

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19873

研究課題名(和文)カルシウムホメオスタシスに着目した新規肝細胞癌治療薬の開発

研究課題名(英文)Development of new chemotherapeutic agent for hepatocellular carcinoma focused on the calcium homeostasis.

研究代表者

稲垣 善則 (INAGAKI, Yoshinori)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40733390

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌は再発が高頻度であり、それに対する有効な化学療法確立が課題となっている。本研究では、ヒト胎児肺繊維芽細胞(HEL細胞)を用いたスクリーニング系を構築し、Ca²⁺-ATPaseの活性阻害剤であるthapsigarginが増殖期の細胞に対して顕著な毒性を示すことを明らかにした。種々の肝癌細胞に対して当該化合物を作用させたところ、静止期細胞に対して毒性を示す濃度よりも100倍程度低い濃度で増殖阻害効果を発揮した。この増殖阻害効果は、肝腫瘍モデルマウスを用いたin vivo試験でも示された。以上の結果から、Ca²⁺-ATPaseの活性阻害剤は肝細胞癌に対する化学療法に有用であると示唆される。

研究成果の概要(英文)：Development of effective chemotherapy is an important task for the improvement of frequent recurrence of hepatocellular carcinoma (HCC). In this study, the screening system of chemical compound using human embryonic lung fibroblast (HEL cell) was established. As the result of screening, thapsigargin (Ca²⁺-ATPase inhibitor) was clarified to have a particular cytotoxic effect against proliferative cells. Thapsigargin showed the cytotoxic effect against various HCC cell lines. This growth inhibitory effect was detected in the in vivo trials using hepatoma model mouse. These results suggest that Ca²⁺-ATPase inhibitor might be useful in the chemotherapy for HCC.

研究分野：腫瘍学

キーワード：肝細胞癌 化学療法 カルシウム ホメオスタシス

1. 研究開始当初の背景

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の5年生存率は他の癌種と比べて顕著に低い。近年の外科的切除術の進歩によって、切除適応の肝細胞癌症例の予後は改善がみられるようになったが、切除不能な症例は依然として予後が悪い。また肝細胞癌の特徴として、術後の再発が非常に高頻度に発生していることが問題となっている。そのため、切除適応外の症例に対する治療や根治術後の補助療法として化学療法が有効となる。従来使用されてきたDNA合成阻害剤のような抗癌剤は、癌細胞以外の正常細胞に対しても作用するため非特異的な副作用が生じる。それが軽減される化学療法剤として注目されている分子標的治療薬は、肝細胞癌の治療においては開発が遅れている。以上のことから、肝細胞癌に対する有効な化学療法の構築が至急の課題となっている。

我々は、ウイルス性肝炎及び肝細胞癌治療に関する新薬開発を目的として、中国・山東大学と協力の下で日中間で構築された共同研究体制に属して研究を展開してきた。その共同研究体制により設立された山東大学中日新薬スクリーニングセンターを中核として、ターゲットの構造活性相関に基づく新規誘導体の設計を可能にするコンピュータ技術を駆使して新規化合物の合成を行っている。過去の研究で、当該共同研究体制は、癌浸潤において重要な役割を果たす様々な因子をターゲットとした阻害剤を設計・合成し、誘導体ライブラリを構築した。その成果として、*in vivo* 担癌モデルにおいて腫瘍拡大抑制効果を示す抗癌剤候補化合物として複数の化合物を見出した (Inagaki Y et al. *Biosci Trends* 4(2), 56-60, 2010)。しかし、これらの化合物の多くは卵巣癌や消化管癌の細胞に対しては増殖抑制効果を示すものの、肝細胞癌に対しては既存の抗癌剤を超えるような顕著な効果を示さなかった。この結果から、肝細胞癌に対する抗癌剤の開発において、これまでとは異なるメカニズムに着目した標的の探索が求められた。

我々の研究グループは、癌細胞が恒常的に増殖する性質を有することを鑑みて、増殖期細胞に対して強い傷害性を示す一方で、細胞分裂を止めた静止期細胞に対しては傷害性を示さない薬剤を探索する系の構築を実施してきた。そして、ヒト胎児肺線維芽細胞 (HEL 細胞) を用いて増殖期細胞と静止期細胞を *in vitro* で分別して作出し、それぞれの細胞に対して化合物を作用させて傷害性を比較することにより、増殖期細胞に対して強い傷害性を有する化合物を探索する系を構築した。その探索系を用いて 370 種類の化合物について細胞傷害性を解析したところ、静止期細胞と比較して増殖期細胞に対して強い傷害性を発揮する化合物を複数見出し

た。なかでも、細胞内のカルシウムホメオスタシス (以下、Ca ホメオスタシス) の調節に作用するとされる化合物 2 種類は、静止期細胞と比較して増殖期細胞に対して 200 から 800 倍の低濃度で傷害性を誘導することを示した。これらの化合物は肝細胞癌培養細胞に対しても同様に強い傷害性を発揮したが、その標的とされる因子や作用機序は不明である。Ca ホメオスタシスの攪乱が、シグナル伝達タンパクの発現や微小管形成の異常を介して癌細胞の細胞死を誘導することが報告されているが (Lu M et al. *Mol Cell* 54(6), 987-98, 2014, Groenendyk J et al. *Sci Signal* 7(329), ra54, 2014)、肝細胞癌を対象としたメカニズムに関する基礎医学的研究や生体内での抗癌効果の誘導における有効性の評価は行われていない。従って、当該化合物の癌細胞傷害性に関する機序を解明することは、未だ途上にある肝細胞癌に対する有望な化学療法の標的を提示すると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、肝細胞癌に対する化学療法戦略の確立を目的として、Ca ホメオスタシスに着目した有望な化学療法の標的の探索とそれに対する化学療法剤の創出とを行うという着想に至った。

3. 研究の方法

3-1. 化合物及び細胞

SERCA 阻害剤である thapsigargin は、和光純薬工業から購入した。肝細胞癌細胞 HuH-7、HLE、HepG2、SK-Hep-1 は、JCRB 細胞バンク、the European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC)、American Type Culture Collection (ATCC) からそれぞれ購入した。

3-2. MTT アッセイ

3-2-1. HEL 細胞を用いた解析

増殖期条件の細胞の解析では、96 ウェルプレートに HEL 細胞を 4×10^3 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 °C において 48 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。

一方、静止期条件の細胞の解析では、96 ウェルプレートに HEL 細胞を 4×10^4 個播種し、1%ウシ胎児血清含有培地に置換して 1 週間培養した。その後、種々の濃度の化合物を含有させた培地を添加し、37 °C において 48 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。

3-2-2. 肝細胞癌細胞を用いた解析

96 ウェルプレートに各種培養細胞を $1-2 \times 10^4$ 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 °C において 48

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 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 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. 肝腫瘍皮下移植モデルを用いた in vivo での抗腫瘍効果の評価

肝細胞癌細胞 HuH-7 を培養し、50%マトリゲルと混合させた後、BALB/c ノードマウスの皮下に 5×10^6 個移植した。腫瘍の大きさが約 500mm³ 程度に生育した段階で、各種濃度の thapsigargin を静脈投与した。そして、投与後 3 日及び 7 日の腫瘍の大きさを計測し、抗腫瘍効果の評価した。

4. 研究成果

4-1. HEL 細胞を用いた細胞毒性評価

培養条件を変えることにより、同一種の細胞で増殖期条件の細胞と静止期条件の細胞を作製する手法を応用し、増殖期条件の細胞に対して顕著な毒性を示す化合物のスクリーニング技術を開発した。この技術を用いて化合物をスクリーニングした結果、増殖期条件の細胞に対して顕著な毒性を示すと判定される化合物を数種類見出した(表 1)。特に、Ca イオンチャネルである SERCA を阻害する機能をもつとされる Thapsigargin は、静止期条件の細胞よりも 750 倍低濃度で増殖期条件の細胞に毒性を示した。癌細胞が恒常的に増殖期条件にあることから、thapsigargin のような性質を有する化合物は抗癌剤候補化合物として有用と考えられる。

表 1 .HEL 細胞を用いたスクリーニング系で増殖期条件の細胞に対して顕著な毒性を示した化合物

| Chemicals | Target | Dividing phase IC ₅₀ * (µM) | Resting phase IC ₅₀ * (µM) | Ratio (resting/dividing) |
|--------------------------------------------|--------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|--------------------------|
| Paclitaxel | Tubulin depolymerization | 0.05 | >100 | > 2,000 |
| Docetaxel | Tubulin depolymerization | 0.01 | 60 | 6,000 |
| Thapsigargin | Ca ²⁺ ATPase | 0.008 | 6 | 750 |
| Cyclohexamide | Protein synthesis | 1.6 | 340 | 213 |
| Cyclohexim D | Actin filamentation | 0.06 | 5.5 | 92 |
| SB225002 | CK2R2 | 1.8 | 36 | 20 |
| Lovastatin | HMG-CoA reductase | 7.5 | 100 | 13 |
| PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor IV | PDGF receptor | 0.2 | > 2 | > 10 |
| Biotinomab | Protonase | 0.2 | 1.3 | 7 |
| Cisplatin | DNA replication | 23 | 120 | 5 |
| Radicicol | Hsp90 | 3 | 13 | 4 |
| Camptothecin | DNA topoisomerase | 1.1 | 2.0 | 2 |
| DMSO | | 400,000 | 400,000 | 1 |

4-2. 肝細胞癌細胞に対する thapsigargin の毒性評価

増殖期細胞に対して顕著な毒性を示すことが示唆された化合物 thapsigargin に関して、各種肝細胞癌細胞に対する毒性を解析し

た。その結果、MTT アッセイ法により導き出される IC₅₀ の数値は 0.006 ~ 131 nM となった。上記の研究において、静止期条件の HEL 細胞における IC₅₀ は 6 µM であったことから、肝細胞癌細胞に対して毒性を示す濃度範囲では静止期細胞に対して毒性を示さないと考えられる。生体内における大部分の細胞は静止期の状態であることから、

表 2 . 各種肝細胞癌細胞に対する thapsigargin の毒性効果

| 各種癌細胞 | IC ₅₀ |
|----------|------------------|
| HuH-7 | 0.006 nM |
| HepG2 | 131 nM |
| SK-HEP-1 | 0.13 nM |
| HLE | 9.35 nM |

4-3. 肝細胞癌細胞の浸潤に対する thapsigargin の効果

肝細胞癌細胞 HuH-7 の浸潤に対する thapsigargin の阻害効果を検討した。その結果、浸潤した細胞数は阻害剤濃度 0.01 nM の条件下で有意に減少した(図 1)。従って、当該化合物は癌細胞の増殖を抑制するとともに、患者の予後に大きく影響する浸潤を阻害する効果を有することが示唆される。なお、阻害剤濃度 10 nM においては、浸潤細胞数は顕著に減少したが、細胞に対する thapsigargin の毒性が発揮されていると考えられる。

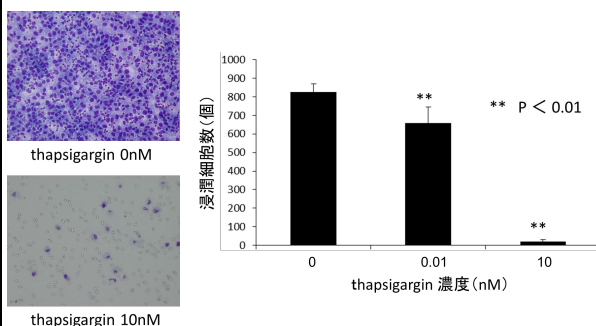


図 1 . 肝細胞癌細胞の浸潤に対する thapsigargin の効果

4-4. 肝腫瘍皮下移植マウスモデルを用いた thapsigargin の抗腫瘍効果の評価

上記の研究項目の成果から、thapsigargin は in vitro において肝細胞癌細胞の増殖及び浸潤を阻害することが示された。そこで、その抗腫瘍効果が生体内においても発揮されるかを明らかにするために、肝腫瘍皮下移植モデルマウスを用いた in vivo 解析を実施した。薬剤容量 0.05 µg/kg 及び 0.5 µg/kg をモデルマウスに対して単回投与したところ、投与後 3 日と 7 日における腫瘍の大きさが PBS 投与群に比べて有意に小さかった(図 2)。ま

た、単回投与においてマウスにおける顕著な体重減少等の副作用は発生しなかった。以上の結果から、thapsigargin の抗腫瘍効果は、生体内においても顕著な毒性を示すことなく誘導可能であると示唆される。

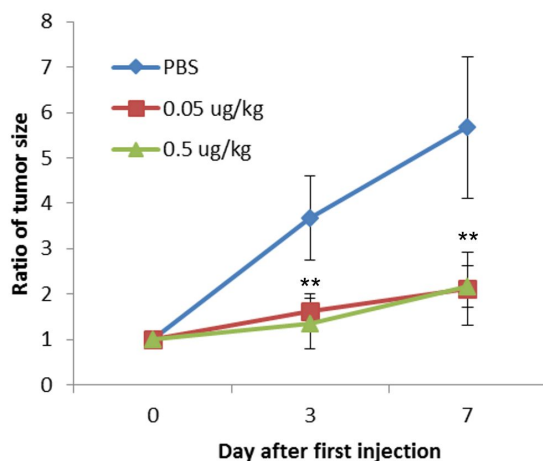


図 2 . 肝腫瘍皮下移植モデルマウスにおける thapsigargin の抗腫瘍効果 (**P<0.01)

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 5 件)

- 1 . Xia J, Inagaki Y, Sawakami T, Song P, Cai Y, Hasegawa K, Sakamoto Y, Akimitsu N, Tang W, Kokudo N. Preliminary investigation of five novel long non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma cell lines. *Biosci Trends*. 2016;10(4):315-9.
- 2 . Inagaki Y, Matsumoto Y, Tang W, Sekimizu K. Dividing phase-dependent cytotoxicity profiling of human embryonic lung fibroblast identifies candidate anticancer reagents. *Drug Discov Ther*. 2016;10(4):195-200.
- 3 . Xia J, Inagaki Y, Song P, Sawakami T, Kokudo N, Hasegawa K, Sakamoto Y, Tang W. Advance in studies on traditional Chinese medicines to treat infection with the hepatitis B virus and hepatitis C virus. *Biosci Trends*. 2016;10(5):327-336.
- 4 . Inagaki Y, Song P, Tang W, Kokudo N. Cancer-associated carbohydrate antigens for clinical diagnostic markers--its effectiveness and limitations. *Drug Discov Ther*. 2015;9(2):129-32.
- 5 . Inagaki Y, Matsumoto Y, Ishii M, Uchino K, Sezutsu H, Sekimizu K. Fluorescence imaging for a noninvasive in vivo toxicity-test using a transgenic silkworm expressing green fluorescent protein. *Sci Rep*. 2015;5:11180.

[学会発表](計 4 件)

- 1 . Kokudo T, Inagaki Y, Hasegawa K, Shirata C, Amikura K, Takahashi A, Kaneko J, Akamatsu N, Arita J, Sakamoto Y, Kokudo N. Preclinical study of c-Met inhibitor as an adjuvant treatment for hepatocellular carcinoma with macroscopic portal vein invasion. 2017 Gastrointestinal Cancers Symposium. 2017 年 1 月 19 日 ~ 21 日 . サンフランシスコ・アメリカ .
- 2 . Kokudo T, Inagaki Y, Hasegawa K, Shirata C, Kaneko J, Akamatsu N, Arita J, Sakamoto Y, Kokudo N. Loss of e-cadherin portal vein tumor thrombosis of hepatocellular carcinoma can be reversed by c-met inhibitor. International Liver Cancer Association 9th Annual Conference ILCA 2015. 2015 年 9 月 4 日 ~ 6 日 . パリ・フランス .
- 3 . Shirata C, Kaneko J, Inagaki Y, Kokudo T, Yamamoto S, Akamatsu N, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N. Near infrared photodynamic therapy using indocyanine green inhibits tumor growth of human hepatocellular carcinoma. International Liver Cancer Association 9th Annual Conference ILCA 2015. 2015 年 9 月 4 日 ~ 6 日 . パリ・フランス .
- 4 . Inagaki Y, Kaneko J, Shirata C, Kokudo T, Yamamoto S, Akamatsu N, Arita J, Tang W, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N. Inhibition of human hepatoma-cell-line tumor growth by near infrared photodynamic therapy with indocyanine green. 第 15 回東京大学生命科学シンポジウム . 2015 年 6 月 27 日 . 東京 .

[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〕
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲垣 善則 (INAGAKI, Yoshinori)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40733390

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

奥祐介 (OKU, Yusuke)
岩手医科大学・薬学部・助教