

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09030

研究課題名(和文) 消化器癌におけるNa⁺/H⁺交換輸送体5の機能解析と特異的阻害薬の開発研究課題名(英文) Development of a selective inhibitor against Na⁺/H⁺ exchange transporter 5 (NHE5), which is a target candidate molecule for gastrointestinal cancer.

研究代表者

二宮 致 (Ninomiya, Itasu)

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：60345618

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)：本研究では消化器癌の標的候補分子であるNa⁺/H⁺交換輸送体5(NHE5)に対する選択的阻害薬の開発を目的とした。NHE非選択的阻害薬アミロライドをリード化合物としてアミロライド誘導体UTX-138のフェニル基に様々な官能基を導入した18種類の誘導体を設計・合成した。その中でUTX-143は最も強いNHE5阻害活性とNHE5選択性を示しヒト線維肉腫細胞HT-1080に対し殺細胞活性、細胞浸潤抑制効果、遊走抑制効果を示した。一方、ヒト皮膚繊維芽細胞に対する殺細胞効果は低かった。以上より腫瘍特異的な殺細胞活性、浸潤抑制効果、遊走抑制効果を有する新規NHE5選択的阻害薬UTX-143の創出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義としては、Na⁺/H⁺交換輸送体5が消化器癌の標的分子であることを見出した事、NHE非選択的阻害薬アミロライドをリード化合物としてNHE5選択的阻害薬UTX-143を創出できた事が挙げられる。また、社会的意義としては、新しい抗がん剤候補物質の創出による消化器癌治療の奏効率向上の可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a selective inhibitor against Na⁺/H⁺ exchange transporter 5 (NHE5), which is a target candidate molecule for gastrointestinal cancer. We attempted to develop a novel NHE5 selective inhibitor with 18 derivatives were designed and synthesized by introducing various functional groups to the phenyl group of amiloride derivative UTX-138 using the method of structure-activity relationship. Regarding NHE1 and NHE5 inhibitory activity, UTX-143 showed the highest NHE5 inhibitory activity and NHE5 selectivity. Next, UTX-143 showed cytotoxic activity, cell invasion inhibitory effect, and migration inhibitory effect against HT-1080 human fibrosarcoma cells. On the other hand, the antiproliferative effect of UTX-143 on normal human skin fibroblasts was very weak. Based on the above results, we succeeded in developing a novel NHE5-selective inhibitor UTX-143 that has tumor-specific antiproliferative, invasion-inhibiting, and migration-inhibiting effects.

研究分野：消化器癌

キーワード：Na⁺/H⁺交換輸送体5 アミロライド UTX-143 殺細胞活性 浸潤抑制効果 遊走抑制効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Na⁺/H⁺交換輸送体(NHE)は生体膜を介した Na⁺と H⁺(プロトン)の交換輸送を担うイオン輸送性膜タンパク質である。哺乳細胞の 11 種の NHE 蛋白のうち NHE1 から NHE5 は細胞膜上で Na⁺/H⁺交換輸送を行うため細胞膜局在性 NHE とも称される。細胞膜局在性 NHE のうち NHE1 はほぼ全ての臓器で発現を示すが、その他は臓器特異的とされている。細胞膜局在性 NHE は Na⁺/K⁺-ATPase によって形成される Na⁺の勾配を駆動力とした Na⁺と H⁺の交換輸送を担う。がん細胞は一般的に嫌氣的解糖による糖代謝を行い、細胞内では代謝に伴う乳酸やプロトンが発生するが、プロトンは NHE によって細胞外へ排出され、正常細胞と異なり細胞内を弱アルカリ、細胞外を弱酸性環境下に制御していることが知られている。このような細胞内アルカリ化と細胞外の酸性化は細胞の運動・浸潤能を亢進し、細胞外基質の分解を誘起して腫瘍の浸潤・転移を促進する。NHE5 は神経細胞に発現が高く、エンドサイトーシスによって細胞質に取り込まれたエンドゾーム内の pH 調整にも関与し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた細胞膜レセプター蛋白の分解やリサイクリングに関与する。我々はこれまでに食道扁平上皮癌・胃癌・乳癌・大腸癌細胞株や外科的切除標本における NHE5 の過剰発現を確認している。

2. 研究の目的

癌細胞との関連が注目されている NHE ではあるが、細胞膜局在のうち NHE5 はこれまで神経特異的とされており、癌細胞においての役割は全く解明されていないのが現状である。本研究では細胞膜局在性 NHE のうち NHE5 に焦点をおき、癌細胞の増殖・進展・転移における NHE5 の役割を細胞膜局在 NHE 活性に伴う浸潤・増殖・癌幹細胞形質の獲得の面から検討する。さらに NHE 特異的阻害剤としては、これまで主に NHE1 選択的阻害剤が合成され、ある程度の抗腫瘍作用が示唆されている程度であり抗癌剤としての臨床試験は未だ行われていない。また NHE1 以外の isoform の選択的阻害剤、特に NHE5 特異的阻害剤の合成ならびに効果は未だ報告がない。本研究では、NHE5 特異的阻害剤の分子設計合成により新規制がん治療の開発を検討する。

3. 研究の方法

(1) 新規 NHE5 阻害剤の NHE1/NHE5 阻害活性の評価

NH₄Cl プレパルス法を用いてラット NHE1 過剰発現細胞およびヒト NHE5 過剰発現細胞の細胞内 pH の変化を測定することにより評価した。手法として、pH 応答性蛍光指示薬である BCECF-AM (DOJINDO) で染色した細胞を NH₄Cl 含有バッファーに暴露させ細胞内 pH をアルカリ化させ、NHCl 非含有バッファーに暴露することで細胞内を急激に酸性化させる。その後の細胞内酸性化からの経時的な pH 回復率を蛍光法により評価した。

(2) 新規 NHE5 阻害剤の in vitro 増殖抑制活性の評価

新たに合成した阻害剤候補化合物については、Cell Counting Kit-8、DOJINDO を用いて、各種ヒトがん細胞および NHE 欠損ハムスター線維芽細胞、さらにこれらの NHE5 過剰発現細胞に対

する *in vitro* 増殖抑制活性を試験し、既存 NHE 非特異的阻害剤の amiloride や 5-(N,N-Hexamethylene)-amiloride (HMA) と細胞増殖抑制における IC₅₀ 値を比較検討した。

(3) *In vivo* 転移抑制活性の評価に用いるヒト野生型 NHE5 過剰発現株の樹立

HA-tag が付加されたヒト野生型 NHE5 および E209I プロトンポンプ機能が欠質した NHE5-E209I 変異体発現プラスミドを基に各遺伝子を pDON-5 Neo プラスミドに挿入した。pDON-5-NHE5-WT プラスミドあるいは pDON-5-NHE5-E209I プラスミドを pVSV-G エンベローベクターと共に GP2-293 パッケージング細胞株に遺伝子導入し、高発現 NHE5 遺伝子導入用レトロウイルスベクターを調整した。調整したレトロウイルスベクターをヒト食道がん TE8 細胞および胃がん TMK-1 細胞へ spinfection により感染させた。感染させた細胞は G418 抗生物質にて選択培養し、野生型 NHE5 および NHE5-E209I 変異体を高発現する TE8 細胞ならびに TMK-1 細胞を樹立した。

(4) 新規 NHE5 阻害剤の *in vitro* 浸潤抑制活性の評価

10 万個の細胞を 30 μ l の 2 mg/ml コラーゲンゲル溶液(Cell Matrix I-A, 新田ゼラチン、大阪)に混和し、24-well plate の中央に滴下し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間放置した。コラーゲンゲルの重合後、各種の阻害剤を含んだ 700 μ l の 5% FBS/DMEM を加えて 24 時間から 48 時間細胞を培養した。培養上清中に含まれる MMP-2 と MMP-9 の活性は、ゼラチンザイモグラフィを用いて検出した。生細胞の細胞活性は、培養液に 70 μ l の cell counting kit-8 溶液を加えて 2 時間培養した後、吸光度を測定することにより評価した。コラーゲンゲルからの細胞遊走は、細胞をメタノールで固定した後、1% Crystal violet 液で染色して観察した。

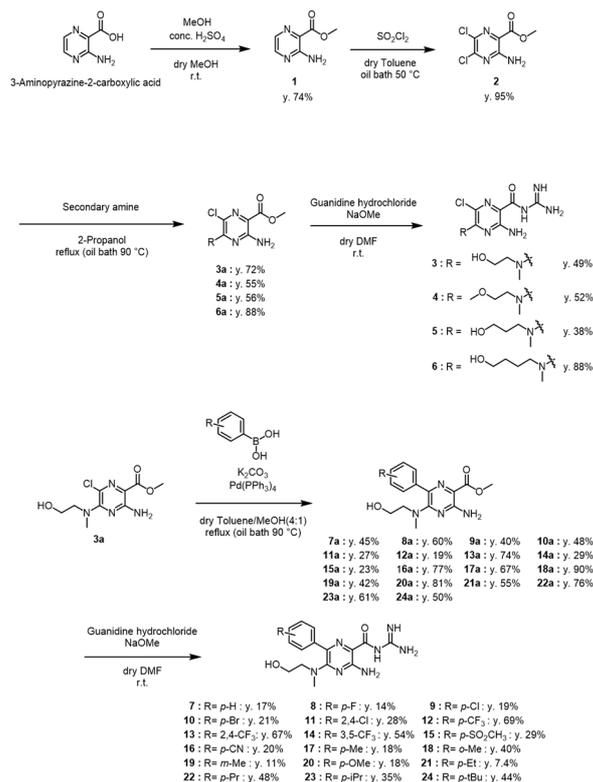
(5) *In vivo* 転移抑制活性の評価

ヒトがん細胞の転移能は受精鶏卵転移実験モデルで評価した。具体的には、孵卵 11 日目の受精鶏卵の漿尿膜上の血管内にヒトがん細胞を移植後、7 日目受精鶏卵の胚子(鶏胚)の肝臓摘出、DNA を抽出して、ヒト α -グロビン遺伝子に対する PCR によりヒトがん細胞の肝転移を定量した。

4. 研究成果

令和 2 年度に、ヒト食道がん細胞株 TE8 および胃がん細胞株 TMK-1 にヒト野生型または変異型 NHE5 cDNA を強制的に過剰発現させた細胞株を樹立した。令和 3 年度、それらの受精鶏卵転移実験モデルにおける肝転移能を親株と比較したところ、TMK-1 のヒト野生型 NHE5 過剰発現株(以下、NHE5 過剰発現株)は、変異型 NHE5 発現細胞株や親株と比較し、高い転移能を有することを見出した。次に、新規 NHE5 阻害剤の分子設計および合成について、アミロライドのピラジン環 5 位にアルキル鎖を導入した HMA や 5-(N-ethyl-N-isopropyl)-Amiloride : EIPA は、アミロライドと比較して NHE5 阻害活性が向上した事が報告されている。そのため、ピラジン環 5 位のアルキル鎖の検討を行った。3-アミノピラジン-2-カルボン酸のメチルエステル化、続いて SO₂Cl₂ を用いたピラジン環 5,6 位のジクロロ化を行った。次に芳香族求核置換反応により各種 2 級アミンをピラジン環 5 位に導入した。最後に、アミドエステル交換によりメチルエステルをグアニジノ基に変換した化合物 3-6 を合成した。アミロライドのピラジン環 5 位に N-メチルアミノエタノールを導入した化合物 3 は、NHE5 選択性を有することを明らかにした。そのため、化合物 3 のピラジン環 5 位の構造を固定し、他の官能基を変更することで NHE5 阻害活性の向上

を目指した。そこで、ピラジン環 6 位のフェニル基に着目し、構造活性相関の手法を用いて誘導体展開を行った。各種フェニルボロン酸を化合物 3a のピラジン環 6 位に導入した。最後に、アミドエステル交換によりメチルエステルをグアニジノ基に変換した化合物 7-24 を合成した。



NHE 阻害活性評価を行う際の化合物 3-24 の至適濃度を決定するため、ハムスター肺線維芽細胞 AP-1 細胞 (NHE 全欠損細胞) にラット NHE1 を発現させた AP-1 rNHE1 細胞とハムスター卵巣細胞 PS120 細胞 (NHE 全欠損細胞) にヒト NHE5 を発現させた PS120 hNHE5 細胞を用いて WST-1 アッセイによる殺細胞活性評価を行なった。NHE1 及び NHE5 阻害活性は、pH 応答性蛍光指示薬である BCECF-AM で細胞染色後、NH₄Cl プレパルス法による細胞内酸性化から継時的な細胞内 pH の回復率を蛍光法により評価した。化合物 3 は、Amiloride や HMA と比較して NHE1 阻害活性が大幅に低下し、NHE5 選択性を示した。化合物 3 の N-メチルアミノエタノール基におけるヒドロキシ基をメトキシ基へ変更した化合物 4 は、NHE5 阻害活性を示さなかった。

また、リンカー数 (n=3, 4) の化合物 5, 6 は NHE5 阻害活性を示さなかったことから、ヒドロキシ基及びリンカー数 (n = 2) が最適であると明らかになった。次に、化合物 3 のピラジン環 5 位を固定し、ピラジン環 6 位の誘導体展開を行った。化合物 3 のピラジン環 6 位にフェニル基を導入した化合物 7 は、化合物 3 と比較して約 3.5 倍高い NHE5 阻害活性を示した。最初に、電子効果の検討のためフェニル基にハロゲン基を導入した (化合物 8-11)。その結果、化合物 9 および 11 は、UTX-138 と比較して NHE5 阻害活性が向上した。ハロゲンの生物学的等価体である CF₃ を導入した化合物 12 および 14 の NHE5 阻害活性は化合物 9 および 11 と同程度だったが、化合物 13 は UTX-138 と比較して NHE5 阻害活性が低下した。また、CF₃ と同程度の電子吸引性をもち親水性を示す CN または CH₃SO₂ を導入した化合物 15 および 16 は NHE5 阻害活性を示さなかった。また、電子供与性基である CH₃ を *p* 位に導入した化合物 17 (UTX-143) は、UTX-138 と比較して NHE5 阻害活性が大きく向上した。置換基の位置選択性の決定のため、*o* 位または *m* 位に CH₃ を導入した化合物 18 および 19 は UTX-143 と比較して NHE5 阻害活性が低下した。CH₃ と比較して立体的自由度を有する OCH₃ を導入した化合物 20 は、NHE5 阻害活性を示さなかった。また、結合ポケットの空間性を検討するために炭素鎖数を増やした化合物 21-24 は、UTX-143 と比較して NHE5 阻害活性が低下した。次に、NHE1 に対する阻害活性を調べたところ、最も高い NHE5 阻害活性を示した UTX-143 (IC₅₀ = 3.11 μM) が最も高い NHE5 選択性 (IC_{50,NHE1}/IC_{50,NHE5} =

80.1 倍) を示した。次に、新たに合成した4つの阻害剤候補化合物 (UTX-138、 UTX-143、

Compound	R	IC _{50,NHE5} (μM) ^(A)	IC _{50,NHE1} (μM) ^(B)	NHE5 selectivity ^(C)
7 (UTX-138)	<i>p</i> -H	15.9	500 (44.2%)	>31.4
8	<i>p</i> -F	30.1	20.9	0.694
9	<i>p</i> -Cl	5.58	100 (41.4%)	>17.9
10	<i>p</i> -Br	10.0 (44.2%)	50.0 (30.1%)	-
11	2,4-Cl	4.75	100 (27.7%)	>21.1
12	<i>p</i> -CF ₃	8.83	10.0 (21.0%)	>1.13
13	2,4-CF ₃	22.0	300 (48.4%)	13.6
14	3,5-CF ₃	4.54	7.62	1.68
15	<i>p</i> -SO ₂ CH ₃	100 (18.5%)	-	-
16	<i>p</i> -CN	100 (0%)	-	-
17 (UTX-143)	<i>p</i> -Me	3.11	249	80.1
18	<i>o</i> -Me	43.4	201	4.63
19	<i>m</i> -Me	30.1	500 (42.8%)	>16.6
20	<i>p</i> -OMe	100 (0%)	-	-
21	<i>p</i> -Et	16.2	18.5	1.14
22	<i>p</i> -Pr	18.3	100 (19.6%)	5.46
23	<i>p</i> -iPr	69.5	7.40	0.106
24	<i>p</i> -tBu	11.1	41.7	3.76

YKM1-86 (化合物 8) YS5-77 (化合物 11)) について、TMK-1 の親株およびその NHE5 過剰発現株、ヒト繊維肉腫 HT-1080 細胞、さらにこれらの細胞に加え 2 種類の NHE 欠損ハムスター繊維芽細胞 (PS120 細胞および AP-1 細胞)、それらのラット NHE1 導入細胞およびヒト NHE5 導入細胞を用いて、*in vitro* の増殖抑制活性を比較試験した。その結果、(1) 非特異的 NHE 阻害剤の HMA は、試験した全ての細胞に対して増殖抑制活性 (IC₅₀ 値: 35-55 μM) を示したの

に対し、4つの新規化合物はいずれも、ハムスターの細胞には増殖抑制活性を示さないが、HT-1080、 TMK-1 親株およびその NHE5 過剰発現株などのヒトがん細胞に対しては増殖抑制効果を示すことが明らかになった。さらに、 UTX-138、 UTX-143、 化合物 8 は、TMK-1 親株よりも NHE5 過剰発現株でより強い増殖抑制活性が認められ、新規化合物の中でも、UTX-143 が最も強い増殖抑制効果を示した。次に、食道がん細胞 (TE1、TE5、TE6、TE9、TE10、TE11、TE15、KES) に対する UTX-143 の *in vitro* の増殖抑制活性の評価を行なった。その結果、TE-1、TE-5 および TE15 の3株が UTX-143 に高感受性を示し、そのうち TE-1 および TE15 については NHE5 mRNA の高発現が認められた。一方、TE-10 は、NHE5 mRNA の発現は高いものの、UTX-143 感受性は低かった。また、ヒトの皮膚由来線維芽細胞 HDF および食道がん患者の臨床検体より樹立した2種の正常の食道由来線維芽細胞に対する UTX-143 の増殖抑制活性を HT-1080 細胞 (NHE1、NHE3 および NHE5 mRNA の発現陽性) と比較試験した。HMA は、HT-1080 細胞 (IC₅₀ 値: 14 μM) および正常線維芽細胞 (IC₅₀ 値: 13-24 μM) の双方に細胞増殖抑制活性を示したが、UTX-138 (IC₅₀ 値: 40 μM) と UTX-143 (IC₅₀ 値: 15 μM) は腫瘍細胞に強い抑制活性を示す一方、正常線維芽細胞に対する IC₅₀ 値は 100 μM 以上と NHE5 mRNA の発現が低いヒト正常線維芽細胞に対しては増殖抑制活性が低いことも確認できた。さらに、4つの阻害剤候補化合物 (UTX-138、 UTX-143、 化合物 8) について、ヒト線維肉腫 HT-1080 細胞を使用して細胞運動、MMP-2 活性化、*in vitro* の浸潤抑制活性を比較試験した。コラーゲンゲルに包埋された細胞の増殖とコラーゲンゲルからの細胞遊走は、UTX-143 により抑制された。細胞のコラーゲンゲル培養により誘導される MMP-2 活性化は、YKM1-86 では抑制効果が認められなかったが、UTX-143 では抑制された。さらに UTX-143 がコラーゲンゲルへの最も強い細胞浸潤抑制効果を示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小宮 悠生、篠原 侑成、二宮 致、遠藤 良夫、滝野 隆久、宇都 義浩
2. 発表標題 Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体 5 (NHE5) 選択的阻害剤であるアミロライド誘 導体の構造活性相関による UTX-143 の創製
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 篠原侑成、二宮 致、遠藤良夫、滝野隆久、宇都義浩
2. 発表標題 Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体5選択的阻害剤としての新規アミロライド誘導体の創製
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小宮悠生、森本華真、篠原侑成、二宮致、遠藤良夫、滝野隆久、宇都義浩
2. 発表標題 アミロライド誘導体の構造活性相関による新規Na ⁺ /H ⁺ 交換輸送体5 (NHE5) 選択的阻害剤UTX-143の創製
3. 学会等名 2022年日本化学会中国四国支部会
4. 発表年 2022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	宇都 義浩 (Uto Yoshihiro) (20304553)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学 域)・教授 (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	遠藤 良夫 (Endo Yoshio) (30211783)	金沢大学・がん進展制御研究所・准教授 (13301)	
研究分担者	滝野 隆久 (Takahisa Takino) (40322119)	金沢大学・GS教育系・教授 (13301)	

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