

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15621

研究課題名(和文) 膵星細胞におけるオートファジー誘導を標的とした新規創薬スクリーニング

研究課題名(英文) New drug discovery screening targeting autophagy

研究代表者

仲田 興平 (NAKATA, Kohei)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：30419569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：膵臓癌間質に存在する線維芽細胞である膵星細胞の活性化にオートファジーが関与していると推測される。本研究では、化合物ライブラリーからのスクリーニングにより新規オートファジー抑制剤となる創薬シーズを検索し、検索された化合物の膵癌や膵星細胞に対する生物学的動態の評価を行い、最終的に新規薬剤を開発することを目的としており、現在PSC抑制作用をもたらすと考えられる化合物を複数同定している。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic stellate cells (PSCs) change from a quiescent to activated state in the tumor microenvironment and secrete extracellular matrix (ECM) molecules and cytokines to increase the aggressiveness of tumors. However, it is not clear how PSCs are activated to produce these factors, or whether this process can be inhibited. We have recently reported regarding the relationships between autophagy and activation of the PSCs and found that autophagy inhibition in PSCs reduced the activation of PSC and proliferation of PSC, followed by the inhibition of the invasiveness of pancreatic cancer cells in vitro and vivo (Endo et al, gastroenterology, 2017). Based on these results we performed high-throughput screening in Drug Discovery for pancreatic cancer targeting pancreatic stellate cells. We found several candidates, which may inhibit the PSCs activation. We also validated and found the compound X truly inhibited PSCs activation and also found it inhibited the proliferation of PSCs.

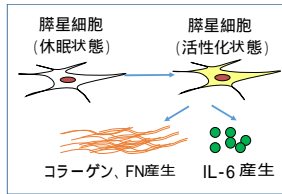
研究分野：医歯薬学

キーワード：オートファジー 膵星細胞 創薬 膵癌

1. 研究開始当初の背景

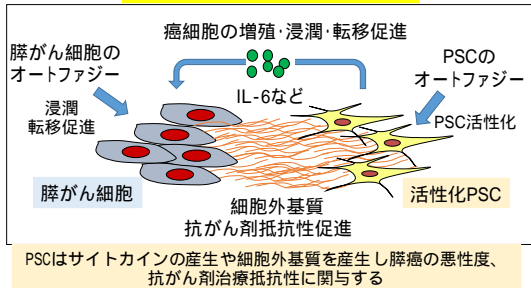
膵癌の5年生存率は10%と極めて低く、その治療法開発は社会的緊急性・重要性が高い。

膵癌細胞周囲には**膵星細胞 (Pancreatic Stellate Cells; PSCs)**と呼ばれる線維芽細胞が存在する(右図)。PSCはIL-6などのサイトカインを産生、癌間質相互作用により癌細胞の浸潤、転移を促進、さらにはコラーゲン、フィブロネクチン(FN)などの細胞外基質を産生することにより乏血管組織を形成、薬剤送達性が低下し抗癌剤治療抵抗性を亢進している(上図)。そのため、PSCの活性化を抑制し、休眠状態(Quiescent状態)へと誘導することが膵癌細胞の悪性を抑制すると考えられていたが、PSCを休眠化する方法は明らかでなかった。



我々は最近オートファジーがPSCの活性化に関与していることを突き止めた(Endo et al, gastroenterology, 2017)。本結果よりPSCのオートファジーを抑制することがPSC活性化の抑制につながり、その結果膵癌を抑制することを同定した(下図)。

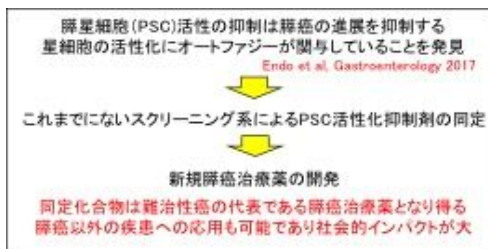
癌間質相互作用とオートファジー



PSCはサイトカインの産生や細胞外基質を産生し膵癌の悪性度、抗癌剤治療抵抗性に関与する

2. 研究の目的

前述の論文の結果を基礎としてPSCにおけるオートファジー誘導を標的とした新規創薬スクリーニングを行う。



3. 研究の方法

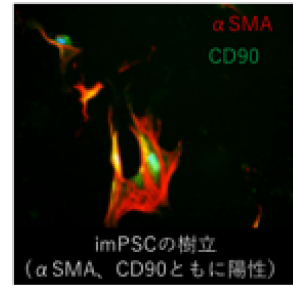
不死化した膵星細胞(imPSC)の作成を行い、オートファジー誘導を客観的に評価する方法を確立後、化合物ライブラリーから新規オートファジー抑制剤のスクリーニングを行う。スクリーニングでは複数の化合物が検出される可能性があるがそれぞれの化合物に対してオ

ートファジー抑制効果の確認を行う。その後、膵癌細胞、imPSCに対するオートファジー抑制効果による浸潤能、増殖能など生物学的動態に与える影響を確認する。その後マウスモデルに対しての検討を行い、毒性の有無を検討し臨床レベルへの応用の可能性を探索する。

4. 研究成果

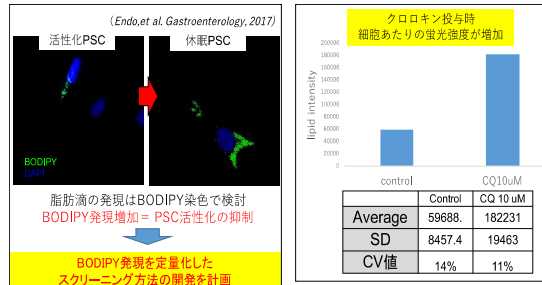
不死化膵星細胞(imPSC)の作成

我々は膵癌患者より得られる手術切除標本を用いて、PSC細胞の作成を継続している。作成された細胞は、PSCの特徴とされるMyofibroblast様の形態を呈し、-SMA, CD90が陽性であることを確認している。一方初代PSCは継代を繰り返すことにより劣化し増殖能が低下する問題があり、長期観察が必要となる*in vivo*や安定した再現性が求められるスクリーニングでの使用には問題があるため申請者はPSCにhTERT, SV40 LargeTを導入し、不死化PSC(imPSCs)を作成に成功、現在複数の初代PSC、imPSCの作成を継続している。



膵星細胞を用いたオートファジー誘導検出アッセイの確立

GFP-RFP-LC3ベクターをPSCおよびimPSCsに導入し、RFP-LC3安定発現細胞の作成を行った、これによりlive状態でのPSCでのオートファジー活性化の評価が可能になった。なお、今回、PSC活性化抑制のマーカとして直接脂肪滴が有用と考えた。そのためオートファジーマーカーではなく、脂肪滴をスクリーニング標的としたスクリーニング系の作成を行った(下図)。



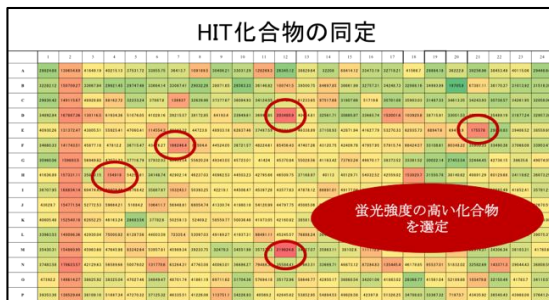
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
A	710757	8007136	882172	8702838	222988	control	258724	2238782	8484	887283	778155	141447	214	262	181981			
B	850484	8609336	873231	8132748	84284		878224	847642	722807	888834	888888	178887	148	262	174917			
C	888888	822222	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
D	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
E	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
F	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
G	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
H	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
I	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
J	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
K	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
L	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
M	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
N	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
O	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			
P	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136		8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136	8007136			

384wellTCQ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

オートファジー抑制化合物のスクリーニングおよびHIT化合物の同定

九州大学化合物ライブラリー創薬先端研究・教育基盤センターの協力のもと東京大学創薬オープンイノベーションセンターが保有する化合物ライブラリーなどを利用しすでに複数のシード化合物を同定している。

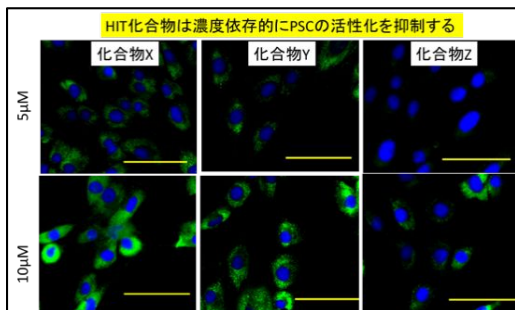
我々はまず既承認薬に対する網羅的探索で膵星細胞を休眠状態に誘導する可能性のある化合物（シード化合物）を152種類同定した。



さらには新規化合物に対するスクリーニングに対してHIT化合物を同定する。創薬機構が保有している化合物サンプルの中で、現有の化合物に対し、忌避構造条件をよりdruglikeに設定し、厳選した1万種類の化合物について、ランダムスクリーニングを行うものである我々はすでに1万種類の化合物提供について承認を受けスクリーニングを一部開始している。

スクリーニングにより検出した新規化合物によるオートファジー抑制の確認

上記で確認した既存薬152種類のvalidationを現在進行させている。スクリーニングで同定されたHIT化合物Xを実際にimPSCに投与し、スクリーニング通りにPSCの活性化が抑制されるかを評価した。PSC活性化抑制の確認には脂肪滴の変化をBODIPYおよび、同じく脂肪滴を染色するLipiDye®で行った。染色で確認されたものはさらにPSC活性化の抑制を確実に確認した。

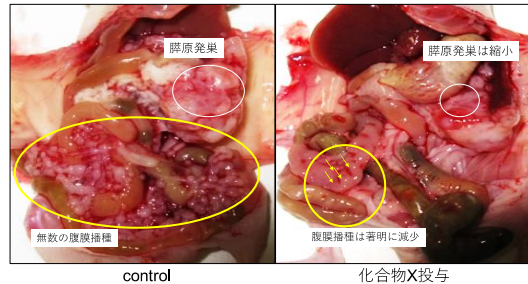


われわれは既にHIT化合物が再現性を持ってPSCを抑制することを確認、さらにはスクリーニングで同定した濃度よりも低い濃度でもPSCの活性化抑制が誘導されることを示した。（前図）

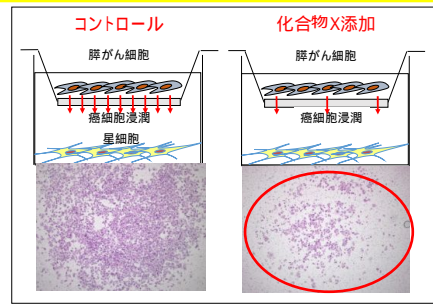
同定薬剤膵星細胞が膵癌の生物学的動態に与える影響の確認

スクリーニング系により同定された薬剤で実際に星細胞の増殖が抑制され、マウスモデルでも転移が抑制される可能性を確認した。

化合物X（既承認薬スクリーニングで同定）は膵がん細胞の浸潤を抑制する



化合物X（既承認薬スクリーニングで同定）は膵がん細胞の浸潤を抑制する



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 1 件)

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 inhibition enhances antiproliferative effect of salinomycin in pancreatic cancer cells, *Pancreatology*, 17(6):990-996, 2017, 査読有, doi: 10.1016/j.pan.2017.08.009

〔学会発表〕(計 2 件)

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 は膵星細胞の活性化に関与しており、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

Koikawa K, Ohuchida K, Ando Y, Kibe S, Nakayama H, Takesue S, Yan Z, Abe T, Okumura T, Iwamoto C, Moriyama T, Nakata K, Miyasaka Y, Okabe Y, Ohtsuka T, Mizumoto K, Nakamura M. Pancreatic organoids elucidate

the new mechanisms of pancreatic cancer local invasion. The 48th Annual Meeting of The American Pancreatic Association, 2017

(4)研究協力者
()

〔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

仲田 興平 (NAKATA, Kohei)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：30419569

(2)研究分担者

白羽根 健吾 (SHIRAHANE, KENGO)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：10529803

当間 宏樹 (TOMA, Hiroki)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：80437780

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

(3)連携研究者
()

研究者番号：