

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09185

研究課題名(和文) アカデミア創薬による肺扁平上皮癌治療のための新規臨床化合物の開発

研究課題名(英文) Development of novel clinical compounds for treating lung squamous cell carcinoma via academic drug discovery

研究代表者

猶本 良夫 (Naomoto, Yoshio)

川崎医科大学・医学部・教授

研究者番号：00237190

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)：我々は、癌特異的サイトカインの1種であるミッドカインに対する特異的阻害剤：iMDKを開発し報告している(PLoS One. 8: e71093. 2013)。今回、文科省 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム：BINDSの技術支援下に、このリード化合物の最適化を行なった。東京大学大学化合物ライブラリー内より選定された候補化合物の、in vitroにおける抗腫瘍効果を細胞内ATPの定量によるcell viability assayにて解析した。これらの結果から、扁平上皮癌を含む肺癌細胞に対し、正常肺細胞よりも効果的に増殖を抑制できる新たな化合物の同定に至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界で年間約140万人の肺癌死亡があり40万人が扁平上皮癌であることが報告されている。本研究により、手術不能な肺扁平上皮癌に対する新規分子標的療法を開発することができれば、その学術的意義は大きい。またミッドカインの発現のある癌種、PI3Kが活性化している癌種は多く(Muramatsu T J Biochem. 2002, Oglino S et al. Oncogene. 2014)、本研究結果は他種の癌治療にも応用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We developed a novel leading compound termed iMDK, a specific inhibitor of midkine, which is a cancer-specific cytokine (PLoS One. 8: e71093. 2013). In this study, we optimized this leading compound with the technical support of Basis for Supporting Innovative Drug Discovery and Life Science Research in Japan Agency for Medical Research and Development. Candidate compounds were selected from the University of Tokyo's compound library and analyzed for their anti-tumor effects using a cell viability assay that quantified the amount of ATP indicating the presence of metabolically active cells. These results led to the identification of novel compounds that inhibited the growth of lung cancer cells, including lung squamous cell carcinoma, more effectively than the normal lung cells.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 ミッドカイン

1. 研究開始当初の背景

成長因子またはサイトカインの1種であるミッドカインは、肺癌、食道癌をはじめとする多くの癌で発現がみられ、その増殖と進展に関与している (Muramatsu et al. J. Biochem. 132: 359-71. 2002)。一方で正常組織におけるミッドカインの発現は低値に留まり、ミッドカイン遺伝子のプロモータ領域は、その癌特異性から癌診断や治療に応用されてきている (Curiel DT et al. Cancer Res. 60: 4305-10. 2000)。申請者らは、このミッドカインプロモータを用いたセルベースアッセイにより、4万4千種の化合物ライブラリからスクリーニングを行い、ミッドカイン特異的阻害剤：iMDKを見出した。そして、当該低分子化合物が Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/AKT シグナルを阻害することで、非小細胞肺癌および口腔癌に抗腫瘍効果を誘導できること報告した (PLoS One. 8: e71093. 2013, Exp Cell Res. 335: 197-206. 2015, Anticancer Res. 36: 2775-81. 2016)。そして現在、iMDKの構造改変から得られた派生物を用いた*in vitro*での解析から、肺扁平上皮癌に対してより強い抗腫瘍効果を示す複数の化合物の選定に至っている。

肺腺癌におけるドライバー変異が明らかとなり、分子標的薬が患者予後を延長してきている一方で、肺扁平上皮癌に対する有効な標的治療法は未確立であり、また免疫チェックポイント阻害剤単独での有効性は2割に留まっている。しかし肺扁平上皮癌の多くでPI3Kの活性化がみられるため、iMDKの最適化による新規治療法開発が期待できる。しかし、申請者らがこれまでの研究で見出した複数のリード化合物は、1 μ M以下の濃度で肺癌細胞の増殖を抑え、担癌マウスに対し抗腫瘍効果を示せてはいるものの、直接の標的分子や作用機序が未解明であり、また効果と安全性には改善の余地がある。

2. 研究の目的

計画において、肺癌の組織とドライバー変異別にオルガノイド培養法の最適化を行う。リード化合物の構造からさらに有望な候補化合物をライブラリから効率的に選択することや、化合物の標的の同定、有機合成化学に基づく最適化は、低分子化合物の医薬品開発過程で求められる重要なプロセスである。しかし、アカデミアが単独でこれらの技術を持つことは困難であり、国による技術支援のための医薬化学研究基盤として、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム：BINDS が 2017 年 4 月より事業化されている。本研究において BINDS の技術支援下に、申請者らがこれまでに見出だしているリード化合物の最適化と標的分子の同定を進め、低毒性で有効な臨床化合物の創製を行う。

3. 研究の方法

iMDK派生物の肺癌細胞株における薬効の解析

BINDS 支援のもとに東京大学化合物ライブラリから選定されたiMDK 周辺化合物を、肺扁平上皮癌細胞株：HCC95、肺腺癌細胞株：H441に投与し、細胞内ATPの定量によりviabilityを測定することで抗腫瘍効果を下記の手順で解析した。

Day 1 細胞の植込み : HCC95 96wellに1wellあたり 500個/50uL
 H441 96wellに1wellあたり1000個/50uLで捲く。 (n=3)
 Day 2 翌日薬剤添加 : 1wellあたり50uLで薬剤をそれぞれ調整する。調整方法は以下の図の通り。



Day 6 薬剤添加から96時間後、viabilityをPromega社 CellTiter-Glo® 2.0にて測定

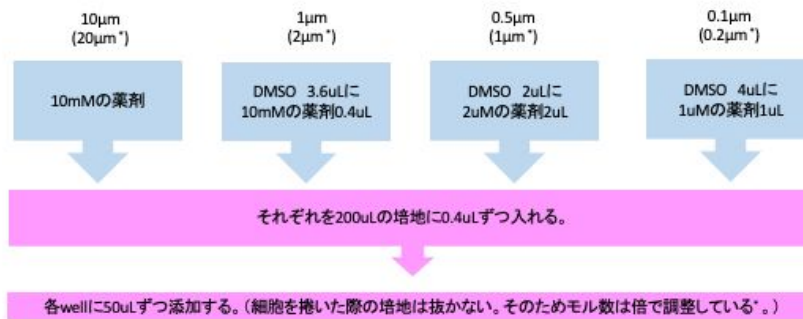
さらに抗腫瘍効果を誘導した化合物の正常細胞に対する薬剤感受性を検討した。

4. 研究成果

Well ID	濃度(mM)	液量(µL)	アッセイ名略称	アッセイ濃度(µM)	活性値 (H441)	活性値 (HCC95)	活性値 (NHLF)
1001	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.049	0.931	
1002	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.077	1.001	
1003	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.990	0.994	
1004	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.891	1.082	
1005	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.946	1.073	
1006	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.117	1.173	
1007	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	*0.555	*0.202	1.007
1008	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.047	1.035	
1009	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.684	1.148	
1010	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.690	*0.194	1.001
1011	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.616	1.003	
1012	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.670	1.129	
1013	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.686	1.203	
1014	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.559	1.196	
1015	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.307	1.039	
1016	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.262	1.012	
1017	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.087	1.098	
1018	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.846	*0.867	0.895
1019	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.316	1.145	
1020	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.169	1.100	
1021	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.101	0.967	
1022	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.061	0.902	
1023	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.022	0.981	
1024	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.128	0.946	
1025	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.103	1.010	
1026	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.020	1.023	
1027	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.030	0.964	
1028	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.976	1.015	
1029	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.939	0.979	
1030	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	0.927	1.015	
1031	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.041	1.030	
1032	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.120	1.022	
1033	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.418	0.971	
1034	10	5	CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay	0.5	1.189	0.989	

* p<0.01 ctrl (DMSO 添加群)に対する有意差

Day 1 細胞の播込み : HCC95 96wellに1wellあたり 500個/50uL
H441 96wellに1wellあたり1000個/50uLで播く。 (n=3)
Day 2 翌日薬剤添加 : 1wellあたり50uLで薬剤をそれぞれ調整する。調整方法は以下の図の通り。



Day 6 薬剤添加から96時間後、viabilityをPromega社 CellTiter-Glo® 2.0にて測定

化合物 ID:1010 は HCC95 肺扁平上皮癌細胞株に抗腫瘍効果を誘導、また化合物 ID:1007 は HCC95 および H441 肺腺癌細胞株に抗腫瘍効果を誘導し、それぞれ正常肺線維芽細胞に対する増殖抑制を起こさなかった。上記検討から、正常細胞障害が少なく、肺扁平上皮癌に抗腫瘍効果を誘導する新しい化合物 1007、1010 が同定された。

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	深澤 拓也 (Fukazawa Takuya) (20379845)	川崎医科大学・医学部・准教授 (35303)	
研究分担者	吉田 将和 (Yoshida Masakazu) (30868914)	川崎医科大学・医学部・特任研究員 (35303)	
研究分担者	湯川 拓郎 (Yukawa Takuro) (80388975)	川崎医科大学・医学部・講師 (35303)	

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