

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07124

研究課題名（和文）複合的がん免疫療法の開発を志向したがん代謝阻害剤の探索

研究課題名（英文）Development of comprehensive cancer immunotherapy using metabolism inhibitors

研究代表者

百瀬 功（Momose, Isao）

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所 沼津支所・主席研究員

研究者番号：10270547

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）：免疫チェックポイント阻害剤は画期的ながん免疫療法と考えられているが、その奏効率の低さが問題となっている。そこで本研究では免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を向上させるために、がん免疫に抑制的に作用するキヌレニンおよび乳酸を減少させる薬剤を探索した。ヒトがん細胞の産生するキヌレニンを減少させる物質としてセリン誘導体を見出した。本化合物は、血清により代謝された代謝物がインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼを阻害することにより、キヌレニン産生を抑制した。また乳酸デヒドロゲナーゼに対する阻害剤を探索したところ、昆虫病原系状菌カメムシタケの産生するシュウ酸が、LDH阻害活性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において見出されたセリン誘導体が、インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ（IDO）に対して阻害活性を示すことを発見した。IDOはトリプトファンを基質することから、トリプトファンをリード化合物として阻害剤が開発されてきたが、セリン誘導体にもIDO阻害があることは、阻害剤開発のケミカルスペースを押し広げることになり、学術的に高い意義がある。日本での死因第一位は「がん」であり、本研究はがん治療薬の開発に繋がる研究であることから高い社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The development of immune checkpoint inhibitors (ICIs) has dramatically altered the landscape of cancer therapy. However, many patients benefit from ICIs because of resistance to ICIs. Although multiple mechanisms of resistance are proposed, kynurenine and lactate as cancer metabolites play particularly important roles in the resistance to ICIs. In the present study, we screened chemical libraries and microbial culture extracts to identify small molecular compounds that decrease the production of kynurenine from cancer cells and inhibit lactate dehydrogenase (LDH). We found a serine derivative that suppresses kynurenine production from human lung A549 cells. Although the serine derivative did not inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase, which catalyzes tryptophan to kynurenine, a serum metabolite of the serine derivative was found inhibit indoleamine 2,3-dioxygenase. We also found that oxalate produced by fungi inhibits LDH, but not succinate and malonate as oxalate analogs.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：がん代謝 インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ 乳酸デヒドロゲナーゼ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、がん免疫療法は、従来の外科治療、放射線療法、がん薬物療法に続く、新たながん治療法として世界中の注目を浴びている。特に免疫チェックポイント阻害剤はがん治療に革新をもたらす画期的ながん免疫療法と考えられている。その主な理由は、既存の標準療法に不応性となった難治性がんにおいて明確な治療効果を発揮し、長期的な全生存期間の延長をもたらす点にある。しかしながら多くのがんに対する免疫チェックポイント阻害剤の奏効率は10-30%であることから、その治療効果を向上させる新たな治療法が望まれている。そこで申請者らは新しいアプローチとしてがんの代謝を阻害することにより、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を向上させる2つの方法を提案する。

(1) キヌレニン産生阻害剤の開発

がん細胞は免疫系からの攻撃を回避するためにトリプトファン代謝を利用していることが知られている。がん細胞はトリプトファンの主要代謝経路であるキヌレニン経路の律速酵素であるインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO) を高発現することにより、トリプトファンを減少させキヌレニンを大量に産生する。局所のがん微小環境におけるトリプトファンの枯渇やキヌレニンなどのトリプトファン代謝物の蓄積は、T細胞の活性化や増殖を抑制しがん免疫応答を制限することが明らかとなっている [M. Platten et al. Nat. Rev. Drug Discov. 18, 379-401 (2019)]。したがってキヌレニン産生を阻害するとがん免疫が賦活化できるため、キヌレニン産生阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の併用療法 (複合的がん免疫療法) は、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を向上させることが期待できる。

(2) 乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 阻害剤の開発

がんの代謝の特徴として、ミトコンドリアの酸化的リン酸化よりも解糖系でATPを産生していることがあげられる。この現象はワールブルグ効果と呼ばれ、核酸とNADPHの合成に有利に働くと考えられているが、同時に解糖系の最終生成物である乳酸を大量に産生する。乳酸は再取り込みされがん細胞のエネルギー源として利用されるが、がん免疫を回避するために重要な役割を担っていることも明らかとなった [A. Brand et al. Cell Metabolism 24, 657-671 (2016)]。すなわち細胞外に放出された乳酸はがん微小環境を酸性化し、T細胞の活性化 T細胞核内因子 (NFAT) の発現を抑制することによりインターフェロンの産生を低下させる。よってT細胞機能が減弱し、がん細胞は免疫系から回避できる。そこでピルビン酸から乳酸を合成する乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) を阻害すると、乳酸が減少しT細胞によるがん細胞への攻撃が惹起できる。したがってLDH阻害剤と免疫チェックポイント阻害剤の複合的がん免疫療法は、免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を向上させることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究は、トリプトファンの代謝物の1つであるキヌレニンの産生阻害剤や乳酸を合成するLDHの阻害剤などのがん代謝阻害剤を開発し、それらを用いて免疫チェックポイント阻害剤の治療効果を向上させることが最終的なゴールとなるが、本期間では「新規キヌレニン産生阻害剤および新規LDH阻害剤を開発する」ことを目的として、がん代謝阻害剤を用いた複合的がん免疫療法開発の研究基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) キヌレニン産生阻害剤の探索：ヒト肺胞基底上皮腺がんA549細胞を用いてインターフェロンによって誘導されるキヌレニン産生を抑制する化合物を探索した。キヌレニン産生は、基質であるトリプトファンの減少をエールリッヒ反応による比色法で検出し、キヌレニン量はLC/MSおよびHPLCにより測定した。阻害剤の探索源としては当研究所で作成した微生物培養液および化合物ライブラリーを用いた。

(2) LDH阻害剤の探索：ヒト組み換えLDHAを用いたin vitro酵素アッセイにてLDH阻害剤を探索した。LDHAはピルビン酸を乳酸へ変換するが、その際に補酵素としてNADHもNAD⁺へ変換することから、NADHを340nmの吸光度で計測することによりLDH活性を測定した。阻害剤の探索源としては当研究所の微生物培養液および化合物ライブラリーを用いた。

(3) 阻害剤の単離精製および構造決定：微生物培養液に含まれる阻害剤は、溶剤抽出法、カラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー等の組み合わせにより単離精製し、MSおよびNMRスペクトルの解析により化学構造を明らかにした。

(4) IDO活性および発現：IDO活性は、ヒト組み換えIDOを用いて基質のトリプトファンの減少をエールリッヒ反応で調べた。各種がん細胞におけるIDOの発現はウェスタンブロット法により調べた。

(5) 細胞増殖抑制活性：96穴プレートにがん細胞を 5×10^3 個/100 μ l/穴ずつ播き、ここに2 μ lのサンプルを加え72時間培養し、生存率をMTT法にて測定した。サンプルはDMSOで5 mMに調整し、これを50%メタノールで希釈した。

(6) 血中キヌレニン濃度：C57BL/6マウスに200 mg/kgの化合物Cを腹腔内および経口投与し、30分後の血中キヌレニン濃度をLC/MSにより定量した。ポジティブコントロールとして

INCB024360 (Epacadostat) を 100 mg/kg 経口投与した。

4. 研究成果

(1) キヌレニン産生阻害剤：ヒト肺がん A549 細胞を用いてインターフェロングによって誘導されるキヌレニン産生の阻害剤を微生物培養液より探索したところ、放線菌培養液からは Herbarin、Scorpinone、Questiomycin A などの脂溶性化合物（図 1）やイオノフォア化合物などを得ることができた。しかし、これらの化合物はキヌレニン産生阻害活性と細胞増殖抑制活性が同じ濃度域で作用しており、すなわちキヌレニン産生を特異的に阻害しているのではなく、細胞増殖抑制効果により、見かけ上はキヌレニン産生を抑制しているように見えている可能性が示唆された。

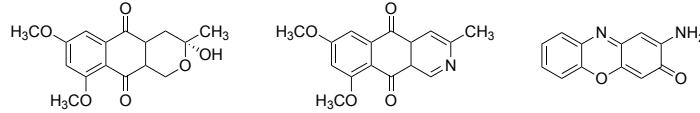


図 1 放線菌由来ヒット化合物

次にキヌレニン産生阻害剤を当研究所化合物ライブラリーより探索したところ、合成中間化合物 A にキヌレニン産生を阻害する活性があることを見出した（図 2）。この化合物はキヌレニン産生阻害を示す濃度で、細胞増殖抑制活性を示さず、またセリンのアミノ酸誘導体であることから、異性体を含む 20 種類の誘導体を化学合成した。その結果、化合物 A と同等の阻害活性を示す化合物は得られるものの、化合物 A の阻害活性を明らかに超える化合物は得られなかった。

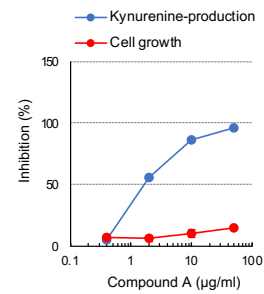


図 2 化合物 A によるキヌレニン産生抑制と細胞増殖抑制

続いて化合物 A の作用機序を調べた。トリプトファンは細胞内で IDO によりキヌレニンに変換される。IDO を阻害するとキヌレニンの産生が抑制されるため、申請者らの発見した化合物 A が IDO を阻害している可能性がある。そこで IDO 阻害活性について調べた。ヒト組み替え IDO を用いて *in vitro* 酵素アッセイにて調べたところ、IC₅₀ 値は 10 µg/ml 以上であり、IDO を阻害しないことがわかった。次に、A549 細胞にインターフェロングを作用させると、JAK/STAT シグナル伝達により IDO の転写が誘導される。そこで化合物 A の IDO 発現に与える影響について、ウェスタンブロット法で活性型 IDO のタンパク質レベルについて調べたが、40µg/ml の化合物 A で IDO の発現を抑制することはなかった。次の可能性として、化合物 A ではなく、その代謝物がキヌレニン産生に影響している可能性について検討した。まず、化合物 A の血清安定性について調べたところ、化合物 A は血清中で化合物 B に代謝されることが明らかとなった。そこで代謝物化合物 B の化学合成品を用いて IDO 活性に対する阻害活性を調べたところ、1.5 µg/ml の IC₅₀ 値を示し強い IDO 阻害活性を有することが明らかとなった。よって化合物 A は血清中で化合物 B に変換され、それが細胞内の IDO を阻害することにより、キヌレニン産生を抑制していると推定した（図 3）。

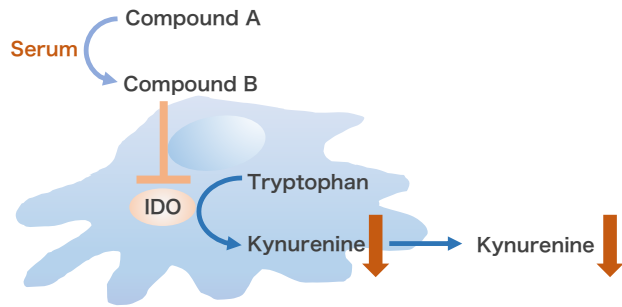


図 3 化合物 A のキヌレニン産生抑制メカニズム

In vivo での薬効を調べるために、マウスを用いた薬物動態試験を実施した。化合物 A と類似した性質を示す化合物 C をモデル化合物として、マウスに経口および腹腔内投与し、30 分後の血中キヌレニン量を LC/MS で測定した。ポジティブコントロール化合物である Epacadostat は経口投与で有意に血中のキヌレニン量を減少させたが、化合物 C は腹腔内投与においても経口投与においてキヌレニン量の減少は認められなかった（図 4）。これは、化合物 C は血中移行性が悪いため、*in vivo* で有効性を示す濃度まで血中濃度が上がらなかったことが原因と推定している。

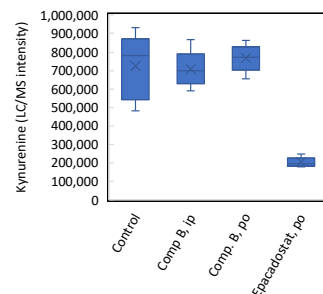


図 4 マウスにおけるキヌレニン産生抑制

IDO 阻害を作用点としたキヌレニン産生阻害剤はいくつも開発されており、治験が実施された化合物をある。しかし臨床で使用されている薬剤はなく、今後、化合物 A の誘導体が First-in human の薬剤となることを期待する。

(2) LDH 阻害剤：微生物培養液より LDH 阻害剤を探索したところ、昆虫病原糸状菌であるカメムシタケの培養液 (Lot. I-14-21) のアセトン抽出物に LDH 阻害活性があることを見出した。そこで、このアセトン抽出液のアセトンを減圧留去後、蒸留水を加え、NaOH 水溶液で pH 7.0 に調整した。この水溶液に活性炭を加え室温で 30 分間攪拌し、濾紙で濾過後、濾液を陽イオン交換樹脂 Dowex 50Wx4 を通過させた。通過液は陰イオン交換樹脂 IRA-35 に吸着させて水洗後、1N アンモニア水で溶出することにより、活性物質を単離することができた。この活性物質の MS スペクトルを測定したところ、 m/z 88. 9868 (M-H)⁻を示し、分子式が C₂H₂O₄ の低分子化合物であることが判明した。次に NMR を測定したところ、¹H-NMR シグナルは出現せず、¹³C-NMR において特徴的なカルボニル基のシグナルが観察された。従って、MS および NMR スペクトルの解析により、本化合物をシュウ酸 (oxalic acid) と同定した (図 5)。LDHA に対する IC₅₀ 値は 48 μg/ml であった。シュウ酸は、LDH の基質であるピルビン酸に良く似た類縁化合物であることから、基質拮抗阻害であると考えている。そこでシュウ酸に類似したジカルボン酸の LDH 阻害活性を調べたところ、LDH 阻害のポジティブコントロール化合物であるオキサミン酸は 14 μg/ml の IC₅₀ 値を示したが、他の化合物はいずれも 200 μg/ml 以上の IC₅₀ 値を示した。基質と誤認識して取り込まれるためには、厳密な構造類似性が求められる可能性がある。

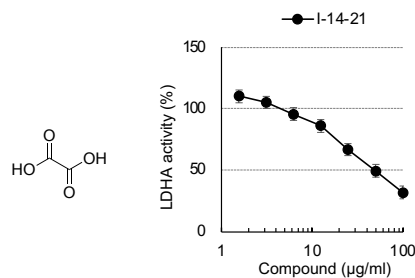


図5 シュウ酸の化学構造とLDHA阻害活性

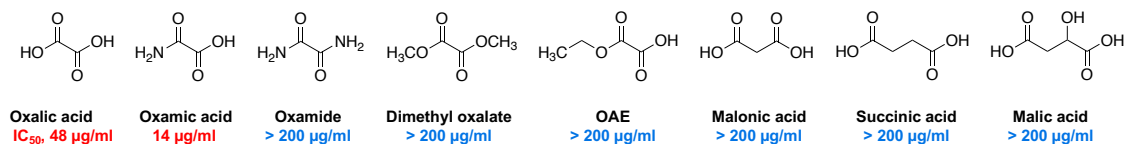


図6 有機酸によるLDH阻害活性

細胞内の LDH を阻害すると NAD⁺の枯渇を導き、その結果として細胞増殖抑制を示すと考えられている。そこで LDH 阻害剤 FX-11 および GEN-140 を用いて 11 種類のヒト膵臓がん細胞に対する薬剤感受性を調べたところ、MIA-Paca-2 や PSN-1 細胞のような解糖系に依存性の高いがん細胞に高感受性を示した。そこで PSN-1 細胞に対するシュウ酸の増殖抑制活性を調べたところ、>100 μg/ml 以上の IC₅₀ 値を示し、細胞増殖抑制効果を示さなかった。これはシュウ酸が水溶性物質であるため、細胞に取り込まれにくいことに起因していると推察する。

スクリーニングを継続していると、さまざまな糸状菌および放線菌がシュウ酸を産生することが確認された。そこで早期同定法の開発に着手した。シュウ酸は水溶性酸性のため、逆相系カラムでも保持されないことから、水溶性化合物に親和性の高いペンタフルオロプロピルフェニル基 (PFPP) が結合したカラムを用いることにより、LC/MS でシュウ酸を分析できる系を開発することができた。

次に当研究所のケミカルライブラリーより LDH 阻害剤を探索した。当ライブラリーには当研究所で得られた天然物化合物や誘導体研究で得られた類縁体や合成中間体化合物などが含まれている。厳選された約 3,000 化合物より 12 化合物に LDH 阻害活性があることがわかった。その中で特に強い阻害活性を示した化合物は、酸化水銀 (HgO) や塩化水銀 (HgCl₂) で、それぞれ LDH に対して 0.59 と 0.48 μg/ml の IC₅₀ 値を示した。水銀はシステインの SH 基やヒスチジンのイミダゾール基と結合する性質があり、LDH は活性中心のヒスチジンが酸塩基触媒として機能していることから、そこに水銀が結合することにより、阻害活性を発揮したと推定する。無機水銀化合物は毒性が予測されるため、これ以上の開発はせず中止とした。

これまで 10,000 以上の天然化合物や微生物培養液から LDH 阻害剤をスクリーニングしているが、シュウ酸よりも優れた天然物化合物は見出せていない。シュウ酸は基質であるピルビン酸のミミックであり、阻害剤開発のリード化合物として理想とも言えることから、今後はシュウ酸の誘導体を合成展開する予定である。国内外の研究によりいくつもの LDH 阻害剤は開発されているが、こちらも臨床応用された例はない。我々の研究から First-in human の薬剤を開発すべく合成展開を実施する。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Y. Kubota, Y. Fujioka, A. Patil, Y. Takagi, D. Matsubara, M. Iijima, I. Momose, R. Naka, K. Nakai, N. Noda, M. Takekawa.	4. 巻 13
2. 論文標題 Qualitative differences in disease-associated MEK mutants reveal molecular signatures and aberrant signaling-crosstalk in cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat. Commun.	6. 最初と最後の頁 4063
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-022-31690-w.	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 渡辺匠, 百瀬功	4. 巻 142
2. 論文標題 がん分子標的治療薬の創薬研究におけるボロン酸の活用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 145-153
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.21-00173-3	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 百瀬功, 小野寺威文, 川田学	4. 巻 141
2. 論文標題 金化合物Auranofinのがん微小環境特異的抗がん活性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 YAKUGAKU ZASSHI	6. 最初と最後の頁 315-321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/yakushi.20-00179-2	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 Y. Yamazaki, H. Abe, C. Sakashita, S.I. Ohba, T. Watanabe, I. Momose and M. Kawada.	4. 巻 74
2. 論文標題 Androprostamine A: a unique antiprostata cancer agent	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Antibiot.	6. 最初と最後の頁 717-725
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-021-00449-8	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 D. Tatsuda, M. Ameniya, R. Sawa, I. Momose and M. Kawada	4. 巻 74
2. 論文標題 Quinofuracins F - I, new quinofuracin derivatives produced by Staphylotrichum boninense PF1444	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J. Antibiot.	6. 最初と最後の頁 758-762
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-021-00452-z	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 T. Onodera, I. Momose, H. Adachi, Y. Yamazaki, R. Sawa, S. Ohba, M. Kawada.	4. 巻 295
2. 論文標題 1.Human pancreatic cancer cells under nutrient deprivation are vulnerable to redox system inhibition.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem.	6. 最初と最後の頁 16678-16690
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013893.	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 I. Momose, T. Onodera, H. Adachi, Y. Yamazaki, R. Sawa, S. Ohba and M. Kawada
2. 発表標題 Human pancreatic cancer cells are vulnerable to inhibition of redox system under nutrient deprivation
3. 学会等名 12th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Y. Yamazaki, S. Ohba, T. Onodera, M. Kawada and I. Momose
2. 発表標題 Synthetic lethal approach that targets c-MYC-driven cancers
3. 学会等名 12th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎洋子、大庭俊一、小野寺威文、川田学、百瀬功
2. 発表標題 c-Mycと合成致死作用を示す低分子化合物の探索研究
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 小野寺威文、坂本修一、大庭俊一、百瀬功、川田学
2. 発表標題 低栄養環境で高発現しているがん特異的代謝遺伝子の機能解明
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 小野寺威文、大庭俊一、百瀬功、川田学
2. 発表標題 低栄養環境に特異的ながん代謝遺伝子の発現誘導メカニズムの解明
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部光、山崎洋子、坂下千春、大庭俊一、渡辺匠、百瀬功、川田学、柴崎正勝
2. 発表標題 前立腺がんに対する新規抗アンドレゲン薬の医薬リード創製
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小野寺威文、坂本修一、百瀬功、川田学
2. 発表標題 低栄養環境で高発現するがん特異的代謝遺伝子の機能的役割
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 小野寺威文、大庭俊一、百瀬功、川田学
2. 発表標題 低栄養環境で高発現するがん特異的代謝遺伝子の探索と機能解明
3. 学会等名 第25回日本がん分子標的治療学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 百瀬功、渡辺匠
2. 発表標題 ボロン酸を利用したがん分子標的治療薬の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野寺威文、大庭俊一、百瀬功、川田学
2. 発表標題 低栄養環境で高発現するがん特異的代謝遺伝子の機能解明
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小野寺威文、坂本修一、百瀬功、川田学
2. 発表標題 低栄養環境で高発現するがん特異的代謝遺伝子の機能的役割
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所 https://www.bikaken.or.jp 公益財団法人微生物化学研究会 微生物化学研究所 沼津支所 https://www.bikaken.or.jp/laboratories/numazu/summary.html

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	飯島 正富 (Iijima Masatomi) (10184342)	公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所 沼津支所・研究員 (72801)	

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
---------	---------