

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07157

研究課題名(和文) 乳がんにおけるc-Mycと合成致死作用を示す新たな抗がん剤の創出

研究課題名(英文) Development of new anticancer drugs that exhibit synthetic lethal effects with c-myc on breast cancer

研究代表者

山崎 洋子 (YAMAZAKI, Yohko)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所 沼津支所・研究員

研究者番号：80342690

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)：c-Mycの過剰発現や過剰活性化はヒトのがんで高頻度にもとめられ、多くのがんでドライバーとして機能している。しかしながら、c-Mycはアンドラッグプルターゲットとされており、その機能をダイレクトに阻害することは依然として極めて困難である。申請者らは、c-Mycと合成致死を示す低分子化合物の発見を目指して、乳がん細胞株を用いた合成致死スクリーニング系を構築し、1万種類以上の微生物培養液および化合物をスクリーニングした。その結果、本研究所で合成されたTriQuinoline (TQ) がc-Myc発現量に依存した細胞毒性を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんは年々罹患率が増加しており、日本では約8人に1人が生涯で乳がん罹患する。乳がんは遠隔再発や遠隔転移が起こると治療は非常に困難であり、現在のところ完治する可能性は極めて低い。若年性の乳がんはトリプルネガティブ乳がんの割合が有意に高く、トリプルネガティブ乳がんにおける特徴としてc-Mycの高発現が見られるという報告がある。本研究はこれまで標的として創薬が困難であったc-Mycを利用した創薬研究であり、探索研究から有望な低分子化合物であるTriQuinoline (TQ) を発見した。今後、TQをシーズとした創薬開発を行うことにより新しい機序の抗がん剤を乳がん患者に提供できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：c-Myc overexpression and overactivation were observed in various cancer types, and c-Myc is a well-established cancer driver gene. c-Myc has been considered an undruggable target, it is extremely difficult to inhibit its function directly. We have constructed a screening system using breast cancer cell lines and screened 10,000 culture broths of microorganisms and our in-house chemical library. As a result, we found that TriQuinoline (TQ), which was synthesized in our laboratory, showed more potent cytotoxicity to c-Myc overexpression cells than to non-c-MYC overexpressing cells.

研究分野：創薬研究

キーワード：合成致死 c-Myc 乳がん

1. 研究開始当初の背景

c-Myc は 1980 年代にバーキットリンパ腫の原因遺伝子として同定された遺伝子である。バーキットリンパ腫では、c-Myc とイムノグロブリンの相互転座により c-Myc の過剰発現が起こり、リンパ腫発症の原因となっている。現在では、がん種を問わず多くのがんで c-Myc の発現上昇や c-Myc タンパク質の異常な蓄積が報告されており、c-Myc は最も有名ながん遺伝子の 1 つとなっている。

c-Myc の C 末端には、bHLH-LZ(basic helix-loop-helix-leucine zipper)ドメインが存在し、このドメインを介してパートナー因子である MAX とヘテロダイマーを形成し、DNA の E ボックスモチーフ (5' -CACGTG -3') に結合して転写因子として機能する。

一方、乳がんは日本人女性のがん罹患の中で最多であり、その罹患率は一貫して増加している。乳がんにおいては臨床病理的に遺伝子解析に基づいたサブタイプ分類が行われ、治療方針が決定される。この中で若年層に多く予後の悪いトリプルネガティブ乳がんにおいて c-Myc の高発現がみとめられることが報告されている (Nat Med. 2016, 4:427-432, Nat Med. 2016, 22:1321-1329)。

c-Myc をダイレクトに阻害することが非常に困難であることは、これまでの研究で明らかになっている。そこで本研究においては c-Myc と合成致死の作用を示す低分子化合物の探索を行った。合成致死スクリーニングは概して RNA 干渉法を利用して行われるが、申請者らは微生物が生産する培養液からの合成致死スクリーニング系を構築した。

2. 研究の目的

c-Myc の過剰発現や過剰活性化はヒトのがんで高頻度にとめられ c-Myc は有望な治療標的分子として期待されている。しかしながら、c-Myc は固定した構造を持たず低分子化合物がアクセスする結合ポケットも有していないため Undruggable target (創薬が困難な治療標的)であり、未だに c-Myc を標的とした創薬には成功例がない。また、c-Myc は正常細胞でも重要な役割を担っていることから c-Myc を阻害することにより重大な副作用も懸念される。

そこで申請者らは c-Myc をダイレクトに阻害することを回避し、合成致死理論に基づいた創薬研究法を精選した。本研究では乳がんにおける c-Myc と合成致死作用を示す新たな抗がん剤の創出を目的とする。

3. 研究の方法

スクリーニング

c-Myc と合成致死作用を示す化合物を得るためのスクリーニングは MCF-7 と Hs578T の 2 つのヒト乳がん細胞株を用いて行う。ウェスタンブロットによる解析で c-Myc 発現は MCF-7 で非常に高く、Hs578T では非常に低いことが確認された。そこで、発現の高い MCF-7 においては siRNA を用いて c-Myc をノックダウンさせた細胞を作成した。また、発現の低い Hs578T においてはレンチウイルスを用いて c-Myc 遺伝子を導入し、恒常的に c-Myc タンパク質を過剰発現させた細胞を作成した。これら 2 種類の細胞における細胞毒性をそれぞれの親株における細胞毒性と比較し、c-Myc 発現が強い細胞で高い細胞毒性を示し、c-Myc 発現が弱い細胞では細胞毒性が低い培

養液をヒットとする。スクリーニングソースとしては当研究所で作成した放線菌、カビ、昆虫病原系状菌などの微生物培養液、および当研究所所有の化合物ライブラリーを用いた。

活性物質生産菌の大量培養

活性が確認できた微生物培養液を活性物質単離精製のために大量培養する。

活性物質生産菌の単離精製

各種クロマトグラフィーを組み合わせることにより活性物質の単離精製を行う。各精製ステップにおいて活性を評価し、着実に活性物質が得られるようにする。

活性物質生産菌の構造決定

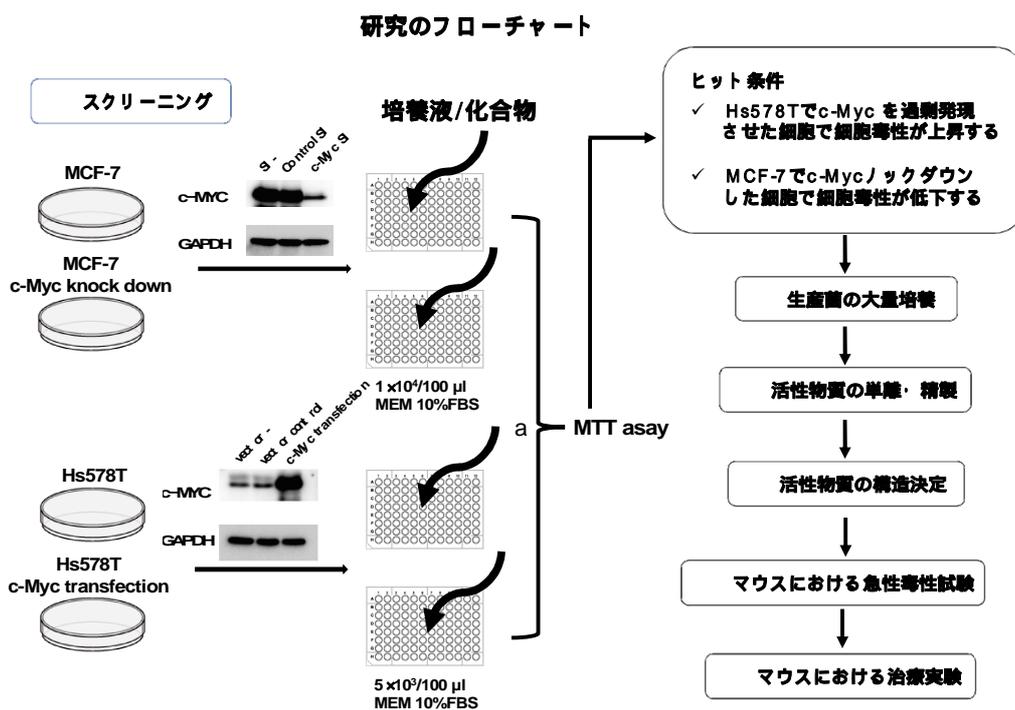
NMR、MS、IRの各スペクトルから単離した化合物の化学構造を明らかにする。

マウスにおける急性毒性試験

いかに *in vitro* での活性が優れた物質でも毒性が高くては制がん剤のリード化合物として不適切である。マウスに得られた化合物を経口、経静脈、腹腔内投与で投与し、2週間体重の変化と生死を観察する。

マウスにおける治療実験

得られた化合物が *in vivo* で制がん効果を示すかどうか免疫不全マウスを用いてゼノグラフトモデルで評価を行う。



4. 研究成果

Compound X

スクリーニングは 1 万種類以上の微生物培養液および化合物について行い、カビの培養液 (6005-48) が乳がん細胞株 MCF-7 および Hs578T において c-Myc 発現レベルに依存した細胞毒性を示すことが明らかになった。そこで、麦を主原料とした培地にてフラスコ 75 本の固体培養を行い、活性物質をエタノールで抽出した。次に、エタノールを減圧蒸留後、蒸留水を加え酢酸ブチルで抽出を行った。さらに、シリカゲルクロマトグラフィーを 2 回行った後 LH20 カラムクロマトグラフィーを行い、最後に高速液体クロマトグラフで単一の活性体を得た。MS, NMR の各種スペクトルによる構造解析の結果、これまで報告のない新規な構造を有する低分子化合物 (Compound X) であることが明らかになった。この化合物の MCF-7 および Hs578T を用いた c-Myc 発現レベルに依存した細胞毒性は図 1 に示す通りである。精製前は、MCF-7 において c-Myc をノックダウンした時に細胞毒性の減弱がみとめられたが、単離した Compound X にはその活性

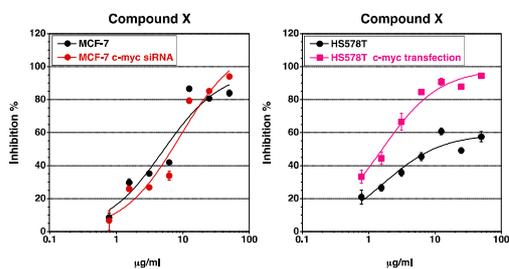


図1. Compound Xのc-Myc依存性細胞毒性

はみとめられなかった。しかしながら、Hs578T においては c-Myc を過剰発現させた細胞に強い細胞毒性を示すことが明らかになった。

さらにヒト乳がん細胞株 T47D および MDA-MB-453 において c-Myc をノックダウンし、細胞毒性を親株と比較したが Compound X の細胞毒性は c-Myc の発現量を変化させても変化がみとめられなかった。

TriQuinoline (TQ)

TriQuinoline (TQ) は当研究所で合成された化合物であり (Nat Commun. 2019, 10:1-11) スクリーニングにおいて図 2 に示すように強い c-Myc 発現レベルに依存した細胞毒性を示した。次に本化合物のマウスにおける急性毒性を経口投与、静脈内投与、皮下投与にて解析した。その結果、12.5 mg/kg の静脈内投与でマウスは死亡し、6.25 mg/kg の静脈内投与では生存が確認できた。この生存マウスの解剖所見では臓器に異常はみとめられなかった。また、経口投与および皮下投与では 50 mg/kg の投与でマウスは生存し、解剖所見でも臓器に異常はみとめられなかった。

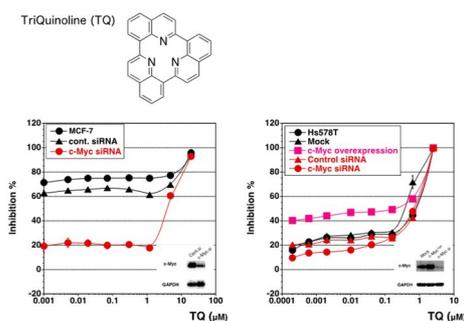


図2. TQの構造とc-Myc依存性細胞毒性

次に Hs578T を用いてゼノグラフトモデルで抗腫瘍効果の解析を試みたところ、Hs578T が BALB/nu-nu に生着できないことが造腫瘍性試験によって明らかになった。そこで、NOD/SCID を用いて再度 Hs578T で造腫瘍性試験を行ったが、やはり Hs578T は NOD/SCID にも生着することができなかった。当研究所が所有するヒト乳がん細胞株でマウスに生着できる細胞株がなかったため、ヒトメラノーマ LOX-IMVI を用いてマウスにおける TQ の抗腫瘍効果を解析した。これは TQ の細胞毒性が増殖に早い細胞に強い傾向がみとめ

次に Hs578T を用いてゼノグラフトモデルで抗腫瘍効果の解析を試みたところ、Hs578T が BALB/nu-nu に生着できないことが造腫瘍性試験によって明らかになった。そこで、NOD/SCID を用いて再度 Hs578T で造腫瘍性試験を行ったが、やはり Hs578T は NOD/SCID にも生着することができなかった。当研究所が所有するヒト乳がん細胞株でマウスに生着できる細胞株がなかったため、ヒトメラノーマ LOX-IMVI を用いてマウスにおける TQ の抗腫瘍効果を解析した。これは TQ の細胞毒性が増殖に早い細胞に強い傾向がみとめ

られたことと LOX-IMVI の増殖がマウスにおいて非常に早いことから決定された。LOX-IMVI における TQ の c-Myc 依存的な細胞毒性は、MCF-7 と比較して同等な活性であった。

LOX-IMVI を用いたゼノグラフトモデルにおいて TQ は 5 mg/kg の静脈内投与、および腫瘍内投与により有意に LOX-IMVI の増殖を抑制することが明らかになった。また、このときマウスの体重減少はみとめられなかった (図 3)。

以上の研究から、今後 TQ を創薬シードとして合成展開を行い創薬研究を推進する予定である。さらに乳がんを用いたゼノグラフトモデルを構築し、TQ の乳がんにおける抗腫瘍効果も解析する。また、TQ の作用機序についても今後解析を進める予定である。

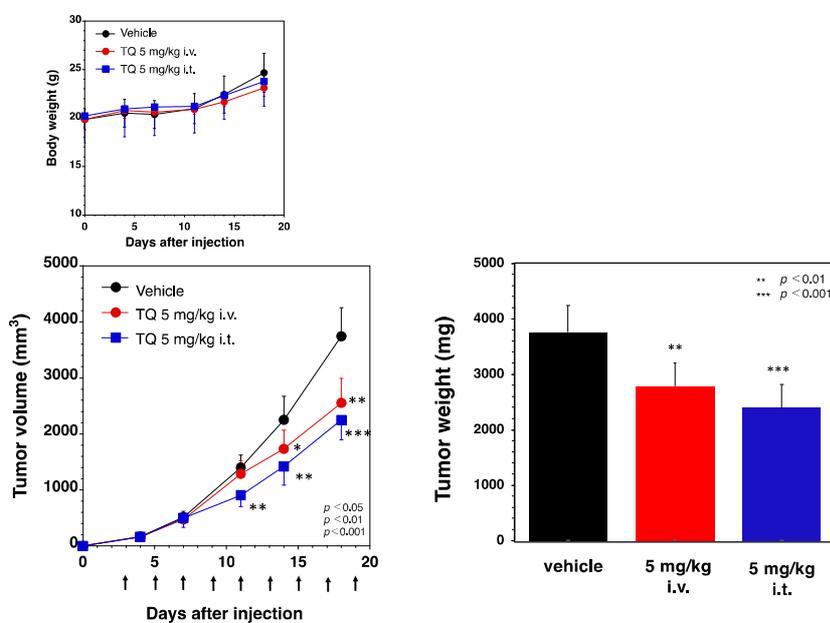


図3. TQのゼノグラフトモデルにおける抗腫瘍効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Yamazaki Y, Abe H, Sakashita C, Ohba SI, Watanabe T, Momose I, Kawada M. | 4. 巻 74 |
| 2. 論文標題 Androprostamine A: a unique antiprostata cancer agent | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 J Antibiot | 6. 最初と最後の頁 717-725 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-021-00449-8. | 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 T Onodera, I Momose, H Adachi, Y Yamazaki, R Sawa, SI Ohba, M Kawada. | 4. 巻 295 |
| 2. 論文標題 Human pancreatic cancer cells under nutrient deprivation are vulnerable to redox system inhibition. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry | 6. 最初と最後の頁 16678-16690 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013893. | 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 I Momose, T Onodera, H Doi, H Adachi, M Iijima, Y Yamazaki, R Sawa, Y Kubota, M Kawada | 4. 巻 82 |
| 2. 論文標題 Leucinostatin Y: A Peptaibiotic Produced by the Entomoparasitic Fungus <i>Purpureocillium lilacinum</i> 40-H-28 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Nat Prod. | 6. 最初と最後の頁 1120-1127 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.8b00839 | 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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 百瀬功、小野寺威文、山崎洋子、大庭俊一、安達勇光、川田学 |
| 2. 発表標題 レドックス制御システムの阻害による栄養欠乏選択的細胞毒性 |
| 3. 学会等名 日本がん分子標的治療学会第23回学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 小野寺威文、百瀬功、山崎洋子、安達勇光、川田学 |
| 2. 発表標題 レドックス制御システムの阻害剤は栄養欠乏環境のがん細胞に選択的な細胞毒性を示す |
| 3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 百瀬功、小野寺威文、山崎洋子、安達勇光、川田学 |
| 2. 発表標題 Research Inhibition of the redox system shows preferential cytotoxicity to human pancreatic cancer cells under nutrient-deprived conditions. |
| 3. 学会等名 11th AACR-JCA Joint Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 阿部 光、山崎 洋子、坂下 千春、大庭 俊一、渡辺 匠、百瀬 功、川田 学、柴崎 正勝 |
| 2. 発表標題 前立腺がんに対する新規抗アンドロゲン薬の医薬リード創製 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第142年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 渥美園子、野坂千里、川田 学、小野寺威文、山崎洋子、大石智一、百瀬 功、澁谷正史、内藤幹彦 |
| 2. 発表標題 神経膠芽腫由来細胞におけるErtredinによるEGFRvIIIタンパクの減少とスフェロイド形成抑制 |
| 3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 山崎洋子、大庭俊一、小野寺威文、川田学、百瀬功 |
| 2. 発表標題 c-Mycと合成致死作用を示す低分子化合物の探索研究 |
| 3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 山崎洋子、大庭俊一、小野寺威文、川田学、百瀬功 |
| 2. 発表標題 Synthetic lethal approach that targets c-MYC-driven cancers |
| 3. 学会等名 12th AACR-JCA Joint Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 百瀬功、小野寺威文、安達勇光、山崎洋子、澤竜一、大庭俊一、川田学 |
| 2. 発表標題 Human pancreatic cancer cells are vulnerable to inhibition of redox system under nutrient deprivation. |
| 3. 学会等名 12th AACR-JCA Joint Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 狩俣 太雅、Wei Xu、山崎 洋子、熊谷 直哉 |
| 2. 発表標題 原子欠損 平面環状分子トリキノリン誘導体DQMzの新規合成法とその機能展開 |
| 3. 学会等名 日本薬学会第143年会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

公益財団法人微生物化学研究所会 微生物化学研究所 沼津支所
<https://www.bikaken.or.jp/laboratories/numazu/summary.html>

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 | 百瀬 功 (Momose Isao) (10270547) | 公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所 沼津支所・主席研究員 (72801) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|