

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25430154

研究課題名(和文) パルミチン酸誘導体を使った大腸がん前臨床試験への展開

研究課題名(英文) A new anticancer agent derived from natural fatty acid for the treatment of colon cancer

研究代表者

酒々井 眞澄 (SUZUI, Masumi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：30347158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がんを標的に天然中鎖脂肪酸をリードとして抗がん効果と腫瘍選択性に優れた新規抗がん薬 palmitoyl piperidinopiperidine (PPI) を創製した(特許第5597427, 2014)。In silico解析でPPIは転写因子STAT3のSH2ドメインに結合することが予測され、in vitroおよびin vivo解析にてPPIはSTAT3の二量体形成およびSTAT3リン酸化阻害によりSTAT3が制御する分子の発現に影響しapoptosisの誘導、血管新生および細胞周期の抑制にはたらき最終的に抗がん効果を発揮していることが示された。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel anticancer drug, palmitoyl piperidinopiperidine (PPI). In silico simulation exhibited that PPI can bind SH2 domain of STAT3, indicating that this drug blocks dimerization of STAT3, thereby inactivates its function. PPI inhibited transcriptional activity of STAT3, and induced G1 arrest/apoptosis in colon carcinoma cells. There was a marked decrease in expression levels of the Bcl-2, Bcl-xL, and VEGF proteins and an increase in those of the cleaved caspase 3, 7, 8, 9 and PARP proteins. PPI inhibited nuclear translocation of pSTAT3. PPI caused a dose dependent decrease in multiplicity of carcinogen-induced ACF in the rat colon. In a xenograft model, PPI decreased the size and number of blood vessels in the tumor. CAM assays showed a dose-dependent decrease in number of blood vessels. Inhibition of STAT3 by PPI affects the function of molecules related to apoptosis, angiogenesis and cell cycle progression, and contributes to growth inhibition of tumor cells.

研究分野：分子毒性学・分子がん治療学

キーワード：天然物 抗がん薬 大腸がん 転写因子 STAT3 腫瘍選択性 構造活性相関 インシリコ

1. 研究開始当初の背景

私たちは、蜂産品ローヤルゼリー由来のデセン酸が抗がん活性を持つことを発見した。デセン酸とパルミチン酸との構造類似性より、パルミチン酸を初期リード化合物として誘導体を設計、合成し、ヒト大腸がん細胞株に対する増殖抑制効果がデセン酸と比較して1,000倍以上の新規化合物Aをみいだした(特願2010-079755)。これまでの研究では、(1)細胞レベルでの高い腫瘍選択性、(2)抗がん効果に必須な構造、(3)標的候補分子(c-kit、転写因子STAT3)、(4)およそ50%有効量(ED₅₀)がわかった。化合物Aの抗がん効果は既存抗がん剤5FUより強く、腫瘍選択性が高いという優れた特性を持つため大腸がんを含む消化器がん治療の良好なリード化合物であると考えられた。現状では、4剤併用(1剤は分子標的薬)の大腸がん治療は併用薬剤数の限界と思われる、たとえ分子標的薬であっても重篤な副作用が起きる場合がある。また、転写因子抑制薬は特異性や毒性の点から前臨床試験を含めて実用には至っていない。これらの問題点を打開するには、腫瘍選択性を決める機序の解明と毒性の軽減をめざした個体レベルでの治療域(LD₅₀/ED₅₀)の設定である。化合物Aをリガンドとするコンピュータ解析でc-kitのリン酸化ドメインとSTAT3のSH2(二量体形成)ドメインは共に化合物Aの結合部位と予測されるが、この細胞レベルでの予測の正しさの検証、腫瘍選択性に必須な構造(ファルマコフォア)の同定が必須である。(研究開始当初は新規化合物Aとしたが2014年特許取得により物質名を公開、新規化合物Aは「palmitoyl piperidinopiperidine」である)

2. 研究の目的

(1) 転写因子STAT3のダイマー形成をいかに阻害するか、腫瘍選択性との関連はなにか
(2) 化合物AのN(窒素)原子の求核性を高めた場合の毒性変化を調べることで腫瘍選択性に必須なファルマコフォアを同定し、腫瘍選択性の高いプロトタイプ化合物を設計する
(3) 移植した大腸がんの縮小効果はあるか、発がん剤で誘発した大腸前がん病変の発生を抑制できるか
(4) 化合物の製剤型(遊離型と塩酸塩)に有利な投与形態(経口と腹腔内)は何か、臨床応用に適する用量と用法を同定する

3. 研究の方法

(1) 腫瘍選択性の機序解析(初期ロット): ヒト大腸がん細胞株(HT29, HCT116, SW480, SW837)を使用、リン酸化型STAT3発現への影響、正常細胞への影響をみてゆく(コロニーアッセイ・MTTアッセイ・ウエスタンブロットアッセイ)。ヒト正常大腸上皮細胞(FHC)を使用、有効濃度での正常細胞の生存率を検討する(コロニーアッセイ・MTTアッセイ、対象検体は5FU)。
(2) N(窒素)原子の求核性にもとづく腫瘍選択

性を決めるファルマコフォアの同定および分子設計と合成: ピペリジン環中のN原子の求核性と標的分子のプラスチャージアミノ酸への親和性を*in silico*にて解析。

プロトタイプ化合物合成と評価: *in silico*解析情報をもとに設計と合成、*in vitro*抗がん効果検証、*in silico*ADME-Tox解析にて動態検討、プロトタイプ化合物(後期ロット)の*in vitro*抗がん効果、毒性試験の結果をみて特許出願する。

(3)(4)動物個体での抗がん効果検証

検体準備: グラム単位での化合物Aのラージスケール合成(研究代表者が物質情報を提供し(株)日油にて合成、動物試験に使用したものは遊離型である)とインビトロでの効果確認。

動物実験: 雌ヌードマウスにヒト大腸がん細胞株HT29を移植し、がん細胞の定着を確認後50mg/kgの化合物Aを10日間に1回の頻度で腹腔内投与し7週後に剖検し体重変化、腫瘍縮小効果を評価する。

ラット大腸発がんプロモーション抑制効果を検証: 4週齢F344/NSIc雄ラットにazoxymethane(AOM, 20mg/kg)を1週に1回計2週間皮下投与し前がん病変aberrant crypt foci(ACF)を誘発した。実験群を次のように設定した。Group 1(5匹): AOM + soybean oil, group 2(5匹): AOM + 2mg/kg PPI, group 3(5匹): AOM + 10mg/kg PPI, group 4(4匹): 無処置経過。Soybean oilあるいはPPIを10日毎に1回計4回腹腔内投与した。大腸粘膜に誘発されたACFの数およびACF内に存在する陰窩(crypt)数をカウントし、対照群と比較することで前がん病変発生抑制の有無を検証した。

4. 研究成果

(1)(2)本研究では大腸がんを標的とし天然物を利用することで毒性の少ない抗がん薬の開発を目指した。天然中鎖脂肪酸のデセン酸はヒト大腸がん細胞株に増殖抑制効果をもつ。私たちはデセン酸を初期リードとして増殖抑制効果がデセン酸と比べて1,000倍強い新規抗がん物質palmitoyl piperidinopiperidine(PPI)を創製した(特許第5597427, 2014)。PPIの抗がん効果およびその機序を示す。*In silico*解析においてPPIは転写因子STAT3のSH2 domainに結合することが予測された。*In vitro*ではPPIはヒト大腸がん細胞株SW837およびHT29においてSTAT3の転写活性およびpSTAT3の発現を抑制した。またpSTAT3/STAT3発現の細胞内局在への影響を解析したところpSTAT3/STAT3が核分画で減少していた。これらの結果からPPIはSTAT3のリン酸化の抑制と核内移行阻害により転写を抑制することが示唆された。さらにPPIはSTAT3の標的遺伝子である細胞周期やapoptosisに関与するcyclinD1、Bcl-xL、Bcl-2の発現を減少させp53の発現を増加させた。フローサイトメトリーにより細胞周期のG1 arrestおよびapoptosisを誘導することが確認された。またSTAT3の別の標的遺伝子である血管新生に関与するVEGFの発現をPPIは減少させ、鶏卵漿尿膜法により血管新生を用量依存的に抑制することが明らかと

なった。PPI はヌードマウスに移植した HT29 細胞に対して体重減少を引き起こすことなく有意な腫瘍縮小効果を発揮した。また、組織学的に主要臓器への毒性影響を検討した結果、有意な毒性影響はみられなかった。移植された腫瘍内において cleaved caspase3 陽性細胞の増加および CD34 陽性血管数の減少を認めたことから、*in vivo* においても apoptosis 誘導と血管新生を抑制することがわかった。

(3)(4)ラット大腸発がんプロモーション抑制効果を検証した。大腸粘膜に形成されたすべての ACF の平均数は group 1 と比較し、group 2 で 10%、group 3 で 20%の用量依存性の抑制を認めた ($P<0.05$)。大腸粘膜に誘発された ACF 内に存在する陰窩 (crypt) 数をカウントした結果、陰窩数が 4 個以上の ACF で group 1 と比較し group 2 で 5%、group 3 で 23% の用量依存性の抑制を認めた ($P<0.05$)。実験経過中に群間で体重に有意差は認めなかった。個体レベルでの有効用量として遊離型 PPI を 10~50 mg/kg、10 日間に 1 回の頻度で腹腔内投与した場合に有意な毒性影響はない。

これらの結果から、新規抗がん物質 PPI は STAT3 の二量体形成および STAT3 リン酸化阻害により STAT3 が制御する分子の発現に影響し apoptosis の誘導、血管新生および細胞周期の抑制にはたらき最終的に抗がん効果を発揮していることが示された。さらに、PPI はラット大腸発がん抑制効果をもつことがわかった。本研究では N 原子がもつプロトンを引きつける特性(求核性)が重要な役割を担っていることを突き止め、PPI のピペリジン構造を開環する(求核性を上げる)ことで腫瘍選択性と抗がん効果が PPI より高い独自のプロトタイプ化合物の開発に成功した(特願 070424, 2015 年出願)。

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)

[学会発表](計 26 件)

1. 安藤さえこ、松本晴年、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。パルミトイルピペリジノピペリジンの抗がん効果発現機序の解析。日本薬学会第 137 年会；仙台国際センター他(宮城県・仙台市)：平成 29 年 3 月 27 日
2. 安藤さえこ、松本晴年、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。Anticancer activity of palmitoyl piperidinopiperidine. 平成 28 年度「先端モデル動物支援プラットフォーム」成果発表会；琵琶湖ホテル(兵庫県・大津市)：2017 年 2 月 7 日
3. 安藤さえこ、松本晴年、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。パルミトイルピペ

リジノピペリジンの毒性影響および抗がん効果発現機序。第 33 回日本毒性病理学会総会；ビッグアイ(大阪府・堺市)：2017 年 1 月 27 日

4. 安藤さえこ、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。大腸がん治療薬パルミトイルピペリジノピペリジンの創薬。第 75 回日本癌学会学術総会；パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)：2016 年 10 月 8 日
5. 安藤さえこ、松本晴年、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。パルミトイルピペリジノピペリジンの抗がん作用機序。平成 28 年「度先端モデル動物支援プラットフォーム」若手支援技術講習会；蓼科グランドホテル(長野県・茅野市)：2016 年 9 月 15 日
6. S. Ando, H. Matsumoto, S. Kaga, K. Fukamachi, M. Futakuchi, M. Suzui. Anticancer mechanism of action of palmitoylpiperidinopiperidine. 第 31 回発癌病理研究会；信州松代ロイヤルホテル(長野県・長野市)：2016 年 8 月 25 日
7. 安藤さえこ、松本晴年、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。パルミトイルピペリジノピペリジンの抗がん効果発現機序。がん予防学術大会 2016；名城大学(愛知県・名古屋市)：2016 年 7 月 2 日
8. 安藤さえこ、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。パルミトイルピペリジノピペリジンの毒性影響および抗がん効果発現機序の解析。第 43 回日本毒性学会学術年会；ウインク愛知(愛知県・名古屋市)：2016 年 6 月 29 日
9. 安藤さえこ、加賀志稀、佐藤圭悟、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。Anticancer mechanism of action of palmitoyl piperidinopiperidine. 平成 27 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ；琵琶湖ホテル(兵庫県・大津市)：2016 年 2 月 3 日
10. 安藤さえこ、加賀志稀、佐藤圭吾、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。新規物質パルミトイルピペリジノピペリジンの抗がん活性の検証。第 74 回日本癌学会学術総会；名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)：2015 年 10 月 9 日
11. 酒々井眞澄、安藤さえこ、加賀志稀、

- 佐藤圭吾、磯田泰彰、深町勝巳、二口充。新規大腸がん治療薬パルミトイルピペリジン誘導体の開発。第74回日本癌学会学術総会；名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)：2015年10月8日
12. 安藤さえこ、加賀志稀、佐藤圭吾、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。パルミトイルピペリジノピペリジンの抗がん活性。平成27年度がん若手研究者ワークショップ；蓼科グランドホテル滝の湯(長野県・茅野市)：2015年9月3日
13. S. Ando, S. Kaga, K. Fukamachi, M. Futakuchi, M. Suzui. Anticancer activity of palmitoyl piperidinopiperidine. 第30回発癌病理研究会；オリビアン小豆島(香川県・小豆郡)：2015年8月28日
14. 安藤さえこ、加賀志稀、松本晴年、佐藤圭吾、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。Anticancer activity of a novel compound palmitoyl piperidinopiperidine. 第61回日本薬学会東海支部総会・大会2015；名古屋市立大学(愛知県・名古屋市)：2015年7月4日
15. 安藤さえこ、佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。新規抗がん物質の個体レベルにおける効果の検証。がん予防学術大会2015；ラフレさいたま(埼玉県・さいたま市)：2015年6月5日
16. 安藤さえこ、佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。パルミチン酸誘導体の in vivo 抗がん効果。平成26年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ；琵琶湖ホテル(兵庫県・大津市)：2015年2月6日
17. 佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。デセン酸誘導体の抗がん作用機序解析。第73回日本癌学会学術総会；パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)：2014年9月26日
18. 佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。新規デセン酸誘導体はアポトーシス誘導により大腸がんを抑制する。平成26年度がん若手研究者ワークショップ；蓼科グランドホテル(長野県・茅野市)：2014年9月6日
19. K. Sato, Y. Isoda, K. Fukamachi, M. Futakuchi, H. Tsuda, M. Suzui. A novel decenoic acid derivative inhibits colon carcinogens by inducing apoptosis. 第29回発癌病理研究会；スパリゾートハワイアンズ(福島県・いわき市)：2014年9月1-3日
20. 酒々井眞澄、佐藤圭悟、二口充、深町勝巳、磯田泰彰。蜂産品由来デセン酸誘導体の抗がん効果。文科省新学術領域研究・がん支援「化学療法基盤支援活動」第3回シンポジウム；万国津梁館(沖縄県・名護市)：2014年5月12日
21. 酒々井眞澄、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、森脇健太。パルミチン酸誘導体の抗がん効果。第72回日本癌学会学術総会；パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)：2013年10月4日
22. 磯田泰彰、森脇健太、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。パルミチン酸誘導体の至適構造と抗がん作用機序。第72回日本癌学会学術総会；パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)：2013年10月5日
23. 磯田泰彰、森脇健太、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。パルミチン酸誘導体の至適構造と抗がん作用機序。平成25年度がん若手研究者ワークショップ；蓼科グランドホテル(長野県・茅野市)：2013年9月7日
24. 磯田泰彰、佐藤圭悟、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。脂肪酸誘導体の抗がん効果および作用機序解析。第32回分子病理学研究会；竹村院群芳園(奈良県・吉野市)：2013年7月20日
25. 酒々井眞澄、磯田泰彰、二口充、深町勝巳。新規パルミチン酸誘導体の抗がん効果。第20回日本がん予防学会；日本薬学会長井記念館(東京都・渋谷区)：2013年7月6日

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：抗がん剤
 発明者：酒々井眞澄、飯沼宗和、森田彰
 権利者：同上
 種類：特許
 番号：特願2015-070424
 出願年月日：2015年3月30日
 国内外の別：国内

取得状況(計2件)

名称：抗がん剤
発明者：酒々井眞澄、飯沼宗和
権利者：同上
種類：特許
番号：特許第 5597427 号
取得年月日：2014 年 8 月 15 日
国内外の別：国内

名称：抗がん剤
発明者：酒々井眞澄、飯沼宗和
権利者：同上
種類：特許
番号：特許第号 5237884 号
取得年月日：2013 年 4 月 5 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

名古屋市立大学大学院医学研究科分子毒性
学分野のホームページ
<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/moltox.dir/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒々井 眞澄 (SUZUI, Masumi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30347158

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

飯沼 宗和 (IINUMA, Munekazu)
岐阜薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：70082998

深町 勝巳 (FUKAMACHI, Katsumi)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：90381798

(4) 研究協力者

永澤 秀子 (NAGASAWA, Hideko)
岐阜薬科大学・薬学部・教授

森田 彰 (MORITA, Akira)
(株)日油