

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462618

研究課題名(和文)キネシンモータータンパク質阻害剤を用いた卵巣がんに対する新規治療法の開発

研究課題名(英文)Potential new chemotherapy strategy for human ovarian carcinoma with a novel KSP inhibitor

研究代表者

武永 美津子 (TAKENAGA, MITSUKO)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：10236490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：新規合成KSP阻害剤のうち、in vitroヒト卵巣がん細胞増殖抑制力価が最も高かったKPYB10602をKSP阻害剤として用いた。

本剤はpaclitaxelに比べ低いものの、carboplatinに比べ高いin vitro増殖抑制を示した。また担がんマウス腫瘍体積の増大を有意に抑制し、かつ微小管阻害薬にみられる歩行障害を示さなかった。本剤は、securinの発現増大を伴ってM期の割合を増やし、下流の活性酸素発生を増加、Bax発現、およびカスパーゼ活性を介してアポトーシス誘導、抗腫瘍効果を示すことが明らかとなった。本研究で新規合成KSP阻害剤が、副作用の少ない抗がん剤になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Among synthetic kinesin spindle protein (KSP) inhibitor compounds, KPYB10602, a six-member lactam-fused carbazole derivative was the most potent in vitro against cell growth of human ovarian cancer, A2780. KPYB10602 caused dose-dependent suppression of tumor growth in vivo. Mitotic arrest due to KPYB10602 was confirmed in vitro, and was characterized by inhibition of securin degradation. Apoptosis after mitotic arrest was associated with an increase in the ratio of pro-apoptotic Bax to anti-apoptotic Bcl-2. Increase of reactive oxygen species (ROS) and caspase pathway were also involved. Furthermore, KPYB10602 caused little neurotoxicity in vivo. Therefore, KPYB10602 could be a promising candidate as an anti-tumor agent with reduced adverse events for treating human ovarian cancer.

研究分野：薬理学

キーワード：KSP阻害 キネシンモータータンパク 細胞周期 ヒト卵巣がん細胞 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) Kinesin spindle protein (KSP) : キネシン(kinesin)は、ATPの加水分解のエネルギーを利用して細胞内微小管に沿って移動するモータータンパクである。なかでも kinesin spindle protein (KSP)は、細胞分裂の際、中心体の分離・移動、紡錘体の形成など重要な働きを担っている。したがって KSP を阻害すると細胞周期はM期で停止しアポトーシスが誘導されることから、KSP 阻害剤は新たなメカニズムで作用する次世代抗がん剤となりうる期待されている。しかしこれまで臨床適用された例はない。

(2) 新規特異的 KSP 阻害剤の創製 : 藤井、大石らは、KSP 阻害活性を示す天然物や類縁化合物の構造共通性から候補化合物の合成を試み、KSP ATPase 阻害活性が高く、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞増殖抑制活性(in vitro)の高い各種カルバゾール誘導体を見出した。これらの候補化合物は、KSP 以外のモータータンパク(CENP-E, Kid, MKLP-1, KIF-4)に対する ATPase 阻害活性を示さず、高い KSP 選択性があることが確認された。

(3) KSP 阻害剤の抗がん剤としての可能性 : 微小管に作用する抗がん剤は、微小管構成タンパクのチューブリンを標的とし、タキサン系(パクリタキセル、ドセタキセルなど)は微小管の脱重合阻害を、ビンカアルカロイド系(ビンクリスチンなど)は重合阻害することにより細胞増殖停止をひき起こす。しかし微小管は、細胞分裂以外にも、細胞内物質輸送、細胞骨格としての形態維持や変形に関わり、特に神経細胞では神経軸索として突起骨格の形成、維持、軸索内物質輸送などに重要な働きを担っている。したがって微小管に直

接作用する抗がん剤では、中枢・末梢神経障害等の重大な副作用を伴うことになる。一方でがん治療効果は、新たなメカニズムで作用する抗がん剤の開発によって達成されてきた。したがって、有糸分裂に関わる“微小管”ではなく、同じく有糸分裂に関わるものの“KSP”を標的とする抗がん剤は、副作用の低減だけでなく、治療効果の増大に寄与できると期待される。

(4) KSP 阻害剤による卵巣癌に対する新規治療法の開発 : 卵巣がんは、自覚できる症状が乏しく、診断時には進行がんになっていることが少なくない。診断後の治療には、手術によるがん摘出を基本とし、手術前の縮小あるいは術後の再発・転移防止にパクリタキセルおよびカルボプラチンの併用療法が標準治療となっている。これら既存の抗がん剤とはメカニズムの全く異なる KSP 阻害剤の抗腫瘍効果を in vivo で検証し有用性を示すことは、将来卵巣がんの治療効果の飛躍に貢献できる抗がん剤となりうる可能性があり、本研究を実施するに至った。

2. 研究の目的

これまでとは全く異なったメカニズムで作用する KSP 阻害剤が、副作用の少ない新たな抗がん剤となりうることを、ヒト卵巣がん接種免疫不全マウスに対する KSP 阻害剤の抗腫瘍効果を検証する。また in vitro でその機序の解明を図る。

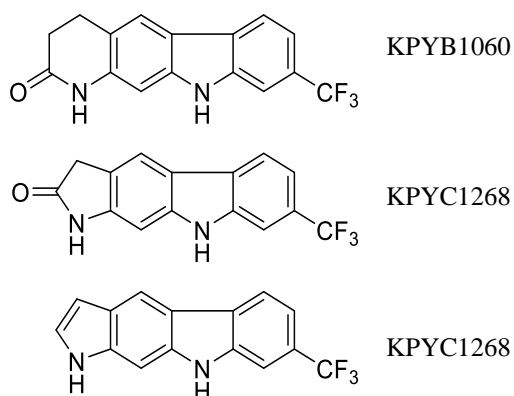
3. 研究の方法

すべての研究は、ヒト卵巣がん細胞 A2780 を in vitro および in vivo で用いた。

(1) 新規KSP阻害剤(カルバゾール型誘導体)の細胞増殖抑制効果の検討(in vitro)

ヒト卵巣癌細胞 A2780 を用いて、3 種類

の新規 KSP 阻害剤(カルバゾール型誘導体) (図・1) の候補化合物の細胞増殖抑制力価を MTT assay とチミジン取り込み assay によって IC₅₀ で評価した。比較薬剤としてパクリタキセル、およびカルボプラチン群を加えた。本結果から、*in vivo* 抗腫瘍効果を評価する新規 KSP 阻害剤(カルバゾール型誘導体) を選択する。以降、力価の最も高い KSP 阻害剤を用いて *in vitro* および *in vivo* での評価を行う。



図・1 新規合成 KSP 阻害剤

(2) 新規 KSP 阻害剤(カルバゾール型誘導体)の抗腫瘍効果に関する検討 (in vivo)

Balb/c-nu ♀ 6 週齢マウスにヒト卵巣がん細胞 A2780(5 x 10⁶)を皮下に接種し、担がんマウスを作製する。腫瘍体積が一定の大きさになった時点で薬剤投与を開始する(day 0)。腫瘍体積は、経時的にノギスで計測 (length x width² x 0.5) し、溶媒投与のみの腫瘍コントロール群の腫瘍体積との比較を行う。薬剤はオリーブ油に懸濁させ、腫瘍周囲であるものの、腫瘍部位から離れた皮下に投与する。許用量に関する予備検討で、低用量(8mg/kg)、高用量(80mg/kg)投与とした。

(3) 新規 KSP 阻害剤(カルバゾール型誘導体)の副作用に関する検討 (in vivo)

正常マウスを用いて、(2)の方法に従い皮

下投与(80mg/kg)し、投与前後の運動歩行機能を Rota-rod test (MK-610A, Muromachi Kikai Co., Ltd. Tokyo)を用いて計測する。比較薬剤としてパクリタキセル投与(25mg/kg ip)群を加えた。以上の動物実験は、聖マリアンナ医科大学大学院動物委員会の承認を受けた後、実施した(動物実験承認番号; 1112005)。

(4) 細胞周期に関する検討 (in vitro)

細胞(2 x 10⁶) を無血清培地で 15 時間培養した後、KSP 阻害剤を添加しさらに培養した。細胞回収後、固定し-20°C で一晩保存した。細胞は 20 µg/ml propidium iodide (PI)、0.1 mg/ml RNase を加え、フローサイトメーター (BD LSR II, BD Biosciences, San Diego, CA)で解析した。解析細胞数は 30,000 cells とした。

(5) アポトーシスに関する検討 (in vitro)

(4)に従い KSP 阻害剤で処理した後、細胞を回収後、FITC annexin V / dead cell apoptosis kit (Invitrogen)で染色解析を行った。

(6) 活性酸素産生に関する検討 (in vitro)

(4)に従い KSP 阻害剤で処理した後、100 µM dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma-Aldrich) を用いて活性酸素産生を解析した。

(7) タンパク発現に関する検討 (in vitro)

細胞溶解液 (20 µg) を用いて、電気泳動および Western blot 解析を行った。用いた抗体は、securin 抗体 (clone 19H16L48) (rabbit, Invitrogen), Mad2 抗体 (mouse, BD Transduction Laboratories), Bax 抗体 (rabbit) Bcl-2 抗体(rabbit), caspase 9 抗体 (rabbit), caspase 3 抗体(rabbit, 以上 Cell Signaling),および β-actin 抗体 (mouse, Sigma-Aldrich)である。

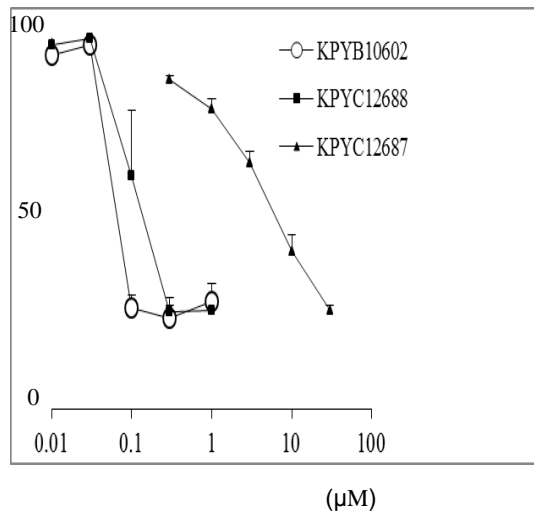
(8) 統計処理

データは the mean ± SD (or SE)で示した。

4. 研究成果

(1) KSP 阻害剤の抗腫瘍効果 (in vitro)

すべての合成 KSP 阻害剤は、濃度依存的に in vitro 細胞増殖抑制を示した (図・2)



図・2 MTT assay; Y 軸 : % of Control
MTT assay で算出した IC₅₀ が KPYB10602 0.078 μM、KPYC12688 は 0.105 μM、KPYC12687 は 8.325 μM と、KPYB10602 が最も抑制力価が高かった。チミジン取り込み実験でも同様な結果が得られた。したがって以降、in vitro および in vivo の検討は、KPYB10602 を KSP 阻害剤として評価した。

(2) KSP 阻害剤 (KPYB10602) の抗腫瘍効果 (in vitro)

KSP 阻害剤 (KPYB10602) の抗腫瘍力価をパクリタキセルおよびカルボプラチンと比較した。

表・1 IC₅₀ 値 (μM)

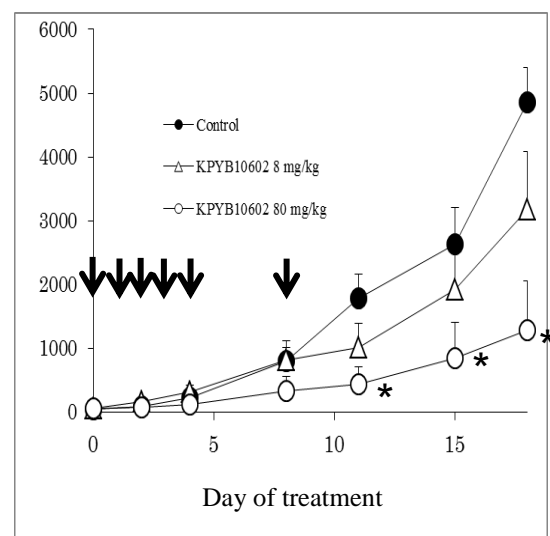
薬剤	MTT assay		
KPYB10602	0.056	±	0.0048
Paclitaxel	0.0051	±	0.0003
Carboplatin	93.0	±	15.6

表・1 に示した IC₅₀ 値から、KPYB10602 はパクリタキセルに比べ 10 分の一の力価であ

ったものの、カルボプラチンに比べ 1600 倍以上の力価を持つことが明らかとなった。

(3) KSP 阻害剤 (KPYB10602) の抗腫瘍効果 (in vivo)

がん細胞接種 7 日目の腫瘍容積が平均 50 mm³ になった時点で薬剤投与を開始した (day 0)。腫瘍容積は徐々に増大し day18 にはコントロール群で 5,000 mm³ にまで達した。KPYB10602 (80 mg/kg) は腫瘍容積の増大を有意に抑制した。完全に腫瘍が消失した個体も 3 例みられた。低用量 KPYB10602 (8 mg/kg) では、効果がやや低く、投与を終了すると徐々に腫瘍の増大が認められた。KPYB10602 投与群では腫瘍の増大を抑える一方で体重増加は、コントロール群に比べ高い傾向がみられた。

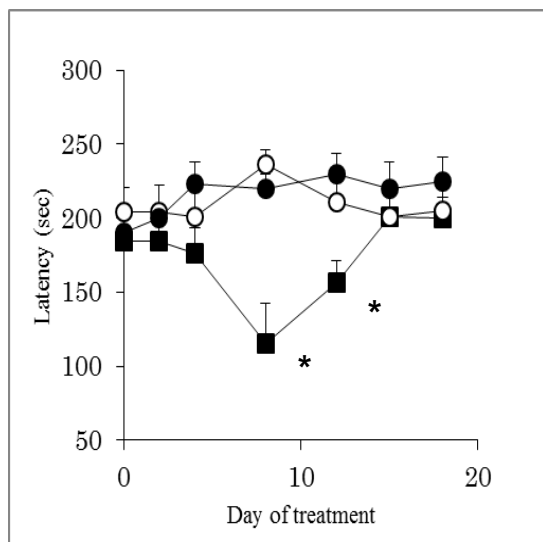


図・3 KSP 阻害剤のヒト卵巣がんマウスに対する抗腫瘍効果 (Y 軸 ; 腫瘍容積 mm³)

(4) KSP 阻害剤 (KPYB10602) の運動機能におよぼす作用 (in vivo)

微小管脱分極阻害を介して抗腫瘍効果を示すパクリタキセルは、末梢神経障害の副作用を示すことが知られている。実際正常マウスに 25mg/kg 投与すると、一時的にバランス

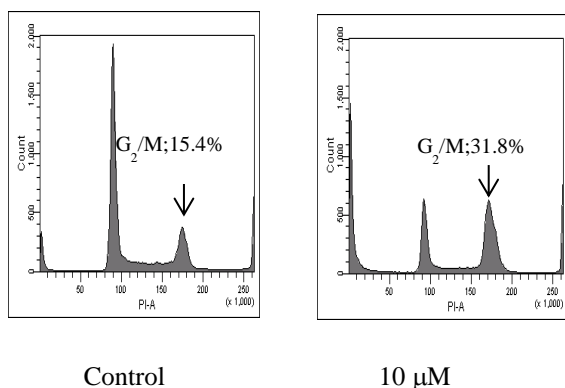
を崩した歩行障害が認められた。この症状を数値化するため、ロータロッドを用いて計測したところ、図・3 に示すように有意な歩行障害を示したパクリタキセル群に対し、KSP 阻害剤群ではほとんど認められなかった。



図・3 KSP 阻害剤の運動機能に対する作用

(5) KSP 阻害剤 (KPYB10602) の細胞周期におよぼす作用(in vitro)

薬剤を添加しないコントロール群の G₂/M 期の割合は 15~16% であった。KPYB10602 (10 μM) を加えて 15 時間培養すると、その割合は 35.0% に増加し mitotic arrest を示した。

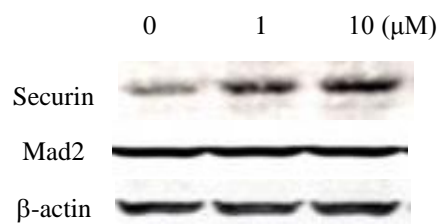


図・4 KSP 阻害剤の細胞周期におよぼす作用 (代表例)

パクリタキセル (2.5 μM) も G₂/M 期の

細胞割合を 32.9% にまで増加させた。一方同条件でカルボプラチン (100 μM) 添加では、G₂/M 期の割合は 15.2% とほとんど変わらなかった。この解析では、アポトーシス細胞の割合(subG₁) を 4.55% から 22.3% と増加させたことも明らかとなった。アポトーシス細胞を FITC 蛍光キットで染色する方法での解析では、アポトーシスが 0.21% から 17.8% に増加することが捉えられている。

細胞 M 期の metaphase から anaphase への正常な移行のためには、securin 分解が必須である。そこで securin に着目して解析したところ、2 倍以上発現が増加しており、KSP 阻害に伴うチェックポイントが発動して securin 分解を抑制していることが明らかとなった。この現象はパクリタキセルでもみられたが、カルボプラチン では認められなかった。



図・5 KSP 阻害剤の securin 分解におよぼす作用

また、アポトーシス誘導タンパクの 1 つ Bax の発現が増加し、一方 Bcl-2 発現にはほとんど変動がみられなかった。結果として KPYB10602 (10 μM) 添加によって Bax/Bcl-2 の割合は 2 倍に増加した。

活性酸素産生も濃度依存的、時間依存的に増加した。またさらに下流にある cleaved caspase-3 や cleaved caspase-9 の発現が増大したことからカスパーゼの活性化を示す結果を得た。

(6) 結論

本研究から、カルバズール誘導体構造をもつ新規合成特異性の高い KSP 阻害剤のうち、KPYB10602 が in vitro, in vivo とともに高い抗腫瘍効果を示すことを明らかにした。特に最も力価の高い KPYB10602 をヒト卵巣がん A2780 担がん免疫不全マウスに皮下投与したところ、体重減少は全くみられず、経時的な腫瘍拡大を用量依存性に抑制し、高い抗腫瘍活性を示した。一方正常マウスに微小管阻害薬を投与すると神経障害に伴う歩行障害がみられたが、KSP 阻害剤では全くみられなかった。以上の結果は新規合成 KSP 阻害剤が、微小管の機能にほとんど影響を及ぼさず副作用の少ない、新たな機序をもった優れた抗がん剤になる可能性を示唆している。今回皮下投与で評価したが、剤型の工夫を加えることで標的臓器、細胞への到達性が上がり、効果の増大をもたらす可能性、また内服による効果が見いだせる可能性も考えられた。本研究が、今後の臨床研究に向けた基礎研究成果の 1 つになることが期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件) 査読有

Takenaga M, Yamamoto Y, Takeuchi T, Ohta Y, Tokura Y, Hamaguchi A, Asai D, Nakashima H, Oishi S, Fujii N. Potential new chemotherapy strategy for human ovarian carcinoma with a novel KSP inhibitor. **Biochem Biophys Res Commun**, 463, 222-228, 2015 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.05.029.

[学会発表] (計 4 件)

1. 武永美津子 竹内智起 山本有貴 都倉享恵 新美純 濱口明美 太田有紀 浅井大輔 大石真也 中島秀喜 藤井信孝: 新規合成 KSP 阻害剤のヒト卵巣がんに対する抗腫瘍効果 日本薬学会第 136 年会

2016. 3. 27. (パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)

2. 武永美津子 山本有貴 竹内智起 都倉享恵 濱口明美 太田有紀 大石真也 藤井信孝: 新規合成 KSP 阻害剤のヒト卵巣がんに対する抗腫瘍効果 第 52 回日本癌治療学会 2014. 8. 29. (パシフィコ横浜、神奈川県横浜市)
3. 武永美津子 竹内智起 都倉享恵 濱口明美 山本有貴 太田有紀 浅井大輔 中島秀喜 大石真也 藤井信孝: 新規 KSP 阻害剤の抗腫瘍効果に関する研究(第 2 報) 第 30 回日本 DDS 学会 2014. 7. 31. (慶応義塾大学薬学部芝キャンパス、東京都港区)
4. 武永美津子 竹内智起 都倉享恵 濱口明美 山本有貴 太田有紀 浅井大輔 中島秀喜 大石真也 藤井信孝: 新規 KSP 阻害剤の抗腫瘍効果に関する研究 第 29 回日本 DDS 学会 2013. 7. 4. (京都テルサ、京都府京都市)

[その他]

ホームページ

<http://www.marianna-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武永 美津子 (TAKENAGA, MITSUKO)

聖マリアンナ医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号: 10236490

(2) 研究分担者

太田 有紀 (OHTA, YUKI)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号: 60387066