

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390373

研究課題名（和文） アミノペプチダーゼをターゲットとした新規分子標的治療薬の創出

研究課題名（英文） Development of novel molecular-targeted medicine against aminopeptidase

研究代表者

唐子 堯（唐偉）(KARAKO TAKASHI (TANG WEI))

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（和文）：

癌細胞表面に高発現するアミノペプチダーゼ N (APN) を標的として新規低分子化合物を合成し、癌細胞の増殖や血管新生に対する抑制効果を検討した。新規合成されたヒドロキサム酸誘導体の一種である化合物 24F は、細胞表面に発現するアミノペプチダーゼの活性を阻害した。24F を種々の肝癌細胞に対して作用させたところ、癌細胞の増殖及びコラーゲンゲルへの浸潤を抑制した。さらに、24F を血管内皮細胞に対して作用させたところ、血管新生において重要な現象であるとされる細胞の移動や血管様構造の形成を阻害した。また、ベストアチン誘導体として合成された化合物 LYP についても同様に検討を実施した結果、癌細胞の増殖を抑制するとともに、血管内皮細胞の移動や血管様構造の形成を阻害した。以上の結果から、本研究で新規に合成されたアミノペプチダーゼ阻害剤は、癌細胞の浸潤や腫瘍組織周囲の血管新生の抑制を介して肝癌の治療薬として有用であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study was aimed to develop novel inhibitors of aminopeptidase N (APN) overexpressed on cancer cell membrane and to evaluate the suppressive effect on cancer cell growth and angiogenesis. A newly-synthesized compound 24F, one of hydroxamic acid derivatives, inhibited the activity of aminopeptidases expressed on HL60 cell membrane. This compound inhibited the growth and invasion of hepatoma cell lines. In addition, incubation of vascular endothelial cells with 24F was found to be effective for the suppression of the angiogenic phenomena such as migration and tube formation. Furthermore, a newly-synthesized bestatin derivative LYP also had the ability to inhibit cancer cell growth as well as migration and tube formation of vascular endothelial cells. These results suggest that newly-synthesized aminopeptidase inhibitors are effective as an anti-cancer agent for hepatoma via inhibition of cancer cell invasion and angiogenesis surrounding cancer tissue.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 5,100,000  | 1,530,000 | 6,630,000  |
| 2010年度 | 4,600,000  | 1,380,000 | 5,980,000  |
| 2011年度 | 3,700,000  | 1,110,000 | 4,810,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 13,400,000 | 4,020,000 | 17,420,000 |

研究分野：応用医学

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：分子標的治療薬、肝細胞癌、浸潤、APN、血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

癌疾患は、癌細胞の増殖の活性化、浸潤や転移、周辺組織における血管新生といった特徴的な現象を誘導することによって病態を進行させていく。それらの現象には、癌細胞で発現が変化している様々な分子種とその連鎖によるメカニズムが関与していることがこれまでに明らかとなっている。創薬研究分野においては、癌組織に特徴的な分子種やメカニズムをターゲットとした新規化学療法剤の開発が行われている。

一方、癌による死亡率が上昇し続けている現在の日本において、肝胆膵領域の臓器における癌の患者、なかでも肝細胞癌（HCC）患者の増加が深刻化している。近年の外科的切除術の進歩によって、切除適応のHCC症例の予後は肝胆膵外科領域における他の癌疾患と比較して良好だが、切除適応外となった症例に関しては依然として予後が悪いのが現状である。切除適応外の症例に対する治療や術後の補助療法として化学療法が有効となるが、DNA合成阻害剤のような一般的な抗癌剤は副作用が問題となっているほか、それが軽減される分子標的治療薬はHCC治療においては開発が遅れている。肝癌診療ガイドラインによると、HCC患者の術後の経過を左右する予後因子として腫瘍数のほか、脈管浸潤や肝機能が挙げられている。従って、癌の化学療法では、腫瘍の増殖を抑制するほか、脈管浸潤やそれに伴う肝内転移の抑制、さらに背景肝の機能回復を視野に入れた治療法や分子標的治療薬の開発が、癌の克服に対して非常に重要といえる。

アミノペプチダーゼ N (APN) は、CD13ともよばれる膜タンパク質で、MMPと同様に亜鉛イオン依存性のペプチダーゼである。APNは、小腸や大腸、腎臓の一部組織などのような正常組織に発現しており、物質の消化や免疫機構における抗原の処理などの機能を果たしている。一方、複数種の癌細胞においてもAPNの発現が確認されている。種々の培養癌細胞株を用いた研究では、癌細胞膜上に発現したAPNが、組織の基底膜の成分であるIV型コラーゲンを分解する機能をもつことが解明され、組織内における癌細胞の浸潤や他臓器への転移に深く関与することが示唆された。さらに、APNが発現している活性化した内皮細胞に対して低酸素環境や血管新生因子などが作用すると、血管新生のほかに更なるAPNの発現が誘導された。また、APNに対するモノクローナル抗体を作用させることにより、低酸素や血管新生因子などの機能性ネットワークが阻害され、血管新生が有意

に抑制されることが明らかとなった。従って、APNの機能を阻害することにより、癌疾患の進行において重要な役割を果たす癌細胞の浸潤や転移、そして周辺組織における血管新生を抑制することができることが示唆された。

## 2. 研究の目的

HCCの脈管浸潤及び肝内転移を抑制し、HCC患者の術後の予後を改善することができる新規化学療法剤開発を目的として、APNをターゲットとした新規化学療法剤の開発を行うという本研究の着想に至った。本研究では、これまでに構築した新薬開発に関する共同研究体制を活用することにより、コンピュータ支援技術による設計と合成を新規的に行い、候補化合物のスクリーニング及び有効性の評価を実施した。そして、上記の研究背景で述べたように、現時点で分子標的治療薬に関する知見が立ち遅れている肝胆膵領域の癌、特にHCCに対する検討を行うことにより、有効な新規分子標的治療薬の候補化合物として研究成果の輩出を試みた。

## 3. 研究の方法

### 3.1. 化合物及び細胞

本研究で使用するアミノペプチダーゼ阻害剤は、研究協力者らによって構築された化合物ライブラリから抽出された。

ヒト白血病細胞 HL-60 及びヒト肝細胞癌細胞 HuH-7 は、Health Research Resources Bank からの分譲を受けた。ヒト肝癌細胞 HepG2 及び PLC/PRF/5 は、European Collection of Cell Cultures からの分譲を受けた。ヒト卵巣癌細胞 ES-2 及び SKOV-3 は、American type cell culture からの分譲を受けた。

### 3.2. MTT アッセイ

96 ウェルプレートに各種培養細胞を  $2-5 \times 10^3$  個播種し、種々の濃度の化合物を含有させた増殖培地を添加し、 $37^\circ\text{C}$ において 72-120 時間培養した。設定時間経過後、培養液に MTT を添加して 4 時間培養後、細胞を可溶化して吸光度を測定した。

### 3.3. マトリゲルトランスウェルアッセイ

人工合成マトリゲルへの細胞の浸潤を検討する目的で、BIOCOAT Matrigel invasion chamber を用いた解析を実施した。無血清培地中で 24 時間、 $37^\circ\text{C}$ 培養した細胞を各種濃度の化合物と混合し、マトリゲル上に播種し

た。48時間、37°C培養した後、マトリゲルを除去し、chamber 下部のフィルターに付着した浸潤細胞を Diff-Quick 染色にて検出した。

### 3.4. 血管内皮細胞移動活性測定

6 ウェルプレートにおいて血管内皮細胞を培養しコンフルエントとした後、細胞シートに直線状の傷を付け、PBS により洗浄した。各種濃度の化合物を含む培地を添加し、直線状の傷の幅を測定した。一定時間培養した後、再度傷の幅を測定し、幅の短縮を細胞の移動活性として解析した。

### 3.5. 血管様構造形成アッセイ

$3-5 \times 10^4$  個の血管内皮細胞を調製し、マトリゲルをコートしたプレート上に播種した。細胞が接着した後、各種濃度の化合物を含有させた培地を添加し、一定時間培養した。内皮細胞により形成された血管様構造の数を計測した。

### 3.6. 蛍光抗体染色及びフローサイトサイトメトリー法

$1 \times 10^6$  個の細胞を試験管中に採取し、マウス由来抗ヒト APN/CD13 抗体を添加して、60分間静置した。その後、FITC 標識抗マウス IgG 二次抗体によって細胞を蛍光標識し、FACS calibur を用いて細胞の蛍光強度を測定した。

## 4. 研究成果

本研究では、コンピュータ支援型分子設計技術を駆使することによりターゲットの活性部位の立体構造に基づいた阻害剤を設計・合成し、その結果構築された化合物ライブラリから有望な候補化合物をスクリーニングすることにより、アミノペプチダーゼ N (APN) を標的とした新規化学療法剤を開発することを目的とした。構築された化合物ライブラリから有効な抗癌効果をもつ化合物を *in vitro* 及び *in vivo* における種々の実験法によってスクリーニングする事を試みた。その結果、複数の有効な化合物を拾い出す事に成功した。

### 4.1. ヒドロキサム酸誘導体 24F の肝細胞癌細胞に対する効果

ヒドロキサム酸誘導体の一種である化合物 (名称: 24F、((S)-2-amino-N-((S)-1-(2-(hydroxyamino)-2-oxoethyl)-2,6-dioxopiperidin-3-yl)-3-phenylpropanamide、図1)は、研究協力者らによって構築された誘導体ライブラリから抽出された新規化合物であり、予備的研究によりアミノペプチダーゼ

の酵素活性を阻害することが示されていた。

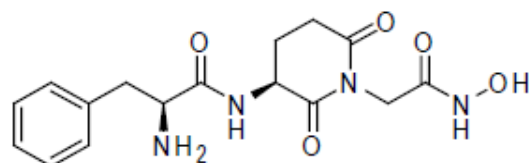


図1 24F の化学構造

まず、本研究では、当該化合物が、細胞膜上に発現するアミノペプチダーゼの酵素反応を阻害するかどうかを検討した。細胞膜上に APN を発現することが知られているヒト白血球細胞株 HL-60 に対して *in vitro* 条件下で 24F を作用させてペプチダーゼ酵素反応産物に由来する吸光度を継時的に測定したところ、24F の添加量に依存して吸光度の低下がみられた (図2)。これは、ペプチダーゼ酵素反応産物の産生量が減少したことを示しており、24F が酵素反応を阻害したことを示唆している。

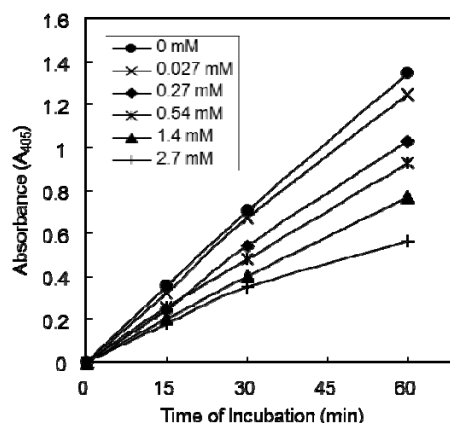


図2 アミノペプチダーゼ酵素反応に対する 24F の効果

一方、種々の HCC 培養細胞表面においても、APN の発現が HL-60 と同様に検出された (図3)。そこで、アミノペプチダーゼ阻害剤 24F がもつ細胞増殖への効果を検討するために、*in vitro* 下において種々の HCC 培養細胞株に対して当該化合物を作用させ、72、96、120 時間後に MTT アッセイを実施して細胞数に依存するミトコンドリア活性を測定した。その結果、複数種の細胞株において 24F による細胞増殖の抑制効果が化合物の添加量依存的に検出された (図4)。また、癌細胞の浸潤への効果を検討するために、人工的に構築されたマトリゲル上での培養系に 24F を添加したところ、マトリゲルを浸潤する癌細胞の数が化合物の投与により減少した (図5)。従って、24F の投与は、HCC 細胞の増殖及び浸潤を阻

害することが示唆された。

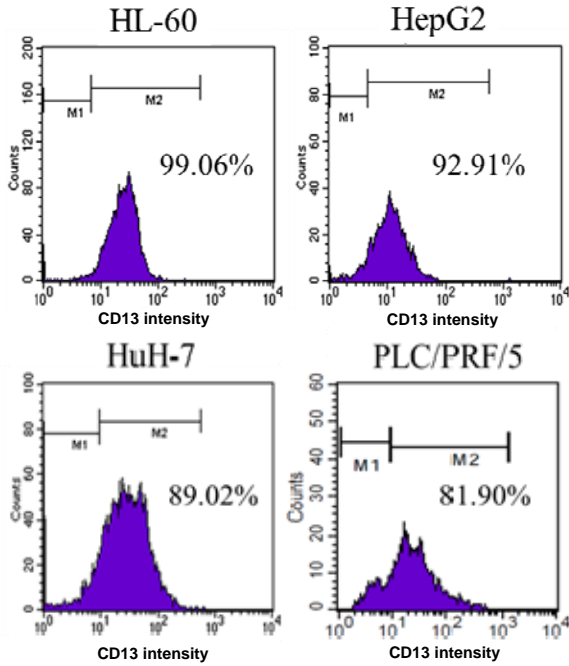


図3 各種肝癌細胞のAPNの発現

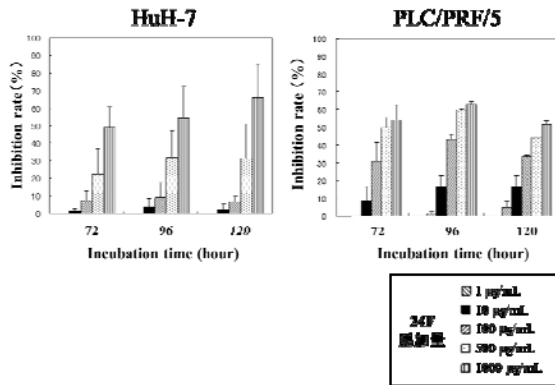


図4 HCC細胞の増殖に対する24Fの効果

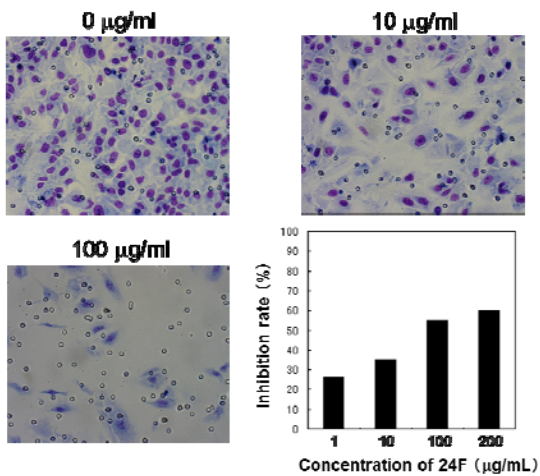


図5 マトリゲルへの癌細胞の浸潤に対する24Fの効果

APNは血管内皮細胞による血管形成に関与し、腫瘍周囲の微小環境における血管新生を促進させることが示唆されている。そこで、24Fが腫瘍組織周囲における血管新生の阻害に寄与しているのではないかと考え、血管内皮細胞に対して当該化合物を作用させた。その結果、*in vitro*条件下で24Fを投与することにより、血管内皮細胞の移動(図6)及び血管様構造の形成(図7)が阻害された。以上の結果から、当該化合物は、HCC細胞そのものの増殖及び浸潤を阻害するほか、血管内皮細胞による血管新生に関連する諸現象を阻害する事によってHCCの進行を抑制できる可能性をもつことが示唆された。

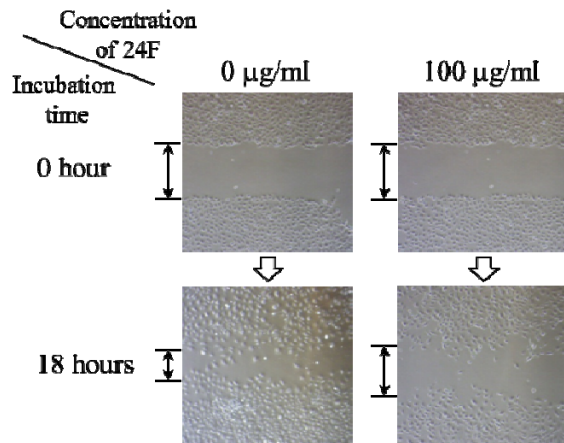


図6 血管内皮細胞の移動活性に対する24Fの効果

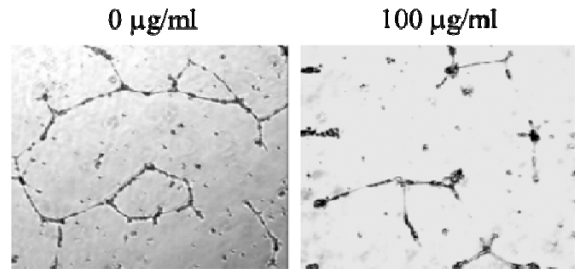


図7 血管様構造形成に対する24Fの効果

HCC細胞を皮下に移植したヌードマウスモデルを用いた*in vivo*解析では、一部の細胞に関して静脈内への当該化合物の投与を2週間実施した予備的研究の結果、腫瘍の大きさの縮小が認められた。本研究で示されたHCC細胞の増殖抑制メカニズムに関して種々の生化学的解析を試みてきたが、アポトーシスに関連する現象について化合物処理による顕著な誘導は認められなかった。今後は、アポトーシス以外の増殖抑制メカニズムに関する解析を進行させる必要がある。

#### 4.2. 新規ベスタチン誘導体 LYP の効果

ベスタチンは、急性非リンパ性白血病に対する治療薬として臨床医療で使用されている抗癌剤である。しかし、ベスタチンは APN 以外にも種々のアミノペプチダーゼの酵素反応を阻害することが知られており、分子標的治療薬としてより特異性の高い化合物の開発が求められた。研究協力者によって APN 阻害剤として合成された bestatin dimethylaminoethyl ester (LYP、図 8) は、ベスタチンと比較して HL-60 細胞表面上の APN の活性をより強く阻害する効果を有することが予備的研究により示された。しかし、当該化合物の癌細胞の増殖や血管新生に関連する現象に対する効果は明らかではなかった

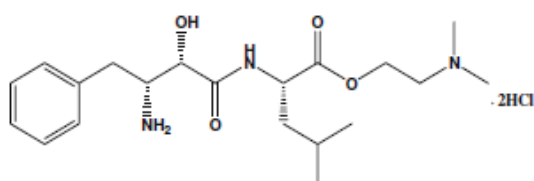


図 8 LYP の化学構造

新規合成化合物 LYP が癌細胞の増殖抑制に寄与するかどうかを検討する目的で、培養癌細胞株 SKOV-3 及び ES-2 に対して種々の濃度の LYP を作用させ、72 時間培養後 MTT アッセイを実施した。その結果、細胞数に依存する吸光度が化合物の添加量依存的に低下したことから (図 9)、当該化合物が癌細胞の増殖を抑制することが示唆された。

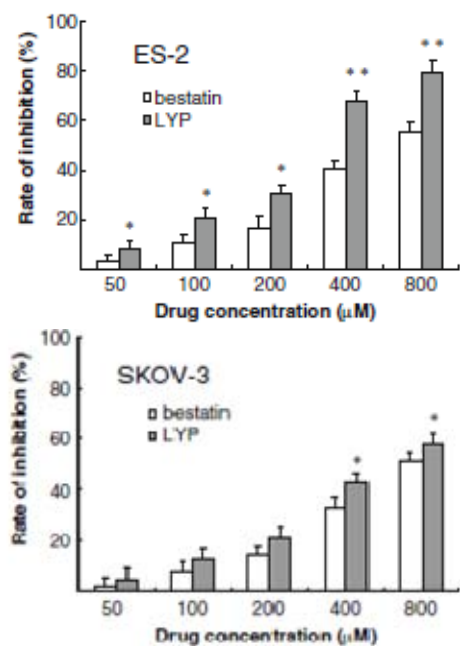


図 9 癌細胞の増殖への LYP の効果  
当該化合物についても、上記の 24F と同様

に血管内皮細胞に対する効果が期待されたことから、同様の検討を実施した。まず、コンフルエントの血管内皮細胞シートに直線状の傷を付け、化合物添加培地で一定時間培養後の傷の幅の変化を解析したところ、化合物の添加量依存的に傷の幅の短縮が阻害された (図 10)。これは、LYP が血管内皮細胞の移動活性を阻害したことを示唆している。また、コラーゲンの薄層上に血管内皮細胞を播種し、化合物添加及び無添加条件で一定時間培養した後の血管様構造の形成を解析したところ、化合物の添加量依存的に血管様構造の数の減少が認められた (図 11)。従って、当該化合物 LYP が、上述した 24F と同様に血管内皮細胞による血管形成にかかわる諸現象の抑制に有効であることが示唆された。

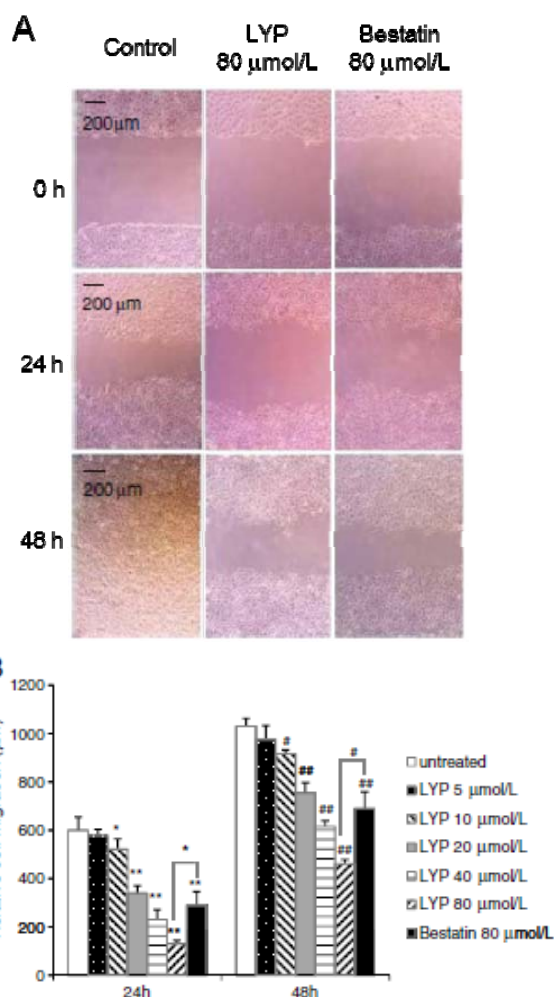


図 10 血管内皮細胞の移動活性に対する LYP の効果

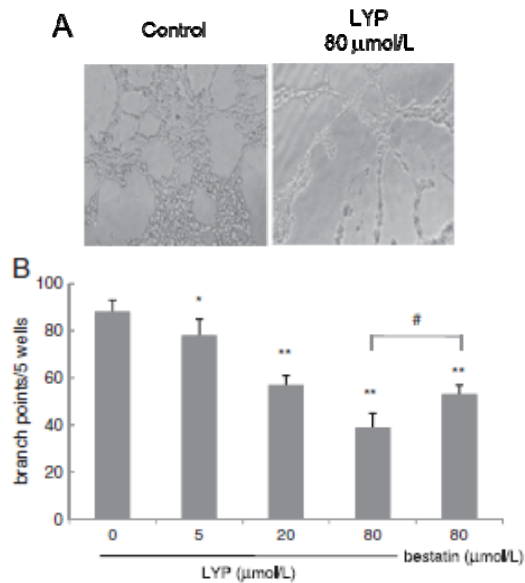


図 11 血管様構造形成に対する LYP の効果

LYP に関しても、癌細胞を皮下移植したヌードマウスを用いた *in vivo* 解析を実施した。腫瘍組織を形成させたモデルマウスに対して当該化合物を 2 週間静脈投与し、腫瘍の重量を解析したところ、投与量依存的な腫瘍の縮小が認められた。さらに、当該化合物が、標的とされる APN の発現量を減少させるという結果も得られている。今後、当該化合物の抗癌効果と APN との関連性を分子生物学的に更に詳細に検討していく必要がある。

#### 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 16 件)

- Gao J, Inagaki Y, Song P, Qu X, Kokudo N, Tang W. Targeting c-Met as a promising strategy for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Pharmacol Res*, 65(1), 23-30, 2012. 査読有. DOI; j.phrs.2011.11.011
- Gao JJ, Song PP, Qi FH, Kokudo N, Qu XJ, Tang W. Evidence-based research on traditional Japanese medicine, Kampo, in treatment of gastrointestinal cancer in Japan. *Drug Discov Ther*, 6(1), 1-8, 2012. 査読有. DOI; 10.5582/ddt.2012.v6.1.1
- Gao JJ, Xue X, Gao ZH, Cui SX, Cheng YN, Xu WF, Tang W, Qu XJ. LYP, a bestatin dimethylaminoethyl ester, inhibited cancer angiogenesis both in vitro and in vivo. *Microvasc Res*, 82(2), 122-130, 2011. 査読有. DOI; j.mvr.2011.05.008
- Zhao X, Xu HL, Inagaki Y, Kokudo N, Xu WF, Dong JH, Tang W. Caffeoyl pyrrolidine derivative LY52 inhibits hepatocellular carcinoma invasion via suppressing matrix metalloproteinase-2. *Hepatol Int* 5(2), 716-721, 2011. 査読有. Doi; 10.1007/s12072-010-9234-y
- Inagaki Y, Qi FH, Gao JJ, Qu XJ, Hasegawa K, Sugawara Y, Tang W, Kokudo N. Effect of c-Met inhibitor SU11274 on hepatocellular carcinoma cell growth. *Biosci Trends* 5(2), 52-56, 2011. 査読有. DOI; 10.5582/bst.2011.v5.2.52
- Gao JJ, Gao ZH, Zhao CR, Yuan Y, Cui SX, Zhang XF, Cheng YN, Xu WF, Tang W, Qu XJ. LYP, a novel bestatin derivative, inhibits cell growth and suppresses APN/CD13 activity in human ovarian carcinoma cells more potently than bestatin. *Invest New Drugs*, 29(4), 574-582, 2011. 査読有. DOI; 10.1007/s10637-010-9391-9
- Inagaki Y, Tang W, Xu H, Nakata M, Mafune K, Konishi T, Seto Y, Kokudo N. Sustained aberrant localization of KL-6 mucin and  $\beta$ -catenin at the invasion front of human gastric cancer cells. *Anticancer Res* 31(2), 535-542, 2011. 査読有. URL; <http://ar.iijournals.org/content/31/2/535.long>
- Qi F, Li A, Inagaki Y, Kokudo N, Tamura S, Nakata M, Tang W. Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor. *Int Immunopharmacol* 11(3), 342-349, 2011. 査読有. DOI; 10.1016/j.intimp.2010.12.007
- Inagaki Y, Tang W, Makuuchi M, Hasegawa K, Sugawara Y, Kokudo N. Clinical and molecular insights into the hepatocellular carcinoma tumour marker des- $\gamma$ -carboxyprothrombin. *Liver Int* 31(1), 22-35, 2011. 査読有. DOI; 10.1111/j.1478-3231.2010.02348.x
- Inagaki Y, Tang W, Zhang L, Du G, Xu W, Kokudo N. Novel aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitor 24F can suppress invasion of hepatocellular carcinoma cells as well as angiogenesis. *Biosci Trends* 4(2), 56-60, 2010. 査読有. URL; <http://www.biosciencetrends.com/acti>

- on/downloaddoc.php?docid=292
11. Qi F, Li A, Inagaki Y, Gao J, Li J, Kokudo N, Li XK, Tang W. Chinese herbal medicines as adjuvant treatment during chemo- or radio-therapy for cancer. *Biosci Trends* 4(6), 297-307, 2010. 査読有 . URL; <http://www.biosciencetrends.com/action/downloaddoc.php?docid=369>
  12. Cui X, Inagaki Y, Xu H, Wang D, Qi F, Kokudo N, Fang D, Tang W. Anti-hepatitis B virus activities of cinobufacini and its active components bufalin and cinobufagin in HepG2.2.15 cells. *Biol Pharm Bull* 33(10), 1728-1732, 2010. 査読有 . DOI; 10.1248/bpb.33.1728
  13. Wang DL, Qi FH, Xu HL, Inagaki Y, Orihara Y, Sekimizu K, Kokudo N, Wang FS, Tang W. Apoptosis-inducing activity of compounds screened and characterized from cinobufacini by bioassay-guided isolation. *Mol Med Rep* 3(4), 717-722, 2010. 査読有 . DOI; 10.3892/mmr\_00000323
  14. Xu HL, Inagaki Y, Seyama Y, Sugawara Y, Kokudo N, Nakata M, Wang FS, Tang W. Expression of KL-6 mucin, a human MUC1 mucin, in intrahepatic cholangiocarcinoma and its potential involvement in tumor cell adhesion and invasion. *Life Sci* 85(9-10), 395-400, 2009. 査読有 . DOI; 10.1016/j.lfs.2009.07.004
  15. Zhang K, Tang W, Qu X, Guo Q, Inagaki Y, Seyama Y, Abe H, Gai R, Kokudo N, Sugawara Y, Nakata M, Makuuchi M. KL-6 mucin in metastatic liver cancer tissues from primary colorectal carcinoma. *Hepato-Gastroenterology* 56(93), 960-963, 2009. 査読有
  16. Inagaki Y, Xu H, Nakata M, Seyama Y, Hasegawa K, Sugawara Y, Tang W, Kokudo N. Clinicopathology of sialomucin: MUC1, particularly KL-6 mucin, in gastrointestinal, hepatic and pancreatic cancers. *Biosci Trends* 3(6), 220-232, 2009. 査読有 . URL; <http://www.biosciencetrends.com/action/downloaddoc.php?docid=258>

[学会発表] (計 7 件)

1. 稲垣善則ら. 肝胆膵領域の癌における KL-6 ムチンの臨床病理学的有用性. 第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会. 2011 年 9 月 25 日. 金沢, 日本.

2. Inagaki Y ら. Biochemical effects of des-gamma-carboxy prothrombin on the progression of hepatocellular carcinoma. 20th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists. Oct 23, 2010. Cairo, Egypt.
3. Tang W ら. Cinobufacini has anti-hepatitis B virus activities via the inhibition of RNA transcription in virus-transfected cells. 20th World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists. Oct 23, 2010. Cairo, Egypt.
4. 稲垣 善則ら. アミノペプチダーゼに着目した肝細胞癌再発抑制を目的とする新規分子標的治療薬の開発. 第 15 回日本病態プロテアーゼ学会学術集会. 2010 年 8 月 20 日. 大阪, 日本.
5. Tang W ら. Evaluation of KL-6 mucin, a type of MUC1 mucin, as a potential target for diagnosis and therapy of intrahepatic cholangiocarcinoma. 第 110 回日本外科学会定期学術集会. 2010 年 4 月 10 日. 名古屋, 日本.
6. Xu HL, Zhao X, Inagaki Y, Kokudo N, Wang FS, Tang W. LY52, a caffeoyl pyrrolidine derivative, suppress invasion of both HepG2 and HepG2.2.15 cells via blocking MMP-2 activity. 第 82 回日本生化学会大会. 2009 年 10 月 24 日. 神戸, 日本.
7. Inagaki Y, Qu XJ, Xu HL, Tang W, Kokudo N. Des-gamma-carboxy prothrombin enhances the production of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma cells. 第 82 回日本生化学会大会. 2009 年 10 月 24 日. 神戸, 日本.

[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]  
ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

唐子 堯 (KARAKO TAKASHI (TANGWEI))

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

國土 典宏 (KOKUDO NORIHIRO)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：00205361

関水 和久 (SEKIMIZU KAZUHISA)

東京大学・薬学系研究科・教授

研究者番号：90126095

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