

令和 2 年 5 月 3 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11873

研究課題名(和文) Angiogeninの活性阻害剤N65828による口腔癌分子標的治療への展開

研究課題名(英文) Development of molecular target therapy for oral cancer by an inhibitor of angiogenin activity, N65828

研究代表者

岸本 晃治 (Kishimoto, Koji)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40243480

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)：血管新生蛋白angiogenin(ANG)は、血管内皮細胞と癌細胞内で核に移行し、リボソームRNAの転写を促進する。その結果、ANGは腫瘍血管新生作用と同時に癌細胞自身への直接的な増殖作用を誘導することによって癌進展に影響を及ぼす。本研究により、ANGのリボヌクレアーゼ活性に対する小分子阻害剤N65828 [8-amino-5-(40-hydroxybiphenyl-4-ylazo)naphthalene-2-sulfonate]は、腫瘍血管新生だけでなく、癌細胞の増殖を直接的に抑制することによって癌の進展を抑制すると考えられた。したがって、N65828は新規口腔癌治療薬の候補と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、腫瘍増殖や血管新生に対する様々な分子標的治療薬の開発が進み臨床応用されている。本研究の特色は、N65828がANGを標的として、血管新生阻害剤であると同時に抗悪性腫瘍剤の性格も兼ね備えている点に着目し、全く新規的な癌治療薬を開発しようとした点である。また、ANGが特に口腔癌組織で強発現しているという特殊性に着目し、N65828を口腔癌治療薬に応用しようとした試みは独創的である。N65828は、ANGのリボヌクレアーゼ活性を阻害することによって抗腫瘍効果を発揮すると考えられ、他のANG阻害薬との相乗の抗腫瘍効果も期待できる。今後、N65828による口腔癌分子標的治療への展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：An angiogenic protein, angiogenin (ANG) undergoes nuclear translocation and stimulates ribosomal RNA transcription in both endothelial and cancer cells. Consequently, ANG has a dual effect on cancer progression by inducing both angiogenesis and cancer cell proliferation. Our results revealed that N65828 [8-amino-5-(40-hydroxybiphenyl-4-ylazo)naphthalene-2-sulfonate], a small-molecule inhibitor of the ribonucleolytic activity of human ANG effectively inhibits oral cancer progression through inhibition of tumor angiogenesis. N65828 also directly inhibits proliferation of certain types of oral cancer cells. Therefore, N65828 has potential as a lead compound for oral cancer therapy.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：angiogenin N65828 口腔癌 新規口腔癌治療薬 リボヌクレアーゼ リボソームRNA 血管新生 抗腫瘍効果

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

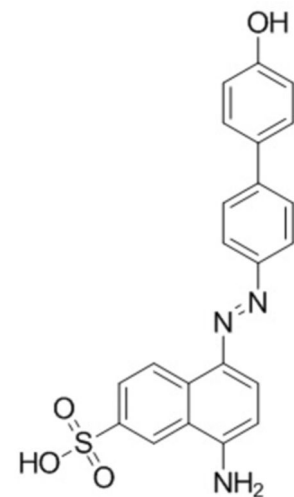
Angiogenin (ANG) は、1985 年にハーバード大学医学部病理学講座 Dr. BL Vallee らにより、HT-29 大腸癌細胞の培養上清から世界で最初に分離された分子量 14 kDa の血管新生蛋白である。申請者らの研究成果によれば、ANG は血管内皮細胞のみならず癌細胞においてもエンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ、核に移行する。そして、リボソーム RNA 遺伝子のプロモータ領域に結合しリボソーム RNA の転写を促進することによって、リボソームの産生、蛋白質への翻訳、細胞増殖を誘導する。したがって、ANG は腫瘍血管新生作用と同時に癌細胞自身への直接的な増殖作用という dual effect を有する。さらに、ANG には癌細胞において p53 を介するアポトーシスを抑制する作用がある。以上から、ANG は癌治療の分子標的になる可能性が考えられる。

一般に、ANG は大腸癌、乳癌、前立腺癌、頭頸部癌など種々の癌組織でその発現が亢進しているが、特に口腔癌で強発現が認められる。すなわち、口腔癌細胞を低酸素下で培養すると多量の ANG を分泌することから、口腔癌組織での ANG の強発現は低酸素環境が原因と考えられる。したがって、ANG は特に口腔癌治療の分子標的として有望と考えられる。

現在は、ANG に対する有効な阻害剤の探索・開発が急務であり、申請者らは ANG に対するモノクローナル抗体、アンチセンス、siRNA、ANG の核移行阻害剤 neamine、分泌阻害剤 terrein を作製し、これらの抗腫瘍効果について検討を行い、新規口腔癌治療薬としての応用の可能性を検討している。

ANG がその生物活性を發揮するためには、リボヌクレアーゼ活性を有することと、ANG が核に移行することが必須である。2002 年に申請者が所属していたハーバード大学医学部病理学講座の Shapiro 博士らのグループは、ANG のリボヌクレアーゼ活性部位に対する小分子阻害剤 N65828 [8-amino-5-(40-hydroxybiphenyl-4-ylazo)naphthalene-2-sulfonate;  $K_i = 81 \mu\text{M}$ ] を同定した。そして、申請者らは N65828 が、リボソーム RNA の転写を阻害し、AKT で誘導された前立腺癌の発生と増殖を抑制することを示してきた。そこで、申請者らは、HSC-2 口腔癌細胞に対する N65828 の阻害活性を調べた結果、HSC-2 細胞に対する増殖抑制作用 ( $\text{IC}_{50} 1.1 \mu\text{M}$ ) があることを *in vitro* で確認した。以上から、ANG のリボヌクレアーゼ活性を阻害する小分子化合物 N65828 は、口腔癌に対して有効に抗腫瘍効果を示し、新規口腔癌治療薬として応用できる可能性が考えられる。

しかし、現段階では N65828 が、前立腺癌を始めとした数種の癌細胞に対して増殖抑制作用と腫瘍血管新生阻害作用を有することは確認されているが、N65828 の口腔癌に対する抗腫瘍効果とそのメカニズムの詳細については明らかにされていない。



N65828 の構造

### 2. 研究の目的

本研究では、口腔癌に対する N65828 の抗腫瘍効果を評価するとともに、ANG 阻害作用を介する抗腫瘍効果のメカニズムを *in vitro* および *in vivo* で検討する。そして、N65828 が口腔癌に対して有効に抗腫瘍効果を示し、新規口腔癌治療薬として応用できる可能性をもつか否かを明らかにする。

### 3. 研究の方法

最初に、N65828 の口腔癌細胞に対する増殖抑制作用と ANG の活性阻害作用について *in vitro* で検討する。次に、ヌードマウスへの口腔癌細胞皮下移植モデルを用いて、腫瘍増殖、血管新生、リボソームの生合成に対する N65828 の影響を明らかにする。また、N65828 の副作用についても検討する。

- (1) 新たに合成した N65828 の ANG に対するリボヌクレアーゼ活性阻害作用を、イースト tRNA に対する ANG のリボヌクレアーゼ活性により測定確認後、以下の実験を行う。
- (2) N65828 の口腔癌細胞に対する抗腫瘍効果の検討: N65828 の HSC-2 および HSC-3 細胞に対する増殖抑制作用を MTT アッセイで測定する。
- (3) N65828 による口腔癌細胞内での ANG の核移行阻害作用の検討: HSC-2 および HSC-3 細胞に対して、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  の ANG のみ添加したものと、N65828 処理を 10 分間行い ANG を添加したものをそれぞれ作製する。細胞をメタノールで固定後、抗 ANG 抗体 26-2F ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) および Alexa Flour 488 でラベルした 2 次抗体を順次反応させ染色し検鏡する。
- (4) ヌードマウスを用いたヒト口腔癌細胞皮下移植モデルにおける N65828 の抗腫瘍効果の検討: 5 週齢雄 BALB/C 系ヌードマウスの背部皮下に HSC-2 細胞 50,000 個を移植する。腫瘍生着後、N65828 ( $6 \mu\text{g}/\text{g}$  body weight、週 3 回) の腹腔内注射を行い(コントロール群には PBS を投与) 腫瘍に対する抗腫瘍効果を検討する ( $n=8$ )。なお、腫瘍の長径と短径を隔日で計測し、腫瘍体積を算出する。
- (5) 免疫組織化学染色: 採取された腫瘍組織を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、パラフィ

ン包埋した標本から厚さ 4.0 $\mu$ m の連続切片を作製し、間接酵素抗体法 (Envision system, Dako) を用いて染色を行う。癌細胞および血管内皮細胞の核における ANG の発現を調べるために、抗 ANG 抗体 26-2F (希釈率 1:100) を使用する。また、抗 PCNA 抗体 (希釈率 1:200; Dako) を用い染色し、腫瘍増殖率を算出する。腫瘍内微小血管の同定には、抗 CD31 抗体 (希釈率 1:100; Abcam) を用い、VECTASTAIN Elite ABC Kit (Vector Lab) により血管内皮細胞の染色を行い評価する。

- (6) Nucleolar organizer regions (NOR)の銀染色：N65828 のリボソームの生合成に対する影響の検討には、標本の nucleolar organizer regions (NOR)の銀染色を行い、30 個の無作為に選択した核の NOR のドット数の平均値によってリボソームの生合成率を評価する。

#### 4. 研究成果

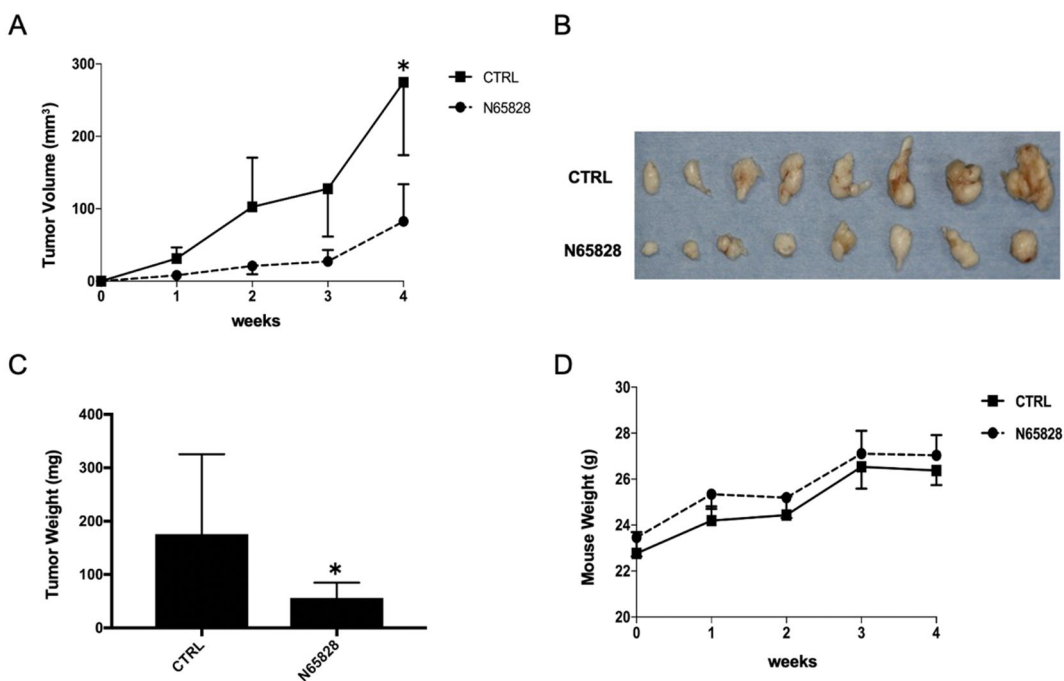


図 1. ノードマウスに植え付けたHSC-2細胞腫瘍の増殖に対するN65828の影響

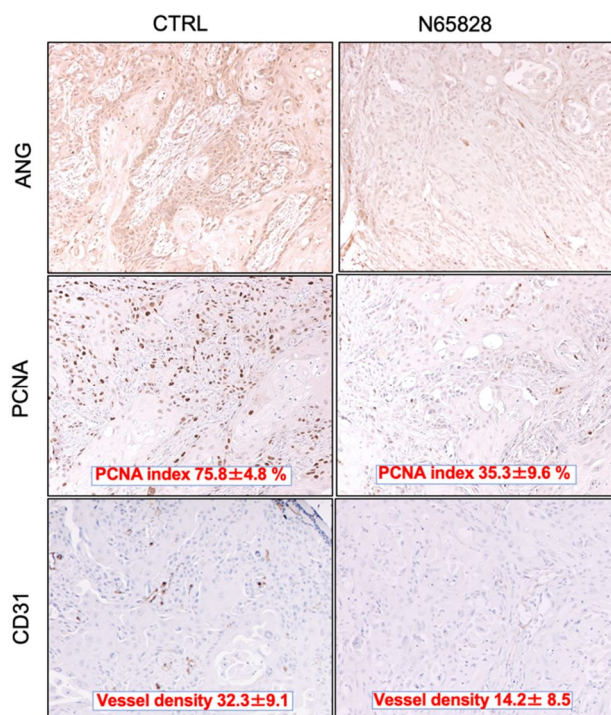


図 2. 免疫組織化学染色

- (1) 新たに合成した N65828 は、ANG に対するリボヌクレアーゼ活性阻害作用を有していることを確認した。
- (2) N65828 は、HSC-2 および HSC-3 細胞に対して、10-100 $\mu$ M の濃度で増殖抑制効果を *in vitro* で示した。
- (3) N65828 は、HSC-2 および HSC-3 細胞に対して、ANG の核移行阻害作用を示した。
- (4) N65828 は、ヌードマウスに植え付けた HSC-2 細胞腫瘍に対して有意な腫瘍増殖抑制効果を示した (図 1)。なお、今回の N65828 の投与量・回数・経路では、生体への副作用は認めなかった。
- (5) 採取された腫瘍組織において、N65828 による ANG の発現抑制、腫瘍増殖率の低下、腫瘍内微小血管数の減少が認められた (図 2)。
- (6) 採取された腫瘍組織における CTRL 群の NOR dot 数  $42 \pm 3.7$ 、N65828 の NOR dot 数  $31 \pm 4.7$  と、N65828 投与により NOR のドット数の低下が認められた。したがって、N65828 は、リボソームの生合成を抑制し、腫瘍増殖を抑制していると考えられた。

以上より、ANG の活性阻害剤 N65828 は新規口腔癌分子標的治療薬の候補と考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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	奥井 達雄  (Okui Tatsuo)  (40610928)	岡山大学・大学病院・助教    (15301)	
研究分担者	伊原木 聡一郎  (Ibaragi Soichiro)  (80549866)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授    (15301)	