

令和元年5月10日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10530

研究課題名(和文) 大腸癌における Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体阻害による新規抗癌治療法の開発研究課題名(英文) Development of novel colon cancer treatment by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitor

研究代表者

二宮 致 (Ninomiya, Itasu)

金沢大学・附属病院・准教授

研究者番号：60345618

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE)のうちNHE5の大腸癌における意義を解析しNHE5特異的阻害剤による新規抗がん治療法を開発する事を目的とした。癌組織では細胞外が酸性で細胞内がアルカリであり細胞内H<sup>+</sup>を細胞外に排出にNHEが深く関与している。NHE5は大腸癌組織において高頻度で過剰発現が確認され、NHE5が癌細胞における細胞外およびエンドゾーム内の弱酸性化環境形成に伴う癌細胞の細胞増殖能・浸潤能・転移能の獲得に重要な役割を果たしている可能性がある。NHE1阻害剤をリード化合物としてNHE5選択的阻害剤を分子設計合成し、NHE5活性の阻害効果と細胞増殖抑制効果を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞は細胞内に発生したプロトン( H<sup>+</sup> )を細胞膜局在性Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体(NHE)によって細胞外へ排出し、細胞内を弱アルカリ、細胞外を弱酸性環境下に制御し、細胞運動・浸潤能を亢進し、細胞外基質の分解を誘起し浸潤・転移を促進する。細胞膜局在性NHEアイソフォームであるNHE5は大腸癌組織において高頻度で過剰発現している。NHE5は癌細胞における細胞外およびエンドゾーム内の弱酸性化環境形成に伴う細胞増殖能・浸潤能・転移能の獲得とチロシンカイネースレセプターのリサイクリングを行っている。NHE5選択的阻害剤によるNHE5の抑制は種々のレセプターの抑制を介した新規抗癌治療法の可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Malignant tumors have an acidic extracellular pH and alkaline intracellular pH, which is facilitated by altered metabolism of tumor cells and the hypoxic tumor microenvironment. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchangers (NHEs) play important roles in secreting protons in tumor cells. Neuron enriched NHE5 dynamically shuttles between the plasma membrane and recycling endosomes, serving as a mechanism that regulates pH across the endosomal and plasma membranes. NHE5 plays an important role in endocytic recycling of tyrosine kinase receptor. In this study, we try to establish a new therapeutic strategy for colon cancer by synthesizing novel NHE5 specific inhibitor.

研究分野：消化器癌

キーワード：大腸癌 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

細胞にとって細胞内イオン環境の制御はその生存に必須である。これを制御するタンパク質のひとつに Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>交換輸送体 (NHE) がある。NHE は生体膜を介した Na<sup>+</sup>と H<sup>+</sup>の交換輸送を 1:1 で行うイオン性輸送膜タンパク質である。哺乳動物の 11 種の NHE アイソフォームの内、NHE1-9 はイオン交換輸送活性を示し、NHE1-5 は細胞膜局在性であり、NHE6-9 はオルガネラ膜局在性である。このうち、NHE1 はほぼ全ての臓器において発現が認められているが、その他の NHE は臓器特異的であるとされている。がん細胞は一般的に嫌氣的解糖による糖代謝に伴い、細胞内ではプロトンが発生するが、このプロトンは NHE によって速やかに細胞外へ排出される。がん細胞は、この機構により正常細胞と異なり細胞内は弱アルカリ性環境、細胞外は弱酸性環境下に制御される。このような環境は細胞の運動・浸潤能を亢進し、ヒアルロン酸などの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。また、カベオラ内の CD44 は高分子ヒアルロン酸と結合しているが、NHE により活性化された Hyal-2 タンパク質が高分子ヒアルロン酸を分解する。これにより発生した低分子ヒアルロン酸は CD44 と結合することで、がん細胞は抗がん剤抵抗性を獲得する。NHE5 は正常細胞の内、神経細胞に高発現していることが明らかになっているが、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 調節にも関与し、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タンパクの分解やリサイクリングに関与していることが分かっている。本研究の研究協力者である沼田教授らは Glioma 細胞において NHE5 を特異的に阻害すると、細胞膜上に発現している c-met や EGFR などの受容体型チロシンキナーゼのリサイクリングが抑制された結果、細胞膜上の受容体の減少と増殖抑制が起こることを確認した。しかし、がん細胞における NHE5 の役割は不明である。また、臨床検体を用いた予備実験の免疫組織染色において NHE5 が大腸がん・乳がんなどの細胞膜および細胞質で過剰発現が確認された。特に大腸がん組織にて高頻度で過剰発現が観察された。以上の理由より、NHE5 は神経細胞のみでなくがん細胞の細胞膜及びリサイクリングエンドゾーム上で細胞外やエンドゾーム内の弱酸性環境形成に重要な役割を果たしており、がん細胞の浸潤・増殖能の獲得、抗がん剤抵抗性の獲得、受容体型チロシンキナーゼのリサイクリングに関与しているという着想に至り、NHE5 をがん治療のターゲットとする有用性が示唆された。しかしながら、NHE1 への阻害活性を低減させ、NHE5 のみへ高い阻害活性を有した NHE5 特異的阻害剤は存在しなかったため、本研究においてこの阻害剤の開発を試みた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、NHE アイソフォームのひとつであり、大腸がんの細胞膜に高発現している NHE5 に対する特異的阻害剤を創出することである。その手法として、ナトリウムプロトン交換輸送体として NHE1、NHE5 それぞれ 1 種のみを有する細胞に対して合成した化合物を添加し、それぞれに対する阻害活性を評価し、その NHE5 選択性を決定する。

## 3. 研究の方法

第一に、ナトリウムプロトンの交換輸送が NHE1 または NHE5 のみに依存させるため、2 種類の細胞種 PS120 hNHE5 細胞 (NHE 全欠損ハムスター繊維芽細胞である PS120 細胞にヒト NHE5 発現ベクターを遺伝子導入)、AP-1 rNHE1 細胞 (NHE 全欠損ハムスター繊維芽細胞である AP-1 細胞にラット NHE1 発現ベクターを遺伝子導入) を作成した。また、ラットグリオーマ細胞の親株、その NHE5 knockdown 細胞株およびヒト NHE5 導入細胞、ヒト乳がん細胞およびその NHE5 knockdown 細胞、さらに食道扁平上皮がん細胞なども作成した。第二に、NHE5 阻害剤を創出するための NHE5 阻害活性の評価系を確立するために、5-(and-6)-carboxy SNARF-1 acetoxymethyl ester acetate (以下 SNARF-1) を用いた細胞内 pH 測定の実験系として塩化アンモニウムプレパルス法を用いた。手法として、SNARF-1 で染色した細胞を NH<sub>4</sub>Cl 含有バッファーに懸濁させることで細胞内の pH を一時的にアルカリ化させ、その後、速やかに NH<sub>4</sub>Cl 不含バッファー (阻害剤含有) に交換することで、細胞内を急激に酸性化させる。ここからの経時的な細胞内 pH 変化を FACS verse を用いて測定することで化合物の阻害活性を評価する。また、NHE が細胞増殖に関与していることから、WST-8 を用いて細胞数をカウントすることで化合物の細胞増殖抑制活性を評価する。第三に NHE5 特異的阻害剤の合成である。リード化合物としてサノフィ・アベンティス社により NHE5 特異的阻害剤として開発された *N*-Diaminomethylene-4-(6,8-dichloro-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline-4-yl) benzenesulfonamide を選択していたが、当該化合物の合成を行ったが、上記の NHE5 阻害活性および細胞増殖抑制活性を示さなかった。そこで、NHE アイソフォーム非選択的阻害剤でありカリウム保持性利尿薬として用いられている Amiloride をリード化合物に選択し、当化合物のピラジン環 5 位を様々な置換基へ変換した誘導体を合成し、その NHE5 阻害活性、細胞増殖抑制活性を評価する。最終的に「NHE5 特異的阻害活性を有する化合物」を 1 つ以上創出して本研究を完了とする。

## 4. 研究成果

平成 28 年度は *N*-Diaminomethylene-4-(6,8-dichloro-2-methyl-1,2,3,4-tetrahydro-isoquinoline-4-yl) benzenesulfonamide をリード化合物とすべく、当該化合物 (YS1-67) を合成し、NHE 欠損ハム

スター繊維芽細胞、そのラット NHE1 導入細胞およびヒト NHE5 導入細胞、ラットグリオーマ細胞の親株、その NHE5 knockdown 細胞株およびヒト NHE5 導入細胞、ヒト乳がん細胞およびその NHE5 knockdown 細胞、さらに食道扁平上皮がん細胞などに対する細胞増殖抑制活性を調べたが、200  $\mu\text{M}$  の高濃度でもいずれの細胞に対しても全く活性は見られなかった。さらに SNARF-1 を用いた細胞内 pH 測定系による NHE5 阻害実験においても十分な活性は得られなかった。これらの細胞は、Amiloride 誘導体の一つで非特異的な NHE 阻害剤である 5-(N,N-hexamethylene)amiloride に対しては  $\text{IC}_{50}$  値にして 10  $\mu\text{M}$  から 20  $\mu\text{M}$  の高い感受性を示すことから、平成 29 年度は Amiloride をリード化合物にした阻害剤の開発を目指すこととした。平成 29 年度は、YS2-27-2-1 および YS2-30-1 の 2 つの化合物を合成し、細胞増殖抑制活性および NHE5 阻害活性を検討した。その結果、YS2-27-2-1 は NHE 欠損ハムスター繊維芽細胞のヒト NHE5 導入細胞に対して YS2-30-1 や Amiloride よりも強い増殖抑制活性を示した。Amiloride に水酸基を導入した YS2-30-1 では活性が減弱することから、増殖抑制効果には疎水性の高い構造が重要であると示唆された。一方、YS2-27-2-1 (500  $\mu\text{M}$ ) および YS2-30-1 (400  $\mu\text{M}$ ) は SNARF-1 を用いたヒト NHE5 導入細胞に対する NHE5 阻害実験において Amiloride (4 mM) よりも強い阻害活性を示すことが確認できた (図 1)。

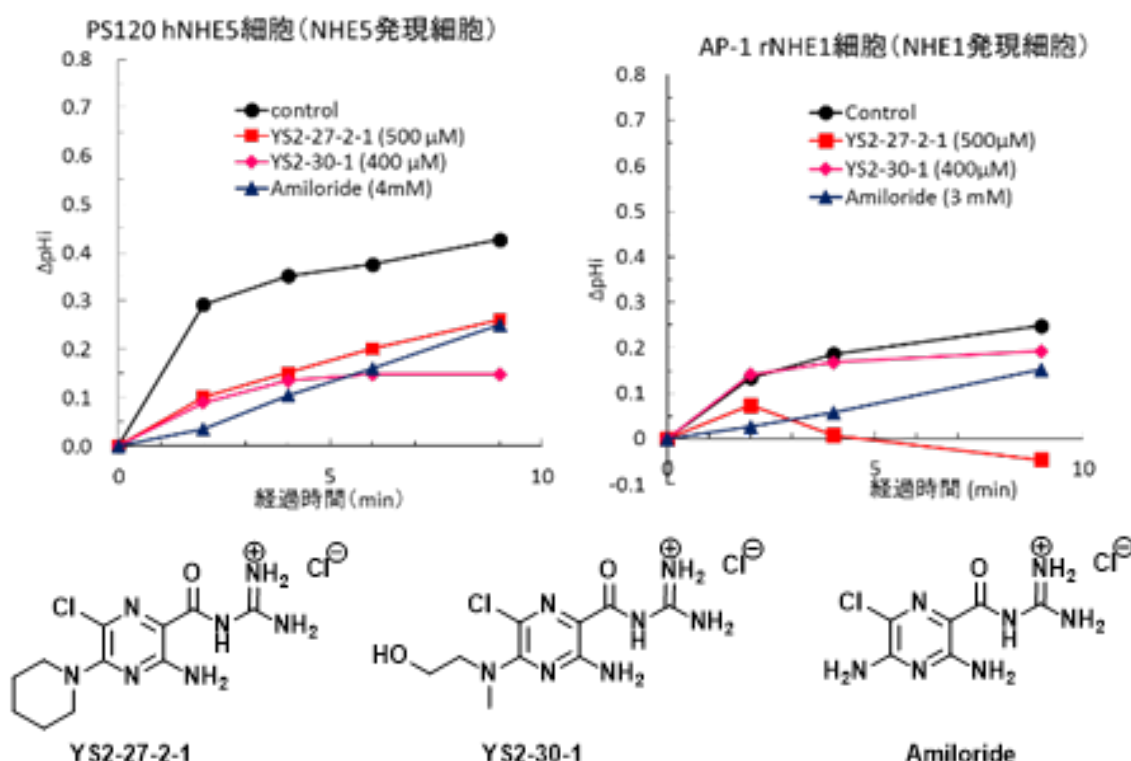


図 1. 細胞内酸性化からの継時的細胞内 pH 測定による NHE5 及び NHE1 阻害活性評価と合成した Amiloride 誘導体の構造

平成 30 年度は、上記の結果より、Amiloride 誘導体の水酸基の重要性、水酸基までの距離に重きを置き、次の 4 つの誘導体を合成した (図 2)。

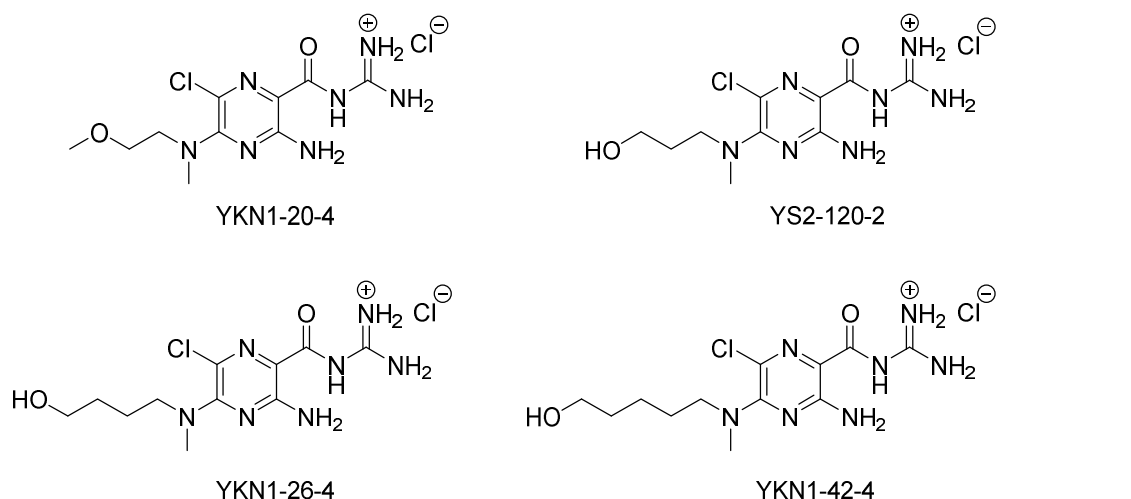


図 2. 各種 Amiloride 誘導体の構造

水酸基の重要性の評価のために、水酸基をメトキシ基で保護した YKN1-20-4 を合成した。水酸基までの適切な距離の探索のために炭素鎖長 3 から 5 まで変えた YS2-120-2 (炭素鎖長 3)、YKN1-26-4 (炭素鎖長 4)、YKN1-42-4 (炭素鎖長 5) を合成し、これらの化合物の NHE 阻害活性、細胞増殖抑制活性を評価した。しかしながら、いずれの化合物も細胞増殖抑制活性を有さなかった。この結果から、増殖抑制には更なる疎水性の導入が必要であると示唆された。YS2-30-1 のヒドロキシ基をメトキシ基で保護した YKN1-20-4 (400  $\mu$ M) は AP-1 rNHE1 細胞において細胞内酸性化後、細胞内 pH が上昇していないため、NHE1 阻害活性が著しく向上したことが分かった。一方で PS120 hNHE5 細胞において、YS2-30-1 (400  $\mu$ M) よりも細胞内 pH の上昇が起こっているため、NHE5 阻害活性は減弱したことが分かった (図 3)。

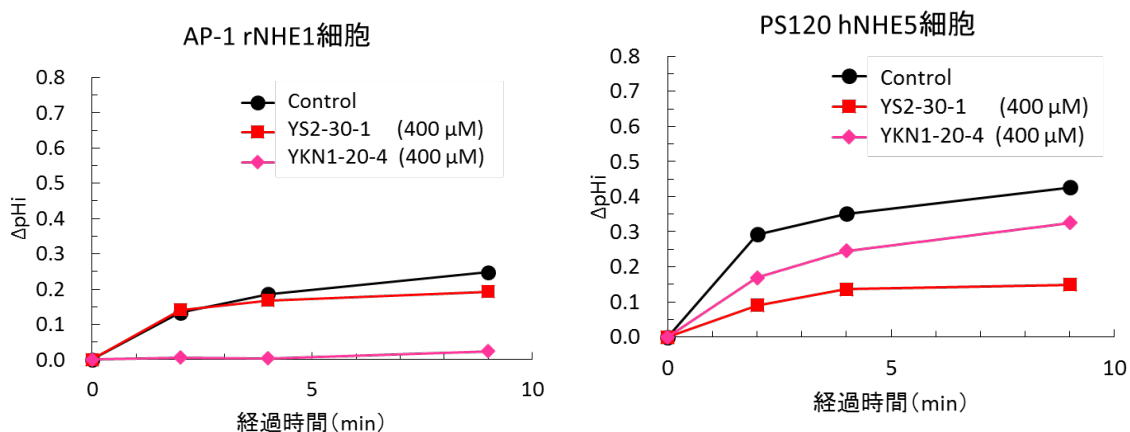


図 3. YS2-30-1 と YKN1-20-4 の NHE1 及び NHE5 阻害活性

このことより、NHE5 選択性にはヒドロキシ基が必要であることが示唆された。続いて、YS2-120-2 (炭素鎖長 3)、YKN1-26-4 (炭素鎖長 4)、YKN1-42-4 (炭素鎖長 5) の NHE5 選択性を評価したところ、YS2-120-2 (400  $\mu$ M) および YKN1-26-4 (400  $\mu$ M) は細胞内酸性化後、細胞内 pH が上昇していないため、NHE1 阻害活性が向上した。一方、細胞内酸性化後、細胞内 pH が YS2-30-1 よりも上昇したため、NHE5 阻害活性が減弱した。一方、YKN1-42-4 (400  $\mu$ M) は NHE5 阻害活性および NHE1 阻害活性が向上した (図 4)。

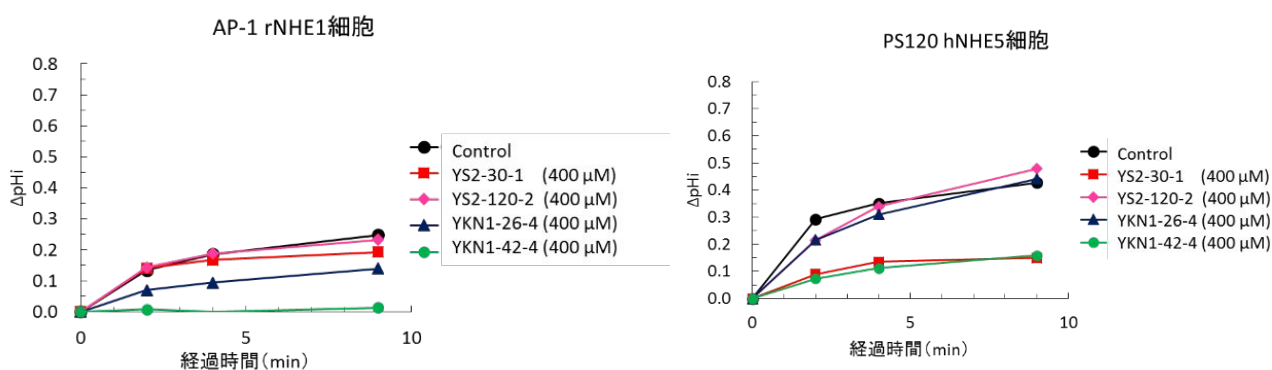


図 4. 炭素鎖長 2 から 5 の NHE1 及び NHE5 阻害活性

以上の結果より Amiloride のピラジン環 5 位の窒素原子よりメチレン 2 個を介して水酸基を有する YS2-30-1 を NHE5 選択的阻害剤として創出できた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：宇都義浩

ローマ字氏名：Yoshihiro Uto

所属研究機関名：徳島大学

部局名：社会産業理工学研究部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：20304553

研究分担者氏名：遠藤良夫

ローマ字氏名：Yoshio Endo

所属研究機関名：金沢大学

部局名：がん進展制御研究所

職名：准教授

研究者番号（8 桁）：30211783

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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、研究者個人に帰属されます。