

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09337

研究課題名（和文）ムコリピンを標的としたがん根治・予防を可能とする治療薬の創出

研究課題名（英文）Development of anticancer agent targeting mucolipin

研究代表者

林 美樹夫（HAYASHI, Mikio）

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：10368251

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）：膠芽腫は生存期間が15か月であり、新たな化学療法剤の開発が望まれている。がんの発生かつ治療抵抗性の根源として、がん幹細胞の存在が提唱されている。我々は、がん幹細胞の増殖を減退させる新規化合物を創出した。さらに、新規化合物は膠芽腫モデルマウスの全生存期間を延長させた。以上の成果は、新規化合物が膠芽腫の新薬に応用できる可能性を示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん幹細胞は自己増殖しながら、分化したがん細胞を生み出す。そのため、がん幹細胞に作用する薬物が開発できれば、根治療法につながる。本研究は、がん幹細胞に有効な化合物を創り出した。この新規化合物はがん治療に広く波及する。

研究成果の概要（英文）：Glioblastoma has a survival period of 15 months, and the development of new chemotherapeutic agents is desired. The existence of cancer stem cells has been proposed as a source of cancer development and treatment resistance. We have created novel compounds that attenuate the proliferation of cancer stem cells. Furthermore, a novel compound prolongs overall survival in glioblastoma model mice. These results suggest that the novel compounds may be applied as a new drug for glioblastoma.

研究分野：トランスレーショナルリサーチ

キーワード：膠芽腫 がん幹細胞 イオンチャネル 創薬

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

希少がん、かつ難治性がんである膠芽腫は生存期間が15か月であり、根治療法はない。膠芽腫は脳の正常部位に浸潤するため、外科手術での全摘出は難しい。膠芽腫に対する唯一の既存薬である、テモゾロミドの有効性は十分ではなく、新たな化学療法剤の開発が望まれている。がんの発生かつ治療抵抗性の根源として、がん幹細胞の存在が提唱されている。がん幹細胞が、自己増殖しながら、分化したがん細胞を生み出すことで、腫瘍組織の不均一性を生み出すと考えられている。我々は、手術で摘出された組織から、がん幹細胞を樹立している。そして、がん幹細胞の増殖や遊走に関わる機能分子を同定するために、イオンチャネルを探索し、一過性受容体電位型チャネルの一種であるムコリピンを見いだした。そして、ムコリピンの作動薬の中から、がん幹細胞を2日間で死滅させる薬物を見いだした。

### 2. 研究の目的

ムコリピンをコードする遺伝子は、MCOLN1-3のサブファミリーがある。MCOLN1に生じた機能喪失型変異は、精神運動発達遅滞、眼の異常を特徴とする、リソソーム蓄積症であるムコリピドーシスIV型を引き起こす。また、MCOLN3に生じた機能獲得型変異は難聴を引き起こすことが、マウスで報告されている。正常細胞において、ムコリピンは細胞内のエンドソームに分布する。しかし、我々は電気生理学および免疫組織学的手法を用いて、ムコリピンが、がん幹細胞の細胞膜に局在することを見いだした。ムコリピンの特異な分布が、がん幹細胞の機能に重要な意義をもつと考えられる。本研究は、ムコリピンの作動薬を応用した抗癌剤の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 本研究は、関西医科大学遺伝子倫理審査委員会および医学倫理委員会に申請を行い、承認の回答を得てから実施した。膠芽腫、転移性脳腫瘍、および肺癌由来のがん幹細胞は三次元スフェア培養法を用いて樹立した (Neuro Oncol 22(3): 333-44, 2020)。手術で切除されたがん組織(0.1-1 g)をはさみにより細かく刻んだ。細切された組織を細胞剥離液 (Accumax; ナカライテスク) 2 mL を入れた試験管に移し、37 °C の恒温槽で5分間振盪 (20 回/分) した。細胞培養液 8 mL を加え混和し、遠心 (40 ×g, 5 分) した。上清を捨て、細胞培養液 10 mL を加え混和し、超低接着表面ディッシュ (100 mm; Corning) で培養した。培養は、5% CO<sub>2</sub> / 95% 空気、37 °C の湿潤な環境で行った。細胞培養液は、D-MEM/Ham's F-12 (和光純薬) に、NaHCO<sub>3</sub> (49 mM)、グルコース (26 mM)、L-グルタミン (3 mM)、MACS NeuroBrew-21 (5 mL; Miltenyi Biotec)、上皮成長因子 (EGF, 20 ng/mL; PeproTech)、線維芽細胞増殖因子 (bFGF, 20 ng/mL; PeproTech) およびペニシリン (100 U/mL) とストレプトマイシン (0.1 mg/mL) を添加したものを使用した。

(2) ムコリピンタンパク質に対して MolSite 法を用いて薬剤結合領域を探索した。その後、既存薬 3 種について 3D 構造を PubChem より取得し、myPresto ソフトウェアを用いて予測された薬剤結合領域に対してドッキング計算を行った。ドッキングモデルのうち G 及びドッキングスコアを指標として薬剤結合領域を選定し、前述の既存薬を教師学習させた Machine Learning Multiple Target Screening (ML-MTS) 法によって LigandBox に登録された仮想化合物ライブラリーの 200 万種からスクリーニングを行った。得られた MTS スコアから上位 100 種に対して、当該タンパク質に対してドッキングを行った。得られた新規の仮想化合物の構造に基づいて、各仮想化合物を実際に合成した。

(3) がん幹細胞を試験管に移し、遠心した。上清を捨て、トリプシン-EDTA 溶液 (Sigma-Aldrich) 2 mL を加え、37 °C の恒温槽で5分間インキュベートした。細胞培養液を加え混和し、遠心した。上清を捨て、細胞培養液を加えた。細胞数を計測し、2,000 個の細胞を 96 ウェル超低接着表面プレート (Corning) に移した。各被験薬を加えた細胞培養液 0.1 mL で4日間培養した。生細胞数測定試薬 SF (ナカライテスク) を用いて、生細胞数を計測した。

(4) 膠芽腫モデルマウスを作製し、新規化合物の有効性を検証した。免疫不全マウス (BALB/cAJcl-nu/nu, 5-8 週齢, 雌) は、三種混合麻酔 (ドミトール 0.75 mg/kg + ミダゾラム 4 mg/kg + ベトルファール 5 mg/kg) で苦痛を与えないよう配慮したうえで、処置した。前頭部皮膚を切開し、プレグマより 2 mm 右側方・1 mm 前方で、頭蓋骨に穴を開けた。脳定位固定装置 (SR-6M-HT; 成茂科学器械研究所) を用いて頭部を保持し、頭蓋骨から 3 mm の深さにて、がん幹細胞 (100-100,000 細胞) を5分かけて注入した。注入終了後、5-0 ナイロンで閉創した。移植後 7 日目から、ゾンデを用いて、被験薬を5日間連続で経口投与し、有効性を全生存期間 (Kaplan-Meier 曲線) で評価した。統計解析は、Gehan-Breslow-Wilcoxon 検定にて行った。被験薬は、体重 1 kg あたり 5 mg となるように 0.5 w/v% メチルセルロース 400 溶液 (富士フイルム和光純薬) に調整し、1日に1回投与した。

### 4. 研究成果

3 種類の薬剤とムコリピンとのドッキングを教師データとしたインシリコスクリーニングにより、化合物ライブラリーの 200 万より 998 種類の候補化合物を抽出した。阻害効果予測値の高

かったトップ 100 化合物の中から、31 種の新規化合物について化学合成に成功し、そのうち 7 種の新規化合物が膠芽腫、転移性脳腫瘍、および肺癌から樹立したがん幹細胞の増殖を減退させた。うち 1 種が終濃度 100 nM で、有効性を示した (図 1、5 株)。NMR を用いて、新規化合物 K3 の化学構造を決定した (特願 WO 2022/210524 A1)。

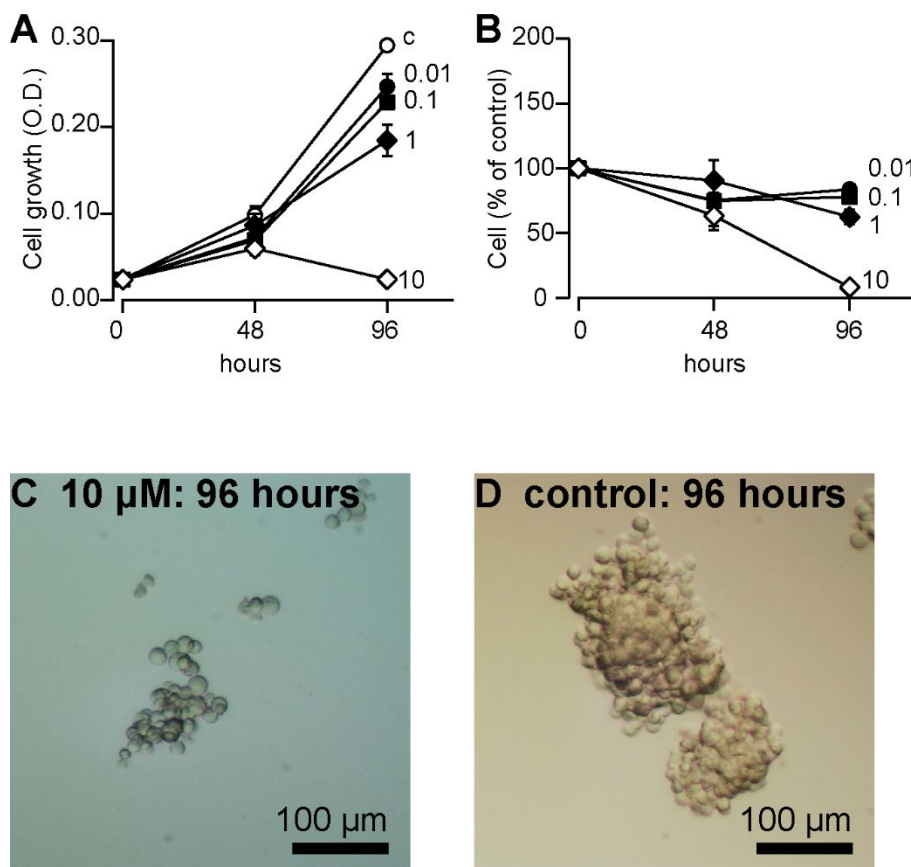


図 1 細胞増殖アッセイ。(A, B) 新規化合物 K3 はがん幹細胞の増殖を抑制した。濃度の単位は  $\mu\text{M}$ 。c: コントロール。(C) K3 を処置したがん幹細胞の光学顕微鏡像。(D) コントロール

細胞増殖アッセイを用いて、K3 の類縁体から有効性が高い化合物 (K84) を見いだした。また、K3 とムコリピンチャネルとのドッキングを機械学習させたインシリコスクリーニングにより、新規化合物 (K98) を創り出した。さらに、K84 と K98 の組み合わせから 19 化合物を合成し、50% 効果濃度が 50 nM の新規化合物 (K110) を創り出した (図 2, 特願 2022/160708)。

膠芽腫モデルマウスにおいて、新規化合物 K3 の有効性試験を行った。K3 は生存日数 (中央値 27 日) をプラセボ群 (中央値 19 日) より有意に延長させた (図 3)。また、新規化合物 K3 について、安定化試験を行った。6 か月間、室温保存した後、実験に供した。細胞増殖アッセイおよび膠芽腫モデルマウスに対する有効性は保持していた。以上の結果から、K3 は膠芽腫の治療に有効であると考えられた。

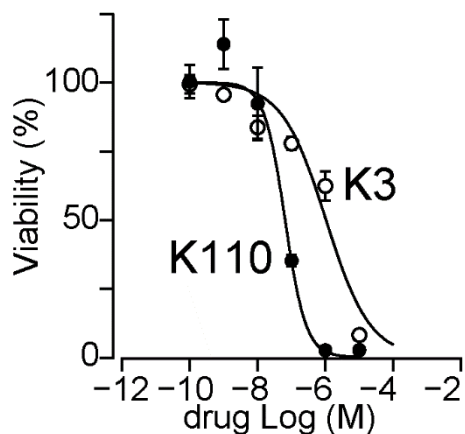


図 2 濃度依存性曲線

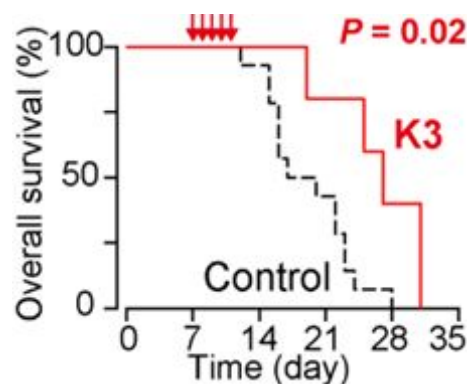


図 3 膠芽腫モデルマウスの生存曲線。矢印は経口投与を示す。

<引用文献>

Iwata R, Lee JH, Hayashi M, et al. ICOSLG-mediated regulatory T cell expansion and IL-10 production promote progression of glioblastoma. *Neuro-Oncology*. 2020; 22(3):333-344.

林 美樹夫, 池田 幸樹, 岩田 亮一 . 窒素含有化合物、前記窒素含有化合物を含む組成物、及び腫瘍悪性度の予測マーカー . 特願 2021-055869( 出願日 2021/3/29 )PCT/JP2022/14962( 提出日 2022/3/28 ) WO 2022/210524 A1 ( 国際公開日 2022/10/6 )

林 美樹夫, 池田 幸樹, 岩田 亮一 . 窒素含有化合物、前記窒素含有化合物を含む組成物、及び腫瘍悪性度の予測マーカー . 特願 2022-160708 ( 出願日 2022/10/5 )

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Maruyama M, Nakano Y, Nishimura T, Iwata R, Matsuda S, Hayashi M, Nakai Y, Nonaka M, Sugimoto T	4. 巻 44(7)
2. 論文標題 PC3-secreted microprotein is expressed in glioblastoma stem-like cells and human glioma tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biological & pharmaceutical bulletin	6. 最初と最後の頁 910-919
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1248/bpb.b20-00868.	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 Matsuo T, Isosaka T, Hayashi Y, Tang L, Doi A, Yasuda A, Hayashi M, Lee CY, Cao L, Kutsuna N, Matsunaga S, Matsuda T, Yao I, Setou M, Kanagawa D, Higasa K, Ikawa M, Liu Q, Kobayakawa R, Kobayakawa K	4. 巻 12(1)
2. 論文標題 Thiazoline-related innate fear stimuli orchestrate hypothermia and anti-hypoxia via sensory TRPA1 activation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature communications	6. 最初と最後の頁 2074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-22205-0.	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 Saha T, Aoun J, Hayashi M, Ali SI, Sarkar P, Bag PK, Leblanc N, Ameen N, Woodward OM, Hoque KM	4. 巻 25
2. 論文標題 Intestinal TMEM16A control luminal chloride secretion in a NHERF1 dependent manner.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and biophysics reports	6. 最初と最後の頁 100912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrep.2021.100912.	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 Hatta M, Kaibori M, Matsushima H, Yoshida T, Okumura T, Hayashi M, Yoshii K, Todo T, Sekimoto M	4. 巻 25
2. 論文標題 Efficacy of a third-generation oncolytic herpes simplex virus in refractory soft tissue sarcoma xenograft models.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular therapy oncolytics	6. 最初と最後の頁 225-235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.omto.2022.04.010.	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 Kaibori M, Matsui K, Hayashi M	4. 巻 14
2. 論文標題 Theranostics Using Indocyanine Green Lactosomes.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14153840.	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 Shoji T, Hayashi M, Sumi C, Kusunoki M, Uba T, Matsuo Y, Hirota K	4. 巻 58
2. 論文標題 Sevoflurane Does Not Promote the Colony-Forming Ability of Human Mesenchymal Glioblastoma Stem Cells In Vitro.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Medicina	6. 最初と最後の頁 1614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/medicina58111614.	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 Sakaguchi T, Sumiyama F, Kotsuka M, Hatta M, Yoshida T, Hayashi M, Kaibori M, Sekimoto M	4. 巻 10
2. 論文標題 Levosimendan Increases Survival in a D-Galactosamine and Lipopolysaccharide Rat Model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 3161
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines10123161.	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 林美樹夫	4. 巻 49
2. 論文標題 がん幹細胞を標的とした経口抗癌剤の開発	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 47-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林美樹夫
2. 発表標題 ムコリピンを標的としたがん予防薬の開発
3. 学会等名 第8回TR推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林美樹夫
2. 発表標題 ムコリピンを標的としたがん予防薬の開発
3. 学会等名 革新的医療技術創出拠点 令和二年度成果報告会 5年間のあゆみ、そしてその先へ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林美樹夫
2. 発表標題 ムコリピンを標的とした脳腫瘍の治療薬の開発
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 林美樹夫, Hoque Kazi Mirajul
2. 発表標題 コレラ菌副毒素は腸管上皮細胞のKCNQ型Kチャネルを活性化する
3. 学会等名 第99回日本生理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林美樹夫
2. 発表標題 がん幹細胞に特異的なイオンチャネルを標的とした抗癌剤の開発
3. 学会等名 第13回スクリーニング学研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林美樹夫
2. 発表標題 ムコリピンを標的とした脳腫瘍治療薬の開発
3. 学会等名 第10回TR推進合同フォーラム・ライフサイエンス技術交流会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 林美樹夫
2. 発表標題 がん幹細胞特異的イオンチャネルを標的とした抗癌剤の創出
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 窒素含有化合物、前記窒素含有化合物を含む組成物、及び腫瘍悪性度の予測マーカー	発明者 林 美樹夫, 池田 幸樹, 岩田 亮一	権利者 学校法人関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、WO 2022/210524 A1	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

産業財産権の名称 窒素含有化合物、前記窒素含有化合物を含む組成物、及び腫瘍悪性度の予測マーカー	発明者 林 美樹夫, 池田 幸樹, 岩田 亮一	権利者 学校法人関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、JP2022/160708	出願年 2022年	国内・外国の別 国内



〔取得〕 計0件

〔その他〕

林 美樹夫 (HAYASHI MIKIO) - マイポータル - researchmap  
<https://researchmap.jp/patchclamperMH>  
researchgate  
<https://www.researchgate.net/profile/Mikio-Hayashi>

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	岩田 亮一  (IWATA Ryoichi)  (60580446)	関西医科大学・医学部・非常勤講師    (34417)	

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