

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591578
 研究課題名（和文） 新規ピロリジン誘導体による肝細胞癌の肝内転移抑制に関する研究
 研究課題名（英文） Inhibition of intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma by novel pyrrolidine derivatives
 研究代表者
 唐子 堯（KARAKO TAKASHI）
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：00313213

研究成果の概要：

本研究では、癌細胞の浸潤や転移において重要な役割をもつマトリクス・メタロプロテナーゼ（MMP）の活性を阻害することが可能な新規ピロリジン誘導体を合成し、その有効性を検討することを目的とした。研究代表者らと共に山東大学「中・日新薬スクリーニングセンター」を設立した研究協力者によって、本研究計画において多くの種類の新規ピロリジン誘導体が合成され、有効な化合物のスクリーニングが実施された。その結果、合成された新規ピロリジン誘導体の一種である LY52 が、他の細胞に毒性を示すことなく、乳癌細胞 MDA-MB-231 の増殖を有意に阻害することを見出した。また、当該化合物は、化合物設計時の想定どおり、ターゲットとする MMP-2 の酵素活性を有意に阻害した。さらに、癌培養細胞株を用いた *in vitro* 解析により、当該化合物が癌細胞の浸潤を有意に阻害することが明らかとなった。また、癌を移植したモデルマウスを用いた *in vivo* 実験では、当該化合物の経口投与により肺に形成される腫瘍結節数が有意に減少した。以上のことから、新規ピロリジン誘導体 LY52 は、癌細胞の増殖のほか、間質組織への浸潤及び他の臓器への転移を阻害することができ、抗癌効果をもつ化合物として有効であることが示唆された。

一方、本研究計画では、抗癌効果をもつことが明らかとなった化合物の構造に基づいて、その結果を化合物設計にフィードバックさせて更なる新規化合物の設計及び化合物ライブラリの拡大を図ってきた。現在、MMP のように癌の進行に重要なタンパク質分解酵素をターゲットとして設計した新規化合物群を有するライブラリが構築された。従って、本研究計画による成果は、今後のタンパク質分解酵素をターゲットとした創薬研究に対して大きく貢献することができたと考えている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
平成 20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：肝臓外科学

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌（以下、肝癌）は、現時点では外科的な切除が有効な治療方法であるが、肝癌の再発率は6割を超えている。その最大の原因は、癌細胞の浸潤による血管侵襲や、周囲への増殖などの肝内転移がその最大の原因と考えられおり、それらを抑制する抗がん剤の開発は、肝癌の克服や患者 QOL の改善ために重要な課題である。

肝癌の肝内転移には、肝癌細胞が過剰発現するマトリクス・メタロプロテイナーゼ（MMP；とりわけ MMP-2 および MMP-9）やそれによる細胞外マトリクス成分の分解が関与していることが示唆されている。本研究代表者らは最近、癌転移に対する新規化学療法剤の開発を目指し、MMP-2 および MMP-9 の基質結合部位をターゲットとして設計・合成した 100 種以上のピロリジン誘導体についてスクリーニングを行い、これら誘導体の一部が *in vitro* の系において MMP の活性を抑制することを見出した。さらに、これらのピロリジン誘導体が、モデル動物を用いた *in vivo* の系においても、移植癌の転移や慢性肝炎の発症、肝硬変への進行を抑制することを示唆する結果を得た。これらの予備的知見から、本研究代表者らが有するピロリジン誘導体は肝内転移に対する新規化学療法剤の候補として期待でき、これら誘導体の有効性をさらに進んだ生化学的・病理学的研究により評価することが必要と考えられた。

2. 研究の目的

肝癌は、患者数の増加と高頻度な再発が問題となっているが、その再発を防止するような有効な化学療法剤の開発は立ち遅れている。前述のように、本研究代表者らは、癌に特徴的なメカニズムに着目した創薬研究を展開し、癌細胞の浸潤において重要な MMP を標的とした新規化合物を開発してきた。本研究では、新規に合成された化合物も含めて、これまで明らかにした予備的知見に基づいて肝癌の肝内転移抑制に対するピロリジン誘導体の有効性を検証するとともに、その疾患制御のメカニズムを解明することを目的とした。本研究を実施することにより、主に以下にあげる事項が成果として輩出できると期待された。

- (1) MMP 活性を抑制する化合物の創生
- (2) モデル動物による転移抑制評価系の確立
- (3) 肝癌の肝内転移抑制剤の提案

3. 研究の方法

本研究計画では、第一段階として、ピロリジン誘導体群から MMP の活性や細胞外マトリクス成分の分解を効果的に抑制する化合物をスクリーニングし (*in vitro* 実験) 次に、モデル動物を用いて肝内転移抑制を評価した (*in vivo* 実験)。さらに、疾患制御のメカニズムを詳細に解析することで (生化学および組織化学的研究) 肝癌の増悪と再発の原因となる肝内転移抑制のための化学療法剤としての候補化合物を開発することを目的とした。

- (1) 培養細胞を用いた *in vitro* 実験による候補化合物のスクリーニング

培養細胞を用いた *in vitro* 実験によるスクリーニングを実施した。すでに作製している 100 種以上のピロリジン誘導体について、主に以下の実験を行い、MMP 活性抑制効果が高く転移抑制に有望な誘導体を選定した。さらに、構造活性相関に基づいて新規誘導体を設計・合成し、候補化合物数の増加を試みた。

培養細胞における MMP の発現に対する阻害効果 (ゼラチン・ザイモグラフィ法)
培養細胞の浸潤に対する効果 (ボイデン・チャンパー法)
ピロリジン誘導体の細胞毒性に関する評価 (MTT 法)

- (2) 肝癌モデル動物を用いた *in vivo* 実験による肝内転移抑制効果の病理学的評価

in vitro 実験による候補化合物のスクリーニングで選定された化合物に関して、モデル動物を用いた *in vivo* 実験を実施した。癌細胞を移植させたモデル動物 (マウス) に候補化合物を投与し、移植癌細胞の転移に対する影響を病理学的に評価した。また、当該ピロ

リジン誘導体の動物個体に対する毒性についても検討した。この *in vivo* 実験の結果をもとにして、候補化合物の絞込みや構造活性相関に基づく新規ピロリジン誘導体設計へのフィードバックを行った。

(3) 疾患制御メカニズムに関する生化学的および組織化学的研究

in vivo 実験において転移抑制効果が高いと評価された候補化合物の作用メカニズムや生体影響について、主に以下の実験を実施した。

培養細胞および動物血清における各種 MMP (MMP-2、MMP-9) および MMP 阻害因子 (TIMP) の発現を、SDS-PAGE や ELISA 法で評価する。

各種細胞外マトリクス成分 (ICAM21、CD54、コラーゲン、ラミニン、ヒアルロン酸など) の発現を、ELISA 法やウエスタンブロット法、フローサイトメトリー法で分析する。

細胞内シグナル伝達に関わる各種因子 (TGFβ1、Smad、ERK1 など) の発現を組織化学的手法を用いて分析する。

モデル動物の肝組織におけるアポトーシス評価のため、c-fos、bcl-2 および Bax の発現を組織化学的手法や TdT-mediated dUTP nick labeling (TUNEL) 法を用いて解析する。

肝細胞の形態学的変化や微細血管の伸長を病理学的に評価する。

4. 研究成果

研究代表者は、研究協力者とともに設立した山東大学「中・日新薬スクリーニングセンター」を主軸として新薬開発に関する研究協力体制を構築した。本研究代表者らは、その研究体制に基づき、研究協力者がもつコンピュータ分子設計技術を利用して新規化合物の開発を行ってきた。その結果、ピロリジン骨格を有した新規ピロリジン誘導体を 100 種類以上有する化合物ライブラリを構築した。本研究では、その化合物群のなかでとりわけ有効性が高いと示唆された化合物 LY52 (図 1) に関して様々な検討を試みた。

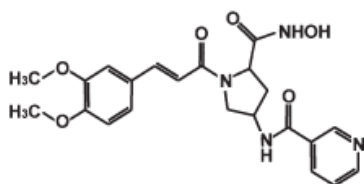


図 1 LY52 の化学構造式

当該化合物 LY52 が標的とする MMP の活性を阻害するかを検証するために、ゼラチンザイモグラフィ法を用いた解析を行った。その結果、LY52 を添加することによって MMP によるコラーゲンの分解が有意に阻害されたことから、LY52 は MMP 阻害剤として機能することが明らかとなった。

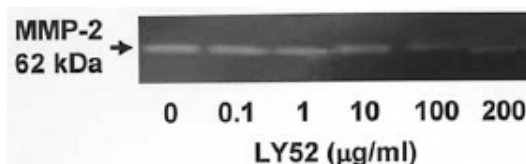


図 2 LY52 による MMP 活性阻害効果

続いて、LY52 が癌細胞の増殖への阻害効果を有するかを MTT アッセイ法により解析した。その結果、検討に用いた乳癌細胞を LY52 と共に長期に培養した場合、LY52 は濃度依存的に乳癌細胞の増殖を阻害した。従って、LY52 は癌細胞の増殖を抑制する能力をもつことが明らかとなり、その効果は肝癌細胞でも実証された。

さらに、癌細胞の浸潤に対する LY52 の効果を *in vitro* で検証するために、人工的なコラーゲンゲルを用いたマトリゲルアッセイを行った。その結果、LY52 を添加することによってコラーゲンゲルを分解して浸潤する癌細胞の数が有意に減少した (図 3)。この効果は、阻害効率は異なるものの、種々の肝癌細胞を用いた場合でも確認された。従って、LY52 は MMP の活性阻害を介して癌細胞の浸潤を阻害できることが示唆された。

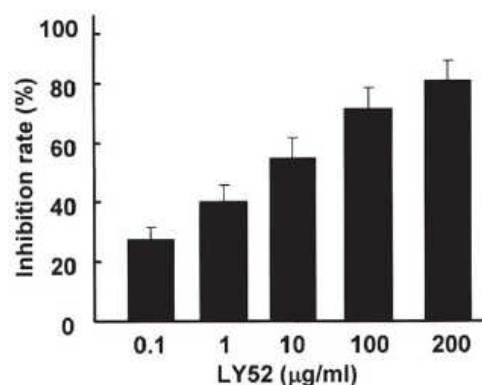


図 3 LY52 による浸潤阻害効果

一方、様々な *in vitro* 解析で癌細胞に対する LY52 の効果が確認されたので、当該化合物を用いた *in vivo* 解析を実施した。C57/BL6 マウスに対して癌細胞及び各種濃度

の LY52 を静脈接種した結果、LY52 の投与によってマウスの肺に形成された癌結節の数が有意に低下した。また、その際にマウスに対して毒性は確認されなかった。このことから、LY52 は動物個体内において癌細胞の転移を抑制する能力をもつことが示唆された。

以上の結果より、新規に合成されたピロリジン誘導体の一種である LY52 は、MMP 阻害剤として機能し、癌細胞の増殖や浸潤の抑制、そして生物体内における癌細胞の転移を抑制する能力をもつことが本研究により明らかとなった。従って、当該化合物 LY52 が、新規化学療法剤としての有効性をもつことが示唆された。

さらに、本研究では、得られた解析結果を化合物設計の段階にフィードバックさせ、より有効性の高い化合物の創出を図ることを実行した。前述のように明らかとなったピロリジン誘導体 LY52 に関する本研究で得られた成果を、ターゲットの選定及び化合物の設計の行程に導入した。それによって、現在は新たな化合物がライブラリに付加され、それらに関する有効性の評価が進行し、その中から有用な化合物が見出されている。従って、本研究で得られた成果は、新規化合物 LY52 の有用性を示すと共に、今後進行する「タンパク質分解酵素をターゲットとした創薬研究」の基盤となった。また、本研究は研究代表者らが構築した研究協力体制に基づいて行われたが、前述した成果は、当該研究体制の連携強化及び創薬研究体系の構築にも大きく貢献した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

Chen MH, Cui SX, Cheng YN, Sun LR, Li QB, Xu WF, Ward SG, Tang W, Qu XJ: Galloyl cyclic-imide derivative CH11041 inhibits tumor invasion through suppressing matrix metalloproteinase activity. *Anticancer Drugs* **19**, 957-965, 2008. 査読有

Cheng XC, Wang Q, Fang H, Tang W, Xu WF: Synthesis of new sulfonyl pyrrolidine derivatives as matrix metalloproteinase inhibitors. *Bioorg Med Chem* **16**, 7932-7938, 2008. 査読有
Cheng XC, Wang Q, Fang H, Tang W, Xu WF: Design, synthesis and evaluation of novel sulfonyl pyrrolidine derivatives as matrix

metalloproteinase inhibitors. *Bioorg Med Chem* **16**, 5398-5404, 2008. 査読有
Yuan H, Li X, Wu J, Li J, Qu X, Xu W, Tang W: Strategies to overcome or circumvent p-glycoprotein mediated multidrug resistance. *Curr Med Chem* **15**, 470-476, 2008. 査読有

Liu J, Li X, Cheng YN, Cui SX, Chen MH, Xu WF, Tian ZG, Makuuchi M, Tang W, Qu XJ: Inhibition of human gastric carcinoma cell growth by treatment of N(3)-o-toluyyl-fluorouracil as a precursor of 5-fluorouracil. *Eur J Pharmacol* **574**, 1-7, 2007. 査読有
Qu XJ, Cui SX, Tian Z, Li X, Chen MH, Xu WF, Inagaki Y, Deng YB, Makuuchi M, Nakata M, Tang W: Induction of apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells by synthetic antineoplaston A10. *Anticancer Res* **27**, 2427-2431, 2007. 査読有

Tang W, Guo Q, Qu XJ, Inagaki Y, Seyama Y, Midorikawa Y, Gai R, Kokudo N, Sugawara Y, Nakata M, Makuuchi M: KL-6 mucin is a useful immunohistochemical marker for cholangiocarcinoma. *Oncol Rep* **17**, 737-741, 2007. 査読有
Li X, Qu XJ, Xu WF, Tang W: Recent advances in P-gp-mediated MDR reversal mechanisms. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* **29**, 607-617, 2007. 査読有

Guo Q, Tang W, Inagaki Y, Kokudo N, Sugawara Y, Karako H, Nakata M, Makuuchi M: Subcellular localization of KL-6 mucin in colorectal carcinoma cell lines: association with metastatic potential and cell morphology. *Oncol Rep* **17**, 1057-1060, 2007. 査読有

[学会発表](計 4 件)

Inagaki Y, Tang W, Qu XJ, Cui SX, Li X, Yuan YX, Tian ZG, Xu WF, Nakata M, Sugawara Y, Kokudo N: ANTINEOPLASTON A10 INHIBITS THE GROWTH OF HEPATOMA CELLS THROUGH THE INDUCTION OF APOPTOSIS. **13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine**, Crete, Greece, Oct 10, 2008.
Tang W, Inagaki Y, Xu HL, Seyama Y, Nakata M, Sugawara Y, Kokudo N: Different expression profile of KL-6 mucin in primary liver cancer tissues. **第108回日本外科学会定期学術集会**. 長

崎, 日本, 2008年5月16日.
Inagaki Y, Xu HL, Kokudo N, Sugawara Y, Nakata M, Tang W: Availability of KL-6 mucin as a tool for discriminating cholangiocarcinoma from hepatocellular carcinoma. **Congress of Biochemistry and Molecular Biology 2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会合同大会)**. 横浜, 日本, 2007年12月13日.

Inagaki Y, Xu HL, Tang W, Nakata M, Sugawara Y, Kokudo N: KL-6 mucin as a diagnostic marker for cholangiocarcinoma. **China Japan Joint Medical Workshop on Drug Discoveries and Therapeutics**. Jinan, China, May 26-30, 2007.

〔図書〕(計 0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

該当なし

取得状況(計 0件)

該当なし

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

唐子 堯 (KARAKO TAKASHI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 00313213

(2) 研究分担者

幕内 雅敏 (MAKUUCHI MASATOSHI)

東京大学・医学部附属病院・名誉教授

研究者番号: 60114641

中田 宗宏 (NAKATA MUNEHIRO)

東海大学・工学部・教授

研究者番号: 00266371

(3) 連携研究者

該当なし