

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09212

研究課題名(和文) CK2阻害剤による副腎皮質癌やステロイド産生副腎腫瘍の新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Developing a novel treatment of adrenocortical carcinoma by a CK2 inhibitor

研究代表者

大江 賢治 (Ohe, Kenji)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：30419527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：CX-4945はCK2阻害剤として知られているが、近年、スプライシングが関与するCLKの阻害効果が報告されている。今回、副腎皮質癌細胞株H295Rにおいて、副腎皮質のマスター・レギュレーターであるNR5A1のmultiple exon skipping、さらにステロイド代謝酵素遺伝子の転写抑制による異常ステロイドホルモン産生低下、さらに、オートファジー誘導による増殖抑制を発見した。

そして、H295R細胞株の担癌ヌードマウスにおいて、CX-5945を腹腔内投与したところ、腫瘍重量、腫瘍体積の減少という知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

副腎皮質癌は、現在の標準的治療であるミトタン-EDP療法では、全生存期間14.8か月で、最新のチェックポイント阻害薬(ペムブロリズマブ)でも全生存期間は、24.9か月である。

今回、発見したCX-4945の副腎皮質癌細胞株H295Rに対する、NR5A1のmultiple exon skippingによる発現抑制、これによる異常ステロイドホルモン産生低下、CX-4945によるH295R細胞のオートファジー誘導による増殖抑制、H295R担癌ヌードマウスにおける腫瘍重量、腫瘍体積の減少、という新知見を得た。

本成果は、悪性度の高い進行副腎皮質癌の治療に役立つことを願っている。

研究成果の概要(英文)：CX-4945 is a so-called casein-kinase 2 inhibitor but recent reports show that it works as a CLK2 inhibitor, a splicing inhibitor that is. We found that it induces multiple exon skipping of the master regulator of the adrenal cortex, NR5A1, resulting in lack of transactivation of steroidogenic enzymes and concomitant steroid production. It also induces autophagy in H295R cells to inhibit its growth.

Most importantly, it reduces tumor weight and volume of H295R cells transplanted to nude-mice.

研究分野：内分泌、腫瘍、RNAスプライシング

キーワード：副腎皮質癌 治療 RNAスプライシング オートファジー

1. 研究開始当初の背景

副腎皮質腫瘍には、副腎癌やステロイド産生副腎腫瘍などが知られているが、薬物による治療は限定的で摘出が原則である。申請者および分担者は 293 細胞において、ステロイド合成酵素遺伝子の発現解析を進める過程で、casein-kinase 2(CK2)阻害剤である CX-4945 がステロイド産生を制御するマスター遺伝子である NR5A1 遺伝子の発現抑制に寄与していることを見つけた。

(1) CX-4945 は、副腎癌のステロイド産生 H295R 細胞株において数  $\mu\text{M}$  のレベルで細胞死が認められた (既存薬のミトタンの 5 倍の活性) (図 1 (A))。

(2) CX-4945 は、ステロイド合成に重要な転写因子である NR5A1 (*Ad4BP/SF-1*) 遺伝子の mRNA 発現を抑制した (図 1 (B))。

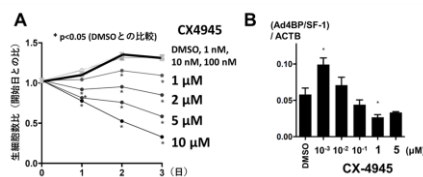


図 1 (A) 副腎癌 H295R 細胞に対する CX-4945 の効果 (MTS assay) と (B) CX-4945 の Ad4BP/SF-1 mRNA に対する効果 (RT-PCR)

2. 研究の目的

CX-4945 が、NR5A1 遺伝子をどのように発現抑制し、副腎皮質癌におけるステロイドホルモンの異常産生および異常増殖にどのように影響を与えるか解明し、臨床応用の可能性を探りたい。

3. 研究の方法

- (1) H295R 細胞に CX-4945 を添加し、オートファジーとアポトーシスの誘導を解析した。
- (2) H295R 細胞に CX-4945 を添加し、マイクロアレイを行なった。
- (3) H295R 細胞に CX-4945 を添加し、NR5A1 の発現を RT-PCR, ウェスタン解析にて解析した。
- (4) ヒト NR5A1 プロモーター解析により CX-4945 の NR5A1 の転写レベルの影響を検討した。
- (5) H295R 細胞に CX-4945 を添加し、ステロイドホルモンを測定し、影響を検討した。
- (6) H295R 細胞をヌードマウスに移植し、CX-4945 の経口投与による腫瘍増殖への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) H295R 細胞に CX-4945 を添加し、オートファジーとアポトーシスの誘導を解析したところ、lysotracker 染色により、著明なオートファジー誘導が認められた (図 2a)。また、caspase 3 の切断 (図 2b) と TUNEL 陽性細胞の増加 (図 2c) がみられ、CX-4945 によりオートファジー関連アポトーシスが誘導されることが認められた。そこで、CX-4945 を添加したときの遺伝子発現を網羅的に解析するためにマイクロアレイを行なった。

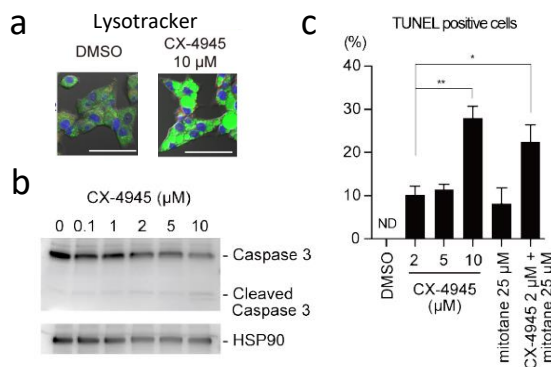


図 2. CX-4945 による H295R 細胞のオートファジー関連アポトーシス誘導

(2) H295R 細胞に CX-4945 を添加し、マイクロアレイを行ったところ、CX-4945 は H295R 細胞において、ステロイド関連遺伝子 (図 3a) や 選択的スプライシングに関与する遺伝子 (図 3b) の発現を低下させることが示唆された。この二つの知見より NR5A1 の選択的スプライシングが示唆されたため、NR5A1 遺伝子の全長に近い部分を RT-PCR により解析することにした。

a down-regulated genes (functional annotation clustering by DAVID analyses)

Annotation Cluster	Enrichment Score	Count	P Value
Annotation Cluster 1	14.95	225	3.10E-21
UP_KEYWORDS	Mitochondrion	225	3.10E-21
UP_KEYWORDS	Transit peptide	125	4.60E-17
UP_SEQ_FEATURE	transit	111	4.00E-14
GOTERM_CC_DIRECT	mitochondrial matrix	80	2.80E-10
Annotation Cluster 2	6.19	111	2.50E-09
UP_KEYWORDS	Oxidoreductase	111	2.50E-09
GOTERM_BP_DIRECT	oxidation-reduction process	108	7.20E-06
GOTERM_MF_DIRECT	oxidoreductase activity	46	1.50E-05
Annotation Cluster 3	4.94	33	1.00E-10
UP_KEYWORDS	Steroid metabolism	33	1.00E-10
UP_KEYWORDS	Steroid metabolism	27	2.00E-09
UP_KEYWORDS	Cholesterol metabolism	24	6.90E-09
UP_KEYWORDS	Steroid biosynthesis	15	7.10E-06
GOTERM_BP_DIRECT	cholesterol biosynthetic	16	1.50E-05
UP_KEYWORDS	Steroid biosynthesis	12	2.30E-05
UP_KEYWORDS	Cholesterol biosynthesis	9	4.50E-04
GOTERM_BP_DIRECT	isoprenoid biosynthetic	8	5.60E-04
GOTERM_BP_DIRECT	cholesterol metabolic process	18	2.20E-03
KEGG_PATHWAY	Steroid biosynthesis	8	1.20E-02
KEGG_PATHWAY	Terpenoid backbone	8	2.00E-02

b down-regulated genes (functional annotation chart by DAVID analyses)

Category	Term	Count	%	P-Value	
1	UP_KEYWORDS	Alternative splicing	1455	65.4	3.00E-46
2	UP_KEYWORDS	Phosphoprotein	1131	50.8	1.40E-28
3	UP_KEYWORDS	Cytoplasm	709	31.9	5.80E-23
4	UP_KEYWORDS	Acetylation	536	24.1	2.50E-22
5	UP_SEQ_FEATURE	splice variant	1056	47.4	2.60E-21
6	UP_KEYWORDS	Mitochondrion	225	10.1	3.10E-21
7	UP_KEYWORDS	Transit peptide	125	5.6	4.60E-17
8	GOTERM_CC_DIRECT	mitochondrion	255	11.5	8.80E-16
9	UP_KEYWORDS	Membrane	978	43.9	3.10E-15
10	UP_SEQ_FEATURE	transit peptide:Mitochondrion	111	5	4.00E-14
11	UP_KEYWORDS	Transferase	273	12.3	6.90E-12
12	GOTERM_MF_DIRECT	protein binding	1185	53.2	7.70E-12
13	KEGG_PATHWAY	Metabolic pathways	237	10.6	3.30E-11
14	GOTERM_CC_DIRECT	cytosol	506	22.7	3.40E-11
15	UP_KEYWORDS	Endoplasmic reticulum	185	8.3	4.00E-11
16	UP_KEYWORDS	Mitochondrion inner membrane	68	3.1	4.00E-11
17	UP_KEYWORDS	Disease mutation	374	16.8	6.90E-11
18	UP_KEYWORDS	Steroid metabolism	33	1.5	1.00E-10

図 3. CX-4945 を添加した H295R 細胞のマイクロアレイ解析

(3) マイクロアレイの結果、たしかに NR5A1 遺伝子の発現低下を認めた (図 4a)。そこで、H295R 細胞に CX-4945 を添加し、NR5A1 の発現を RT-PCR を行なったところ、全長 (full length) がほぼすべて、NR5A1 ex1, 2, 3, 7 (エキソン 4, 5, 6 の multiple exon skipping による生じたアイソフォーム) と NR5A1 ex1, 2, 7 (エキソン 3, 4, 5, 6 の multiple exon skipping による生じたアイソフォーム) にほぼすべて変化した (図 4b: lane 1 DMSO コントロール、lane 2 CX-4945 10  $\mu$ M)。

(4) ヒト NR5A1 プロモーター解析により CX-4945 の NR5A1 の転写レベルの影響を検討したところ、CX-4945 10  $\mu$ M では活性の低下を認められたが、有意ではなく CX-4945 は、NR5A1 の転写活性へ影響しないと考えた (図 4c)。また、CX-4945 添加した H295R 細胞の NR5A1 のウエスタン解析を行なったところ、発現低下がみられた。図 4b lane 2 の CX-4945 により生じたアイソフォームの発現プラスミドを作製し、StAR プロモーターの活性を検討したところ、NR5A1 全長のようなステロイド関連遺伝子の転写活性化能は認められなかった。

(5) CX-4945 による H295R 細胞のステロイド関連遺伝子の mRNA 発現への影響を調べたところ、NR5A1 の発現低下と同じ低下がみられた (StAR (図 5a), CYP11A1 (図 5b), HSD3B2 (図 5c))。また、H295R 細胞に CX-4945 を添加し、ステロイドホルモンを測定し、影響を検討したところ、アルドステロンの産生低下 (図 5d) とコルチゾール (図 5e) の産生低下を認めた。以上より、CX-4945 は、NR5A1 の異常スプライシングにより NR5A1 発現低下によるステロイドホルモンの産生低下およびオートファジー関連アポトーシスを誘導したことより、つぎに担癌マウスにおいて CX-4945 の効果を試すことにした。

(6) H295R 細胞をヌードマウスに移植し、CX-4945 の経口投与による腫瘍増殖への影響を検討したところ、腫瘍重量 (図 6a) と腫瘍体積 (図 6b) の減少傾向がみられ、マウスにおいて CX-4945 の H295R 副腎皮質癌に対し、抗腫瘍効果を認めた。このような化合物による組織のマスター遺伝子の異常スプライシングの誘導による発現抑制は初めての知見 (図 6c) であるとともに、予後が悪い副腎皮質癌の治療に適用されることを願っている。

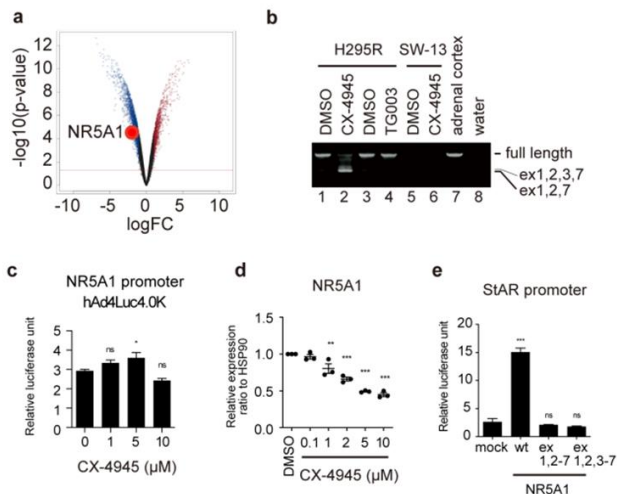


図 4. CX-4945 による H295R 細胞における NR5A1 遺伝子の異常スプライシング

図 4. CX-4945 による H295R 細胞における NR5A1 遺伝子の異常スプライシング

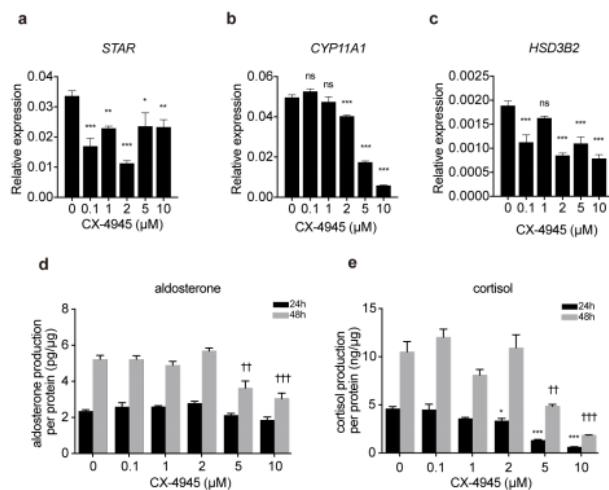


図 5. CX-4945 による H295R 細胞のステロイドホルモン産生能の低下

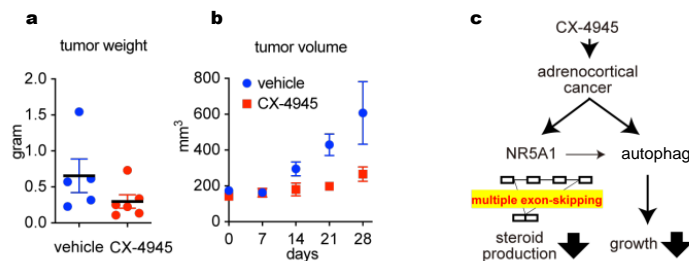


図 6. H295R 細胞移植ヌードマウスに CX-4945 を腹腔投与したところ、(a) 腫瘍重量と (b) 腫瘍体積の現象が見られた。(c) モデル図

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ohe Kenji, Tanaka Tomoko, Horita Yuta, Harada Yoshihiro, Yamasaki Takafumi, Abe Ichiro, Tanabe Makito, Nomiyama Takashi, Kobayashi Kunihisa, Enjoji Munechika, Yanase Toshihiko	4. 巻 512
2. 論文標題 Circular IRE-type RNAs of the NR5A1 gene are formed in adrenocortical cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1~6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.02.151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tomoko Tanaka, Kenji Ohe, Takashi Nomiyama, Toshihiko Yanase.
2. 発表標題 20.CX-4945 as a novel adrenocortical carcinoma drug that induces multiple exon-skipping and circular RNA of NR5A1.
3. 学会等名 ENDO2019, (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大江賢治、堀田裕太、田中智子、原田義広、森征慶、村田雄介、遠城寺宗近、柳瀬敏彦
2. 発表標題 ヒト副腎皮質に発現しているIREタイプの新規環状RNAの発見
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka T, Ohe K, Nomiyama T, Yanase T
2. 発表標題 CX-4945 as a novel adrenocortical carcinoma drug that induces multiple exon-skipping and circular RNA of NR5A1
3. 学会等名 ENDO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tanaka T, Ohe K, Abe I, Kobayashi K, Enjoji M, Yanase T
2. 発表標題 CX-4945 is a novel candidate for the treatment of adrenocortical tumors
3. 学会等名 20th European Congress of Endocrinology (Barcelona, Spain) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中智子、大江賢治、阿部一朗、小林邦久、柳瀬敏彦
2. 発表標題 CX-4945はH295R細胞の増殖およびホルモン産生を抑制する
3. 学会等名 第91回日本内分泌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔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	田中 智子  (Tomoko Tanaka)  (10380528)	福岡大学・医学部・講師   (37111)	
研究分担者	遠城寺 宗近  (Munechika Enjoji)  (20253411)	福岡大学・薬学部・教授   (37111)	
研究分担者	蘆田 健二  (Kenji Ashida)  (40549333)	久留米大学・医学部・准教授   (37104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------