

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293340

研究課題名(和文)サイクリンAを標的とした子宮内膜癌治療薬の開発：新規化合物の機能解析と改良

研究課題名(英文)Development of a new drug for endometrial carcinoma targeting cyclin A

研究代表者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA, Tanri)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：20235493

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：我が国では著増する子宮内膜癌に対する新たな治療法が待たれている。子宮内膜癌において細胞周期促進因子であるサイクリンAの陽性症例が予後不良であったことから、サイクリンAを治療標的分子と考え、低分子化合物ライブラリーからサイクリンA転写抑制活性を有する化合物Xを新たに同定した。この化合物Xは子宮内膜癌細胞のサイクリンAの転写とマウスに移植した内膜癌の増殖を9割以上抑制することから新規薬剤のリード化合物であることが示された。さらこの化合物Xを改良するため、Xの作用機序を検討したところ転写因子prohibitinを新たに同定し、これをもとにしたXの改良の基盤が整備された。

研究成果の概要(英文)：Since the number of endometrial carcinoma (EC) patients is sharply increasing in Japan, development of new therapeutic strategies is mandatory. We previously found the increased expression of cyclin A, a cell-cycle regulatory molecule, to be correlated with poor prognosis of EC patients. Therefore, we considered cyclin A to be an important therapeutic target. After screening of a library containing more than 10,000 low molecular weight compounds, we found that a molecule with 300 Da (termed "X") had strongly suppressed the transcription of cyclin A and growth of EC xenografts on mice, suggesting "X" to be a promising lead compound. In order to improve the function of "X", we examined the working mechanism of "X", and found X to bind to a transcriptional factor, prohibitin. Thus, prohibitin-oriented structural modification seems to pave the way for a new drug development.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮内膜癌 サイクリンA 分子標的薬 低分子化合物

1. 研究開始当初の背景

近年わが国において子宮内膜癌の患者は著明に増加しており、例えば最近 20 年で患者数は約 6 倍となっている。子宮内膜癌においては癌が子宮に限局している早期癌の場合には手術で根治が期待できるが、患者数自体の急増にともない、手術不能な進行癌患者が増加している。このような場合には手術と化学療法および放射線療法が施行されているが予後は不良である。このため、進行癌や再発癌に対する新たな治療戦略としての分子標的療法の開発が強く待たれている。

内膜癌に対する分子標的療法を開発するためには、子宮内膜癌の増殖機序を理解することが重要である。我々は子宮内膜癌の増殖機序を解明するために、正常内膜および内膜癌におけるサイクリンをはじめとした各種の細胞周期調節因子の発現を調べたところ、これらの因子が内膜癌では過剰発現されており、特にサイクリン A の発現は独立した予後不良因子であることを見出した(Cancer 1996; 77: 321, Cancer 1996; 78: 1248, Cancer 1997; 80: 2250, Hum Pathol 2003; 34: 471)。加えて、抗癌剤を使用した後に再発や転移を呈した症例ではこれら病巣でのサイクリン A の発現が増強していることを明らかにした。

これらの結果から、我々は、サイクリン A は本来の機能として細胞増殖を刺激するのみならず、抗癌剤感受性などにも影響を及ぼしているのではないかと考えこれを検証した。まず子宮内膜癌細胞 HHUA にサイクリン A 発現ベクターを導入してサイクリン A 強発現 HHUA 株を樹立し、この細胞の増殖能、抗癌剤に対する感受性を検討した。この結果サイクリン A 導入細胞ではコントロール細胞と比較して、i) 増殖能が亢進した、ii)、内膜癌治療の Key drug であるシスプラチン(CDDP)とアドリアマイ

シンに対する感受性が *in vitro*、およびマウスをもちいた *in vivo* の系でも低下していた、iii)このサイクリン A による CDDP 耐性獲得の機序は CDDP によるアポトーシスの抑制による、iv) このアポトーシス減少は PI3 kinase-Akt 経路の活性化による、などこの所見を明らかにした。

我々はこのサイクリン A 導入による Akt 活性化の分子機序を明らかにするために、サイクリン A 導入によって発現増強する遺伝子群を Microarray によって解析した結果、periplakin に注目した。Periplakin は細胞内では Akt のシグナルの安定化に関与するといわれている(J Cell Sci 2002;115:3957)。我々は Akt 蛋白が periplakin と結合しており、siRNA を用いて periplakin の発現を抑制すると、Akt 活性が低下することを明らかにした。さらにこれが、サイクリン A によって活性化された転写因子 SP1 が periplakin の転写を促進していることを証明した(J Cell Mol Med. 2009 Jul 6)。これらの結果はサイクリン A が内膜癌に対する新規の治療標的となりうる可能性を示す。そこで我々は抗サイクリン A 活性を有する薬剤の開発を試みた。サイクリン A は細胞表面ではなく核内で作用する分子であるので、抗体による創薬は困難であることが予想された。またサイクリン A 自体を分子標的とした場合、サイクリン A 自体に酵素活性はないとされているので、ドラッグデザインが困難と考えられた。

これらから、細胞質と核孔を通じて核内に到達する薬型として低分子化合物に注目し、さらにその機能としてサイクリン A の転写抑制に焦点をあてた。この条件を満たす低分子化合物を同定するために、まず、サイクリン A プロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を有する reporter plasmid への組み込み(pGL4/CCA2/Neo)これを

cyclin A高発現内膜癌Ishikawa細胞へ導入した。この細胞を用いて約1万種のHigh throughputの低分子化合物薬剤ライブラリーをスクリーニングした結果、サイクリンA発現阻害活性を有する分子量約300kDの化合物を新たに同定した。この化合物を子宮内膜癌細胞に添加したところ、サイクリンA転写抑制と細胞増殖抑制効果が認められた。この結果はこの化合物が子宮内膜癌に対する有望なリード化合物であることを示すものであり、全く新しい分子標的薬の道を開くものとして非常に大きな可能性を有することを示している。

2. 研究の目的

これらの背景から、本研究では下の3つを大きな目標とした。

- 1) 新たに同定した化合物のさらなる機能の評価
- 2) この化合物の抗腫瘍能の分子機序の解明：
- 3) この化合物の構造改変による新規化合物の合成

3. 研究方法

上記の目的 1) ~ 3) を達成するために以下の研究を行う。

- 1) この化合物の抗腫瘍能と抗癌剤感受性に対する作用および毒性を *in vitro* およびマウスを用いた実験系にて包括的に検討する。サイクリン A は乳がんや大腸癌でも予後因子であるので、婦人科腫瘍のみならず全身の種々の癌種での効果を評価する
- 2) この新規化合物の機序はサイクリン A の抑制を通じて細胞増殖を抑制することしか判明しておらず、アポトーシス誘導能なども含めた抗腫瘍機能に関する詳細な分子機序は未だ不明である。本研究ではこの抗腫瘍作用の分子機序をさらに明らかにするために、この化合物の標的分子を同定するとともに、その下流の分子機序を明らかにする。

3) この化合物の標的分子の構造解析を基盤として、この化合物の改良のためのドラッグデザインを行い、これに基づき構造修飾・改変を行い、さらに優れた化合物を開発する。

4. 研究成果

- 1) この化合物 X を種々の子宮内膜癌細胞、卵巣癌細胞、乳癌細胞に添加したところ、 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 、72時間で最大94%のサイクリンA転写抑制と93%の細胞増殖抑制効果が認められた。また、この化合物を内膜癌細胞にCDDPとともに添加したところ、CDDPへの増感作用がみられた。さらにこの抗腫瘍作用をマウスを用いた *in vivo* の系で検討した結果、マウス皮下に接種した子宮内膜癌細胞および卵巣癌細胞の増殖を0.5mg/kg/週 の4週間の腹腔内投与で最大約67%抑制した。またほぼ同様の抗腫瘍効果薬剤の皮下注射でも観察された。増殖抑制効果は癌種を問わず観察され、抗腫瘍効果は腫瘍細胞のサイクリンAの発現量と相関していた。
- 2) この化合物投与後にはアポトーシス細胞の増加が確認され、caspaseをはじめとするアポトーシス関連因子の発現が増進していた。
- 3) この化合物Xの構造式自体は既知であるので、特許申請のためには構造の改変が必要である。このため、この化合物Xの改良を試みた。そのためには化合物Xのリガンドの同定が必要であるため、FGビーズ法（多摩川精機）により抽出した内膜癌細胞の蛋白液中のリガンドをクロマトグラフィにより解析したところ新たに転写因子prohibitinを同定した。このことは新たな薬剤開発のための有効な情報であると考えられた。

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 7件)

1. Ke H, Suzuki A, Miyamoto T, Kashima H, Shiozawa T. 4-hydroxy estrogen induces DNA damage on codon 130/131 of PTEN in endometrial carcinoma cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2015; 400: 71-7. doi: 10.1016/j.mce.2014.10.027.(査読有)
2. Yamada Y, Miyamoto T, Horiuchi A, Ohya A, Shiozawa T. Polypoid endometriosis of the ovary mimicking ovarian carcinoma dissemination: a case report and literature review. *J Obstet Gynaecol Res.* 2014; 40: 1426-30. doi: 10.1111/jog.12358.(査読有)
3. Miyamoto T, Tachibana R, Kobara H, Takano T, Kato H, Shimizu A, Ohya A, Uehara T, Shiozawa T. Recurrent low-grade endometrial stromal sarcoma with intracaval and intracardiac tumor thrombus: diagnosis, treatment, and surgical management. *International Cancer Conference Journal* 2014; 3; 1-7 DOI: 10.1007/s13691-013-0134-6(査読有)
4. Utsuno H, Miyamoto T, Oka K, Shiozawa T. Morphological alterations in protamine-deficient spermatozoa. *Hum Reprod.* 2014; 29: 2374-81. doi: 10.1093/humrep/deu225.(査読有)
5. Clonality analysis suggests that STK11 gene mutations are involved in progression of lobular endocervical glandular hyperplasia (LEGH) to minimal deviation adenocarcinoma (MDA).
Takatsu A, Miyamoto T, Fuseya C, Suzuki A, Kashima H, Horiuchi A, Ishii K, Shiozawa T.
Virchows Arch. 2013 Jun;462(6):645-51. doi: 10.1007/s00428-013-1417-1.(査読有)
6. Lipocalin2 enhances the matrix metalloproteinase-9 activity and invasion of extravillous trophoblasts under hypoxia.
Kobara H, Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Yamada Y, Ishikawa K, Kikuchi N, Ohira S, Shiozawa T.
Placenta. 2013 Nov;34(11):1036-43. doi: 10.1016/j.placenta.2013.08.004.(査読有)
7. Immunohistochemical expression of core 2 β1,6-N-acetylglucosaminyl transferase 1 (C2GnT1) in endometrioid-type endometrial carcinoma: a novel potential prognostic factor.
Miyamoto T, Suzuki A, Asaka R, Ishikawa K, Yamada Y, Kobara H, Nakayama J, Shiozawa T.
Histopathology. 2013 Jun;62(7):986-93. doi: 10.1111/his.12107.(査読有)

〔学会発表〕(計 1件)

1. 安藤大史, 宮本 強, 山田 靖, 鈴木 昭久, 浅香亮一, 石川香織, 小原久典, 塩沢丹里 卵巣明細胞癌発生に關与する新規候補遺伝子の機能的スクリーニング 第72回日本癌学会学術総会 2013.10.03~2013.10.05 パシフィコ横浜(横浜)〔図書〕(計 0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩沢 丹里 (SHIOZAWA, Tanri)
信州大学・学術研究院医学系・教授
研究者番号：20235493

(2) 研究分担者

鈴木 昭久 (SUZUKI, Akihisa)
信州大学・医学部附属病院・特任研究員
研究者番号：10547095
(H25)

浅香 亮一 (ASAKA, Ryoichi)
信州大学・医学部附属病院・助教 (特定雇用)
研究者番号：00623688

安藤 大史 (ANDO, Hirofumi)
信州大学・医学部附属病院・助教 (診療)
研究者番号：80722925
(H26 H27)