

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10188

研究課題名(和文) 化合物ライブラリーを利用した膵癌間質標的新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel therapeutic agent targeting pancreatic cancer stroma by screening compound library

研究代表者

富永 洋平 (TOMINAGA, Yohei)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：90304823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は膵癌間質中の膵星細胞を新しい治療標的ととらえ、膵星細胞の活性状態を評価するスクリーニング系を開発し、膵星細胞の不活性化を誘導する新規膵癌治療薬開発を行うことを目的とした。膵星細胞の活性状態を評価するスクリーニング系を独自に作成し、これを用いて化合物3398種類に対してスクリーニングを行ったところ、膵星細胞を休眠状態に誘導する可能性のある化合物(シード化合物)を複数種同定した。一部の化合物では濃度依存性に膵星細胞の増殖が抑制されることを確認した。今後はin vivoでの治療効果確認や、新規化合物のスクリーニングを継続する。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we demonstrated that cancer-associated stroma would become a new target for the treatment of pancreatic cancer. We focused on pancreatic stellate cells (PSCs) as a therapeutic target and developed a novel screening assay system to detect the activation of PSCs. Then we performed high-throughput screening using this assay, and we showed 152 compounds led PSCs into quiescent state. These data suggest that the drugs targeting PSCs may become a novel strategy for pancreatic cancer therapy.

研究分野：医歯薬学

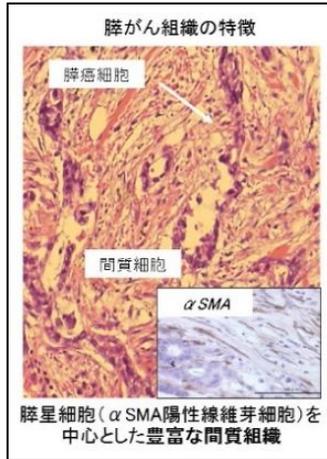
キーワード：化合物ライブラリー 癌間質相互作用 間質標的治療 膵星細胞 化合物スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は欧米や日本でもここ 30 年以上ほとんど生存率の改善が見られない取り残された癌腫であり、膵臓癌への新たな治療法および診断法の開発は、社会的要請度・貢献度・緊急性が高い。

これまで腫瘍細胞自体に関する研究が進められてきたがいまだに画期的治療法の確立には至っていない。膵臓癌の組織は、豊富な間質増生 (desmoplasia) を特徴とし、癌細胞と間質細胞の相互作用が癌の浸潤能・転移能・治療抵抗性に影響を及ぼしている。間質細胞の中で線維化に特に関わる細胞として膵星細胞 (Pancreatic Stellate Cells; PSCs) の存在が報告された (Gastroenterology, 1998, Bachem)。この膵星細胞は膵癌組織中の desmoplasia 中にも同定され、腫瘍細胞の刺激により活性化された膵星細胞 (activated PSCs) が間質増生を促すことが報告された (Gastroenterology, 2005, Bachem)。腫瘍細胞と膵星細胞との相互作用が膵癌の悪性度を高める主因として注目されており、膵星細胞を新たな治療標的とする新規治療戦略の確立が期待されている。新規医薬品の開発方法として化合物ライブラリーを利用した創薬がある。化合物ライブラリーとは、ある目的のために収集された化合物の集合体そのもの、または収集された化合物を保管し、探索できるシステムのことである。本邦において、医薬品開発事業は企業を中心に行われてきたが、文部科学省は大学や研究機関が持つ創薬シーズを有効利用し新薬開発を促進するため、最先端研究基盤事業「化合物ライブラリーを活用した創薬等最先端研究・教育基盤の整備」事業を開始している。この事業では、

東京大学創薬イノベーションセンターを中心に全国 6 か所の基幹大学を拠点とする組織体制が構築され、九州大学はその基幹大学として「九州大学化合物ライブラリー創薬先端研究・教育基盤センター」が設置されている。ここにはスクリーニング事業に必要な機器の整備がなされており、東京大学創薬オープンイノベーションセンターに保有する 20 万の化合物のサンプル提供を受けることができ、目的とする化合物のスクリーニングを行うことが可能となっている。現在のところ、東京大学の化合物ライブラリーを利用した癌治療に関連した新規化合物の同定について膵癌治療に応用可



能な薬剤はなく、新規化合物が同定されれば、画期的な発見となり得る。

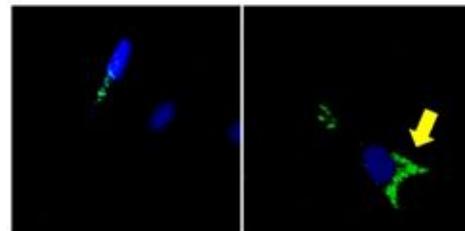
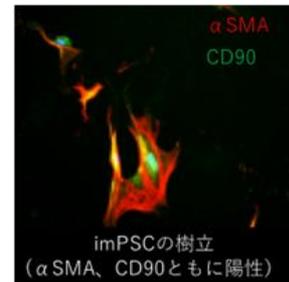
2. 研究の目的

本研究では、化合物ライブラリーを用いて膵癌の間質増生において中心的な役割を担っている膵星細胞 (Pancreatic stellate cells; PSCs) を治療標的とした新規治療薬を同定し、その薬剤に因る癌間質改変を基盤とした薬剤送達効率の改善と癌浸潤の制御を実現する新規治療戦略を確立することが目的である。

3. 研究の方法

化合物スクリーニングのためのアッセイ系の構築

膵星細胞は膵癌切除標本から primary culture を行い樹立した細胞を使用する。当研究室は膵癌切除標本を容易に入手可能な環境にあり、かつ primary culture の手法に精通している。現時点で独自のプロトコールに従って 60種類以上の膵癌由来膵星細胞を樹立しストックしており、現在もさらに樹立し続けている。アッセイ系の構築では膵星細胞が静止状態に移行したときに蓄積される脂肪滴の発現に着目し、この蛍光強度を定量化することで膵星細胞の活性状態を評価することとした。

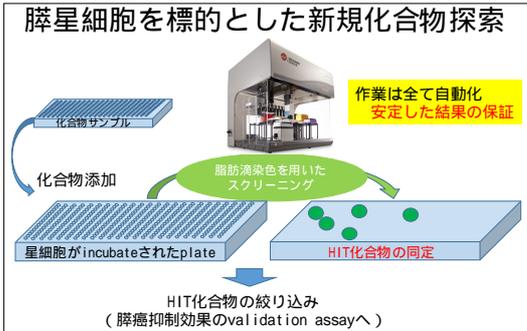


脂肪滴 (矢印) の増加
→ Quiescent状態へ変化

化合物のスクリーニング

アッセイ系の構築後、東京大学創薬オープンイノベーションセンターから化合物のサンプル提供を受けた。東京大学創薬イノベーションセンターは約 20 万の化合物を保有し、様々な形式で化合物の保存・提供を行っている。今回は既承認薬で構成された 9600種類の化合物サンプルに対してスクリーニングを行った。スクリーニングに関しては、九州大学化合物ライブラリー創薬先端研究・教育基盤センターに設置された、IN Cell Analyzer2000を用いたアッセイを

予定している。ここにはオートメーション化された8連の分注装置も備え付けてあり、効率的なスクリーニングが可能である。



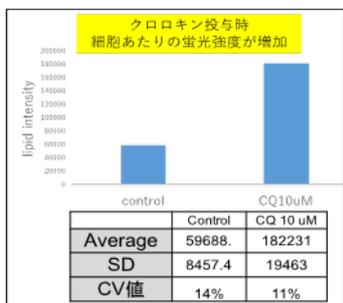
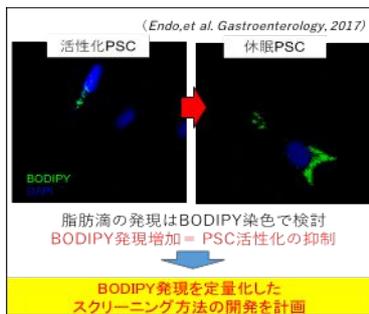
得られたヒット化合物の in vitroおよび in vivoでの膵星細胞の活性化抑制効果の検証およびヒット化合物の最適化

in vitroの実験では膵星細胞に化合物を添加し培養した群で増殖能を測定する。また、免疫染色やウエスタンブロット法で化合物添加状態のPSCで活性状態の指標である SMAやFibronectinの発現の変動を観察する。

4. 研究成果

まず静止状態で膵星細胞の細胞質内で増加する脂肪滴に着目し、脂肪滴の数及び蛍光強度を数値化し、活性状態を評価するスクリーニング系を作成した。

得られたスクリーニング系を用いて、膵星細胞を静止状態に誘導することが知られているクロロキン(オートファジー阻害剤)を positive control としこの評価系を用いてスクリーニングしたところ、クロロキン添加群では有意に蛍光強度数値の上昇がみられた。



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
A	7197.6	6971.36	6921.72	6702.38	7229.8	control	7397.28	7297.67	8494	8679.83	77978.65	141244.	2146.	562	188188				
B	65049.2	66909.38	61763.81	6127.49	64209.6		67102.76	54744.21	72728.01	65005.94	69899.35	170887.	1634	383	174721.7				
C	6892.61	62997.32	48771.42	54681.31	60332.24	52966.41	48933.28	48466.3	6187.0	68644.13	58935.35	107170.8	170887.	1634	383	174721.7			
D	5361.11	48133.92	65116.46	52974.87	53839.34	53828.35	54871.31	49793.19	57872.26	6191.21	47983.1	52335.34	132569.2	21473.7	16279.13	188333.	18218.1	172642.6	
E	4588.1	6931.70	49706.53	69591.79	50926.84	58933.6	55649.05	51947.69	62477.85	56787.82	67274.09	62366.86	184245.9	184439.9	13265.64	189247.7	15647.4	186387.	
F	5165.31	72381.42	65648.87	56421.84	58727.38	54488.89	56277.24	48252.12	59233.55	54681.09	62121.36	44875.78	188769.3	184419	178477.2	167487.	173826.	156627.	
G	6329.24	49365.18	49483.95	52316.65	58244.89	57202.31	57218.4	56378.68	48177.22	56978.36	47648.43	43265.89	201497.3	188068.4	97728.4	173881.8	178464.	235872.5	
H	5361.54	59338.88	5871.45	48131.43	58771.7	48439.87	61888.4	51001.77	49233.62	59559.87	38622.43	45458.09	168268.2	142551.5	15881.17	158072.5	15647.4	186387.	
I	6889.17	52428.88	51281.11	58873.5	51354.56	62388.83	62324.52	60718.59	61178.99	46888.87	49941.25	147388.1	188353.	18842.47	198881.6	172283.	171712.2		
J	47912.77	53976.44	53952.2	58873.52	52441.17	60113.84	71831.77	48373.49	58233.59	53487.38	67643.8	53398.07	182779.2	220243.3	15782.12	188328.7	187741.8	212439.1	
K	58649.88	52178.78	58154.15	681281															
L	64224.09	58236.43	74705.89	57181															
M	58892.	62246.83	61885.32	54718															
N	58445.45	59342.59	54883.34	78885.31	52644.13	14238.24	62142.63	74221.84	44758.45	55318.82	58862.16	45593.39	794228.2	23006.	18824.24	192748.4	256177.8	187487.	
O	43333.81	54234.382	58102.6	78827.65	60611.85	78639.33	60988.84	61710.76	58684.38	53882.18	53981.22	777622.	193826.1	206387.3	170353.5	164237.8	178648.5		
P	48029.05	65518.48	51519.25	8081.5	64876.19	18737.23	72338.44	47916.99	62876.87	63833.77	74242.37	60975.62	158824.4	88720.8	64493.22	148023.	148023.	178648.5	

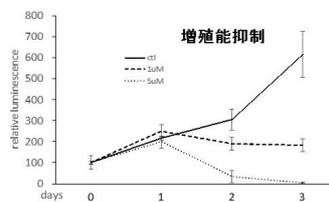
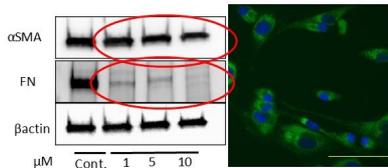
Average 59688 Average 182231

384wellでCQ投与時にlipidの濃度が上昇することを確認 本評価系の安定を証明

系は感度・特異度共に高くスクリーニングに使用するに問題ないとして、東京大学創薬機構の化合物ライブラリーから薬剤の供与を受けることとなった。現在、既承認薬3398種類に対してスクリーニングを行い、その中で膵星細胞を休眠状態に誘導する可能性のある化合物(シード化合物)を15種類同定した。(赤印)

この中で脂肪滴の発現強度の最も高い化合物については増殖能の評価を行い、濃度依存性に膵星細胞の増殖が阻害されることを確認した。また化合物を添加した膵星細胞では、活性化の指標である SMA、fibronectin の蛋白発現の低下を認めた。

化合物T-XXI



以上より我々が独自に作成したアッセイ系を用いて、化合物のスクリーニングを行い、膵微小環境を標的とする治療につながる可能性のある化合物を同定できた。今後は癌細胞や、癌間質相互作用に与える影響、及び in vivo で腫瘍抑制効果を示すかを更に評価し、化合物の絞り込みを行う必要がある。

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 3 件)

1) Endo S, Nakata K, Sagara A, Koikawa K, Ando Y, Kibe S, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Okumura T, Moriyama T, Miyasaka Y, Ohuchida K, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M. Autophagy Is Required for Activation of Pancreatic Stellate Cells, Associated With Pancreatic Cancer Progression and Promotes Growth of Pancreatic Tumors in Mice, *Gastroenterology*, 152(6):1492-1506, 2017, 査読有, doi:10.1053/j.gastro.2017.01.010

2) Okumura T, Ohuchida K, Sada M, Abe T, Endo S, Koikawa K, Iwamoto C, Miura D, Mizuuchi Y, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Hashizume M, Nakamura M, Extra-pancreatic invasion induces lipolytic and fibrotic changes in the adipose microenvironment, with released fatty acids enhancing the invasiveness of pancreatic cancer cells, *Oncotarget*, 8(11):18280-18295, 2017, 査読有, doi:10.18632/oncotarget.15430

3) Yoshida M, Miyasaka Y, Ohuchida K, Okumura T, Zheng B, Torata N, Fujita H, Nabae T, Manabe T, Shimamoto M, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M, Calpain inhibitor calpeptin suppresses pancreatic cancer by disrupting cancer-stromal interactions in a mouse xenograft model. *Cancer science*, 107(10):1443-1452, 2017, 査読有 doi: 10.1111/cas.13024

〔学会発表〕(計 3 件)

1) 仲田興平、遠藤翔、大内田研宙、水元一博、小田義直、橋爪誠、中村雅史、オートファジーは膵星細胞の活性化に関しており、その抑制は膵癌の進展を制御する、第 76 回日本癌学会学術総会、2017

2) Endo S, Nakata K, Ohuchida K, Ando Y, Kibe S, Takesue S, Nakayama H, Abe T, Koikawa K, Okumura T, Mizuuchi Y, Moriyama T, Miyasaka Y, Manabe T, Ohtsuka T, Nagai E, Mizumoto K, Oda Y, Nakamura M, Autophagy Drives Pancreatic Stellate Cells Activation and Promotes Pancreatic Cancer, 47th Annual Meeting of the American

Pancreatic Association 2016

3) 吉田真樹、宮坂義浩、大内田研宙、遠藤翔、阿部俊也、肥川和寛、齋子龍、千々岩芳朗、奥村隆志、佐田政史、堀岡宏平、鄭彪、森山大樹、真鍋達也、大塚隆生、植木隆、永井英司、水元一博、中村雅史、癌と間質を同時に標的とするカルパイン阻害薬カルペプチンの膵癌に対する治療効果の検討、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富永 洋平 (TOMINAGA, Yohei)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：90304823

(2) 研究分担者

森山 大樹 (MORIYAMA, Taiki)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：70586859

水元 一博 (MIZUMOTO, Kazuhiro)
九州大学・大学病院・准教授
研究者番号：90253418

大内田 研宙 (OHUCHIDA, Kenoki)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：20452708
(2017 年度)

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者 ()