

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 11 月 4 日現在

機関番号：82713

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430165

研究課題名(和文)PDIを標的とした難治性固形腫瘍治療薬の開発

研究課題名(英文)Invention of novel cancer drug for refractory solid tumor

研究代表者

山田 六平(YAMADA, ROPPEI)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター(臨床研究所)・その他部局等・その他

研究者番号：30404974

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：PDI阻害薬としての臨床応用が期待された新規化合物PACMA31であったが再現性が証明されずPDI阻害薬としての開発は断念した。しかしその誘導体であるPACMA5は以下の知見を得た。1) 正常細胞には殺細胞効果を示さず、多種のがん細胞には殺細胞効果を示すこと、2) その殺細胞効果は活性酸素発生を介した非アポトーシス細胞死であること、3) 临床上難治性である卵巣癌腹膜播種のマウスモデルにおいて腫瘍増殖抑制効果を示すこと、4) PACMA5の標的タンパクは活性酸素発生に関与するProtein1(仮称)であることが明らかとなった。したがってPACMA5は難治性固形腫瘍の新たな治療薬の候補となりうる。

研究成果の概要(英文)：We discontinued the invention of PACMA31 as a PDI inhibitor, because our data did not show reproduction. But PACMA5, other PACMA derivative, had four novel findings. 1) It showed potency for not normal cells but cancer cells. 2) It induced non-apoptotic cell death via ROS generation. 3) It showed efficacy for ovarian peritoneal dissemination. 4) Its target protein is Protein 1 (tentative name) which is closely related to ROS generation. Thus we believed PACMA5 can be a new candidate of a novel cancer drug for refractory solid tumor.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：難治性固形腫瘍 活性酸素

1. 研究開始当初の背景

申請者らは High Through putout Screening (HTS)法を用いて新規化合物 Propynoic Acid Carbamoyl Methyl Amides(以下 PACMAs)を創薬し、その殺細胞効果は薬剤耐性の細胞株を含む多種の癌細胞に発揮されることを見出した(1)

さらにそのアナログの一つである PACMA31 が PDI を不可逆的に阻害し、卵巣癌に対し抗腫瘍効果を発揮することを見出した(2)

はじめに参考文献(2)のごとく siRNA による PDI ノックダウン細胞を用いて PDI の発現と細胞増殖能との関連を検討した。siRNA/PDI-OVCAR8 細胞はウエスタンブロットにおいて PDI のノックダウンは確認できたが、細胞増殖能はコントロールベクター導入細胞と変わりなかった。そのため PDI は増殖能に寄与しないと判断し、これは siRNA の off target 効果と考えられた。また tissue array で肺癌および甲状腺未分化癌における PDI の発現と悪性度の関連を調べたが、臨床病期および予後との相関は認めなかった。ここで卵巣癌の中でも既存の抗がん剤に耐性を示す卵巣明細胞腺癌に着目し、5つの細胞株を用いて PACMA31 の同じ誘導体である PACMA5 の殺細胞効果を調べたところ、いずれの細胞株に対しても著しく高い殺細胞効果を示した。またその細胞死は既存の抗がん剤によって誘導される細胞死とは全く異なる新しい細胞死であることを阻害剤、蛍光色素による染色で確認した。PACMA5 は現存する抗がん剤に対して難治性である卵巣明細胞腺癌に対する新たな治療薬になりうると考え、研究を進めていく方針とした。

2. 研究の目的

OCCA に対する新たな細胞死経路の解明をおこない、治療薬を開発する。OCCA は化学療法における抵抗性を示す予後不良の卵巣癌である。本邦では OCCA の割合が高く、治療成績改善は喫緊の課題である。申請者らが創薬した Propynoic Acid Carbamoyl Methyl Amides(以下 PACMAs)の OCCA に対する殺細胞効果は IM-54(酸化ストレス(Reactive Oxygen Stress 以下 ROS))が誘導するネクロシスの特異的阻害薬)の介入により劇的に抑制されたことより、そのメカニズムは ROS 誘導におけるネクロシスである可能性が高い、と考えられた。このような代替的な細胞死経路の分子機構をさらに解明することによって、新たながん治療戦略の開発が進むことが期待される。

3. 研究の方法

MTS assay : 96 穴プレートに 3000-10000/well の細胞を散布し、一晩インキュベーターで静置した。薬剤を投与後イン

キュベーター内に静置し、48 時間後 MTS 試薬 (Promega, Cell titer 96)を投与し、その後 2 時間インキュベーションし、450nm で吸光度を測定した。

ROS の測定 : 24 穴プレートに 40000 の細胞を散布し、一晩インキュベーター内で静置した。薬剤を投与後、PBS で 3 回洗浄し、Mitoxox (Invitrogen)10 μM を投与し、20 分間インキュベーションしたのち、蛍光顕微鏡 (BZ9000, Keyence)で観察した。

OCCA 腹膜播種モデルに対する PACMA5 の治療効果を検討する目的で、腹膜播種モデルを作製した。体外から腹膜播種の評価を定量する目的でまず卵巣明細胞腺癌細胞株 ES-2 に Luciferase (RediFect Red-FLuc-Puro Lentiviral Particles (CLS960002) Sumitomo Pharamaceuticals International)を導入し、発光細胞を確立した。この細胞を PBS に懸濁(1.0x10⁶/100 μL)し SCID-Beige(雌、6 週齢)10 尾に腹腔内投与した。IVIS Imaging system を用い、腹膜播種を確認後、2 群に分け、コントロール群 (0.1%DMSO+oil 600 μL) と PACMA5(40mg/kg, 0.1%DMSO+oil /600 μL)の腹腔内投与(週 2 回)をおこなった。

実験開始 18 日目で屠殺し、腹腔内結節の採取および重量の測定をおこなった。

標的タンパクの同定

ビオチン標識 PACMA5 を用い ES-2 セルライセートから PACMA5 結合タンパク質の回収を行った。ビオチン標識 PACMA5 およびネガティブコントロールとして用いたビオチン標識ゲルダナマイシンをストレプトアビジン融合セファロースビーズに結合させ、PACMA5 に結合するタンパク質をプルダウン法によって回収した。ビーズに結合したタンパク質は SDS-PAGE によって分離後 CBB 染色を行い、ゲルダナマイシンに結合したサンプルと比較することで PACMA5 に特異的に結合するタンパク質バンドを決定した。得られたバンドをゲルから切り出し、LC-MS/MS 解析によるタンパク質同定を行うことでバンドに含まれるタンパク質を同定した。

4. 研究成果

OCCA 細胞株に対する 11 の PACMA 化合物の殺細胞効果(48 時間曝露)を MTS assay で判定。

また、ROS 誘導性ネクロシス阻害薬 IM54 前投与が与える殺細胞効果への影響を MTS assay で検討(図1)。阻害の程度、化学構造などを考慮し、compound5 を研究対象とした。

ROS 発生のメカニズムおよび細胞死のメカニズムを明らかにする目的で、各阻害薬投与後の殺細胞効果を検討した。

使用した阻害薬 : apocynin (NADPH オキシダーゼ阻害薬), MitoTEMPO(ミトコンドリア ROS 阻

IM54 inhibits cell death induced by all PACMAs on RMG1 cell line

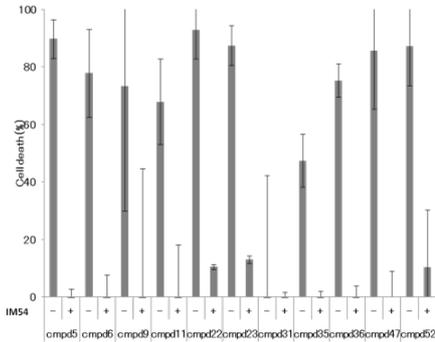


図1. PACMA 誘導体の最適化

害薬), IM54(ROS誘導性ネクロシス阻害薬), z-Vad(アポトーシス阻害薬), Necrostatin-1(ネクロプトーシス阻害薬)

上記の阻害薬前投与1時間後にPACMA51 μMを投与し、24時間後に殺細胞効果の判定をおこなった。細胞内のROSはミトコンドリア呼吸鎖複合体あるいは細胞膜のNADPHオキシダーゼから発生することが知られている。PACMAの細胞死はMitoTEMPOとIM54によってほぼ完全にキャンセルされ、NADPH阻害薬、アポトーシス阻害薬、ネクロプトーシス阻害薬の介入による細胞死のキャンセルは認められなかった(図2)。さらにPACMA5投与1時間後の細胞内のROSをMitosox(ミトコンドリアROSの蛍光色素)によって蛍光顕微鏡で観察したところ、細胞死がキャンセルされた2例においてはROSの発生がほとんど認められなかった(図3)。このことはPACMA5による細胞死が、ミトコンドリアROS発生を起点としたネクロシスであることを示唆している。

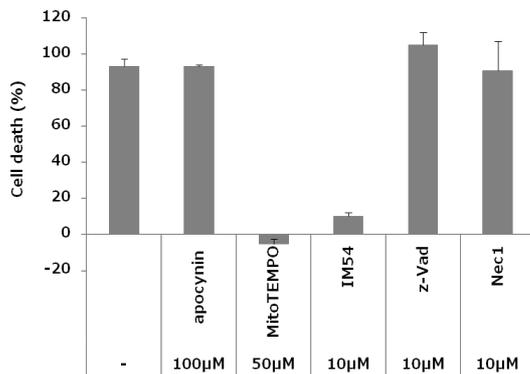


図2. PACMA5の細胞死はMitoTEMPO,IM54で阻害される

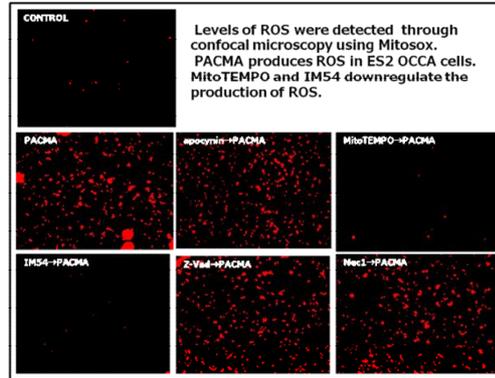


図3. PACMA5はミトコンドリアROSを発生し、MitoTEMPO,IM54はROS発生を阻害する。

正常細胞への毒性を検討する目的でPACMA投与48時間後の細胞死をMTS assayで検討した。正常細胞(HEK293T, Fa2N-4, RWPE-1, HUVEC, NuLi-1, RPEC/TERT1)に対する殺細胞効果はほとんど認められなかったが、OCCA細胞株(RMG-1, JHOC5, OVTOKO, TOV21G, ES2)に対しては高い殺細胞効果を示した。(図4)

このことはPACMAの殺細胞効果ががん細胞選択的である可能性を示唆するものである。

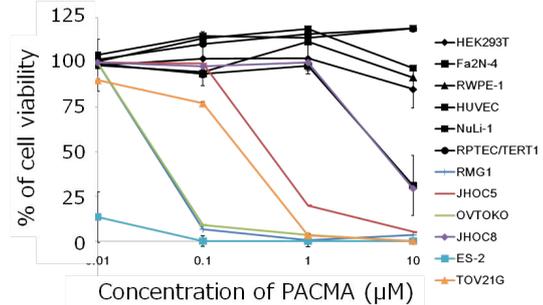
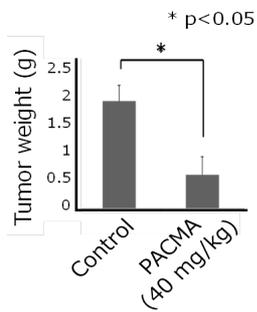


図4. PACMA5はがん細胞選択的に殺細胞効果を発揮する

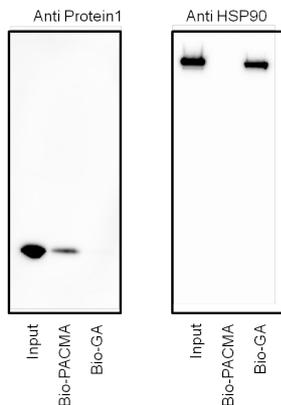
卵巣明細胞腺癌腹膜播種の制御

前述のごとく腹膜播種モデルマウスを用い、PACMA5の腫瘍増殖抑制効果を検討した。コントロール群の結節の重量は1.8gであったのに対し、PACMA5治療群の結節の重量は0.6gであり(図5)、両群間に統計学的有意差(p<0.05)を認めた。このことはPACMA5腹腔内投与が卵巣癌腹膜播種をある程度制御できる可能性があることを示している。



**図5 . PACMA5 は
卵巣癌腹膜播種を制御する**

PACMA5 が結合する標的タンパクを同定する目的で前述のごとくタンパク質バンドの LC-MS/MS 解析をおこなった。解析の結果、このタンパク質は Protein1(仮称)であることが同定された(図 6)。Protein1 は過酸化水素発生に関連したタンパク質であることが知られており、このタンパク質が PACMA5 の標的タンパクである可能性は高いと考えている。PACMA5 に結合した Protein1 がどのようなシグナルを送り、ROS を発生させるのか、現在検討中である。



**図6 . ビオチン化 PACMA5 で Protein1 が
選択的に pull-down された**

【参考文献】

- (1) Yamada R et al. Discovery and preclinical evaluation of a novel class of cytotoxic propionic acid carbamoyl methyl amides (PACMA5).
J Med Chem. Apr 28;54(8):2902-14, 2011
- (2) Xu S, Yamada R et al. Discovery of an orally active small-molecule irreversible inhibitor of protein disulfide isomerase for ovarian cancer treatment.
Proc Natl Acad Sci U S A.
Oct2;109(40):16348-53, 2012

5 . 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

- [雑誌論文](計 0件)
- [学会発表](計 0件)
- [図書](計 0件)
- [産業財産権] 出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6 . 研究組織
(1)研究代表者

山田六平 (Yamada Roppei)
地方独立行政法人神奈川県立病院機構
神奈川県立がんセンター臨床研究所 がん生物学部
研究者番号：30404974

(2)研究分担者

宮城洋平 (Miyagi Yohei)
地方独立行政法人神奈川県立病院機構
神奈川県立がんセンター臨床研究所 がん分子病態学部
研究者番号：00254194

(3)連携研究者

()

研究者番号：