

令和 6 年 6 月 28 日現在

機関番号：23701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19383

研究課題名（和文）難治性がん治療標的の真打：ミトコンドリア鉄硫黄タンパク質MiNTを狙う革新創薬

研究課題名（英文）Drug Discovery Targeting Mitochondrial Iron Sulfur Protein MiNT, a Novel Molecular Target for Anti-Mitochondrial Therapy

研究代表者

永澤 秀子（Hideko, Nagasawa）

岐阜薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：90207994

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：様々ながんを高発現することが知られるCISD3遺伝子は、ミトコンドリアマトリックスに局在する鉄硫黄タンパク質MiNTをコードし、細胞内の鉄、Fe-S、および活性酸素のホメオスタシスに関与する。そこで、MiNTを標的とするがん治療薬の開発に取り組んだ。1)種々のTZD誘導体を設計・合成し、フェロトーシス誘導作用を調べたところ有意な効果は認められなかったが、細胞内の二価鉄誘導を示す化合物を見出した。2)フェロトーシス誘導剤のアルテスネートはミトコンドリア標的化によって、活性が増強する。そこで難治性子宮頸がんにおける効果について検討したところ、ヘム依存的な細胞死を誘導することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「鉄・ROS中毒」表現型は悪性形質やがん幹細胞の特性であることをふまえれば、MiNT標的薬はがん細胞特異的にROSバーストを引き起こして悪性がん細胞を駆逐することができるものと期待される。このような創薬研究は、これまでに例がないことから、ミトコンドリア機能不全を有する難治性がん治療の有望な治療薬として期待できる。

研究成果の概要（英文）：The CISD3 gene, known to be highly expressed in various cancers, encodes the iron-sulphur protein MiNT, which localises to the mitochondrial matrix and is involved in intracellular iron, Fe-S and ROS homeostasis. Therefore, we aimed to develop ferroptosis inducers or inhibitors targeting MiNT. 1) Various TZD derivatives, including novel compounds, were designed and synthesised, but none showed significant ferroptosis inducing activity. Interestingly, compounds showing intracellular iron divalent inducibility were found. 2) The ferroptosis inducer artesunate (ATS), whose activity is enhanced by mitochondrial targeting, was investigated for induction of ferroptosis in refractory cervical cancer and was found to induce heme-dependent cell death.

研究分野：創薬化学、ケミカルバイオロジー

キーワード：ミトコンドリア 鉄代謝 酸化ストレス がん治療 鉄・ROS中毒 MiNT

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過去 50 年に渡り、がんのエネルギー代謝の特徴として、好氣的解糖 (Warburg 効果) に着目した創薬研究が行われてきたが、未だ新薬創製には至っていない。近年、がんは主にミトコンドリアの代謝疾患であることが明らかになり、がんのミトコンドリアを標的とする創薬が再燃している。ごく最近、米国の大型がんゲノムプロジェクトの公開データベース TCGA の全がん解析により、CISD3 遺伝子がさまざまなヒトのがんにおいて高発現しており、これを高発現している患者は、再発率が高く、生存率が低いことが判明した (Y. Li *et al.*, *Cell Death Dis.* 12, 839, 2021)。この遺伝子はミトコンドリアマトリックスに局在する鉄硫黄タンパク質 MiNT をコードし、細胞内の鉄、Fe-S、および活性酸素のホメオスタシスに参与する。Mitochondrial inner NEET (MiNT) は「鉄・活性酸素(ROS)中毒」を呈する悪性がん細胞の増殖を助け、オートファジーやアポトーシス、フェロトーシスなどの細胞死を防いでいると予想される。

2. 研究の目的

本研究では、腫瘍ミトコンドリアにおける真の標的と目される鉄硫黄タンパク質 MiNT を狙った新規ミトコンドリアトキシンの創製に挑戦する。「MiNTこそが、がんのミトコンドリア標的の真打タンパク質ではないか？」という仮説のもと、MiNT 結合リガンド pioglitazone (TZD) をもとにより親和性の高いリガンド構造への最適化、ミトコンドリア送達能の付与と活性酸素応答プロドラッグ化、コバレントドラッグ化、ミトコンドリアを標的とするフェロトーシス誘導の検討により、難治性がんやがん幹細胞の駆逐を目指す。

3. 研究の方法

創薬戦略と分子設計：MiNT は NEET タンパク質ファミリーに属し、TZD は、同じファミリーのアイソフォームである mNT の最初のリガンドとして同定された。ドッキングシミュレーションによる *in silico* スクリーニング及び TZD の構造修飾により MiNT との親和性を高め、ミトコンドリア送達キャリア、ミトコンドリアの ROS または光刺激によって活性化されるプロドラッグ保護基の導入により mNT におけるこれらの化合物の作用を解析する。mNT 標的基に蛍光標識基を導入することで、mNT との相互作用について解析する。またコバレント結合基を導入してここで、mNT の修飾がどのような効果をもたらすかを解析する。得られた候補化合物について、研究室で開発したミトコンドリア局在二価鉄蛍光プローブを用いたセルベース活性評価と作用機構の解析を行う。

4. 研究成果

がん細胞の重要な特徴に「鉄・活性酸素中毒」がある。すなわち過剰な鉄ががんの高い代謝要求を支え、増殖を助ける一方でフェロトーシスに対して脆弱になる。これに対し、様々ながんにおいて高発現している CISD3 遺伝子は、ミトコンドリアマトリックスに局在する鉄硫黄タンパク質 Mitochondrial inner NEET (MiNT) をコードし、細胞内の鉄、Fe-S、および活性酸素のホメオスタシスに参与し、酸化ストレスの更新によるオートファジーやアポトーシス、フェロトーシスなどの細胞死を防いでいると予想される。そこで、MiNT を標的とするフェロトーシス誘導剤または阻害剤の開発に取り組んだ。

種々の TZD 誘導体の Knoevenagel 反応を基盤とする多様性志向合成を行い新規化合物を含む候補化合物を得た。さらに、これらのマイクロフローシステムによるスケールアップ合成についても検討した。また、独自の二価鉄蛍光プローブを用いて、得られた誘導体をがん細胞に作用させ、蛍光イメージングによって二価鉄変動を調べたところ、二価鉄誘導作用を示す誘導体を見出した。そこで、フェロトーシス誘導作用を調べたが、有意な効果を示す化合物は得られなかった。別に、血管新生阻害作用を調べたところ、複数の誘導体に有意な血管新生抑制作用があることが明らかになった。

TZD 誘導体の NEET たんぱく質との相互作用を解析するため、標的蛋白を蛍光標識できるニトロベンゾオキサジアゾール誘導体を合成した。また、既報に従って MiNT タンパク質強発現またはロックダウン細胞の作成に取り組み、現在クローニング中である。

mNT の修飾による酸化ストレス作用について検討するため、独自に開発した酸化ストレス誘導剤のケージド過酸化化合物と TZD のハイブリッド分子を設計し、現在合成中である。このケージド過酸化化合物もトリフェニルホスホニウム基を標的として導入した誘導体 MitoTBHP は、光照射によって過酸化化合物を放出することで、ミトコンドリア膜電位を脱分極させる (Tsuji *et al.*, *Chem. Commun.*, 59, 6706, 2023)。

難治性子宮頸がんのフェロトーシス誘導によるがん治療を目指して、ドラッグリポジショニングを目指して、抗マラリア薬のアルテスネート (ATS) の作用について検討した。ATS はミトコンドリアに標的化することで、細胞毒性が大きく向上することが報告されている (C. H. Zhang *et al.*, *Angew. Chem.-Int. Edit.* 55, 13770, 2016) ことから TZD との併用及びハイブリッド化についても検討中である。子宮頸がん細胞のうち CaSki 細胞が ATS 抵抗性を示すことが明らかになったことから、Hemin を添加したところ、細胞毒性が有意に増強されることがわか

った。さらに、ヘム合成前駆体のアミノレブリン酸を併用したところ、HeLa 細胞に対する ATS の効果が有意に増感されたことから、ATS はヘム依存的に細胞死を誘導することが示唆された。一方、CaSki 細胞は ALA との併用でも抵抗性は改善されなかった。さらに、独自に開発したヘム蛍光プローブ(K. Kawai *et. al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 144, 3792, 2022)によるイメージング解析により、ATS と ALA の併用により、HeLa および CaSki 細胞のいずれにおいても遊離ヘムのレベルが有意に増強することが明らかになったことから、CaSki 細胞の抵抗性には抗酸化ストレスシステムの亢進が予想された。実際細胞内グルタチオンは HeLa 細胞に比べて有意に高いことから、今後 GSH 阻害剤などとの併用についても検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuji Mieko, Taira Haruno, Udagawa Taro, Aoki Tatsuya, Hirayama Tasuku, Nagasawa Hideko	4. 巻 41
2. 論文標題 Synthesis and photochemical properties of caged peroxides for photocontrol of cellular oxidative stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D3CC01192E	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawai Kanta, Hirayama Tasuku, Imai Haruka, Murakami Takanori, Inden Masatoshi, Hozumi Isao, Nagasawa Hideko	4. 巻 144
2. 論文標題 Molecular Imaging of Labile Heme in Living Cells Using a Small Molecule Fluorescent Probe	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of the American Chemical Society	6. 最初と最後の頁 3793 ~ 3803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/jacs.1c08485	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Mieko Tsuji, Haruno Taira, Tasuku Hirayama, Hideko Nagasawa
2. 発表標題 Development of photocaged peroxides for the control of oxidative stress in mitochondria
3. 学会等名 Future Drug Discovery Empowered by Chemical Biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永澤秀子、森美奈子、辻美恵子、平山祐、森重健一郎
2. 発表標題 CD44v陽性治療抵抗性子宮頸癌の酸化ストレス耐性の抑制による化学療法増感
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 辻美恵子、平山祐、永澤秀子
2. 発表標題 ミトコンドリア放出型光 ケージドペルオキシド化合物の開発研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田 陽子, 鈴木 紀子, 竹中 基記, 辻 美恵子, 平山 祐, 永澤 秀子
2. 発表標題 腫瘍細胞の鉄代謝およびヘム合成誘導を利用したArtesunate誘導性細胞死の増感
3. 学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永澤秀子
2. 発表標題 がんの酸化ストレスを標的とする化学ツールの開発と治療戦略
3. 学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永澤秀子
2. 発表標題 がん細胞の酸化ストレスを見る、操る
3. 学会等名 第35回バイオメディカル分析科学シンポジウム（招待講演）
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	平山 祐 (Hirayama Tasuku) (10600207)	岐阜薬科大学・薬学部・准教授 (23701)	
研究 分担者	辻 美恵子 (Tsuji Mieko) (40709721)	岐阜薬科大学・薬学部・助教 (23701)	

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