上につながることが分かった。今後、ヒト初代肝細胞を用いて肝細胞への化合物の取り込み量を定量・評価することでこれらの化合物がトランスポーターの基質となるかどうか、また*in vivo*での薬物動態試験を行い、肝臓や胆道に選択的に移行するかどうかを調べる必要がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Calvisi DF, Boulter L, Vaguero J, Saborowski A, Fabris L, Rodrigues PM, Coulouarn C, Castro RE, Segatto O, Raggi C, van der Laan LJW, et al. ; CCA Model Consortium*. (*Cholangiocarcinoma (CCA) Model Consortium のメンバーとして参加)	4. 巻 -
2. 論文標題 Criteria for preclinical models of cholangiocarcinoma: scientific and medical relevance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology	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) 10.1038/s41575-022-00739-y	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 該当する
1. 著者名 van Tienderen GS*, Li L*, Broutier L*, Saito Y*, Inacio P, Huch M, Selaru FM, van der Laan LJW, Versteegen MMA. (*共同筆頭著者)	4. 巻 40
2. 論文標題 Hepatobiliary tumor organoids for personalized medicine: a multicenter view on establishment, limitations and future directions.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Cell	6. 最初と最後の頁 226-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ccell.2022.02.001.	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 該当する
1. 著者名 Marsee A, Roos FJM, Versteegen MMA; HPB Organoid Consortium*, Gehart H, de Koning E, Lemaigre F, Forbes SJ, Peng WC, Huch M, Takebe T, Vallier L, Clevers H, van der Laan LJW, Spee B. (*Hepatic, Pancreatic, and Biliary (HPB) Organoid Consortium のメンバーとして参加)	4. 巻 28
2. 論文標題 Building consensus on definition and nomenclature of hepatic, pancreatic, and biliary organoids.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Stem Cell	6. 最初と最後の頁 816-832
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stem.2021.04.005.	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 該当する
1. 著者名 Tominaga H, Matsuzaki J, Oikawa C, Toyoshima K, Manabe H, Ozawa E, Shimamura A, Yokoyama R, Serizawa Y, Ochiya T, Saito Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 Challenges for Better Diagnosis and Management of Pancreatic and Biliary Tract Cancers Focusing on Blood Biomarkers: A Systematic Review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13164220.	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 Kawasaki K, Toshimitsu K, Matano M, Fujita M, Fujii M, Togasaki K, Ebisudani T, Shimokawa M, Takano A, Takahashi S, Ohta Y, Nanki K, Igarashi R, Ishimaru K, Ishida H, Sukawa Y, Sugimoto S, Saito Y, et al.	4. 巻 183
2. 論文標題 An Organoid Biobank of Neuroendocrine Neoplasms Enables Genotype-Phenotype Mapping.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1420-1435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2020.10.023.	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 Saito Y, Muramatsu T, Saito H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Establishment and Long-Term Culture of Organoids Derived from Human Biliary Tract Carcinoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2019.100009.	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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 及川 千尋、松崎 潤太郎、落谷 孝広、齋藤 義正
2. 発表標題 膵がんドライバー遺伝子変異誘導による形質変化の追跡
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 葉 子祥、松崎 潤太郎、及川 千尋、金井 弥栄、齋藤 義正
2. 発表標題 誘導性CRISPR/dCas9を用いたC19MCの肝内胆管癌オルガノイドの分化における役割の解明
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 富永皓斗、松崎潤太郎、齋藤義正
2. 発表標題 スタチン製剤の胆管がん抑制作用に関する検討
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富永皓斗、松崎潤太郎、齋藤義正
2. 発表標題 セリバスタチンのヒト肝内胆管がん(IHCC)抑制作用に関する検討
3. 学会等名 日本消化器関連学会週間(JDDW2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤義正
2. 発表標題 難治性がんオルガノイドを用いた創薬研究
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須田雄大、齋藤義正
2. 発表標題 マイクロ流体デバイスでの共培養モデルにおいて、肝星細胞は胆管癌オルガノイドの浸潤を抑制する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
研究 分担 者	大江 知之 (Ohe Tomoyuki) (30624283)	慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・准教授 (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------