

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24390313

研究課題名(和文)新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤による胆管癌・膵癌治療法の開発

研究課題名(英文) Novel inhibitor of serine threonine kinase for the treatment of cholangiocarcinoma and pancreas cancer

研究代表者

榑野 正人 (Nagino, Masato)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20237564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：相互マシンラーニング法およびZ'-LYTE Kinase Assay 法を用いて新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤T5467374を選定した。阻害剤T5467374は膵癌細胞株において増殖抑制および細胞死に誘導を認め、ヒト膵癌の皮下発癌モデルにおいても抗腫瘍効果を認めた。またセリンスレオニンキナーゼであるAKTに対して阻害作用を有するビスボロールの誘導体を開発した。ビスボロールの誘導体は、ヒト膵癌の皮下発癌モデルにおいて抗腫瘍効果を有し、皮下腫瘍でのAKT発現も減弱させた。

研究成果の概要(英文)：Novel inhibitor of serine threonine kinase, T5467374 was identified using interactive machine learning method and Z'-LYTE Kinase Assay. T5467374 suppressed the proliferation and induced the cell death in pancreas cancer cell lines. This inhibitor suppressed the tumor growth in subcutaneous xenograft model of pancreas cancer. Bisabolol derivative were developed as the inhibitor of AKT serine threonine kinase. Bisabolol derivative showed the antitumor effect in subcutaneous xenograft model of pancreas cancer. This reagent suppressed the AKT expression in the tumor.

研究分野：外科腫瘍学

キーワード：胆管癌 膵癌 セリンスレオニンキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

癌治療の進歩により、一部の癌においては治療成績の改善を認めるようになった。しかし胆管癌、膵癌は難度の高い手術が必要となり、しかも転移や高度浸潤などのため手術不能となることが多い難治癌である。新たな分子標的治療薬が開発されているが、根治切除術と分子標的治療を行っても胆管癌の5年生存率は20-30%、膵癌の5年生存率は10%である。いずれの予後も極めて不良であり、新たな治療法の開発が必要である。

細胞での機能発現においてタンパクの活性化と関連するキナーゼの重要性が多く報告されている。キナーゼはATPなどのリン酸基を標的分子に移動させるリン酸化酵素で、セリン、スレオニン残基をリン酸化させるセリンスレオニンキナーゼとチロシン残基をリン酸化させるチロシンキナーゼがある。キナーゼの異常が癌の原因の1つであることが報告されている。キナーゼ阻害剤は化学的に合成でき、抗体医薬と異なり細胞外に出ていない分子を標的にでき Imatinib(グリベック)、Gefitinib(イレッサ)などが臨床応用されているが、いくつかの課題が残っている。キナーゼの99%がセリンスレオニンキナーゼであり、チロシンキナーゼは0.1%未満である。臨床応用されたキナーゼ阻害剤の多くが、チロシンキナーゼを標的にしており、99%を占めるセリンスレオニンキナーゼを標的にしたキナーゼ阻害剤の開発が不十分である。セリンスレオニンキナーゼの中には分子標的として有用なものも多くあり、これまでのキナーゼ阻害剤より有効なものが存在している可能性がある。新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤の開発により癌治療成績の改善が期待される。

またセリンスレオニンとチロシンの両方をリン酸化する双特異性キナーゼ (Dual-specificity kinase)の存在も確認されており、キナーゼの機能や制御は十分に明

らかになっていない。キナーゼの新たな知見の発見やその解明により新たな癌治療法の開発も期待される

2. 研究の目的

胆管癌、膵癌は予後不良な癌であり、新たな治療法が必要とされている。本研究ではわれわれが行ってきた癌分子標的治療法の開発研究を進展させ、新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤を相互マシンラーニング法と Z'-LYTE Kinase Assay 法を用いて行なう。新規のセリンスレオニンキナーゼ阻害剤の開発により新たな知見を得ることが期待される。本研究の最終目的は、研究成果を臨床へ応用し胆管癌、膵癌の治療成績を改善させることである。

3. 研究の方法

1) 新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤の開発

*in silico*スクリーニング法である相互マシンラーニング法は、これまで小分子化合物のスクリーニング法として行なわれてきたドッキングシュミレーション法と異なり、標的タンパクの立体構造から予測した構造に基づく化合物ライブラリーからの候補化合物の探索が必要でない。また500以下の分子量、構造(高次構造)、疎水性・親水性、極性、結晶構造などの絞り込みも不要であり大幅な時間の短縮が可能になる。

この相互マシンラーニング法を用いて400万種類の小分子化合物から既知化合物との類似度(Tanimoto係数の最大値)、LogPなどのスコア化により500種類の化合物を選択し、その上位150種類を候補化合物とした。

150種類を候補化合物の内、購入可能であった142種類の化合物について、1nMから1000nMに濃度設定を行ない、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を利用したZ'-LYTE Kinase Assay法を用いて、タンパク質分解時の切断に対する感受性を測定した。リン酸化ペプチ

ドと非リン酸化ペプチドの間でのタンパク質分解時の切断に対する感受性の違いを利用し、セリンスレオニンキナーゼ阻害作用を持つ新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤として T5467374 を選定した。

2) 胆管癌、膵癌細胞株を用いた新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤の機能解析
阻害剤 T5467374 を 1nM から 1000nM に濃度設定し、胆管癌細胞株 HuCCT1、膵癌細胞株 KLM1、KP4、Panc1、正常膵細胞由来細胞株 RI515 に投与し、MTT アッセイによる増殖能とトリパンプルー色素排出試験による細胞死誘導能、ボイディンチャンバー法による浸潤能について検討した。

3) 新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤の基礎的研究
細胞周期の進行をリアルタイムで観察可能な蛍光プローブである Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) を導入した胆管癌細胞株 HuCCT1 を樹立した。Fucci を導入した胆管癌細胞株 HuCCT1 に対してノコダゾールおよびチミジンを用いて細胞周期の同調を行ない、細胞周期の進行に伴う発光変化を確認した。また阻害剤 T5467374 を、Fucci を導入した胆管癌細胞株 HuCCT1 に投与し、細胞周期停止を含めた細胞周期への影響について検討を行った。

4) 担癌動物実験モデルを用いた新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤の機能解析
BALB/c ノードマウス7週齢雄の大腿に膵癌細胞株 KLM1 を皮下注射してヒト膵癌の皮下発癌モデルを作成した。この膵癌皮下発癌モデルに 1nM から 1000nM に濃度にて阻害剤 T5467374 を経口にて週 1 回で 3 週連続投与し、それぞれの大腿の腫瘍の大きさを測定して抗腫瘍効果を検討した。

5) AKT に対するセリンスレオニンキナーゼ阻害剤の誘導体開発

セリンスレオニンキナーゼである AKT に対して阻害作用を有するピサボロールの誘導体を 22 種類作成した。ヒト膵癌細胞株 KLM1、KP4、Panc1、ヒト正常膵臓由来細胞株 RI515 へピサボロール誘導体を 100 μ M と 10 μ M で投与し、MTT アッセイにて増殖能の検討を行なった。また膵癌細胞株 KLM1、KP4、Panc1 において誘導体投与後の細胞携形態の検討を行った。膵癌細胞株 KLM1、KP4、Panc1 に選択したピサボロール誘導体を投与し、細胞死をトリパンプルーテストで検討した。膵癌細胞株 KLM1、KP4、Panc1 に 62.5 μ M の阻害剤と誘導体を投与し、48 時間後に Muse Annexin V and Dead Cell Kit を用いてアポトーシスについて検討した。BALB/c ノードマウス7週齢雄の大腿に膵癌細胞株 KLM1 を皮下注射してヒト膵癌の皮下発癌モデルを作成した。この膵癌皮下発癌モデルに対して阻害剤、誘導体 (1000 mg/kg) の週 2 回合計 5 回経口投与を行ない、それぞれの大腿の腫瘍の大きさを測定して抗腫瘍効果を検討した。また皮下腫瘍での AKT 発現を検討した。

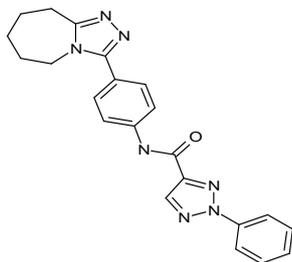
4 . 研究成果

1) 新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤の開発

相互マシニング法にて 150 種類の候補化合物を選定した。

150 種類の候補化合物の内、8 種類は安定性などから購入できず、残り 142 種類の化合物について、Enamine 社より購入した。Z'-LYTE Kinase Assay 法の結果、最もセリンスレオニンキナーゼ阻害作用の強かった T5467374 (C22H21N7O: MW399.45) (図 1) を新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤として選定した。

図 1



2) 胆管癌、膵癌細胞株を用いた新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤の機能解析

阻害剤 T5467374 は正常膵細胞由来細胞株 RI515 と比較して膵癌細胞株 KLM1、KP4、Panc1 において低濃度で有意な増殖抑制効果と細胞死誘導能を示した。また浸潤能についても正常膵細胞由来細胞株 RI515 と比較して膵癌細胞株 KLM1、KP4、Panc1 においては抑制効果を認めた。

3) 新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤の基礎的研究

Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) を導入した胆管癌細胞株 HuCCT1 を樹立した。しかし、ヒト膵癌細胞株 KLM1、KP4 について Fucci の導入を行なったが、樹立はできなかった。

ノコダゾールおよびチミジンを用いた細胞周期の同調により Fucci を導入した胆管癌細胞株 HuCCT1 において細胞周期の進行に伴う発光変化の確認が可能であった。また阻害剤 T5467374 は Fucci を導入した胆管癌細胞株 HuCCT1 において細胞死のため細胞周期停止については確認できなかった。

4) 担癌動物実験モデルを用いた新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤の機能解析

膵癌細胞株 KLM1 によるマウス皮下発癌モデルにおいて、阻害剤 T5467374 投与群において腫瘍の増殖抑制効果を認めた。しかし、阻害剤 T5467374 の高濃度投与群においては死亡例を認めた。

5) AKT に対するセリンスレオニンキナーゼ阻害剤の誘導体開発

セリンスレオニンキナーゼである AKT に対して阻害作用を有するピサボロールの誘導体を 36 種類作成した。ヒト膵癌細胞株 KLM1 では 100 μ M の 11 種類の誘導体で増殖抑制効果を認め、10 μ M では 2 種類の誘導体で増殖抑制効果を認めた。ヒト正常膵臓由来細胞株 RI515 では 100 μ M の 11 種類の誘導体で増殖抑制効果を認め、10 μ M では増殖抑制効果のある誘導体はなかった。この結果より最も増殖抑制能のピサボロール誘導体を以後の実験において用いた。

ヒト膵癌細胞株 KLM1、KP4、Panc1 において、ピサボロール誘導体はピサボロールより低濃度での増殖抑制が可能であった (図 2)。また膵癌細胞株 KLM1、KP4、Panc1 においてピサボロール誘導体により細胞間の接着が減弱し形態の異常を認めた。膵癌細胞株 KLM1、KP4、Panc1 においてピサボロール誘導体による細胞死の誘導はピサボロールより亢進していた (図 3)。またアポトーシスに関してピサボロールでは KLM1 26.20%、KP4 34.06%、Panc1 20.95% と誘導体では KLM1 34.45%、KP4 40.13%、Panc1 31.50% は誘導体においてアポトーシスがより亢進していた。また KLM1、KP4、Panc1 では阻害剤と誘導体では早期と後期アポトーシスの分布で異なるパターンを示しており、阻害剤と誘導体で異なる機序の存在が示唆された。

膵癌細胞株 KLM1 によるマウス皮下発癌モデルにおいてピサボロール投与群と比較してピサボロール誘導体投与群において腫瘍の増殖抑制効果を認めた (図 4、5)。また皮下腫瘍での AKT 発現も誘導体投与群で減弱していた。

図2

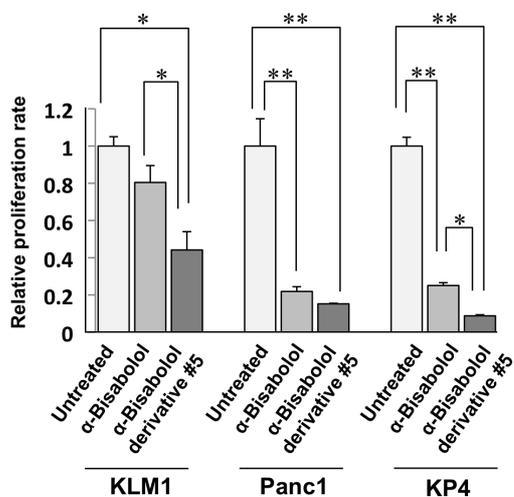


図3

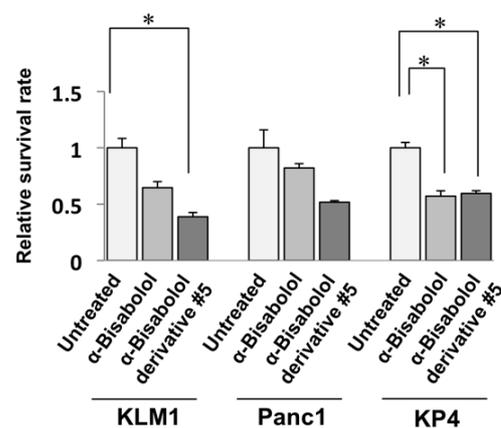
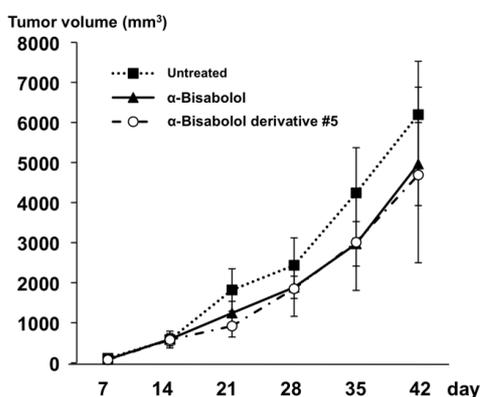


図4



図5



本研究により相互マシンラーニング法を用いて新規セリンスレオニンキナーゼ阻害剤 T5467374 は抗腫瘍効果を認めた。またセリンスレオニンキナーゼである AKT に対して阻害作用を有するピサボロールの誘導体を開発し、その有効性を明らかにした。

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1件)

Murata Y, Kokuryo T, Yokoyama Y, Yamaguchi J, Miwa T, Shibuya M, Yamamoto Y, Nagino M.

The Anticancer Effects of Novel α-Bisabolol Derivatives Against Pancreatic Cancer.

Anticancer Res. 37(2):589-598. 2017 (査読有)

〔学会発表〕(計1件)

Murata Y, Kokuryo T, Yokoyama Y, Yamaguchi J, Miwa T, Seki T, Nagino M. The anti-cancer effect of the novel α-bisabolol derivatives for pancreatic cancer. The 10th AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: Feb 16-20, 2016. Maui, Hawaii, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榑野 正人 (NAGINO MASATO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20237564

(2) 研究分担者

江畑 智希 (EBATA TOMOKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：60362258

國料 俊男 (KOKURYO TOSHIO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：60378023

横山 幸浩 (YOKOYAMA YUKIHIRO)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80378091

千賀 威 (SENGA TAKESHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80419431