

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10584

研究課題名(和文) GGCTを標的とした低分子阻害物質による泌尿器癌治療の開発

研究課題名(英文) Development of anticancer therapy for urological malignancy using GGCT inhibitors

研究代表者

影山 進 (Kageyama, Susumu)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：50378452

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)：GGCT(γ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ)は癌進行に関わるタンパク質として知られている。当該研究では癌増殖におけるGGCTの機能を阻害する低分子化合物の開発を計画した。われわれが設計した40種の化合物のうちでGA(N-グルタリル-L-アラニン)が最も高いGGCT阻害効率を示した。しかしながら、GAは細胞膜透過性が低かったため、透過性を高める目的でジエステル化したpro-GAを作製した。Pro-GAは、MCF7細胞、PC3細胞およびHL-60白血病細胞における細胞増殖阻害を示した。Pro-GAの腹腔内投与はMCF7およびPC3移植マウスにおいて腫瘍増殖阻害を示した。

研究成果の概要(英文)：GGCT (gamma-glutamylcyclotransferase) is known to be one of cancer-promoting proteins. In this study we planned developing the low molecular compounds that can inhibit GGCT function in cancer proliferation. Among the 40 compounds we designed, GA (N-glutaryl-L-alanine) showed the highest GGCT inhibition efficiency. However, since GA had low cell membrane permeability, the diesterified compound, pro-GA, was designed for the purpose of enhancing membrane permeability.

Pro-GA showed a significant inhibition on cell growth in MCF7 breast cancer cell, PC3 prostate cancer cell and HL-60 leukemia cell. Intraperitoneal administration of pro-GA showed a significant tumor growth inhibition in MCF7- and PC3-inoculated mice. Body weight loss and treatment-related death were not observed in these xenograft mice.

研究分野：泌尿器腫瘍

キーワード：γ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ 低分子化合物 抗癌剤

1. 研究開始当初の背景

われわれは尿路上皮癌の診断・治療の標的となる特異タンパク質を求めてプロテオーム解析を網羅的に行ってきた。これにより尿路上皮癌で高発現しているいくつかのタンパク質群を同定し、これらのうち calreticulin など多数の膀胱癌組織および患者尿から高率に検出、新規診断マーカーとしての有用性を報告した (Kageyama, Clin Chem, 2004; Iwaki, Cancer Sci, 2004; Kageyama, Int J Urol, 2009)。今回申請の GGCT (別名 C7orf24) も上記タンパク質群の一つとして同定したものである。

われわれが C7orf24 を同定した当時は、遺伝子データベースの仮想タンパク質であった。特異抗体を作製しウエスタンブロットで臨床検体を検討したところ、やはり実在するタンパク質であり、しかも正常組織に比べて癌組織で明らかに高発現していることを確認した。また C7orf24 高発現は膀胱癌に限らず各種の癌細胞株でも広く認められた。つづいて C7orf24 の機能解析として NIH3T3 細胞に遺伝子導入した安定発現株を樹立すると増殖促進が見られることを見出した。また、RNA 干渉実験では複数の癌細胞株において著しい増殖抑制を認める一方、正常細胞では著変を認めなかった (Kageyama, Proteomics Clin Appl, 2007)。以上から C7orf24 は悪性腫瘍の治療標的となりうると考えた。

われわれの報告の翌年に Oakley らは C7orf24 が グルタミン回路の酵素のうち長年未同定であった gamma-glutamyl cyclotransferase (GGCT) と同一であると報告した (J Biol Chem, 2008)。したがって、現在データベース上ではこの名称 (GGCT) で統一されている。その後、Gromov らは大変興味深い報告をした (J Proteome Res, 2010)。乳癌 123 例の臨床検体を試料としてわれわれと同様の二次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析を行い、同じく GGCT が高発現タンパク質であると同定した。また、高発現症例は有意に生存率が低いことも示した。さらに他癌種でも検討しており、子宮癌、肺癌、大腸癌でも高発現していると報告した。このことはわれわれが各種癌細胞株での高発現を証明してきたことと合致する結果であった。

われわれは多くの共同研究体を構築し、癌における GGCT の役割解明と GGCT を標的とした治療法の開発をテーマに研究を積み重ねてきた。Uejima らは骨肉腫を対象として論文を発表した (Anticancer Res, 2011)。手術標本 40 例での GGCT mRNA 発現は対照とした正常骨芽細胞株より全例で高値 (平均 8.7 倍) を示した。骨肉腫細胞株 (HOS) を試料としてマトリゲルチャンバーを用いた検討では、siGGCT 投与により HOS 細胞の遊走能と浸潤能の双方が抑制された。さらに GGCT をノックダウンした HOS 細胞の DNA マイクロアレイ解析では、インテグリンやカドヘリンなどの細

胞接着関連分子の発現量に変化が認められた。以上から増殖、遊走、浸潤といった癌細胞の特征的性質のいずれにも GGCT が深くかかわっていることが示唆された。Ohno らは GGCT 遺伝子の発現制御機構を明らかにした。NF-Y 結合型 CCAAT ボックスが転写開始点近傍に 3 カ所存在するという特徴的な構造を有し、この構造はおもに細胞周期関連遺伝子に認められることから、GGCT は細胞周期に関する何らかの機能を果たしていることが示唆された (FEBS J, 2011)。また、彼らは正常細胞と癌細胞との間に遺伝子発現の差異があることを報告した。GGCT 遺伝子のプロモーターは正常細胞では安定なヘテロクロマチン構造を有しているのに対し、癌細胞ではユークロマチン構造であることを明らかにし、すなわち癌細胞における GGCT 高発現は細胞の癌化にともなうクロマチン構造変化に起因することを示唆した (J Biochem, 2013)。動物モデルでは Hama らが肺癌細胞株 EBC-1 をマウスの皮下に移植し担癌動物を作製し、この腫瘍に needle-free jet injection をもちいて siGGCT を投与、著しい腫瘍縮小を示した (Cancer Gene Ther, 2012)。

本研究の分担研究者である京都大学化学研究所の平竹潤教授らは、グルタミン回路に関する世界的なトップグループの一つである。GGCT とともにこの回路を構成する -グルタミントランスペプチダーゼ (GGT) の生理作用についてきわめて多くの業績を挙げている (Frontiers in Pharmacology, 2014 他多数)。すでに商品化された GGT 阻害剤 (GGsTop™, 和光純薬工業) を含め多数の低分子阻害物質を開発し、これらをケミカルプローブとして GGT の立体構造やその生理的役割を探る研究を進めている。その正確な技術と豊富な経験は全く新しい生理活性物質の創製につながっている。われわれがこれまで行ってきた RNA 干渉を介するアプローチとは異なり、この共同研究体により GGCT の働きを抑制できる低分子化合物を開発することができれば、全く新しい治療法の発展が期待できるものと考え、本研究を計画した。

2. 研究の目的

われわれが尿路上皮癌プロテオーム解析から同定した細胞増殖促進に関わる新規癌関連タンパク質 GGCT に対する機能阻害低分子化合物 (リード化合物) を作製する。また、その抗腫瘍効果を各種癌細胞株において検証する。さらに上記癌細胞株を皮下移植した担癌マウスを作製し、同化合物を全身投与し、抗腫瘍効果とともに毒性に関しても観察・検討を行い、新規抗癌剤の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) GGCT 阻害物質探索とリード化合物合成
GGCT が担う酵素反応の基質である -グルタミンアミノ酸を模倣した複数の化合物を設計する。

(2) GGCT 阻害効果の検証

われわれが確立した GGCT 活性測定蛍光プローブ LISA-101 を (ChemBioChem, 2013) を用いてリード化合物による酵素反応の阻害効果を検証する。

(3) 抗腫瘍効果の検証 (in vitro)

各種癌細胞株に作製したリード化合物を投与し、細胞増殖抑制効果を確認する。また、正常細胞株における反応も検証する。

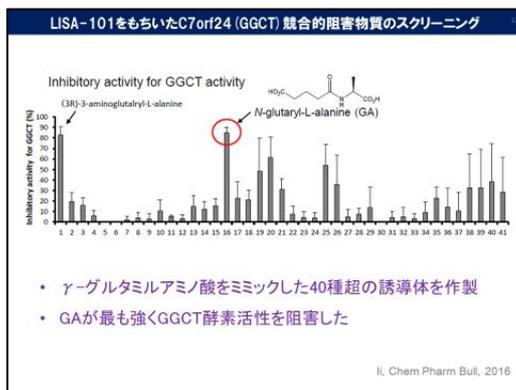
(4) 抗腫瘍効果の検証 (in vivo)

各種の癌細胞株を皮下移植した担癌マウスを作製し、リード化合物の抗癌作用および有害反応を観察する。

4. 研究成果

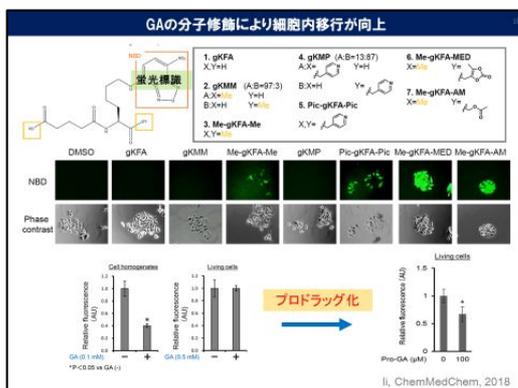
(1) GGCT 阻害物質探索とリード化合物合成

GGCT 酵素反応をミミックする数十種の候補分子を設計し、上記の LISA-101 をもちいて網羅的なスクリーニングを行った (li, Chem Pharm Bull, 2016)。その結果、L-グルタリルアラニン (GA) が最も高い阻害効率であった。



(2) GGCT 阻害効果の検証

GA は GGCT タンパク質への阻害効果は十分だが、そのままの構造では細胞内へは到達できないと判明した。そこで、メチル基・アセトキシメチル基の付加で細胞膜透過性を高めたプロドラッグ (pro-GA, 分子量 289.3, C12H19NO7) を作製した (文献)。

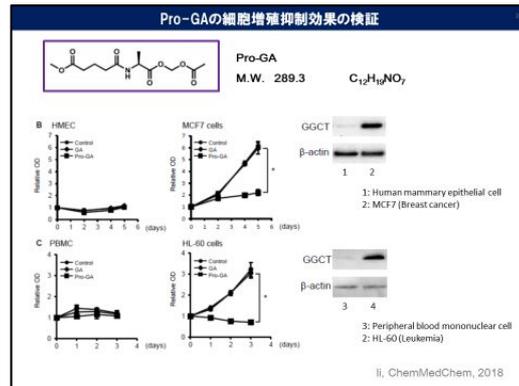


なお, pro-GA の 2 つのエステル基は細胞

内エステラーゼにより速やかに加水分解され、GA に変換される。

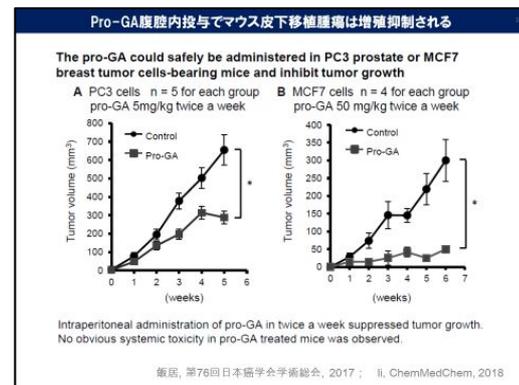
(3) 抗腫瘍効果の検証 (in vitro)

GGCT 高発現乳癌細胞株 MCF7 と正常乳腺細胞 (HMEC) に pro-GA を添加したところ、pro-GA 処置 MCF7 のみに有意な増殖抑制が認められた (文献⑤) また、細胞種を変えて、正常末梢血単核球 (PBMC) と白血病細胞 HL-60 で同様の検討を行ったが、やはり悪性細胞のみに増殖抑制を認めた。



(4) 抗腫瘍効果の検証 (in vivo)

GGCT 高発現細胞株 MCF7 および PC3 を皮下移植した担癌マウスに pro-GA を腹腔内投与 (50mg/kg または 5mg/kg, 2 回/週) し、しゅよう体積を経時的に測定した。いずれの細胞においても有意な腫瘍生育抑制が認められた。また、体重減少などの有害事象は全く認めなかった。



以上の結果より、当初計画した当該研究の目的は達せられたと思われる。

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 15 件)

Yoshida T, Kageyama S, Isono T, Yuasa T, Kushima R, Kawauchi A, Chano T. Superoxide dismutase 2 expression can predict prognosis of metastatic renal cell carcinoma. Cancer Biomarkers. in

press, 2018
Baba M, Kageyama S, Yoshida T,
Fujiwara R, Kim CJ, Takimoto K,
Nagasawa M, Soga H, Nagatani Y,
Nishikawa Z, Kawauchi A. Intravesical
bacillus Calmette-Guerin therapy
after second transurethral resection
for primary T1 bladder cancer. *Int J
Clin Oncol*. in press, 2018. doi:
10.1007/s10147-018-1292-5.
Isono T, Chano T, Yoshida T, Kageyama
S, Kawauchi A, Yonese J, Yuasa T.
Abundance of TRAIL attenuated by
HIF2 and c-FLIP affects malignancy
in renal cell carcinomas. *Oncotarget*,
in press, 2018
Taniguchi K, Matsumura K, Ii H,
Kageyama S, Ashihara E, Chano T,
Kawauchi A, Yoshiki T, Nakata S.
Depletion of
gamma-glutamylcyclotransferase in
cancer cells induces autophagy
followed by cellular senescence. *Am J
Cancer Res*. 2018, 8:650-661 PMID:
29736310
Ii H, Yoshiya T, Nakata S, Taniguchi
K, Hidaka K, Tsuda S, Mochizuki M,
Nishiuchi Y, Tsuda Y, Ito K, Kageyama
S, Yoshiki T. A Novel Prodrug of a
-Glutamylcyclotransferase Inhibitor
Suppresses Cancer Cell Proliferation
invitro and Inhibits Tumor Growth in
a Xenograft Mouse Model of Prostate
Cancer. *ChemMedChem*. 2018 13:155-163.
doi: 10.1002/cmdc.201700660.
Taniguchi K, Matsumura K, Kageyama S,
Ii H, Ashihara E, Chano T, Kawauchi A,
Yoshiki T, Nakata S. Prohibitin-2 is
a novel regulator of p21(WAF1/CIP1)
induced by depletion of
-glutamylcyclotransferase. *Biochem
Biophys Res Commun*. 2018 496:218-224.
doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.029.
Kim CJ, Tambe Y, Mukaisho KI, Sugihara
H, Kageyama S, Kawauchi A, Inoue H.
Periostin suppresses in vivo
invasiveness via PDK1/Akt/mTOR
signaling pathway in a mouse
orthotopic model of bladder cancer.
Oncol Lett. 2017 13:4276-4284. doi:
10.3892/ol.2017.6004.
Yoshiya T, Ii H, Tsuda S, Mochizuki M,
Kageyama S, Yoshiki T. Design of
fluorogenic probes and
fluorescent-tagged inhibitors for
-glutamyl cyclotransferase. *J Pept
Sci*. 2017 23:618-623. doi:
10.1002/psc.2984.
Ii H, Yoshiki T, Hoshiya N, Uenishi J.
Synthesis and GGCT Inhibitory

Activity of N-Glutaryl-L-alanine
Analogues. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*.
2016 64:785-92.doi:
10.1248/cpb.c16-00167.
Isono T, Chano T, Yoshida T, Kageyama
S, Kawauchi A, Suzaki M, Yuasa T.
Hydroxyl-HIF2-alpha is potential
therapeutic target for renal cell
carcinomas. *Am J Cancer Res*. 2016
6:2263-2276 PMID: 27822416
Matsumura K, Nakata S, Taniguchi K, Ii
H, Ashihara E, Kageyama S, Kawauchi A,
Yoshiki T. Depletion of
-glutamylcyclotransferase inhibits
breast cancer cell growth via cellular
senescence induction mediated by CDK
inhibitor upregulation. *BMC Cancer*.
2016 16:748. PMID: 27658708
Fujiwara R, Kageyama S, Tomita K,
Hanada E, Tsuru T, Yoshida T, Narita
M, Isono T, Kawauchi A. Metastatic
Prostatic Ductal Adenocarcinoma
Successfully Treated with Docetaxel
Chemotherapy: A Case Report. *Case Rep
Oncol*. 2015 8:339-44. doi:
10.1159/000438785.
Kageyama S, Hanada E, Ii H, Tomita K,
Yoshiki T, Kawauchi A.
Gamma-Glutamylcyclotransferase: A
Novel Target Molecule for Cancer
Diagnosis and Treatment. *Biomed Res
Int*. 2015 2015:345219. doi:
10.1155/2015/345219.
Kageyama S, Isono T, Iwaki H, Hanada
E, Tomita K, Yoshida T, Yoshiki T,
Kawauchi A. Proteome research in
urothelial carcinoma. *Int J Urol*. 2015
22:621-8. doi: 10.1111/iju.12793.
Noda S, Otsuji T, Baba M, Yoshida T,
Kageyama S, Okamoto K, Okada Y,
Kawauchi A, Onishi H, Hira D, Morita
SY, Terada T. Assessment of
Sunitinib-Induced Toxicities and
Clinical Outcomes Based on
Therapeutic Drug Monitoring of
Sunitinib for Patients With Renal Cell
Carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*.
2015 13:350-8. doi:
10.1016/j.clgc.2015.01.007.

〔学会発表〕(計 10 件)

高木寛子 . -グルタミルシクロトラン
スフェラーゼ阻害剤の細胞老化を介し
た細胞増殖抑制効果と抗がん剤併用に
よるその効果の増強 . 日本薬学会第 138
年会 2018 年 3 月 26 日 石川県立音楽
堂ほか (石川県金沢市)
飯居宏美 . 新規 -グルタミルシクロト
ランスフェラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果
の検討 . 日本薬学会第 138 年会 2018

年3月26日 石川県立音楽堂ほか(石川県金沢市)
飯居宏美. 担癌マウスにおける -グルタミンシクロトランスフェラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果. 第76回日本癌学会学術総会 2017年9月30日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

谷口恵香. -グルタミンシクロトランスフェラーゼ(GGCT)の発現低下はオートファジーを介して細胞老化を誘導する. 第76回日本癌学会学術総会 2017年9月30日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

影山 進. 新規癌増殖因子 GGCT/C7orf24 を標的とした抗がん剤の開発 -小規模プロテオーム解析からの挑戦- 第105回日本泌尿器科学会総会 2017年4月23日 城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

Matsumura K. Depletion of -glutamylcyclotransferase inhibits cancer cell growth through cellular senescence induction. 2016 ASCB (American Society of Cell Biology) Annual Meeting, 2016.12.3, San Francisco, USA

松村健吾. CDKI 誘導を介した -グルタミンシクロトランスフェラーゼの抑制による細胞老化誘導. 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月8日 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Matsumura K. Depletion of -glutamylcyclotransferase inhibits cancer cell growth via cellular senescence caused by CDK inhibitor induction. 24th Biennial Congress of the European Association for Cancer Research, 2016.7.11, Manchester, UK
吉矢 拓. -グルタミンシクロトランスフェラーゼ (GGCT) 基質 "LISA-101" の開発と応用. 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015年12月1日 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

吉矢 拓. -グルタミンシクロトランスフェラーゼ: 蛍光基質 LISA-101 の開発とインヒビター探索. 第20回日本病態プロテアーゼ学会学術集会 2015年8月21日 ANA クラウンプラザホテルグランコート名古屋(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
なし

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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

影山 進 (KAGEYAMA, Susumu)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50378452

(2) 研究分担者

河内 明宏 (KAWAUCHI, Akihiro)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90240952

吉貴 達寛 (YOSHIKI, Tatsuhiko)
滋賀医科大学・医学部・客員教授
研究者番号: 80230704

吉田 哲也 (YOSHIDA, Tetsuya)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60510310

花田 英紀 (HANADA, Eiki)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40555067

富田 圭司 (TOMITA, Keiji)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30640148

平竹 潤 (HIRATAKE, Jun)
京都大学・化学研究所・教授
研究者番号: 80199075

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
なし