

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07079

研究課題名(和文) 内因性硫化水素合成阻害による抗がん剤の有効性増大と副作用軽減の可能性について

研究課題名(英文) Possibility for increase in efficacy and alleviation in adverse effect of anti-cancer drugs by inhibition of endogenous hydrogen sulfide synthesis

研究代表者

関口 富美子 (SEKIGUCHI, Fumiko)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：90271410

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)：本研究では、生体内で硫化水素(H₂S)を産生する酵素シスタチオン- γ -シントラーゼ(CBS)の阻害が、がん化した形質細胞である多発性骨髄腫の細胞増殖を強く抑制することを明らかにした。さらに、パーキンソン病治療薬であるカルビドパがCBS阻害活性を有し、多発性骨髄腫の細胞死を誘起することを見出した。これらの結果は、多発性骨髄腫の抗がん剤治療に、カルビドパやその他のCBS阻害薬の追加が、抗がん剤の有効性を高められ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

多発性骨髄腫の治療には抗がん剤のボルテゾミブ(BTZ)が用いられるが、BTZに対する抵抗性獲得細胞の出現により治療が困難となり予後不良となる。本研究において、BTZ抵抗性を獲得した多発性骨髄腫に対してもCBS阻害薬は抗がん作用を示すことが明らかとなり、CBS阻害薬が新しい多発性骨髄腫の治療戦略のシーズとなる可能性を提案できた。また、パーキンソン病治療薬であるcarbidopaは、D体ではパーキンソン病治療効果を持たないが、CBS阻害活性はL体、D体いずれにも認められることから、D-carbidopaが選択性の高いCBS阻害薬の開発シーズになりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our study has revealed that inhibition of cystathionine- γ -synthase (CBS), an H₂S-forming enzyme in a mammalian body, markedly suppresses cell proliferation of multiple myeloma, a cancer that forms in a type of white blood cell called a plasma cell. In addition, we have found that carbidopa, a medicine for Parkinson disease, possesses inhibitory activity of CBS, and induces cell death of multiple myeloma. The data suggest that additional medication of carbidopa or other CBS inhibitors to anticancer drugs for multiple myeloma enhances the efficacy of anticancer drugs.

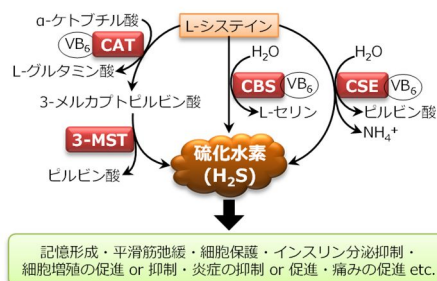
研究分野：薬理学

キーワード：硫化水素合成酵素、シスタチオン- γ -シントラーゼ(CBS)、多発性骨髄腫、芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素阻害薬、カルビドパ、がん増殖抑制、CBS阻害薬

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。

1. 研究開始当初の背景

有毒ガスである硫化水素(H₂S)は、哺乳類の生体内において L-cysteine から cystathionine-γ-lyase (CSE)、cystathionine-β-synthase (CBS)、cysteine aminotransferase と協同して働く 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3-MST)などによって生合成され、図 1 に示す様々な生体反応の調節に関与しているが、各種がん細胞において、これら H₂S 合成酵素の発現増加ががんの増悪に寄与することが示されている [1,2]。一方、我々は H₂S が知覚神経に発現する Ca_v3.2 T 型 Ca²⁺チャネル(T-channel) や TRPA1 チャネルの機能増強を介して体性痛、内臓痛、神経障害性疼痛の発症に寄与することを報告している [3]。



ボルテゾミブ(BTZ)、パクリタキセル、オキサリプラチンおよびビンクリスチンなどの抗がん剤の治療において、高頻度で発症する化学療法誘起末梢神経障害(chemotherapy-induced peripheral neuropathy, CIPN)は、治療中の患者の QOL を著しく低下させるだけでなく、重篤な場合は抗がん剤治療の継続中止を余儀なくさせる。また、多くの抗がん剤はその治療に伴い薬剤抵抗性を示すがん細胞が出現することも重大な問題となっている。H₂S のがん増悪作用および難治性疼痛への寄与を示す知見を考え合わせると、内因性 H₂S は、抗がん剤治療における薬剤抵抗性細胞の出現および副作用の CIPN 発症のどちらにも寄与する可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、内因性 H₂S の産生抑制が、抗がん剤の治療効果を増大させ、副作用の CIPN 発症を軽減させる可能性を明らかにする。始めに、各種がん細胞の増殖におよぼす H₂S 合成酵素阻害薬の影響を、抗がん剤に対する感受性株と抵抗性獲得株と比較し、その反応に関わる H₂S 合成酵素、情報伝達系、標的分子について明らかにする。また、マウスへの抗がん剤投与で誘起される CIPN や結腸炎モデルにおける内臓痛に関連する痛みにおける内因性 H₂S の寄与、その反応に関わる H₂S 合成酵素、情報伝達系、標的分子、H₂S 産生細胞などについて検討する。また、3 つの H₂S 合成酵素のうち、高い選択的阻害薬が見出されていない CBS を標的とした新規選択的阻害薬の開発を目的に、富山大学の豊岡尚樹教授(研究協力者)により供与される種々の合成化合物について CBS 阻害活性を検討した。

3. 研究の方法

(1)がん由来培養細胞の生細胞数の評価:実験には、多発性骨髄腫由来 KMS-11 細胞とその BTZ 抵抗性株 KMS-11/BTZ 細胞を使用した。生細胞数は MTT あるいは calcein-AM を用いて評価した。

(2)CBS 阻害活性の評価:H₂S プローブ(AzMC)を用い、CBS を高発現するラット腎臓ホモジネートに、CBS の基質となる L-cysteine と L-homocysteine、CSE 阻害薬 DL-propargylglycine (PPG)および 3-MST 阻害薬 6-methyl-2-((2-(naphthalen-1-yl)-2-oxoethyl)thio)pyrimidin-4(3H)-one (MNOTP)存在下における H₂S 産生量を測定し、CBS 阻害活性を検討する化合物の抑制効果を評価した。

(3)侵害受容反応に対する CBS 阻害活性物質の効果の評価:炎症性腸疾患(IBD)/過敏性腸症候群(IBS)モデルは、イソフルラン麻酔下、マウスに 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) 2 mg/mouse/50 μL を結腸内に投与して作製した。TNBS 投与 6 日後に、マウスの結腸内に水 200 μL を注入して結腸伸展刺激を与え、下腹部のなめ行動回数を 30 分間測定した。評価する CBS 阻害活性物質は水の結腸内注入 60 分前に腹腔内投与した。侵害受容行動測定後にマウスから結腸を摘出し、結腸組織の CBS および CSE のタンパク質発現量を Western blot 法により測定した。

4. 研究成果

(1)BTZ 10 nM は、KMS-11 細胞の増殖を顕著に抑制したが、KMS-11/BTZ 細胞の増殖には全く影響せず、KMS-11/BTZ 細胞の BTZ 抵抗性獲得が確認できた。どちらの細胞の増殖も CBS 阻害薬の AOAA 1 mM により強く抑制されたが、CSE 阻害薬の PPG 3 mM および 3-MST 阻害薬の MNOTP 10 μM の抑制効果はわずかであった。KMS-11/BTZ 細胞の BTZ 10

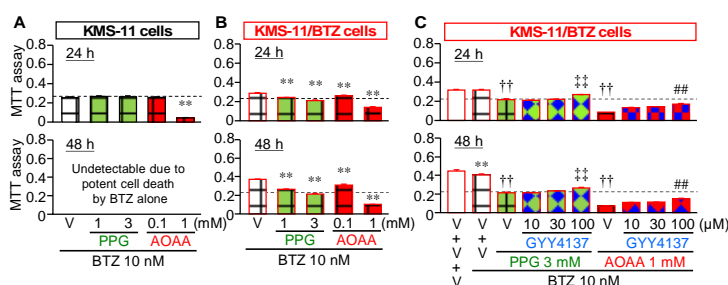


図2. ヒト多発性骨髄腫由来KMS-11細胞とそのbortezomib (BTZ)抵抗株KMS-11/BTZ細胞のBTZ存在下の生細胞数におよぼすCSE阻害薬 DL-propargylglycine (PPG)およびCBS阻害薬 aminoxyacetic acid (AOAA)の減少効果と、その効果に対する持続性H₂S放出薬GY4137の回復作用。点線は刺激前の生細胞数。データは平均値±S.E.M. (n=8)。** P<0.01 vs. vehicle (V)+BTZ (A, B) or V+V+V (C); †† P<0.01 vs. V+V+BTZ; ††† P<0.01 vs. V+PPG+BTZ; ### P<0.01 vs. V+AOAA+BTZ。

nM 存在下で残存した細胞は、AOAA を添加することで顕著に減少したが、持続的 H₂S 放出薬である GYY4137 100 μM を添加すると AOAA の細胞死誘導効果は有意に抑制された (図 2)。これらの結果より、CBS により産生される内因性 H₂S は、KMS-11 と KMS-11/BTZ のどちらの細胞増殖に対しても促進的に作用していると考えられる。

(2) 先の実験では、CBS 阻害薬として AOAA を使用したが、この試薬の CBS 選択性は低く、臨床応用は難しい。興味深いことに、パーキンソン病治療に levodopa と共に使用される芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)阻害薬の benserazide が高い CBS 阻害活性を有することが示された [4]。そこで別の AADC 阻害薬である carbidopa について CBS 阻害活性を検討したところ、benserazide より強力な CBS 阻害活性が認められた (図 3)。Carbidopa による CBS 阻害活性は L 体、D 体どちらでも同程度認められたが、AADC 阻害活性は L 体でのみ見られた。

Benserazide だけでなく carbidopa にも CBS 阻害活性が認められたことから、KMS-11 および KMS-11/BTZ 細胞の生細胞数に対するこれら AADC 阻害薬の効果を検討したところ、benserazide は KMS-11 および KMS-11/BTZ の増殖をそれぞれ 10 および 30 μM 以上で有意に抑制し、carbidopa はそれぞれ 300 および 100 μM 以上の濃度で有意に抑制した。

(3) 我々は、TNBS 誘起 IBD/IBS モデルマウスの結腸内水注入伸展刺激による結腸痛様侵害受容行動の増加には、T-channel の機能増強が関することを報告している [5]。また我々は、マウスにおいて膵炎や膀胱炎に伴ってみられる内臓痛には、CSE により産生された H₂S による Ca_v3.2 T-channel の機能増強が寄与することを報告している [3]。そこで次に、TNBS 誘起 IBD/IBS モデルマウスにおいても同様の機序が関与する可能性について検討するため、このモデルの結腸組織における CSE と CBS のタンパク質発現量を検討したところ、CSE 発現量は TNBS 投与により変化しなかったが、CBS 発現量は顕著に増加したことから、このモデルの結腸痛発症には CSE ではなく CBS により産生された H₂S の関与が大きいことが示唆された。そこでこのモデルにおける結腸痛様侵害受容行動に対する D-carbidopa と L-carbidopa の効果を検討したところ、いずれも 25 mg/kg の腹腔内投与により TNBS 投与による結腸痛様行動を強く抑制した。

以上の結果より、CBS 阻害活性を有する AADC 阻害薬の carbidopa は、多発性骨髄腫の増殖を BTZ 抵抗性獲得の有無にかかわらず抑制できること、また、CBS による H₂S 産生亢進が寄与する痛みに対して鎮痛作用を示すことが明らかとなった。さらに、D-carbidopa は AADC を阻害することなく CBS 阻害作用を示したことから、D-carbidopa は新しい選択的 CBS 阻害薬の開発シーズになりうる可能性が示唆された。

< 引用文献 >

- [1] Sekiguchi F, Sekimoto T, Ogura A, et al. Endogenous Hydrogen Sulfide Enhances Cell Proliferation of Human Gastric Cancer AGS Cells. *Biol Pharm Bull*, **39**, 887-890 (2016).
- [2] Cao X, Ding L, Xie ZZ, et al. A Review of Hydrogen Sulfide Synthesis, Metabolism, and Measurement: Is Modulation of Hydrogen Sulfide a Novel Therapeutic for Cancer? *Antioxid Redox Signal*, **31**, 1-38 (2019).
- [3] Sekiguchi F, Tsubota M, Kawabata A. Involvement of Voltage-Gated Calcium Channels in Inflammation and Inflammatory Pain. *Biol Pharm Bull*, **41**, 1127-1134 (2018).
- [4] Druzhyna N, Szczesny B, Olah G, et al. Screening of a composite library of clinically used drugs and well-characterized pharmacological compounds for cystathionine beta-synthase inhibition identifies benserazide as a drug potentially suitable for repurposing for the experimental therapy of colon cancer. *Pharmacol Res*, **113**, 18-37 (2016).
- [5] Tsubota M, Matsui K, Fukushi S, et al. Effects of bepridil and pimozone, existing medicines capable of blocking T-type Ca²⁺ channels, on visceral pain in mice. *Biol Pharm Bull*, **44**, 461-464 (2021).

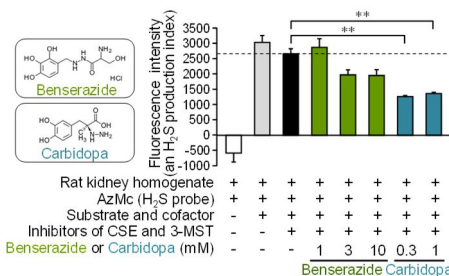


図3. ラット腎ホモジネートのCBS活性に対する芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)阻害薬のbenserazideとcarbidopaの効果-H₂SプローブAzMcを用いた測定。データは刺激開始時と刺激1時間後の蛍光強度の差として示している(平均±S.E.M., n=6)。** P<0.01。

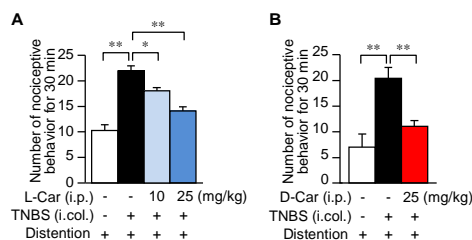


図4. TNBS誘起IBD/IBSモデルマウスにおいて結腸内水注入による結腸伸展刺激誘起結腸痛様侵害受容行動増加におよぼすL-carbidopaおよびD-carbidopa腹腔内前処置の効果。TNBS結腸内投与6日後のマウスの結腸内に水200 μLを注入することで生じる侵害受容行動を30分間測定。L-およびD-carbidopaは水注入の60分前に腹腔内投与した。データは平均±S.E.M. (n=5-6)で示している。* P<0.05; ** P<0.01。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 関口富美子、福島志歩、森口晴香、平本志於里、田中宏和、芦田隆司、松村到、川畑篤史
2. 発表標題 H2S産生酵素cystathionine- -synthaseの阻害薬はボルテゾミブ耐性を獲得した多発性骨髄腫細胞の生存・増殖を抑制する
3. 学会等名 第139回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森口晴香、関口富美子、福島志歩、本多泉侑、井場祐里子、坪田真帆、平本志於里、田中宏和、芦田隆司、松村到、川畑篤史
2. 発表標題 芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素阻害薬カルビドパとベンセラジドは多発性骨髄腫細胞の生存・増殖を抑制する：H2S産生阻害作用の関与について
3. 学会等名 第71回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関口富美子、森口晴香、福島志歩、井場祐里子、坪田真帆、平本志於里、岡田卓哉、豊岡尚樹、田中宏和、芦田隆司、松村到、川畑篤史
2. 発表標題 内因性H2S産生阻害による多発性骨髄腫細胞の生存抑制：カルビドパとベンセラジドのcystathionine- -synthase阻害活性とボルテゾミブ耐性多発性骨髄腫治療への応用について
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井場祐里子、本多泉侑、坪田真帆、川瀬篤史、岡田卓哉、豊岡尚樹、川畑篤史
2. 発表標題 芳香族L-アミノ酸脱炭酸酵素を阻害しないD-carbidopaはH2S産生酵素cystathionine- -synthaseを阻害することでTNBS誘起結腸痛を抑制する
3. 学会等名 第141回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

近畿大学薬学部病態薬理学研究室HP
<https://www.phar.kindai.ac.jp/byoutai/index/byoutai.htm>

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	川畑 篤史 (KAWABATA Atsufumi) (20177728)	近畿大学・薬学部・教授 (34419)	
研究分担者	坪田 真帆 (TSUBOTA Maho) (90510123)	近畿大学・薬学部・講師 (34419)	

	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
研究協力者	豊岡 尚樹 (TOYOOKA Naoki)		

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