

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16091

研究課題名（和文）ドラッグ・リポジショニングによるCYP2J2を標的とした新規がん治療薬の開発

研究課題名（英文）Development of novel cancer therapeutics targeting CYP2J2 by drug repositioning

研究代表者

田島 正教（Tjima, Masataka）

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：70453412

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,300,000円

研究成果の概要（和文）： 癌細胞においてCytochrome P450（CYP）2J2が高発現し、アラキドン酸からエポキシエイコサトリエン酸の産生を介して細胞の増殖に関与していることが報告されている。そこでCYP2J2阻害薬が抗がん剤になりうるか検討を行った。

株化癌細胞を使用したin vitro実験より、CYP2J2阻害薬により細胞増殖抑制が認められた。最も効果が認められたクロペラスチンをXenograftマウスに投与したところ、腫瘍増大の抑制作用が認められた。一方、明らかな副作用は認められなかった。これらの結果から、CYP2J2阻害薬は新たな作用メカニズムの抗がん剤になりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、Cytochrome P450（CYP）2J2阻害は抗がん剤の新たなターゲットになりうると考えられた。また、阻害薬として現在市販されている医薬品成分を選択したドラッグ・リポジショニングであるため、治療薬としての開発障壁は低く、臨床応用しやすいものと考えられる。

研究成果の概要（英文）： It has been reported that Cytochrome P450 (CYP) 2J2 is highly expressed in cancer cells and is involved in cell growth via the production of epoxyeicosatrienoic acids from arachidonic acid. Therefore, we investigated whether CYP2J2 inhibitors could be anti-cancer drugs. In vitro experiments using cancer cell lines demonstrated that CYP2J2 inhibitors suppressed cell proliferation. Cloperastin, the most effective inhibitor, was administered to Xenograft mice and was found to inhibit tumor growth. On the other hand, no obvious side effects were observed. These results indicate that CYP2J2 inhibitors may be anti-cancer agents with a new mechanism.

研究分野：薬物動態学

キーワード：CYP2J2 がん治療薬 ドラッグ・リポジショニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬物代謝の中心を担うチトクロム P450 (CYP) には様々な CYP 分子種が存在しており、CYP の阻害や誘導を介した相互作用は、臨床における医薬品の効果や副作用発現に直結する。申請者は CYP2J2 に着目し、CYP2J2 を介した薬物間相互作用について明らかにしてきた。一方、CYP2J2 は脂肪酸であるアラキドン酸をエポキシエイコサトリエン酸 (EET) 類への代謝にも関与し、細胞増殖を調節していることが報告されている¹⁾。また、肺癌細胞 A549 や肝癌細胞 HepG2 などの癌細胞の CYP2J2 の発現を抑制することにより増殖が抑制されること、EET 類を添加すると増殖が促進することが報告されている¹⁾。これらの事実から、CYP2J2 を阻害する薬物は抗がん剤への応用が期待される。

CYP2J2 は、小腸や肝臓をはじめ、肺、食道や胃など様々な組織にも発現しているが、これら組織が癌化すると癌細胞中の CYP2J2 発現量は高くなるため、CYP2J2 を治療ターゲットとすることは副作用が少なく癌細胞特異的に作用を発揮できるものと考えられる。現在、様々な作用機序をもった抗がん剤があるが、CYP2J2 をターゲットとしたものは存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、CYP2J2 の薬物代謝酵素としての役割ではなく、生理的役割 (脂質代謝制御) に着目し、CYP2J2 阻害作用を有する化合物が脂質代謝制御を介した抗がん剤になりうるかを評価した。化合物は、CYP2J2 阻害作用を有する医薬品として申請者が明らかにしたクロペラスチン、チペピジン、ノスカピン、プロムヘキシンを用いた。既存医薬品を用いるドラッグ・リポジショニング研究であるため、開発期間やコストを抑えられ、安全で安価に臨床応用できる可能性が高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) CYP2J2 阻害薬の癌細胞および正常細胞の増殖に及ぼす影響

株化癌細胞 (A549、HepG2、MCF-7) あるいはヒト正常肝細胞を 96 well プレートに播種し、CYP2J2 阻害薬を添加した。48 時間培養後、MTS assay により増殖に及ぼす影響を調べた。

(2) クロペラスチンの CYP2J2 阻害様式の解明

0.1 M のリン酸バッファー (pH 7.4) にリコンビナント CYP2J2、astemizole (0.5-50 nM)、反応液 (1.3 mM NADP⁺、3.3 mM G6P、0.4U/mL G6PDH) および CYP2J2 阻害薬 (0.5-50 μM) を添加し、7 分間反応させた。反応後、代謝物である 0-demethylastemizole 濃度を LC-MS/MS で測定した。測定結果をもとに Lineweaver-Burk plot および Dixon plot を作成し、阻害様式および阻害定数 (K_i) を推定した。

(3) Xenograft マウスにおけるクロペラスチンの腫瘍肥大抑制効果

BALB/c ノードマウス (6Ws、雄) の後足付け根に HepG2 細胞 2×10⁶ cells/100 μL (PBS:Matrigel=1:1) を皮下投与した。移植 1 週間後から、体重を測定するとともに、Digimatic Caliper で腫瘍径を測定し腫瘍体積を求めた。腫瘍体積は次式を用いて計算した。

$$\text{腫瘍体積} = (\text{短径 mm})^2 \times (\text{長径 mm}) / 2$$

腫瘍体積が 200 mm³ に達したのち、腫瘍の体積の平均が等しくなるようにコントロール群とクロペラスチン群に分けた。コントロール群には生理食塩水を、クロペラスチン群ではクロペラスチンを 25 mg/kg で連日腹腔内投与した。1 週間毎に体重測定、腫瘍径の測定を行い、21 日経過後、採血および腫瘍の摘出を行った。血液は血球計算、生化学 (ALT、AST、Cr) 検査を行い、有害事象の評価をした。

4. 研究成果

(1) 癌細胞および正常細胞の増殖に及ぼす影響

A549 細胞において、プロムヘキシン、クロペラスチン、ノスカピンで生存率の低下が認められた。HepG2 細胞および MCF-7 細胞においては、全ての被験薬で生存率の低下がみられた。クロペラスチンの作用はいずれの細胞においても一番強く、特に HepG2 細胞では 30 μM 以上の濃度で完全に死滅させた。クロペラスチンの生存率に及ぼす影響は濃度依存性がみられ A549 細胞、HepG2 細胞および MCF-7 細胞での Growth Inhibition 50 (GI50) はそれぞれ 32.7、14.7、19.2

μM と算出された。

一方、ヒト正常肝細胞の生存に及ぼすクロペラスチンの影響を調べたところ、50 μM では生存率が 60%程度まで低下したが、20 μM では Control と差は認められなかった。

(2) クロペラスチンの CYP2J2 阻害様式の解明

癌細胞を使用した *in vitro* 試験において最も効果が認められたクロペラスチンの CYP2J2 阻害様式および阻害定数 (K_i) を調べた。CYP2J2 の基質としてアステミゾールを使用し、Lineweaver-Burk plot と Dixon plot を作成した。Lineweaver-Burk plot と Dixon plot から、クロペラスチンの CYP2J2 阻害は非競合阻害であると判断できた (図 1A, B)。また、x 軸を阻害薬濃度、Lineweaver-Burk plot から傾きを求め y 軸に傾きをプロットした Lineweaver-Burk plot second plot を作成した (図 1C)。x 軸の交点からクロペラスチンの K_i 値を 14.1 と算出した。

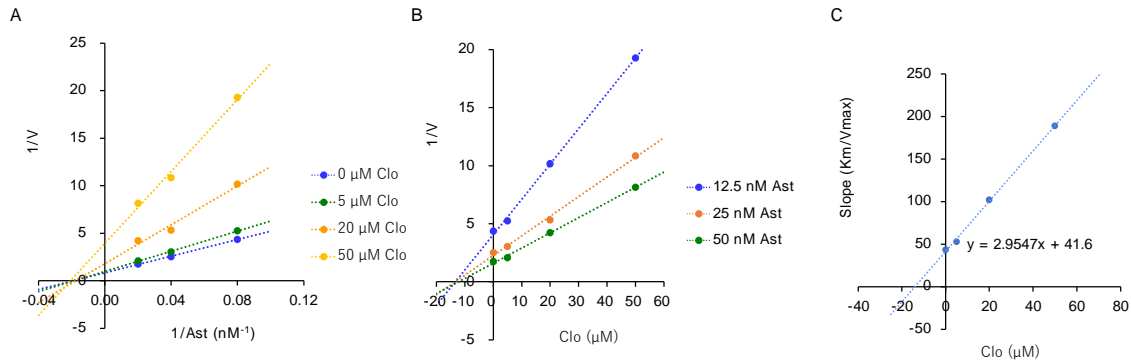


図 1 (A) Lineweaver-Burk plot、(B) Dixon plot および (C) Lineweaver-burk secondary plot

(3) Xenograft マウスにおけるクロペラスチンの腫瘍肥大抑制効果

癌細胞を使用した *in vitro* 試験において最も効果が認められた HepG2 細胞をヌードマウスに移植し、Xenograft マウスを作成した。

コントロール群およびクロペラスチン群の体重は、腫瘍移植後、時間の経過とともに減少が認められたが、両群に差はなかった (図 2A)。腫瘍体積はクロペラスチンの投与により腫瘍肥大が抑制され、3 週目においては有意差が認められた (図 2B)。一方、血液中の赤血球・白血球・血小板数は両群で変化はなく、ALT、AST、Cr 値も変化はなかった。

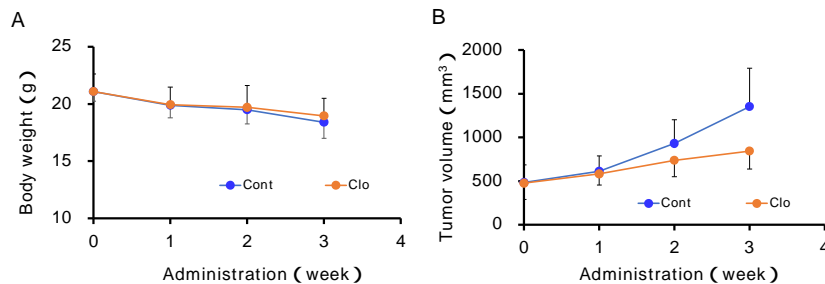


図 2 クロペラスチン投与による(A) 体重変化および(B) 腫瘍体積変化, (n=5, mean ± S.D.)

以上の検討により、今回検討した 4 つの CYP2J2 阻害薬において、癌細胞の生存率低下作用が認められた。CYP2J2 阻害作用の強いクロペラスチン、ノスカピンは癌細胞の生存に及ぼす影響も強く、CYP2J2 阻害の強度とおおかた相関するものであった。中でもクロペラスチンは、いずれの細胞においても最も強い作用を示し、HepG2 細胞では 30 μM 以上で完全に死滅させた。クロペラスチンは、ラットにおける組織移行性を測定した実験で肝臓へ分布しやすいことが報告されている²⁾。このことから、肝細胞内へ取り込まれやすく HepG2 細胞で最も効果が認められたのではないかと推察された。クロペラスチンの正常肝細胞への影響は HepG2 細胞と比較し低いことから、癌細胞特異的に増殖を抑制することが示唆された。

一方、クロペラスチンの CYP2J2 阻害作用の詳細を Lineweaver-Burk plot と Dixon plot を作成することにより調べた。その結果、クロペラスチンの CYP2J2 に対する阻害は非競合阻害であり、阻害定数 K_i 値は 14.1 μM と算出された。クロペラスチン 10 mg の単回投与時の最高血漿中濃度は 7.2 ng/mL である³⁾が、半減期が 35 時間程度と比較的長いこと、最大 1 回 20 mg を 3 回投与することを考慮すると血漿中濃度は高くなる。また肝臓では血漿中の 20~30 倍の濃度になる²⁾ので、肝細胞内のクロペラスチン濃度は K_i 値近くまで到達する可能性がある。

HepG2 細胞をヌードマウスに移植した Xenograft マウスを使用した検討において、クロペラス

チン投与群において腫瘍増大の抑制作用が認められた。また、血液中の赤血球・白血球・血小板数はコントロール群と比較し変化はなく、ALT、AST、Cr 値も変化はないことから有害事象はないものと示唆された。近年、クロペラスチンがミトコンドリアの酸化的リン酸化を抑制することにより食道扁平上皮癌(ESCC)の進行を阻害する⁴⁾ことが報告された。これは本研究を支持するものであるとともに、クロペラスチンにおける抗腫瘍作用のメカニズムは多岐にわたるものと考えられる。

本研究の結果から、クロペラスチンは正常細胞への影響は少なく、癌細胞特異的に細胞増殖抑制作用を示すことが明らかとなった。さらに CYP2J2 阻害は新たな作用メカニズムの抗がん剤になりうると考えられた。

引用文献

- 1) Cancer Res. 2005; 65: 4707-4715.
- 2) 応用薬理 1971; 5: 735-739.
- 3) Drugs in R&D 2022; 22: 311-320.
- 4) Cell Death Discov. 2021; 7: 166.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 田島正教、林 新那、橋本梨央、杉山恵理花、佐藤 均
2. 発表標題 CYP2J2阻害によるがん細胞増殖抑制効果の検討
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
---------	---------