

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18111

研究課題名(和文) がん増殖関連蛋白GGCTを標的とした腎がんに対する新規治療の開発

研究課題名(英文) Development of a novel treatment for renal cancer targeting the cancer proliferation-related protein GGCT

研究代表者

窪田 成寿(Kubota, Shigehisa)

滋賀医科大学・医学部・助教

研究者番号：80759118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：種々の腎細胞がん株に対し、 $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT)阻害剤 pro-GAは有意な抗腫瘍効果を認めた。その作用機序として、グルタチオン(GSH)代謝阻害によるGSHやシステインの枯渇が酸化ストレスを惹起し、抗腫瘍効果をもたらすことを明らかにした。より効果的な治療方法の確立を目的とし、酸化ストレス誘導剤との併用療法について検討した結果、pro-GAと酸化ストレス誘導剤の併用はそれぞれ低用量でも活性酸素種ROSの著明な増大を誘導し、強い抗腫瘍効果が得られることが明らかになった。GGCTを標的とした治療は腎癌に対する新規治療選択の1つとなりうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

腎癌に対するさまざまな分子標的治療の開発が進められているが、いずれも有害事象の克服が課題とされている。申請者らはGGCTを標的とした治療が、酸化ストレスの誘導を介して腎癌に対する優れた抗腫瘍効果をもたらすことを明らかにした。この作用機序に着目し、酸化ストレスを増強させる非抗癌剤との併用治療が、単剤と比較しより低用量で強い腫瘍増殖抑制効果を発揮することを示した。本研究の発展は、腎癌に対する新規標的治療の可能性を示すと共に、ドラッグリポジショニングによる治療効果増強と副作用の低減を実現することにも貢献でき、社会的意義は高いものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：An inhibitor of  $\gamma$ -glutamylcyclotransferase (GGCT), pro-GA, demonstrated significant anti-tumor effects on various renal cell carcinoma cell lines. The mechanism of action was shown to be the induction of oxidative stress by inhibition of glutathione (GSH) metabolism, resulting in depletion of GSH and cysteine, which in turn led to the anti-tumor effects. In order to establish a more effective treatment method, combination therapy with an oxidative stress inducer was investigated. The combination of pro-GA and an oxidative stress inducer induced a significant increase in reactive oxygen species (ROS) even at low doses, resulting in a strong anti-tumor effect. Targeting GGCT may be a novel therapeutic option for the treatment of renal cancer.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード： $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ がん増殖関連蛋白 腎癌 新規治療標的

## 1. 研究当初の背景

申請者らは泌尿器がんにおける診断バイオマーカーおよび治療標的の探索を行い、がん増殖関連蛋白として  $\gamma$ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT) を同定した。GGCTの機能として、正常組織に対するがん化促進作用はないものの、がん細胞における増殖・遊走・浸潤に重要な役割を担っており、発現阻害によりがん特異的な増殖抑制効果が見られることを見出し、新規治療標的としての可能性を示した (Kageyama, Proteomics Clin Appl, 2007)。また、GGCT阻害による抗腫瘍メカニズムの1つとしてCDK inhibitorの誘導による細胞老化を介した非アポトーシス細胞死機構に基づくものであることを見出した (Matsumura, BMC cancer, 2016)。さらに、細胞内で安定的にGGCT酵素活性を阻害する低分子化合物 (pro-GA) の開発に成功し、担がんマウスに対して臓器障害を示さずに優れた抗腫瘍効果を発揮することを示した (Ii, ChemMedChem, 2018)。GGCT阻害剤のもつ従来の抗がん薬や分子標的薬と異なる抗腫瘍メカニズムに着目し、尿路上皮がんにおいて、GGCT標的治療が単独治療として有効であるのみならず、既存の抗がん薬との併用で抗腫瘍効果がさらに増強されることを示した (Hanada, Kubota, Anticancer Res, 2019)。

転移性腎がんに対する分子標的薬の効果は限定的かつ時限的であり、一方で有害事象は高度である。その原因は、腎がんにおける遺伝的多様性と、治療標的であるVEGFRやmTORが正常組織にも広く発現していることが大きい。この問題を解決するために、より効果的で副作用の少ない新規治療薬の開発が腎がん治療における喫緊の課題とさ

れてきた。GGCT高発現は腎がんにおいても予後不良と相関することが示されており、腎がんに対してGGCT標的治療を応用することができれば、現在の分子標的薬治療の問題である効果不良や多彩な副作用を克服しうる新規治療となりうるのではないかと考えた。

## **2. 本研究の目的**

本研究では、腎がんに対するGGCT標的治療の有効性を明らかにし、新規腎がん治療の開発につなげるために、腎がん細胞株を用いてGGCT標的治療の抗腫瘍効果の検討を行う。さらに腎がんにおける抗腫瘍メカニズムの解明と鍵となる分子機構に着目した投与方法の確立を目指す。

## **3. 研究の方法**

### **1) 腎癌培養細胞におけるGGCT阻害による抗腫瘍効果の検討**

腎癌細胞株（SW839, VMRC-RCW, KMRC-1, NC65, ACHN, Caki1/2）の腎がん細胞株に対するGGCT阻害剤pro-GAの細胞増殖抑制効果を、DMSOを対照薬としてWST-8 assayを用いて検討する。

### **2) GGCT阻害剤の抗腫瘍メカニズムおよび効果予測バイオマーカーの検討**

pro-GA投与時のGGCT関連代謝産物の変化に着目し、GGCT阻害時の抗腫瘍メカニズムに関連した分子機構を同定する。鍵となる分子の添加や枯渇による抗腫瘍効果への影響を検討する。

### 3) GGCT標的治療の最適化を目指した併用療法の探索

2.で得られた結果をもとにpro-GAの作用を増強しうる薬剤を探索し，pro-GAと併用した際のがん細胞への影響を検討する．

## 4. 研究の成果

GGCT阻害剤pro-GAの投与は腎癌細胞株のいずれにおいても濃度依存性に細胞増殖を抑制した．IC50値を算出し，Pro-GAへの感受性を検討した結果，高感受性株はSW839，NC65，低感受性株はKMRC-1，Caki-2であった．高感受性株であったSW839を用いて，GGCT関連代謝産物であるグルタチオン(GSH)，システイン(Cys)の変動を計測した結果，いずれもpro-GA投与により低下を示した．ROS-Glo™ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Assayを用いて活性酸素種(ROS)を計測した結果，SW839においてpro-GA投与によるROSの増大を認めた．この結果はNC65およびKMRC-1においても同様であった．また，pro-GAによる細胞増殖抑制効果はGSHおよびCys前駆物質 N-acetyl-L-cysteine (NAC)の添加によりcancelされた．以上より，GGCT阻害剤pro-GAは，GGCT酵素活性を阻害することで，関連代謝産物であるGSH, Cysの枯渇を誘導し，細胞内の酸化ストレスが増大することで抗腫瘍効果を呈することが示唆された．

GGCT阻害剤pro-GAの作用機序に着目し，酸化ストレスを誘導する薬物との併用治

療により、抗腫瘍効果が増強されるかを検討した。われわれは狭心症治療として使用されていた血管拡張薬オキシフェドリン(OXY)がアルデヒド代謝を阻害することで、酸化ストレスを増大させ、がん細胞のGSH枯渇剤に対する感受性を増強する(Otsuki, Cancer sci, 2020)ことに着目し、pro-GAとの併用効果をWST-8 assayを用いて検討した。SW839に対し、Pro-GA、OXYはともに濃度依存性に細胞増殖を抑制した。それぞれ単剤では対照薬DMSOと比較して有意な細胞増殖を認めない濃度であっても、両者を併用することで相乗的な細胞増殖抑制効果が得られた。この結果はNC65、更にはpro-GA低感受性であるKMRC-1においても同様であった。低用量での併用でもpro-GAの作用が増強され、低有害事象に寄与できる可能性が示唆された。

以上より、GGCT阻害剤pro-GAの腎癌細胞に対する抗腫瘍効果を明らかにするとともに、その抗腫瘍効果メカニズムの一部を解明することができた。また、作用機序に着目することで、既存薬との併用療法の有用性を見出した。

本研究の発展は、腎癌に対するGGCTを新規標的とした治療の可能性を示すと共に、ドラッグリポジショニングによる治療効果増強と副作用の低減を実現することにも貢献できると考えられる。今後の研究でさらなる検証を続けていきたい。

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

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