

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22568

研究課題名(和文) 癌細胞シグナル活性化因子14-3-3 を標的とした新規膵臓癌治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of new therapeutic agents for pancreatic cancer targeting 14-3-3 $\zeta$ 

研究代表者

佐谷 秀行 (Saya, Hideyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・教授

研究者番号：80264282

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は数年前よりBenzaldehyde (BA) という芳香族アルデヒドのがん細胞抑制効果に注目してその作用機序の解明を行ってきた。その結果、BAは正常細胞には細胞傷害性をほとんど示さず、膵臓がん細胞BxPC3、肺がん細胞株A549などに対して顕著な腫瘍抑制効果を示し、その機構として14-3-3 がクライアント蛋白のリン酸化部分に結合するのを阻害することを見出した。本研究では、分子標的薬や放射線治療に耐性になった細胞では14-3-3 の標的であるAxlが上昇することに着目し、その発現をBAが抑制することで耐性克服効果があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Axlはがんの悪性化に関わるきわめて重要な因子であり、特にオシメルチニブなどの分子標的薬、放射線治療などに耐性となった細胞においてAxlの発現が高まることが見出されており、その意義と分子機構が注目されている。今回の研究によって14-3-3 を介した Axlの安定化および活性化をBenzaldehydeが阻害することが明らかとなり、この化合物が何故治療抵抗性細胞に対して効果を発揮するのか、その一端を明らかにすることができた。今後この極めて毒性の低い化合物が膵臓がんなど治療抵抗性がんの治療に用いることができるように、詳細な非臨床および臨床研究を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：We have been elucidating the mechanism of action by focusing on the cancer cell-suppressing effect of aromatic aldehyde called Benzaldehyde (BA) for several years. As a result, BA showed no cytotoxicity to normal cells and showed a remarkable tumor suppressive effect on pancreatic cancer cell BxPC3, lung cancer cell line A549, etc. BA was found to inhibit the binding of 14-3-3 to the phosphorylated moiety of its client protein. In this study, we focused on Axl, which is one of the client proteins of 14-3-3, because Axl is increased in cells which become resistant to molecular-targeted drugs and radiotherapy. We found that BA suppresses Axl expression and may have a tolerance-overcoming effect.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：14-3-3 ベンズアルデヒド

## 1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは最も難治性の高いがんであり、わが国でも発症が増加傾向である。現時点では膵臓がんを発症すると高率に本疾患で死亡する状況である。多くの症例が発見された時点ですでに進行がんであり、根治手術が難しく、切除率も 20% 以下でその手術施行者の生存期間中央値も 20 ヶ月と非常に短い。膵臓がんにおいては近年開発の著しい分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤などの新規治療薬でも有効な成績が出ていない状況である。

申請者は数年前より Benzaldehyde という最もシンプルな芳香族アルデヒドのがん細胞抑制効果に注目してその作用機序の解明を行ってきた。この物質は 1980 年台にその誘導体を抗がん剤として開発する多施設における臨床試験が行われ安全性までは確認されていたが、社会的な事情から企業による開発が中断されていた。しかし、手術不可能な膵臓がん症例に対して安全性の確認された Benzaldehyde 誘導体投与が医師主導の臨床研究下において行われ、有効例があったため、その作用機序の解明が非常に重要であると考えた。

その結果、Benzaldehyde は正常細胞には細胞障害性をほとんど示さず、膵臓がん細胞 BxPC3、肺がん細胞株 A549 などに対して顕著な腫瘍抑制効果を示し、がん細胞で活性化されている PIK3/AKT/mTOR、ERK、NF- $\kappa$ B、STAT3 などの複数の経路を抑制することが確認された。単一の物質が複数のがん活性化経路を抑制するメカニズムはがん細胞シグナル活性化因子である 14-3-3 ががん活性亢進経路に存在する複数のクライアント蛋白のリン酸化部分に結合する蛋白-蛋白間結合を Benzaldehyde が阻害するためそれらのリン酸化状態が低下するためである事を確認してきた。

## 2. 研究の目的

14-3-3 は 7 つのアイソフォームを有するリン酸化結合蛋白であり 700 以上のクライアント蛋白が存在するといわれている。細胞における重要な作用を多く担っている物質であるが、近年多くのがんにおいて 14-3-3 が高発現し腫瘍形成能や転移、化学療法抵抗性、放射線治療抵抗性にも関わる予後不良因子であることが報告されてきている。そのため新たながん治療の標的として注目されているが、有効な治療薬はまだ開発されていない。14-3-3 をノックアウトすることは大きな副作用が生じる可能性が高く蛋白-蛋白間結合を阻害する Benzaldehyde の作用機序は理想的なメカニズムであると考えている。14-3-3 が関わる多系統の抑制を行うことで、既存の抗がん剤には得られなかった腫瘍細胞の不均一性にも対応可能な治療効果を期待できる可能性がある。

本研究は難治性膵臓がん細胞に対して、14-3-3 抑制作用を介した Benzaldehyde を用いた画期的治療法の開発を目指して実施した。

## 3. 研究の方法

(1) 分子標的薬 Osimertinib 耐性に関わる分子 Axl が 14-3-3 $\zeta$  クライアント蛋白である事に注目し Benzaldehyde が Axl 抑制効果を示すか、更に Osimertinib 耐性克服の可能性について膵臓がん細胞株 BxPC3 細胞を用いて検討した。具体的には、膵臓がんマウスモデルを用いて Benzaldehyde が Axl 抑制を示すかを確認した。

方法：KRAS 変異、p53 変異を導入したマウスから発生した膵臓がん細胞株 (KPC cell line) をマウスの皮下及び膵臓同所に移植を行い、Benzaldehyde 投与群、非投与群における腫瘍増殖抑制効果・転移能の変化などを評価した。また、抗 Axl 抗体を用いて腫瘍組織の免疫組織染色を行い、Benzaldehyde 投与による Axl 発現抑制の有無を確認した。

(2) 14-3-3 は放射線治療を行うことで発現が上昇し、それが治療抵抗性と関わっていることが報告されている。そこで、Benzaldehyde と放射線治療とを併用することで、放射線によって生ずる 14-3-3 高発現を抑制し、放射線治療の効果を高めることが出来るかについて検証を行った。

方法：放射線と Benzaldehyde の併用効果を colony formation assay を用いて検討した。

## 4. 研究成果

(1) Benzaldehyde (BA) 高感受性の BxPC3 細胞において、Axl 蛋白の BA 曝露による発現変化をウェスタンブロットにて確認した。その結果、Axl の発現は BA 投与後 2 時間で顕著に抑制されることが確認できた(図 1)。

Benzaldehyde がオシメルチニブ耐性に対して作用するか検討するため、BxPC3 細胞にオシメルチニブ 3  $\mu$ M、10 日間連日投与を行い、オシメルチニブに耐性を持つ細胞(O-BxPC3)を取得した。そして、BA 投与 48 時間目で Cell titer glo アッセイを行い、増殖抑制効果を評価した。O-BxPC3 は明らかに親株 P-BxPC3 と比較して BA に対する感受性が高まっている事が確認された(図 2)。

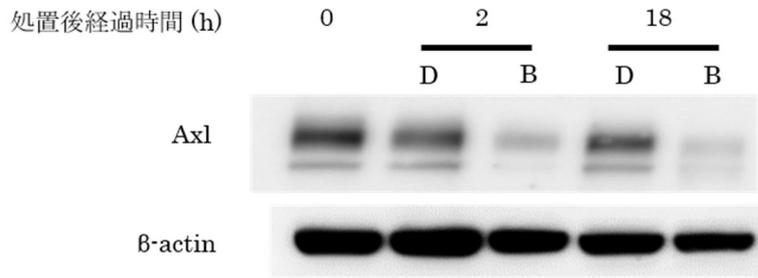


図1: BxPC3細胞におけるAxl蛋白発現解析

D: DMSO シール(+) $1\%O_2$  B: ベンズアルデヒド $500\mu M$  シール(+) $1\%O_2$

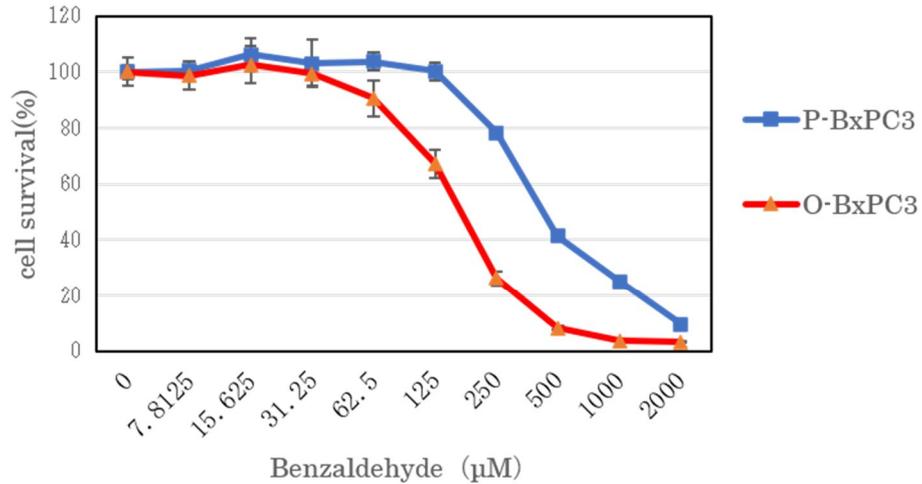


図2: オシメルチニブ耐性細胞に対するベンズアルデヒドの効果

C57BL/6 (7w, ) に KPC cell line (Pdx1- Cre, lox-stop-lox-KrasG12D/+, lox-stop-lox-tp53R172H/+変異マウス由来の膵臓がん細胞を株化したもの)を皮下移植し、サイクロデキストリン包摂 Benzaldehyde (CDBA) を Benzaldehyde 40mg/kg 相当の 400mg/kg を 1日1回、週6日、計24回腹腔内投与を行い、腫瘍抑制効果を確認した。統計的な有意差には至らなかったが、腫瘍抑制傾向が確認された(図3A)。また、腫瘍組織の免疫組織染色にて CDBA 投与による Axl の発現低下が確認された(図3B)。

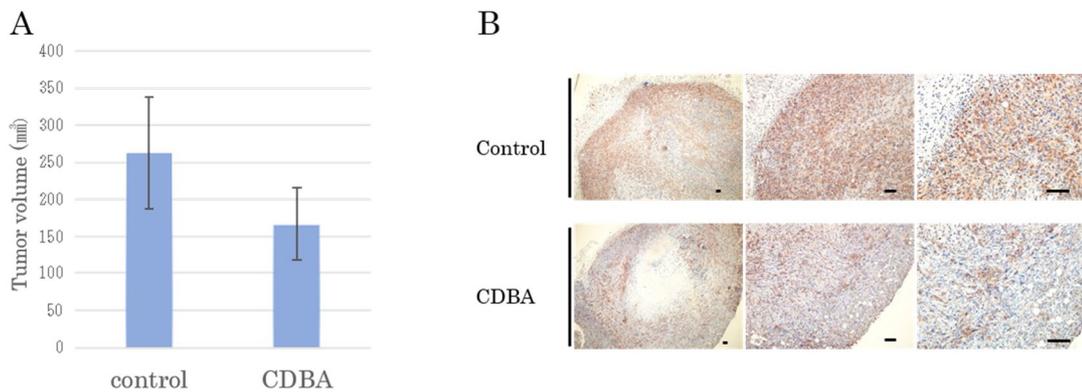


図3: KPC細胞皮下移植マウスモデルに対するCDBA (βサイクロデキストリン包摂 Benzaldehyde) 投与の効果。A: 腫瘍サイズ、B: 抗Axl抗体による腫瘍組織の免疫組織染色 (スケールバーは100 $\mu m$ )

(2) ヒト膵臓がん細胞株 PANC1 細胞において連日 2Gy ずつ計 50Gy の放射線照射を行った耐性株と親株とで Benzaldehyde (BA) の感受性について colony formation assay により検討を行った。親株においては相加的な抑制効果であったが、50Gy 照射後の耐性株においては放射線治療と BA の相乗的な抑制効果が得られることが確認された (図 4)。

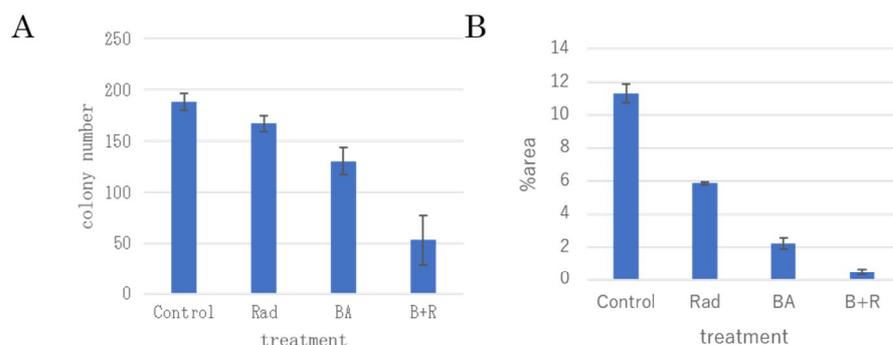


図4:放射線耐性株に対するBAの効果。A:放射線耐性PANC1細胞におけるコロニー数の変化。B:放射線耐性PANC1細胞におけるコロニー面積の変化。Rad: 50Gy放射線照射、BA: Benzaldehyde、B+R: Benzaldehyde+50Gy放射線照射

Axl はがんの悪性化に関わるきわめて重要な因子であり、特にオシメルチニブなどの分子標的薬、放射線治療などに耐性となった細胞において Axl の発現が高まることが見出されており、その意義と機構が注目されている。申請者らはこれまでの解析により、14-3-3 とがん細胞で活性化している複数の経路の中に高発現している多くのリン酸化したクライアント蛋白との蛋白-蛋白間結合をBAが抑制することを見出している。今回の研究によって14-3-3ζを介したAxlの安定化および活性化をBenzaldehydeが阻害することが明らかとなり、Benzaldehydeが何故分子標的薬や放射線などの治療に抵抗性があるがん細胞に対して効果を発揮するのか、その一端を明らかにすることができた。

膵臓がんは発見時すでに進行がんであることが多く、化学療法、放射線療法など集学的な治療を行っても早期に治療抵抗性を獲得するため生存期間の改善が望めない厳しい疾患である。今回示すことが出来たBAのAxl阻害作用は、膵臓がんなどの治療抵抗性腫瘍克服のために重要であり、今後この極めて毒性の低い化合物を用いた非臨床および臨床研究を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤 潤、大西 伸幸、杉原 英志、岡崎 章悟、信末 博行、笠間 隆志、佐谷 秀行
2. 発表標題 Benzaldehydeは腫瘍細胞における14-3-3 ;の高発現を介してAMPK活性を亢進させる
3. 学会等名 第78回日本癌学会総会
4. 発表年 2019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	齋藤 潤 (Saito Jun) (80837378)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・共同研究員  (32612)	

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