

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10813

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫に対する新規PI3K阻害剤を用いた治療法の開発

研究課題名(英文) Development of strategies to treat malignant mesothelioma by novel PIK3CA inhibitors

研究代表者

猶本 良夫 (Naomoto, Yoshio)

川崎医科大学・医学部・特任教授

研究者番号：00237190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：胸膜中皮腫における、PI3K活性高値は予後不良因子であることが報告されている。今回我々は、新たにiMDKをリード化合物とする誘導体(derivatives)の合成を行い、これらの小分子化合物の悪性胸膜中皮腫に対する抗腫瘍性を検討した。上皮型胸膜中皮腫株：MSTO-211Hにおいて、2種の派生化合物がiMDKよりも低濃度で抗腫瘍性を示した。当該化合物添加後48時間後のウェスタンブロット解析のからリン酸化AKTの抑制が確認できた。またBcl-2阻害剤：ABT263はiMDKのMSTO211H株における抗腫瘍効果を増強し、併用効果の有効性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸膜中皮腫における有効な分子標的療法は未だ樹立されていない。その中で近年、悪性胸膜中皮腫におけるPI3Kinase活性が予後不良因子であり、当該活性を抑制することで中皮腫の増殖を抑制できることが報告された(Varghese et al. Cancer 117. 361-71. 2011)。本研究において、iMDK派生化合物X,Yは中皮腫細胞株MSTO211Hに対し低濃度で抗腫瘍性を示し、臨床化合物として有望と考えられた。本研究による新規治療開発は、平均生存期間が1年未満という悪性胸膜中皮腫の予後の改善、胸水貯留による呼吸困難や胸痛等の症状の緩和を目指すものであり、その学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：We have developed an inhibitor, iMDK, that is specific for the cancer related growth factor Midkine and reported that this small compound can inhibit the PI3Kinase / AKT pathway and induce an antitumor effect in lung cancer. In the present study, we have synthesized derivatives of iMDK and investigated the antitumor properties of these small molecule compounds in malignant mesothelioma. In MSTO-211H malignant pleural mesothelioma cells, two of the newly synthesized compounds showed antitumor activity at lower concentrations than iMDK. Furthermore, immunoblot assays revealed that these two compounds suppressed the phosphorylation of AKT at a lower concentration than iMDK 48 hours after treatment. Moreover, a Bcl-2 inhibitor, ABL263, enhanced the antitumor effect induced by iMDK in MSTO-211H cells, suggesting that inhibition of PIK3CA and Bcl-2 might be a promising therapy to treat mesothelioma.

研究分野：食道癌、肺癌、胸膜中皮腫に対する新規補助療法の開発

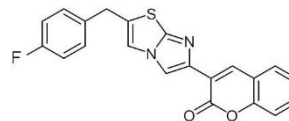
キーワード：胸膜中皮腫 PIK3CA AKT

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は、癌特異的増殖因子である Midkine に対する特異的阻害剤：iMDK の開発を行い、当該低分子化合物が PI3Kinase/AKT を阻害し、肺癌に対し抗腫瘍効果を誘導できること報告した (Fukazawa T et al. PLoS One. 8: e71093. 2013, Exp Cell Res. 335: 197-206. 2015)。今回我々は、新たに

図1 iMDK構造式



米国 San Diego にある Sanford-Burnham Medical Research Institute (SBMRI) との共同研究により iMDK (図1) をリード化合物とする誘導體 (derivatives) の合成に成功した。

現在、肺癌における EGFR 遺伝子変異や EML4-ALK fusion に対する分子標的療法が、治療に欠かせないモダリティーとなっている一方で、胸膜中皮腫に対する有効な標的治療法は確立されていない。この中で、Varghese らは、胸膜中皮腫の多くで PIK3CA 遺伝子変異や PI3Kinase の活性化がみられ、予後と相関することを報告した (Cancer 117. 361-71. 2011)。本研究において、上記 iMDK 派生化合物の最適化と抗腫瘍効果の解析を行うことで、胸膜中皮腫に対する臨床試験、また新たな臨床研究への展開へと繋がる有効かつ低毒性の治療薬開発を行う。

2. 研究の目的

胸膜中皮腫に対する臨床試験、また新たな臨床研究への展開へと繋がる有効かつ低毒性の治療薬開発を行う。本研究の目的は、iMDK 派生化合物からの最適化ならびに薬効試験を行うことで、手術不能進行肺扁平上皮癌への臨床試験に繋がる新規臨床化合物の創出にある。胸膜中皮腫は現在、アスベスト公害病として社会問題化している予後不良疾患である。治療法として外科手術や化学療法が試みられているが、特に瀰漫性悪性胸膜中皮腫における治療効果は限られている。また本邦における中皮腫患者は今後 30 年間増加することが確実であり、新しい治療法開発が急務となってきている (Imai m et al. Cancer Sci.11: 1483-5. 2015. Robinson BW, N Engl J Med. 1591-1603, 2005)。また Midkine の発現のある癌腫、PI3Kinase が活性化している癌腫は多く (Muramatsu T. J Biochem. 132:359-71.2002, Oglino S et al. Oncogene. 33:2949-55. 2014)、本研究成果は多種の癌治療にも応用できることが期待される。

3. 研究の方法

1) iMDK 誘導體の中皮腫および肺癌細胞株を用いた薬効の解析

胸膜中皮腫細胞株に対し、各種派生化合物を順次投与し、72 時間後の cell viability を tripan blue exclusion assay で測定した。また PIK3CA 遺伝子変異を持ち PIK3CA 活性の高い肺扁平上皮癌細胞株 HCC95 (University of Texas Southwestern Medical Center の Adi Gazdar 教授より入手済み) をコントロールとして使用した。

2) iMDK 誘導體の下流シグナルの解析

上記検討における AKT、pAKT 発現を immunoblot 法で解析した。また iMDK 誘導體からの apoptosis を TUNEL 法にて検出した。

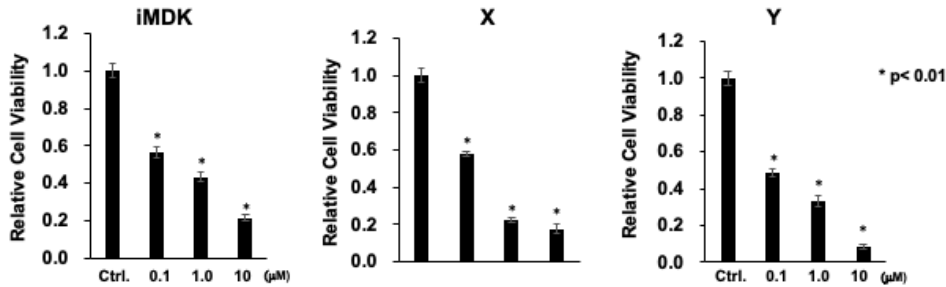
3) 多種分子比標的薬剤との併用効果を 1.と同様の方法で検討した。

4. 研究成果

1) iMDK 誘導体の肺癌細胞株を用いた薬効の解析

iMDK 誘導体 X,Y は中皮腫細胞株 MSTO211H に対し、iMDK よりも低濃度で増殖能を抑制した (図 2)。

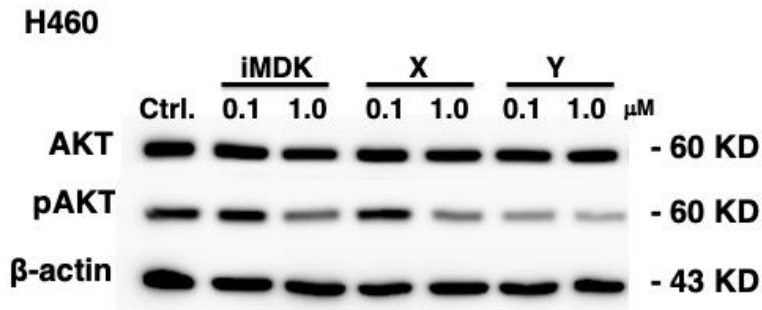
図 2



2) iMDK 誘導体の下流シグナルの解析

MDK 誘導体 X,Y は AKT 活性の高い肺癌細胞株 H460 に対し、iMDK と同等または低い濃度で投与後 48 時間において、リン酸化 AKT 発現を抑制することを確認した (図 3)。

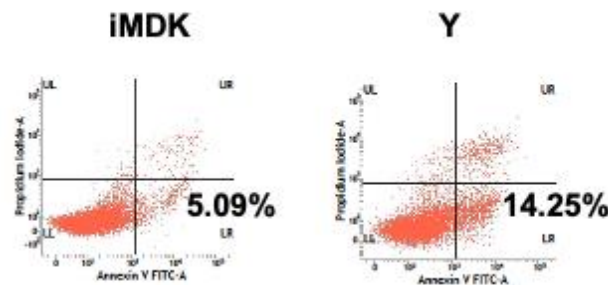
図 3



3) iMDK 誘導体からの apoptosis の解析

Anexin V を用いたフローサイトメトリー解析において MDK 誘導体 Y は H460 に対し、0.1μM で投与後 24 時間において、iMDK より多くの細胞に後期 apoptosis を誘導することが出来た (図 4)。

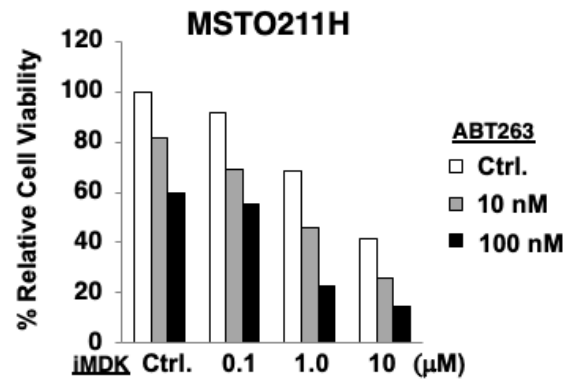
図 4



4) Bcl-2 阻害剤: ABT263 の併用効果の検討

中皮腫細胞: MSTO211H において ABT263 は投与後 72 時間において、濃度依存性に iMDK の抗腫瘍効果を増強した (図 5)。

5



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Takuya Fukazawa, Yuitaka Maeda, Tomoki Yamatsuji, Munenori, Takaoka, Masakazu Yoshida, Naomasa Ishida, Miki Iwai, Etsuko, Yokota, Takuro Yukawa, Minoru Haisa, Noriko Miyake, Tomoko Ikeda, Nagio Takigawa, Jeffery Whitsett, Yoshio Naomoto |
| 2. 発表標題 Development of a novel targeted therapy for malignant mesothelioma by a midkine inhibitor. |
| 3. 学会等名 ACR Annual Meeting 2017 (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

| | | |
|--|---|-------------------------------------|
| 産業財産権の名称 METHODS AND COMPOSITIONS TO TREAT CANCER | 発明者 深澤拓也 Whitsett Jeffrey A 前田 豊 | 権利者 シンシナティ チルドレンズホ スピタル 深澤 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、WO/2018/022973 | 出願年 2017年 | 国内・外国の別 外国 |

〔取得〕 計1件

| | | |
|--|--------------|---------------|
| 産業財産権の名称 METHODS AND COMPOSITIONS TO TREAT CANCER | 発明者 深澤拓也 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、PCT/US2017/044335 | 取得年 2018年 | 国内・外国の別 外国 |

〔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 |
|-------|---|-----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 深澤 拓也 (Fukazawa Takuya) (20379845) | 川崎医科大学・医学部・准教授 (35303) | |
| 研究分担者 | 山辻 知樹 (Yamatsuji Tomoki) (40379730) | 川崎医科大学・医学部・教授 (35303) | |
| 研究分担者 | 高岡 宗徳 (Takaoka Munenori) (50548568) | 川崎医科大学・医学部・講師 (35303) | |