

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16322

研究課題名（和文）p62-Keap1-Nrf2系の制御に基づく抗癌剤耐性克服剤の創製

研究課題名（英文）Development of chemoresistance-overcoming agent targeting p62-Keap1-Nrf2 axis

研究代表者

安田 大輔（Yasuda, Daisuke）

大阪医科薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：40736097

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）：Nrf2は生体防御に重要な一方で、ある種の癌細胞においてはその薬剤耐性に関与することが知られている。本研究ではp62過剰発現によりNrf2の異常活性化した癌細胞において抗がん剤感受性増強作用を示す化合物をデザイン・合成し、その作用を評価した。スクリーニングにより得られた化合物K67の構造を改変した誘導体を合成し活性評価を行なったところ、肝細胞癌・肺癌それぞれの細胞種において有効な抗がん剤活性増強作用を示す2化合物を見出した。また、そのうち1化合物はp62の過剰発現していない細胞においてはNrf2活性化作用を示し、癌細胞において特異的に抗がん剤耐性を増強するユニークな化合物であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん剤耐性の出現は治療上・社会上の重大な問題である。本研究ではNrf2の異常活性化により既存の抗がん剤への耐性を獲得した癌細胞株に対して、それ自身は細胞生存率に影響せず、抗がん剤への感受性を増強させるユニークな創薬シーズを見出した。この成果は、Nrf2抑制剤が新規な癌治療戦略として有望であることを示すとともに、悪性度の高い癌細胞を低コストな既存の抗がん剤を主体とした処理で対処可能にするという画期的な成果である。

研究成果の概要（英文）：While Nrf2 is important protein for biological defense, it is known to be involved in drug resistance in certain types of cancer cells. In this study, we designed, synthesized and evaluated compounds that enhance sensitivity to anticancer drugs in cancer cells with aberrant activation of Nrf2 due to overexpression of p62. Derivatives of K67 obtained by screening were synthesized and their activities were evaluated. As a result, we found two compounds that showed effective potentiation of anticancer drug activity in hepatocellular carcinoma and lung cancer cells, respectively. one of the compounds showed Nrf2 activation in cells that did not overexpress p62, indicating that it is a unique compound that specifically enhances anticancer drug resistance in cancer cells.

研究分野：創薬化学、有機化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：Nrf2 p62 抗がん剤耐性 Keap1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

抗癌剤耐性は、治療上および医療経済上の大きな問題であり、その特徴に応じた解決策が常に求められる。ある種の癌では、生体防御機構である Nrf2 を悪用して抗癌剤耐性を獲得する場合があります。特に p62 というタンパク質を介した Nrf2 の異常活性化が注目されている。研究代表者らは p62 が Nrf2 抑制因子 Keap1 とのタンパク質間相互作用 (PPI) により Nrf2 を活性化することの事実から、p62-Keap1 間の PPI を阻害剤の探索を試みた。その結果、p62 を高発現し Nrf2 の異常活性化した肝細胞癌株 Huh-1 において分子標的薬ソラフェニブへの耐性を克服するユニークな化合物 2-アセトニル-1,4-ビス[(4-エトキシベンゼンスルホニル)アミノ]ナフタレン (K67) を見出した。

2. 研究の目的

スクリーニングヒットにより見出された K67 の構造展開を中心に、(1) さらに高活性化化合物の創出、(2) 肝細胞癌以外での抗がん剤作用増強効果の評価、(3) Nrf2 に対する抑制/活性化バランスの検証の3項目を研究目的に据えた。

3. 研究の方法

(1) K67 のエトキシ基を各種アルキル基またはアルコキシ基に置換した誘導体群をデザイン、合成し、Huh-1 におけるソラフェニブの抗がん活性増強効果およびヒト肝ミクロソーム中での代謝安定性を評価した。

(2) 非小細胞性肺癌細胞株 A549 を用い、新規にデザイン・合成した末端アミド型誘導体のドキシソルピシン感受性増強作用を評価した。

(3) レポーター細胞株 HEK293-ARE-Luc を用い、細胞内 Nrf2 活性化効果を評価した。

4. 研究成果

(1) K67 のエトキシ基を種々変換した誘導体を合成し、Huh-1 におけるソラフェニブ感受性増強効果を評価したところ、R (Fig.1) にイソプロポキシ基、ブトキシ基、イソブトキシ基を有する誘導体が K67 よりも強力な効果を示した。特にイソプロポキシ誘導体は、p62 の過剰発現していない肝細胞がん株 Huh-7 に対しては単独曝露・ソラフェニブとの併用のいずれにおいても有意な細胞生存率低下作用を示さなかったため、Huh-1 に対し特異的に作用していることが示唆された。またそのソラフェニブ感受性増強効果には濃度依存性が見られ、5 μ M 以上で Huh-1 に対し有意な効果を示した (Fig. 2)。

またヒト肝ミクロソーム中における代謝安定性を親化合物の残存率から評価したところ、K67 を含むアルコキシ体のインキュベーション 30 分後の残存率はいずれも 20% 程度、アルキル体の残存率はいずれも 10% 程度であり、クロロ体・アセトアミド体は 60% 程度の残存率を示した。

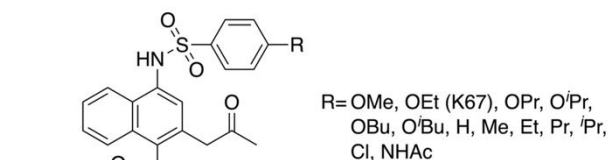


Fig.1 K67 誘導体 (1)

(2) 新規誘導体として、K67 のアセトニル基をアミド構造に変換した化合物群をデザイン・合成した (Fig. 3)。これらの誘導体について、p62 の過剰発現が見られる非小細胞肺癌細胞株 A549 におけるドキシソルピシン感受性増強作用を評価した。その結果、モノメチルアミド・ジメチルアミド体の双方が K67 よりも強力な感受性増強作用を示した (Fig. 4)。これらの誘導体は、単独では細胞生存率を低下させなかった。

(3) HEK293-ARE-Luc 細胞に各誘導体 (10 μ M) を添加し 24 時間後の Nrf2 活性化状態をルシフェラーゼアッセイにより評価した。その結果、K67 およびイソプロポキシ体はほとんど Nrf2 活性化作用を示さなかった。このことから、K67 およびイソプロポキシ体は p62-Keap1

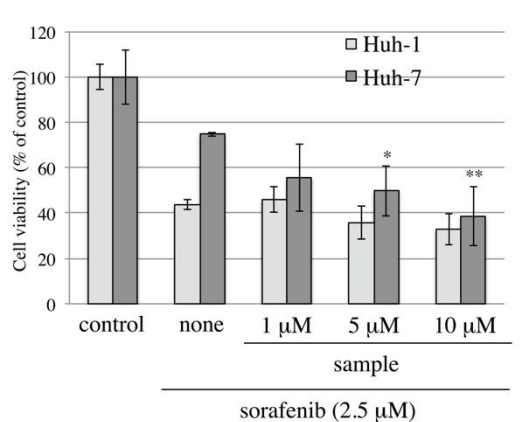


Fig. 2 イソプロポキシ体のソラフェニブ感受性増強効果

PPI への選択性が高いことが示された。一方、ジメチルアミド体 (Fig. 3) は既存の Nrf2 活性化剤 *tert*-ブチルヒドロキノンと同等の強力な Nrf2 活性化効果を示した。

結果を総括すると、K67 の構造を改変し抗がん剤感受性増強作用をより強力にした誘導体としてイソプロポキシ体 (Fig. 1) およびジメチルアミド体 (Fig. 3) 等を見出した。イソプロポキシ体は Huh-1、ジメチルアミド体は A549 に対しそれぞれ有効な抗がん剤感受性増強作用を示し (Fig. 2, Fig. 4)、単独では細胞生存率に影響しなかった。また、ジメチルアミド体は HEK293-ARE-Luc 細胞では強力な Nrf2 活性化効果を示した一方で A549 では抗がん剤感受性増強作用を示したことから、p62 過剰発現細胞でのみ Nrf2 の活性を抑制し、それ以外の細胞では Nrf2 活性を増強して副作用の防止などに役立つユニークな創薬シーズであることが示唆された。

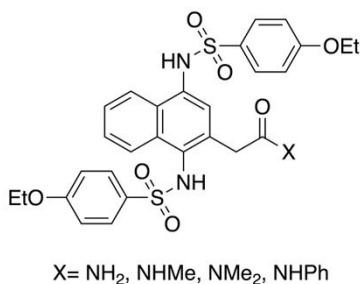


Fig. 3 K67 誘導体 (2)

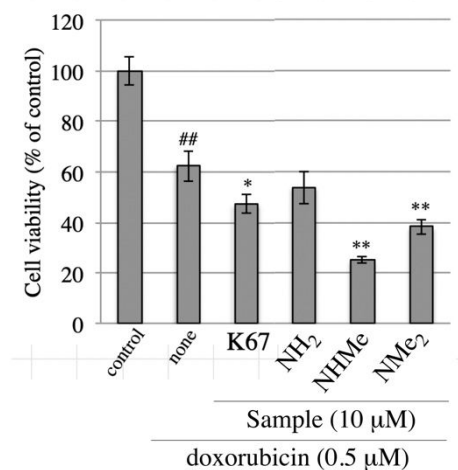


Fig. 4 ドキソルビシン感受性増強効果

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 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Daisuke Yasuda, Tomoyuki Ohe, Kyoko Takahashi, Riyo Imamura, Hirotsu Kojima, Takayoshi Okabe, Yoshinobu Ichimura, Masaaki Komatsu, Masayuki Yamamoto, Tetsuo Nagano, Tadahiko Mashino	4. 巻 Mar 30
2. 論文標題 Inhibitors of the protein-protein interaction between phosphorylated p62 and Keap1 attenuate chemoresistance in a human hepatocellular carcinoma cell line	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Free Radical Research	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2020.1732955	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安田 大輔、吉田 逸平、高橋 恭子、熊谷 直哉、増野 匡彦、今村 理世、小島 宏建、岡部 隆義、一村 義信、小松 雅明、山本 雅之、長野 哲雄、大江 知之
2. 発表標題 p62-Keap1-Nrf2 系を標的とした抗がん剤 感受性増強剤の創製
3. 学会等名 第74回日本酸化ストレス学会・第21回日本N0学会合同学術集会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------