

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08315

研究課題名(和文) ドラッグ・リポジショニングによるコリントランスポーターを標的とした癌治療薬の開発

研究課題名(英文) Development of anticancer drug targeting choline transporter by drug repositioning

研究代表者

稲津 正人 (Inazu, Masato)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：00297269

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)：新規のコリントランスポーターであるcholine transporter-like protein 1 (CTL1) は様々ながん細胞において高発現しており、その機能阻害により細胞増殖の抑制ならびにアポトーシスが誘導されることを見出した。さらに、CTL1阻害剤を既存医薬品および植物由来の有機化合物ライブラリーから探索した結果、有望なイソキノリン誘導体を見出した。本ヒット化合物は新規の治療メカニズムを有する新たな分子標的癌治療薬の候補となり得ると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでの抗がん剤が標的としていない新規のがん治療標的分子であるcholine transporter-like protein 1 (CTL1)を見出し、このCTL1を阻害しアポトーシスによる細胞死を誘導する化合物を発見した。本ヒット化合物のメカニズムも明らかにし、癌細胞移植ヌードマウスにて抗腫瘍効果を確認した。本研究における成果は、新たな分子標的治療薬の開発に繋がり、予防・治療医学および創薬科学への発展に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：A novel choline transporter-like protein 1 (CTL1) was found to be highly expressed in cancer cells, and its inhibition induced apoptosis and suppressed cell growth. Furthermore, the search for CTL1 inhibitors from existing pharmaceutical and plant-derived organic compound libraries led to the discovery of promising isoquinoline derivatives. This hit compound may be a candidate for a new molecularly targeted cancer drug with a novel therapeutic mechanism.

研究分野：薬理学

キーワード：コリン トランスポーター がん治療

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新規のコリントランスポーターである choline transporter-like protein 1 (CTL1)は様々な組織に発現し、CTL1 を介するコリン取り込みは、細胞膜の構成成分であるリン脂質の合成に深く関与しており、細胞増殖に重要な機能分子である。近年、癌細胞においてコリン代謝系の活性増加が報告されており、細胞増殖との関連性が指摘されている。臨床において、PET/CT を用いた癌の画像診断に ^{11}C -コリンや ^{18}F -コリンが用いられるようになり、コリンの腫瘍細胞への集積性の高さが確認されその特性が臨床応用されている。従って、癌細胞は積極的にコリンを取り込み細胞増殖に利用していることが推察される。そこで我々は、癌細胞におけるコリン代謝系の律速段階に関与する CTL1 の機能解析を行い、癌細胞の異常増殖機能との関連性を解明し、新たな分子標的癌治療の研究に着手している。これまでの研究において、グリオーマ、小細胞肺癌、乳癌細胞ならびに大腸癌におけるコリン輸送は CTL1 を介していることを明らかにし、その機能阻害により細胞増殖の抑制ならびにアポトーシスが誘導されることを見出している。これらの知見は、CTL1 分子を標的とした癌治療の可能性を示唆しており、新たな分子標的癌治療薬の開発に繋がると確信する。

2. 研究の目的

様々な癌細胞における CTL1 を介したコリン取り込み機構の異常亢進が癌細胞の増殖と深く関係していることを報告してきた。臨床においてもコリン PET/CT の画像診断によりコリンの腫瘍細胞への集積性の高さが確認されていることより、癌細胞は積極的にコリンを取り込み細胞増殖に利用していることが推察される。多くの癌細胞は新規のコリントランスポーターである CTL1 を介して取り込まれており、CTL1 の機能阻害はアポトーシスを誘導することが確認されている。したがって、CTL1 は癌治療における新規標的分子としての可能性があり、CTL1 阻害剤をドラッグ・リポジショニング研究および植物由来の有機化合物ライブラリーからの探索により見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒトグリオーマ細胞株 U251MG 細胞ヒト食道がん細胞株 KYSE180 細胞およびヒト舌がん細胞株 HSC-3 細胞は、JCRB 細胞バンクより分譲されたものを用いた。ヒト膵臓がん細胞株 MIA PaCa-2 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターより購入し、10%FBS 含有 D-MEM 培地および 10%FBS 含有 RPMI-1630 培地を用いて培養を行なった。全ての培地には 100 units/mL ペニシリンおよび 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを加えた。

(2) 植物由来有機化合物ライブラリー

植物由来有機化合物ライブラリー (500 化合物) は、フランスの Greenpharma 社より購入した。いずれの化合物も 10 mM の DMSO 溶液で遮光下にて冷凍保存した。スクリーニングでは、100% DMSO 溶液を溶媒対照として比較検討した。

(3) コリン取り込み測定

各種がん細胞を 24 穴プレートに 1×10^5 個/well になるように播種し、24 時間後に ^3H コリン取り込み実験を行なった。U251MG 細胞を培養した 24 穴プレートの培地を捨てた後、uptake buffer (125 mM NaCl, 4.8 mM KCl, 1.2 mM CaCl_2 , 1.2 mM KH_2PO_4 , 5.6 mM glucose, 1.2 mM MgSO_4 and 25 mM HEPES, pH 7.4) で洗浄した。uptake buffer を加えた後、最終濃度が 10 μM になるように ^3H コリンを加えて取り込みを開始した。 ^3H コリンの取り込みを行なった後、uptake buffer を吸引し予め冷やしておいた uptake buffer で 2 回洗浄した。細胞は、0.1 M NaOH, 0.1 % Triton X-100 溶液で溶解させ細胞内に取り込まれた ^3H コリン量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

(4) 細胞生存および Caspase-3/7 活性の測定

細胞生存は、CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) を用いて培養中の生細胞数を発光アッセイにより測定した。アポトーシスの指標である caspase-3/7 活性は、caspase-Glo[®] 3/7 Assay Systems (Promega) を用いて発光アッセイにより測定した。Caspase-3/7 活性の測定と同時に生細胞数を測定し、単位生細胞数あたりの活性として評価した。

(5) RT-PCR 法による mRNA の定量

U251MG 細胞および不死化ヒト正常アストロサイトの Total RNA は、RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) を用いて抽出した。

コリントランスポーター (CHT1, CTL1-5, OCT1-3)、スフィンゴミエリナーゼ (SMPD1-4, SMPDL3A, SMPDL3B)、サバイビン (Survivin1-3) およびハウスキーピング遺伝子の GAPDH、B2M

の mRNA 発現は、各ターゲット遺伝子に対する TaqMan Probe (Applied Biosystems) と TaqMan[®] RNA-to-Ct[™] 1-Step Kit (Applied Biosystems) を用いて LightCycler[®] 96 システム (Roche) にて定量化した。

(6) Western blot 法によるタンパクの定量

U251MG 細胞のタンパクは RIPA buffer を用いて抽出し、超音波による破碎後 2-Mercaptoethanol と Laemmli Sample Buffer (BIO-RAD) を混合、加熱しサンプルを調整した。Mini-PROTEAN[®] TGX[™] (BIO-RAD) を用いて電気泳動、Trans-Blot[®] Turbo[™] Transfer System (BIO-RAD) で PVDF membrane に転写を行った。転写した membrane は iBind[™] Flex Solution Kit (Invitrogen) を用いて blocking 後、一次抗体 (抗 CTL1, 2 抗体、抗 SMPD4 抗体、抗 Survivin1 抗体) を反応させ、次に HRP 結合抗ウサギ、マウス二次抗体を用い、ECL[™] Prime Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) にて検出した。

(7) 細胞免疫染色

100% エタノールにて細胞を固定し、一次抗体 (抗 CTL1, 2 抗体、抗 COX 抗体、抗 Carnexin 抗体) を反応させ、二次抗体に Alexa Fluor488 goat anti-rabbit IgG、Alexa Fluor568 goat anti-mouse IgG を用いて免疫陽性の蛍光画像を共焦点レーザー顕微鏡 (FV10i-DOC: オリンパス) を用いて取り込んだ。核の染色は DAPI を用いた。

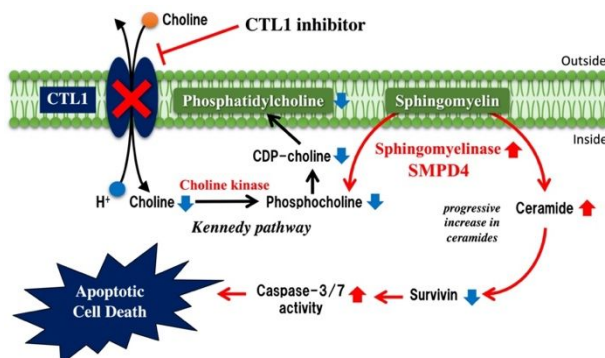
(8) ヒトがん異種移植モデルマウスにおけるヒット化合物の抗腫瘍効果の観察

雄性ヌードマウスにがん細胞の懸濁液を皮下注射により移植した。定着後はその固形腫瘍をブロック状にし、次のマウスに植え継いだ。腫瘍体積が 200 mm³ を超えてから、化合物を 10 mg/kg を腹腔内投与した。対照は同容量の 100% DMSO を用いた。体重と腫瘍の長径 (L)、短径 (W) を測定し、 $L \times W^2 \times 1/2$ を推定腫瘍体積として観察した。各種臓器の Total RNA は PS 2000 Cell Destroyer を用いて臓器を破碎後に抽出を行った。

4. 研究成果

口腔領域の癌である舌がんおよび食道がんにおいて RT-PCR、Western blot および免疫染色により CTL1 および CTL2 が高発現していることを見出した。細胞外からのコリン輸送には CTL1 がコリン取り込みに関与していることを明らかにした。さらに、CTL1 を介したコリン取り込みを阻害することによりアポトーシス誘導による細胞死が観察され、CTL1 はがん治療の標的分子になりうると考えられる。さらに、食道がんにおいてカチオン系医薬品のコリン取り込み阻害作用および細胞死誘導作用を検討した結果、既存医薬品のアゼラスチン、クレマスチン、ロラタジン、ルパタジン、ペプリジル、メキタジン、パロキセチンがコリン取り込み阻害によるアポトーシス誘導を引き起こすことを明らかにした。しかしながら、これらの薬物の臨床使用量と比較すると効果を発現する濃度は高濃度でありドラッグ・リポジショニングとして臨床応用するには難しいと判断した。

そこで、CTL1 阻害剤を植物由来の有機化合物ライブラリー (500 化合物) からスクリーニングを行った。その結果、CTL1 阻害作用を有し、アポトーシス誘導による細胞死を引き起こすヒット化合物のイソキノリン誘導体を見出した。これらの化合物はグリオーマ細胞、膵臓がん細胞、舌がん細胞に対して有効であり、マウスがん移植モデルにてがん細胞の増殖抑制を確認した。また、下記のアポトーシス誘導メカニズムを解明した。CTL1 阻害作用により細胞内コリン量の減少により細胞膜の主成分である phosphatidylcholine 合成が低下し、細胞膜合成が出来ず増殖抑制が引き起こされる。しかし、癌細胞は増殖能を維持する代償機構として sphingomyelinase-4 を活性化して sphingomyelin を分解して phosphocholine を供給することで細胞膜合成を維持しようとするが同時にアポトーシス誘導分子である ceramide が生成する。この ceramide により caspase-3/7 が活性化され細胞死が誘導される。また、ceramide はアポトーシス抑制因子の survivin 発現を抑制してアポトーシス誘導を増加させる事が示唆された。



これらの結果は、従来の抗がん剤とは異なる作用機序を持つコリントランスポーター CTL1 を含むコリンの代謝系を標的とした新規抗がん剤の開発につながる可能性があることと結論づけられる。植物由来の有機化合物のライブラリーから発見されたイソキノリン誘導体は、新しい治療機序を持つグリオーマ治療のリード化合物となりうる。コリン PET は、前立腺がん、乳がん、食道がんの肺転移、縦隔リンパ節転移を含む複数の腫瘍のイメージングに高い効果を示すことが示さ

れており、この治療メカニズムは多くの腫瘍に対しても提案される可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Fumiaki Nagashima, Ryohta Nishiyama, Beniko Iwao, Yuiko Kawai, Chikanao Ishii, Tsuyoshi Yamanaka, Hiroyuki Uchino and Masato Inazu	4. 巻 26
2. 論文標題 Molecular and Functional Characterization of Choline Transporter-Like Proteins in Esophageal Cancer Cells and Potential Therapeutic Targets	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biomolecules & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 399-408
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4062/biomolther.2017.113	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Masato Inazu, Iwao Saiki, Hiroyuki Uchino, Tsuyoshi Yamanaka	4. 巻 30
2. 論文標題 Choline transporter-like protein 1 (CTL1/SLC44A1) is a therapeutic target molecule for prostate cancer therapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Oncology	6. 最初と最後の頁 i7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/annonc/mdz029.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Saiki I, Yara M, Yamanaka T, Uchino H, Inazu M	4. 巻 28
2. 論文標題 Functional Expression of Choline Transporter-Like Protein 1 in LNCaP Prostate Cancer Cells: A Novel Molecular Target	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules & Therapeutics	6. 最初と最後の頁 195-201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4062/biomolther.2019.097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 稲津正人	4. 巻 75
2. 論文標題 癌治療の新しい分子標的としての choline transporter-like proteins (CTLs)	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 東京医科大学雑誌	6. 最初と最後の頁 51-65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ishikawa T, Suwanai H, Shikuma J, Suzuki R, Yamanaka T, Odawara M, Inazu M	4. 巻 21
2. 論文標題 Protein kinase C promotes choline transporter-like protein 1 function via improved cell surface expression in immortalized human hepatic cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Medicine Reports	6. 最初と最後の頁 777-785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2019.10894	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Inazu M	4. 巻 11
2. 論文標題 Functional Expression of Choline Transporters in the Blood-Brain Barrier	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nutrients	6. 最初と最後の頁 2265
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nu11102265	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Inazu M, Hirai K, Watanabe S, Shibata K, Nishijima N, Yamanaka T	4. 巻 suppl 92
2. 論文標題 Exploratory research in plant-derived natural organic compounds with antitumor activity targeting choline transporter	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Pharmacol. Sci.	6. 最初と最後の頁 P111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/jpssuppl.92.0_3-P-111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Inazu M, Hirai K, Watanabe S, Nishijima N, Shibata K, Hase A, Gido R, Yamanaka T	4. 巻 31
2. 論文標題 Development of new therapeutic drugs for pancreatic cancer targeting choline transporter-like protein 1 (CTL1/SLC44A1)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Annals of Oncology	6. 最初と最後の頁 S8-S9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.annonc.2020.01.044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Masato Inazu, Masayuki Seki, Tsuyoshi Yamanaka, Masato Odawara
2. 発表標題 Functional analysis of choline transporter-like proteins in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts: A novel molecular target for rheumatoid arthritis
3. 学会等名 The 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Inazu, Iwao Saiki, Hiroyuki Uchino, Tsuyoshi Yamanaka
2. 発表標題 Choline transporter-like protein 1 (CTL1/SLC44A1) is a therapeutic target molecule for prostate cancer therapy
3. 学会等名 TAT2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田薫、西島希、渡邊才一郎、吉森彩、石川卓也、松井元介、森井貫、近津大地、稲津正人
2. 発表標題 植物化学とがん治療の融合 ~ コリントランスポーターを標的とした舌がん治療剤の探索 ~
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西島希、柴田薫、渡邊才一郎、吉森彩、石川卓也、町田優一、林睦実、山中力、稲津正人
2. 発表標題 植物化学とがん治療の融合 ~ Fight Against Glioma ~
3. 学会等名 第13回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲津正人、柴田薫、西島希、渡邊才一郎、平井花歩、山中力
2. 発表標題 コリントランスポーターを標的とした抗腫瘍活性を有する植物由来天然有機化合物の探索
3. 学会等名 第7回 医薬工3大学包括連携推進シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Inazu, Kaho Hirai, Saiichiro Watanabe, Kaoru Shibata, Nozomi Nishijima, Tsuyoshi Yamanaka
2. 発表標題 Exploratory research for plant-derived natural organic compounds with anti-tumor activity targeting choline transporter
3. 学会等名 The 92th Annual Meeting of the Japanese Pharmacological Society
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊才一郎、林睦実、西島希、柴田薫、吉森彩、町田優一、松井元介、森井貫、平井花歩、山中力、稲津正人
2. 発表標題 植物化学とがん治療の融合～コリン代謝系を標的とした抗腫瘍活性を有する植物由来天然有機化合物の探索～
3. 学会等名 第182回東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masato Inazu
2. 発表標題 Functional expression of choline transporter-like proteins (CTLs/SLC44A) in human tongue cancer: A novel molecular target for tongue cancer therapy.
3. 学会等名 10th BioMedical Transporters Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 稲津正人
2. 発表標題 細胞増殖と生存に対するコリントランスポーターCTLs/SLC44A の役割
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会アップデートシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hirai K, Nishijima N, Shibata K, Watanabe S, Yamanaka T, Inazu M
2. 発表標題 Choline transporter-like protein 1 (CTL1/SLC44A1) is a therapeutic target molecule for cancer therapy
3. 学会等名 The 7th China-Japan Joint Meeting of Basic and Clinical Pharmacology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 稲津正人、平井花歩、渡邊才一郎、柴田薫、西島希、山中力
2. 発表標題 コリントランスポーターを標的とした抗腫瘍活性を有する植物由来天然有機化合物の探索
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊才一郎、平井花歩、西島希、長谷紅音、儀同りこ、山中力、稲津正人
2. 発表標題 がん治療標的分子としてのCholine transporter-like proteins (CTLs/SLC44A)-植物由来天然化合物からの探索研究-
3. 学会等名 第14回トランスポーター研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平井花歩、渡邊才一郎、柴田薫、西島希、山中力、稲津正人
2. 発表標題 Drug discovery from plant-derived natural products as a treatment against pancreatic cancer: Search for choline transporter inhibitors
3. 学会等名 第8回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊才一郎、林睦実、西島希、柴田薫、吉森彩、町田優一、松井元介、森井貫、平井花歩、山中力、稲津正人
2. 発表標題 植物化学とがん治療の融合 ~コリン代謝系を標的とした抗腫瘍活性を有する植物由来天然有機化合物の探索~
3. 学会等名 第8回医薬工3大学包括連携推進シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平井花歩、渡邊才一郎、西島希、柴田薫、長谷紅音、儀同りこ、山中力、稲津正人
2. 発表標題 がん治療におけるcholine transporter-like protein 1 (CTL1)を標的とした新規化合物の抗腫瘍効果
3. 学会等名 第4回黒潮カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 長谷紅音、儀同りこ、平井花歩、渡邊才一郎、山中力、稲津正人
2. 発表標題 ヒト肝がん細胞株HuH-7におけるコリントランスポーターの機能解析およびコリン取り込み阻害剤の効果
3. 学会等名 第184回 東京医科大学医学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 稲津正人(分担)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 東京科学同人	5. 総ページ数 256
3. 書名 新スタンダード栄養・食物シリーズ13、分子栄養学 科学的根拠に基づく食理学	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 がん治療剤	発明者 稲津正人	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-53259	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----