

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07193

研究課題名(和文) 膵がん治療を目的としたアルブミン結合性NOラジカル放出型抗がん剤の開発

研究課題名(英文) Development of albumin-binding nitric oxide donors for treatment of pancreatic cancer

研究代表者

西 弘二 (Nishi, Koji)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：00398249

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)：膵臓がんは、化学療法の奏効率が極めて低い癌腫の1つである。一酸化窒素(NO)は血管拡張作用に加えて、抗腫瘍効果を有することが知られている。本研究では、血中滞留性と腫瘍集積性を有するアルブミン結合性NO放出型抗がん剤の開発を目的として、フェニル酪酸のニトロ化体(Nitrated phenylbutyrate; NPB)を合成した。NPBは、ヒト膵臓がん細胞に対して細胞死を誘導し、腫瘍移植マウスにおいて、40日以上の抗腫瘍効果を発揮した。さらに、NPBの細胞死誘導効果は、オートファジー阻害によるものであることが示唆された。以上の結果より、NPBは膵臓がん有効な治療薬になることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵臓がんは、5年相対生存率が10%未満と他の癌腫の中でも最も低い。しかし現在までに有効とされている治療薬では十分な効果は得られていないため、新たな治療薬の開発が急務となっている。これまで、一酸化窒素(NO)を放出するニトロ化合物を、抗がん剤として利用するために様々な研究が行われてきたが臨床応用には至っていない。本研究で合成したNPBはin vivoにおいて長期的な抗腫瘍効果を発揮することが分かった。これは、これまで問題となってきたニトロ化合物の問題点を克服した結果とも考えられる。そのため今後さらなる検討を行うことで、将来的には膵臓がん治療の有効な治療薬になることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is one of the carcinomas with extremely low response rates to chemotherapy. Nitric oxide (NO) is known to have anti-tumor effects in addition to its vasodilating effects. In this study, we synthesized nitrated phenylbutyrate (NPB) to develop an albumin-binding NO-releasing anticancer drug with blood retention and tumor accumulation. NPB induced cell death in human pancreatic cancer cells and exhibited antitumor effects for more than 40 days in tumor-transplanted mice. Furthermore, the cell death-inducing effect of NPB was suggested to be due to inhibition of autophagy. Based on these results, NPB is expected to be an effective therapeutic agent for pancreatic cancer.

研究分野：薬物動態学、DDS

キーワード：膵臓がん 一酸化窒素 アルブミン 細胞死 がん治療 オートファジー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵臓がんは最も予後の悪い固形がんの1つであり、化学療法の奏効率や5年生存率は他のがん種に比べて著しく低い。この原因は、膵臓腫瘍の周辺環境にあると考えられている。一般に、腫瘍周辺の新生血管の血流量は低いことが知られているが、膵臓はそれ自体が血流量の低い組織であるため、薬物移行性が非常に低い。さらに膵臓がんでは、腫瘍周辺に多く存在する間質がバリアとなり、腫瘍まで薬剤が行き届かない。最近、Islamらはニトログリセリンにより腫瘍周辺血管を拡張することで血流を改善し、腫瘍への薬剤移行性を上げることができる可能性を報告している (Mol Cancer Ther. 2018)。しかし、ニトログリセリンのようなNOラジカル放出剤は、急激な血圧の低下を招くため投与量コントロールが難しく、低血圧患者に使用できない。加えて、消失半減期も極めて短いため、血流改善による抗がん剤の効果が一過的になる。興味深いことに、Kinoshitaらは、アルブミンに結合させたNOが、がん間質を縮小させ、腫瘍サイズを縮小させることを報告している。

このような背景のもと申請者は、NOラジカル放出型薬剤がアルブミン結合性を有することができれば、腫瘍周辺血管を拡張することで薬物移行性を向上させ、間質および腫瘍に対して細胞死や増殖抑制効果を発揮することができるだけでなく、血中滞留性およびEPR効果による腫瘍集積性を向上させることで、これらの作用を腫瘍周辺で持続的に発揮することができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍周辺の血管拡張作用、腫瘍周辺間質およびがん細胞への高い攻撃性、腫瘍集積性、血中滞留性を兼ね備えた多機能型のアルブミン結合性NOラジカル放出型抗がん剤を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験材料

クロラムブシルは東京化成工業株式会社より購入した。ヒト膵臓がんの細胞であるAsPC1、BxPC3およびPANC-1はAmerican Type Culture Collection (ATCC)より購入した。ヒト子宮頸部がん細胞のGFP-LC3-RFP-LC3 G HeLaはRIKEN CELL BANKより譲渡された。

(2) NPBの合成

CH₃CN中のクロラムブシルおよびAgNO₃の混合物を70℃で一晩攪拌した。室温に冷却した後、懸濁液を濾過し、溶媒を蒸発させた。残渣をシリカゲル上のフラッシュカラムクロマトグラフィーにより精製してニトロ化フェニル酪酸 (Nitrated phenylbutyrate; NPB、図1) を淡黄色油として得た。NPBはNMRを用いて確認を行った。¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ = 7.10 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 6.66 (d, J = 8.6 Hz, 2H), 4.60 (t, J = 6.0 Hz, 4H), 3.71 (t, J = 5.7 Hz, 4H), 2.59 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 2.37 (t, J = 7.4 Hz, 2H), 1.90-1.96 (m, 2H). ¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ = 179.8, 144.1, 131.2, 129.8, 112.9, 69.9, 48.9, 33.8, 33.2, 26.3. MS (ESI): m/z calcd for C₁₄H₂₀N₃O₈ [M+H]⁺ 358.1250, found 358.1241.

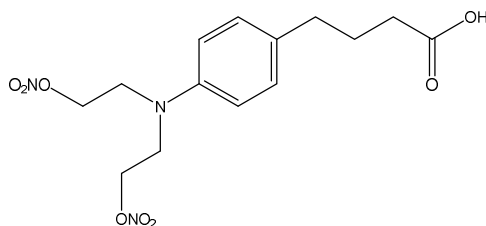


図1 ニトロ化フェニル酪酸 (Nitrated phenylbutyrate; NPB)

(3) 細胞培養

ヒト膵臓がん細胞のAsPC1、BxPC3またはPANC1は非働化した10% (v/v) Fetal Bovine serum (FBS) 及び抗生物質 (ペニシリン 100 units/mL, ストレプトマイシン 100 µg/mL) 含有RPMI1640またはDMEMを用いて、細胞培養用ディッシュに播種し、37℃、5% CO₂下のインキュベーターで静置培養した。

(4) 細胞毒性試験

NPB (500 µM) を細胞に添加し、MUSE Annexin V and Dead Cell kit (Luminex, USA) を用いてMUSE cell analyzer (Luminex, USA) により細胞死判定を行った。

(5) NOx測定

NPBを50 µMとなるように調製し、0, 2, 24, 48, 72および96時間後のNOx濃度をGriess法によって測定した。

(6) オートファジー活性評価

GFP-LC3-RFP-LC3 G Hela 細胞を 96-well black bottom plate (Thermo) に播種し、一晚培養した。NPB (500 μM) または CQ (40 μM) を添加し 6 および 24 時間後にマイクロプレートリーダー (TECAN, Infinite200 pro, Switzerland) を用いて蛍光強度を測定した (GFP: ex.395 nm, em.510 nm, RFP: ex.555 nm, em.583 nm)。Beclin-1、p62 および LC3-I/II の検出は、抗 Beclin-1 抗体、抗 p62 抗体および抗 LC3-I/II 抗体を用いて行った。

(7) 抗腫瘍効果

日本 SLC より購入した Balb/c ノドマウス (6 週齢、雄) の右背部に BxPC3 細胞を皮下投与し、BxPC3 担がんマウスを作製した。腫瘍体積が 50 mm³ に達したマウスにコントロール群として生理食塩水 (saline) 治療群として NPB (10 mg/kg) を尾静脈より単回投与し腫瘍体積および体重を測定した。腫瘍体積についてはノギスを用いて長径 (L) mm および短径 (W) mm を測定し算出した。

4. 研究成果

(1) NPB のアルブミン結合性評価

NPB が PB と同様のアルブミン結合性を示すかどうか、限外過法を用いて遊離型薬物濃度を測定し、Scatchard プロットにより結合定数 (K) および結合部位数 (n) を算出した (Table 1)。その結果、NPB の結合定数は PB と比較してやや低下したが、結合性を示す n・K に有意差が見られなかったことから、NPB は PB と比較して同等のアルブミン結合性を有することが示唆された。

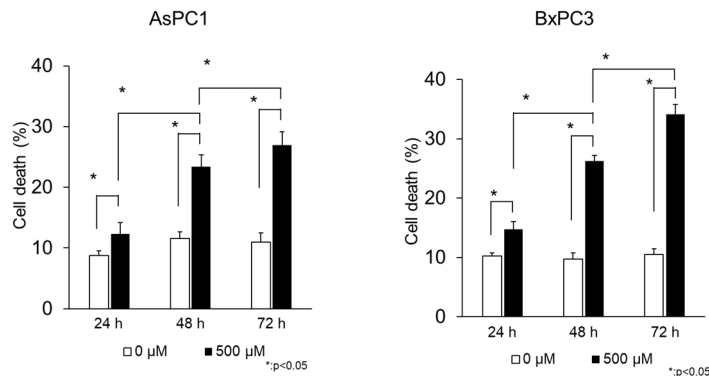
Table 1 PB および NPB のアルブミン結合特性

	PB	NPB
K (x 10 ⁶ M ⁻¹)	0.50 ± 0.17	0.10 ± 0.08
n	0.80 ± 0.03	2.54 ± 1.38
n · K	0.41 ± 0.15	0.25 ± 0.11

(2) NPB の細胞死誘導効果

NPB のヒト膵臓がん細胞に対する細胞死誘導効果の有無を確認するために、NPB を AsPC1 および BxPC3 に曝露したところ、濃度依存的に細胞死を誘導することが確認された (図 2)。また同様に、NPB は時間依存的にも細胞死を誘導することが確認され、その効果は 96 時間まで増大することが観察された (図 3)。

(A)



(B)

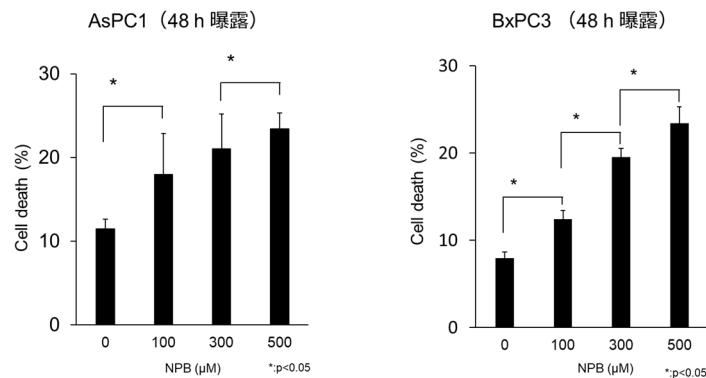


図 2 NPB の時間 (A) および濃度 (B) 依存的細胞死誘導効果

(3) 細胞死誘導メカニズム

NPB の細胞死誘導メカニズムを明らかにするために、始めにアポトーシスの関与について検討を行った。しかし、NPB 曝露後の細胞において、アポトーシス細胞に特徴的な、poly ADP-ribose polymerase (PARP) や Caspase3 および 7 の分解は観察されなかった。また Caspase3 および 7 の活性化も観察されなかったことからアポトーシスの関与の可能性は低いと考えられた。次に細胞内 ATP 含量を測定したところ、NPB 曝露後の細胞では、ATP 含量が顕著に減少していた。このような細胞死における ATP 含量の減少は、ネクロ-シスやオートファジー阻害時に見られる。そこで、オートファジー阻害についての検討を行った結果、NPB はオートファジーマーカーである Beclin 1 の発現抑制および LC3-I および p62 の蓄積を誘導した。これらの結果は NPB がオートファジーを阻害することを示している。さらに、腫瘍環境を模した低栄養状態 (HBSS 培地) または低酸素状態 (1%O₂) において、細胞を培養したところ、オートファジーが亢進していることが観察されたが、NPB はこの際にもオートファジーを阻害した。ヒト膵臓がん細胞株である PANC1 は他の細胞株と異なり、その生存をオートファジーに依存している細胞であることが知られている。NPB は他の細胞株より、上述した腫瘍環境モデルにおいて、有意に細胞死を誘導することが観察された。これらの結果より、NPB は腫瘍環境において、オートファジーを亢進させることで生存可能となっている膵臓がん細胞に対して、そのオートファジーを阻害することで、細胞死を誘導することが示唆された。次に、NPB によるこれらの効果が NO によるものであるか確認するために、NPB からの硝酸・亜硝酸イオン (NOx) の放出を評価した。その結果、NPB は他のニトロ化合物と異なり、非常に緩やかに NOx を放出し、最長 96 時間までの放出が確認され、放出率は約 100% と極めて理想的な性質を持つことが明らかとなった。さらに、NO を持たないフェニル酪酸や、NPB のニトロ基をヒドロキシ基に置換した Hydroxy-PB においては NPB のような細胞死誘導効果は観察されなかった。これらの結果から、NPB の細胞死誘導効果には NO が関与していることが示唆された。

(4) マウスにおける腫瘍増殖抑制効果

in vivo における NPB の抗腫瘍効果を評価するために、ヒト膵臓がん細胞 BxPC3 を皮下移植したマウスに NPB (10 mg/kg) を尾静注し、その後の腫瘍体積を測定した。その結果、単回投与にも関わらず、7 週間以上も抗腫瘍効果を発揮した。これらの結果は、NPB からの緩やかな NOx の放出、アルブミン結合による血中滞留性および腫瘍集積性の向上によるものである可能性が考えられる。そのため今後は NPB の体内動態の解析が必要であると思われる。

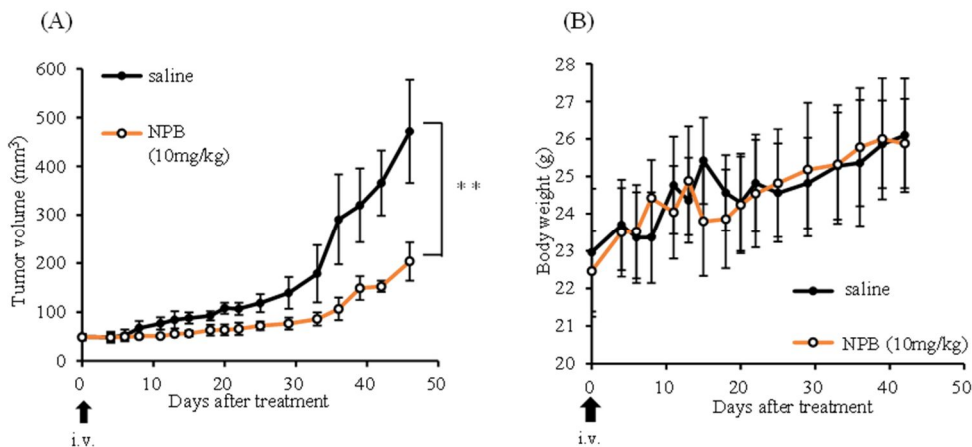


図3 BxPC3 移植マウスにおける NPB の抗腫瘍効果

また、NPB 投与による体重の減少、骨髄抑制および肝機能・腎機能障害が観察されなかったことから、NPB は膵臓がん治療において安全性の高い治療薬になる可能性が期待される。

本研究では、アルブミン結合による血中滞留性の向上およびアルブミンの EPR 効果や腫瘍内アルブミン受容体による腫瘍集積性の向上を目指して NPB を合成し、各種検討を行った。その結果、*in vitro* および *in vivo* いずれにおいても、NPB が膵臓がんに対して有効であることが示され、NPB が新規膵臓がん治療薬として臨床的にも極めて有用であることが期待できる。

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 1件）

1. 著者名 Nishi K, Imoto S, Beppu T, Uchibori S, Yano A, Ishima YU, Ikeda T, Tsukigawa K, Otagiri M, Yamasaki K.	4. 巻 42
2. 論文標題 The Nitrated Form of Nateglinide Induces Apoptosis in Human Pancreatic Cancer Cells Through a Caspase-dependent Mechanism.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 1333-1338
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15601.	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西 弘二
2. 発表標題 血清タンパク質による薬物輸送機構の解明と膵がん治療への展開
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別府 拓豪、西 弘二、井本 修平、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 ヒト膵がん細胞に対するニトロ化フェニル酪酸の細胞死誘導メカニズムの解明
3. 学会等名 第37回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別府 拓豪、西 弘二、井本 修平、異島 優、月川 健士、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 ヒト膵がん細胞におけるニトロ化フェニル酪酸の細胞死誘導メカニズムの解明と抗腫瘍効果の評価
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別府 拓豪、西 弘二、井本 修平、異島 優、月川 健士、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 ヒト膵がん細胞におけるニトロ化フェニル酪酸のオートファジー阻害効果
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 別府 拓豪、西 弘二、井本 修平、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 ヒト膵がん細胞に対するニトロ化フェニル酪酸の細胞死誘導効果
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 別府 拓豪、西 弘二、井本 修平、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 ヒト膵がん細胞に対するニトロ化フェニル酪酸の細胞死誘導効果
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 別府 拓豪、西 弘二、井本 修平、異島 優、月川 健士、小田切 優樹、山崎 啓之
2. 発表標題 ヒト膵がん細胞に対するニトロ化フェニル酪酸の細胞死誘導効果
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 sj2001UU	発明者 西弘二、山崎啓之、 井本修平、小田切優 樹、別府拓豪	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-010513	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	異島 優 (Ishima Yu) (00457590)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(薬学域)・准教授 (16101)	
研究 分 担 者	井本 修平 (Imoto Shuhei) (20447189)	崇城大学・薬学部・教授 (37401)	
研究 分 担 者	山崎 啓之 (Yamasaki Keishi) (30435143)	崇城大学・薬学部・教授 (37401)	

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