

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09491

研究課題名（和文）新たに合成した子宮内膜癌に対する抗腫瘍性化合物の作用機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Mechanism of Action of Newly Synthesized Antitumor Compounds Against Endometrial Cancer

研究代表者

山田 靖（Yamada, Yasushi）

信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・助教

研究者番号：60646652

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）：近年我が国では子宮内膜癌が著増しており、新たな治療の開発が待たれている。申請者らは内膜癌の増殖機序を検討したところ、細胞周期進行を促進するサイクリンA2の過剰発現が予後不良因子であり、サイクリンA2が治療標的として好適であると考えた。サイクリンA2転写抑制能を有する化合物を探索する目的で、低分子化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、サイクリンA2の転写と細胞増殖を抑制する化合物Xを同定した。その改变化合物X1を合成したところ、X1はXの10倍の抗腫瘍作用を有することが判明した。本研究では子宮内膜癌発癌モデルマウスを使用しこの化合物の抗腫瘍効果と安全性につき検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでX1の内膜癌細胞株に対する抗腫瘍効果と、ヌードマウス皮下移植モデルでのX1の抗腫瘍効果は示して来たが、免疫不全のない子宮体癌発癌マウスモデルでの検討をしたことで、よりヒトへの投与に近い状態での抗腫瘍効果の検討が行われた。また、化合物の生体に対する安全性の評価を行うことができた。これらの結果は、今後化合物X1の臨床応用を検討するに当たり、非常に有益な情報となる。

研究成果の概要（英文）：In recent years, the incidence of endometrial cancer has been significantly increasing in our country, and the development of new treatments is eagerly awaited. Upon examining the mechanisms of endometrial cancer proliferation, we found that the overexpression of cyclin A2, which promotes cell cycle progression, is a poor prognostic factor, and we considered cyclin A2 to be a suitable therapeutic target. To identify compounds with cyclin A2 transcription inhibitory activity, we screened a library of small molecule compounds and identified compound X, which inhibits both the transcription of cyclin A2 and cell proliferation. After synthesizing the modified compound X1, it was found that X1 has ten times the antitumor activity of X. This study primarily evaluated the antitumor effect and safety of this compound using a mouse model of endometrial cancer.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：サイクリンA 子宮内膜癌 分子標的薬

### 1. 研究開始当初の背景

近年我が国では子宮内膜癌が著増しており、新たな治療の開発が待たれている。申請者らは内膜癌の増殖機序を検討したところ、細胞周期進行を促進するサイクリン A2 の過剰発現が予後不良因子であり、サイクリン A2 が治療標的として好適であると考えた。サイクリン A2 転写抑制能を有する化合物を探索する目的で、サイクリン A2 プロモーターを用いたルシフェラーゼアッセイにより低分子化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、サイクリン A2 の転写と細胞増殖を抑制する化合物 X を同定した。その改变化合物 X1 を合成したところ、X1 は X の 10 倍の抗腫瘍作用を有することが判明した。本研究では多種の細胞や系を用いて、X1 の作用、特にその抗腫瘍作用の分子機序を解明し、臨床応用への途を開く。

内膜癌の分子標的薬を開発するためには、内膜癌の生物学的悪性度をよく反映するバイオマーカーを選定し、それを標的とした治療戦略を立てることが非常に重要である。申請者らはその観点から細胞周期調節因子に着目した。細胞周期調節因子はサイクリンやサイクリン依存性リン酸化酵素(cdk)、癌抑制遺伝子産物など、細胞増殖調節の根幹にかかわる分子群からなる。特にサイクリンは細胞周期特異的に発現され、特定の cdk と結合して増殖を促進する。申請者らは内膜癌の増殖機序を検討したところ、サイクリン A2 の発現が独立した予後不良因子であること(Hum Pathol 2003; 34; 471)、さらに Akt 経路の活性化を通してシスプラチンに対する耐性の獲得に関与していることを明らかにした(J Cell Mol Med. 2009 Jul 6)。サイクリン A2 は G1 期から M 期まで細胞周期の長い期間発現すること、また cdk2 と cdk1 に結合するという他のサイクリンにはない大きな特徴があり、非常に重要な分子である。さらに独自に開発した DNA 損傷を定量化する方法(Mol Cell Endocrinol.2015;400:71)によって、サイクリン A2 はシスプラチンによって発生する DNA エラーを修復していることを見出した。以上から、サイクリン A2 が内膜癌に対する治療標的として極めて好適であることはほぼ確実である。

### 2. 研究の目的

#### ・抗サイクリン A2 作用を有する低分子化合物の同定

申請者らは抗サイクリン A2 活性を有する低分子化合物を同定するためにサイクリン A2 プロモーターを有するルシフェラーゼアッセイを樹立し、約 1 万種の低分子化合物ライブラリーをスクリーニングした。これにより、サイクリン A2 発現抑制活性を有する分子量約 300 の化合物 X を新たに同定した。X は内膜癌細胞などに対し、 $1 \times 10^{-7} M$  で最大 94%のサイクリン A2 転写抑制と 93%の細胞増殖抑制効果を示した。さらに X を皮下投与したところ、マウス皮下に接種した子宮内膜癌細胞の増殖を有意に抑制し、X が内膜癌に対する有望なリード化合物であることが判明した。

#### ・新たな低分子化合物 X1 の合成

しかし X は溶媒に難溶性で、薬剤の投与経路が限定されるという問題点があった。このため、X の構造活性相関データなどから構造を改変し化合物 X1 を新たに合成ところ、X1 の溶解度が劇的に改善され、X と比較して約 10 倍もの子宮内膜癌細胞に対する増殖抑制能を有した。また X1 の腹腔内投与によって各種の子宮内膜癌細胞の増殖を抑制し、この効果は細胞種によっては内膜癌のキードラッグであるシスプラチンより高かった。ヌードマウス皮下の内膜癌に対し X1 を投与したところ、腫瘍は消失した。これらの結果は X1 が全く新規の内膜癌の治療薬としての極めて高い可能性を示すものである。本研究ではこの化合物 X1 の更なる効果の評価と機序の解明、およびそれに基づく臨床応用の途を開く。本研究の学術的な問いは、抗腫瘍性化合物 X1 の作用とその作用機序を明らかにすることである。また、新規薬剤には安全性の問題がつかぬにつまとう。現時点ではマウスに対する明らかな副作用は認めないが、生体投与で問題が起きないかをさらに検討する。

### 3. 研究の方法

#### 1) 化合物 X1 の抗腫瘍効果のさらなる評価

i) ノックアウトマウスを用いた検討：我々は米国ジョンスホプキンス大学婦人科病理部から PTEN と ARID1a のダブルノックアウトマウスを入手している。このマウスは短期間で子宮内膜癌を発生する。また、C57BL 系であり、ヌードマウスと異なり免疫不全ではない。このマウスに X1 子宮内腔に投与し、効果と安全性を評価する。

ii) 安全性の評価：各種正常細胞（正常子宮内膜腺上皮、間質細胞）、血管内皮細胞、不死化子宮内膜細胞などに X1 を添加し、細胞毒性を評価する。またマウス投与によって安全性を評価する。安全性の評価項目は、血液検査（腎機能、肝機能、血球算定）、腎臓、肝臓の組織標本での細胞障害性、食思不振の評価のための体重測定を含む。

#### 4. 研究成果

i)Arid1a/Pten ダブルノックアウトマウスにおける化合物X1の効果

図1のようにドキシサイクリンでノックアウトマウスに子宮内膜癌の発がんを誘導したのち、化合物X1を4週後に1回投与、その2週後に片側の子宮を摘出し、その際にその体側の子宮に化合物X1を2回目の投与をおこない、その2週後に残った子宮を摘出した。

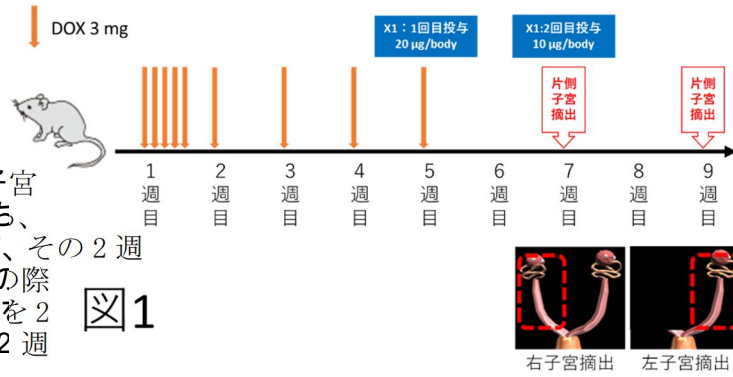


図1

その結果、1回目投与後では腫瘍の残存を認めたが、図2のように化合物X12回投与したマウスでは腫瘍の残存を認めなかった。

その後マウスのN数を増やし、現在、コントロール5匹、X1投与群5匹まで検討を進めたところ。コントロール5匹ではすべて腫瘍が残存しているのに対し、X1投与群では異型増殖症どまりで、1匹も腫瘍の残存を認めていない。現在、さらなる検討のため、実験を追加している。

化合物X1 2回投与後

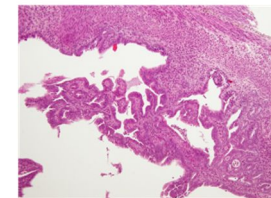
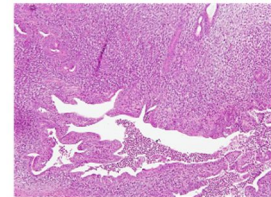
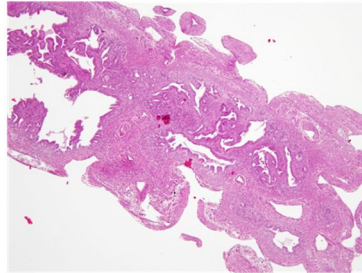


図2

ii)

正常子宮内膜間質細胞に化合物X1を添加し、WST-1アッセイで細胞独資を評価したところ、正常子宮内膜間質細胞には増殖抑制効果を認めず、正常細胞における安全性を確認した。

また、i)のマウスの血液検査にて一部のコントロール群で肝逸脱酵素の軽度上昇を認めたが、X1投与群で血球減少や、肝機能障害、腎機能障害は認めなかった。

i)のマウスの肝臓、腎臓を摘出し、HE染色で細胞障害性を評価したが、明らかな肝障害、腎障害は認めなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 浅香亮一
2. 発表標題 サイクリンA2を標的とした新規低分子化合物の子宮内膜癌に対する作用の検討
3. 学会等名 第21回婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 浅香 亮一、横川 裕亮、宮本 強、山田 靖、小野 元紀、田中 泰裕、上條 恭佑、安藤 大史、岡崎 浩輔、塩沢 丹里
2. 発表標題 サイクリンA2を標的とした新規低分子化合物の子宮内膜癌に対する作用の検討
3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会総会
4. 発表年 2023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
研究分担者	塩沢 丹里  (Shiozawa Tanri)  (20235493)	信州大学・学術研究院医学系・教授    (13601)	
研究分担者	竹内 穂高  (Takeuchi Hodaka)  (30816351)	信州大学・医学部附属病院・助教（診療）    (13601)	

6. 研究組織（つづき）

	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	宮本 強  (Miyamoto Tsutomu)  (70418721)	信州大学・学術研究院医学系・准教授    (13601)	

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