

SAFB 顆粒形成阻害を標的とした新規作用機序を介した温熱増感剤の開発

岡山大学 学術研究院ヘルスシステム統合科学学域

渡邊 和則

1. はじめに

がん治療法の1つにハイパーサーミアがある。ハイパーサーミアは腫瘍部位を加温することでがん細胞を細胞死に誘導し、治療を行う方法である。そのため、ハイパーサーミアは手術よりも低侵襲で、化学療法よりも副作用が小さいなどの特徴がある。しかし、ハイパーサーミアは、細胞が熱に曝された時に示す熱応答により治療効果が低減してしまうという課題がある。そのため、近年ではハイパーサーミアと化学療法を併用することで、低容量でそれぞれ単独の治療法よりも高い治療効果を上げることが報告されている。例えば、抗がん剤であるシスプラチンとハイパーサーミアを併用することで高い治療効果を示すことが報告されている。このように、ハイパーサーミアの治療効果を増強する化合物（主に抗がん剤）を温熱増感剤と呼ばれている。しかしながら、化学療法は多少なりとも副作用を伴うため、併用療法でも副作用が現れてしまい、併用療法のデメリットとなっている。また、基礎研究及び臨床研究段階だが、熱応答の1つである HSP70 や HSP90 の阻害剤を併用することで熱による細胞死誘導効率が高まることが報告されているが、通常培養温度で細胞毒性が観察されること、熱による細胞死誘導効率に改善の余地など課題がある⁽¹⁾。

我々は、熱応答の1つである核内ストレス顆粒の形成に着目し、研究を進めている。これまでに、核内ストレス顆粒の構成タンパク質である SAFB 顆粒の形成を膜イオンチャネルタンパク質 TRPV1 のアンタゴニストで抑制することで、熱により細胞死する細胞数が増加することを発見している（図 1 A, B）⁽²⁾。このことから、TRPV1 アンタゴニストを温熱増感剤として用いることでハイパーサーミアの治療効果を改善することが期待される。しかしながら、TRPV1 アンタゴニストを用いた熱による細胞死誘導効率は、まだまだ改善の余地がある。

2. 新規 SAFB 顆粒形成抑制剤の探索と課題

私は、SAFB 顆粒の形成を効率よく抑制し、熱による細胞死誘導効率が高まる新規薬剤の探索を進めている。現在、大阪大学創薬サイエンス研究支援拠点から化合物ライブラリーの提供を受け、スクリーニングした結果、子宮頸がん細胞において SAFB 顆粒の形成を抑制し、熱による細胞死誘導効率が高いヒット化合物を同定した（投稿準備中）。ヒット化合物は、通常培養温度ではあまり細胞死を誘導せず、熱により高い細胞死誘導効率を示すことを明らかにした。また、ヒット化合物はハイパーサーミアと併用される抗がん剤、5-フルオロウラシル、シスプラチンよりも高い効果を示すことも明らかにした。このことから、ヒット化合物はハイパーサーミアで治療していない時には不要な副作用を示さず、ハイパーサーミア治療時に高い治療効果を示す温熱増感剤候補になると考えている。しかしながら、ヒット化合物の生物学的特

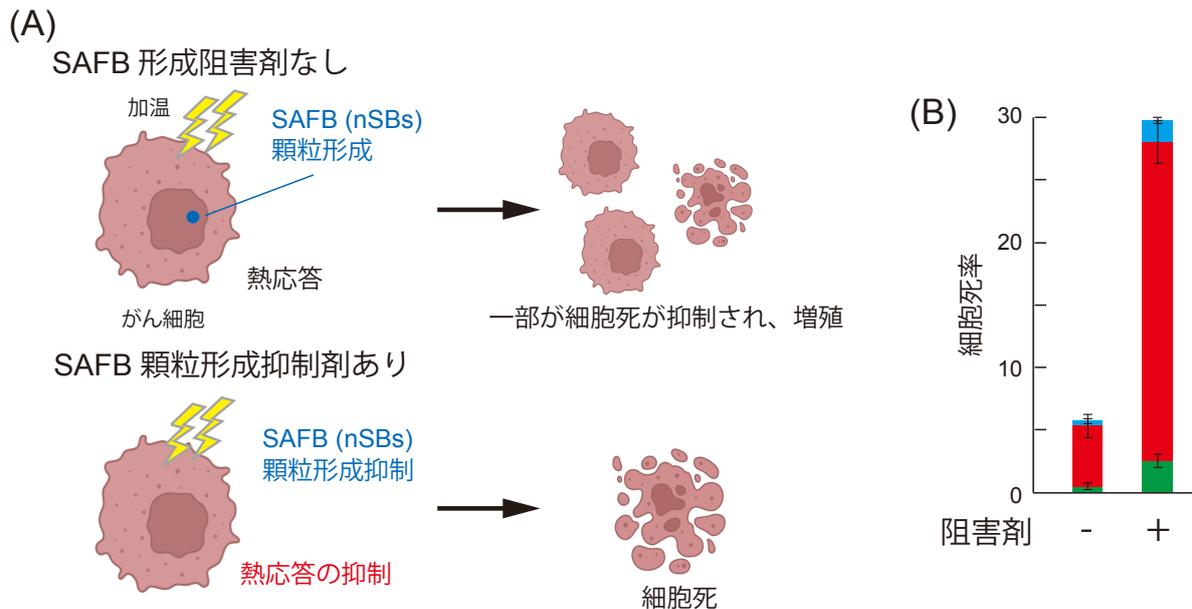


図 1 SAFB 顆粒形成抑制剤存在下での細胞死誘導

SAFB 顆粒阻害剤による細胞死誘導機構(A)と阻害剤存在下での細胞死誘導効率(B)。緑はアポトーシス前期、赤はアポトーシス後期、青は細胞死の割合を示している。

性は明らかになっておらず、*in vivo* での効果も検証されていない。また、ヒット化合物による細胞死誘導効率は既存の SAFB 顆粒形成抑制剤よりも改善されてはいるが、まだまだ改善の余地がある。

そこで本研究では、2つの課題に取り組んだ。1つ目はヒット化合物の生物学的特性を明らかにし、*in vivo* での効果を検証することを目的とした。2つ目は、ヒット化合物よりも SAFB 顆粒の形成を抑制し、細胞死誘導効率が高いリード化合物を開発するためにまず、リード化合物の骨格構造（リード骨格）の同定を試みた。

3. ヒット化合物の生物学的特性の同定

ハイパーサーミアの特徴として、さまざまながん細胞に適応可能な点が挙げられる。一方で、ヒット化合物が熱による細胞死誘導効率を増強させる知見は子宮頸がん細胞でのみ得られている。そこで、ヒット化合物がさまざまながん細胞にも適応可能であることを明らかにすることで、ヒット化合物とハイパーサーミアの併用でさまざまながんに適応可能か示すことができると考えた。そこで、膵臓がん細胞や肝がん細胞、肺がん細胞に対してヒット化合物が熱による細胞死誘導効率を高めるのか検証した。その結果、全ての細胞において、ヒット化合物が熱による細胞死誘導効率を高めることが明らかになった。また、ヒット化合物は全てのがん細胞において 5-フルオロウラシルよりも高い細胞死誘導効率を示した。さらに、肝がん細胞、肺がん細胞ではシスプラチンよりも高い細胞誘導効率を示し、膵臓がん細胞ではシスプラチンと同程度の細胞死誘導効率を示した。一方で、良性細胞でも細胞死をわずかに誘導してしまうことも明らかになった。

次に、それぞれのがん細胞に対するヒット化合物の half-maximal growth inhibitory concentration (GI₅₀)の同定を行った。その結果、熱ストレス下でのヒット化合物の GI₅₀ は数 μM

程度であることが明らかになった。また通常培養条件下での GI₅₀ を測定することで、The thermal enhancement ratio (TER)を同定した。TERはハイパーサーミアを組み合わせた際の化学療法の増強を定量化するための指標で、1よりも大きい値が示されればハイパーサーミアを組み合わせることで化学療法の効果が増強されたことを示す⁽³⁾。TERを計算したところ、ヒット化合物のそれぞれのがん細胞に対するTERは1.5~12であった。このことから、ハイパーサーミアと併用することでヒット化合物の効果が増強されていることが明らかになった。

ヒット化合物は通常培養条件下でも高濃度になると細胞増殖を抑制するが、細胞死誘導効率は低い。また、ハイパーサーミアの効果を増強する抗がん剤は、細胞周期の停止を誘導することが多い⁽⁴⁾。このことから、ヒット化合物は通常培養条件下で細胞周期の停止を誘導することで細胞増殖を抑制していると考えた。そこでヒット化合物による細胞周期への影響を検証した結果、予想外なことに細胞周期への影響がないことが明らかになった。このことから、ヒット化合物による細胞増殖の抑制は細胞周期に影響を与えず、細胞の倍加時間(ダブリングタイム)に影響を与えていることが示唆された。

4. *In vivo*におけるヒット化合物を用いたハイパーサーミアの増強の検証

*In vivo*において、ヒット化合物がハイパーサーミアによる抗腫瘍効果を増強するのか検証した。その結果、ヒット化合物を導入したマウスは、未処理のマウスよりもわずかな抗腫瘍効果と延命効果が観察された。また、ハイパーサーミア処理したマウスはヒット化合物を導入したマウスよりも高い抗腫瘍効果を示し、延命効果も観察された。ヒット化合物を導入し、ハイパーサーミア処理を行ったマウスは、ハイパーサーミア処理のみ行ったマウスよりも高い抗腫瘍効果を示し、延命効果も観察された。一方で、ヒット化合物やハイパーサーミア処理による臓器への影響はなく、体重の増減もなかったことからヒット化合物は重篤な副作用はないことが示唆された。このことから、ヒット化合物は単独でも抗腫瘍効果があり、ハイパーサーミアと併用することで高い抗腫瘍効果を示すことが明らかになった。このことから、ヒット化合物はハイパーサーミア効果を増強する温熱増感剤であることが示唆された。

5. 温熱増感剤として重要なリード骨格の同定

ヒット化合物よりも SAFB 顆粒の形成を抑制し、細胞死誘導効率が低いリード化合物を開発するために次の課題に取り組んだ。ヒット化合物は大きく分けて、構造 A、構造 B (リンカー)、構造 C で構成されている (図 2)。また、SAFB 顆粒の形成を抑制すると、熱による細胞増殖抑制が増強される。そこでまず、ヒット化合物の構造をベースに、熱による細胞増殖抑制を大きく増強するために重要な化学構造 (リード骨格) の同定を試みた。

様々な化合物が登録されている Pubchem には、市販されているヒット化合物の類縁化合物が登録されてい

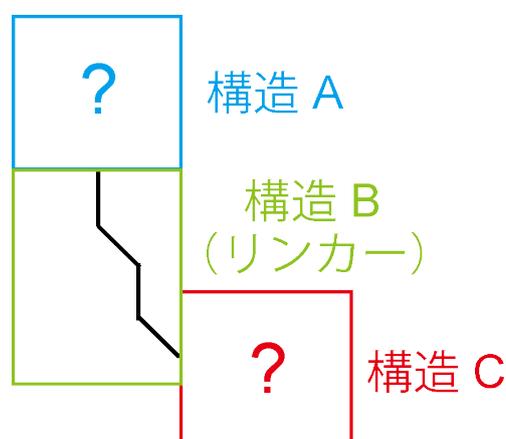


図 2 ヒット化合物の化学構造

る。また、構造 A、構造 C、構造 A-B などの化合物も市販されている。そこで、リード骨格を明らかにするために、市販されているヒット化合物の類縁化合物を用いて、熱による細胞増殖抑制が大きく増強されるリード骨格の同定を試みた。これまでに、構造 A、構造 C だけでは熱による細胞増殖の抑制は増強されないことが明らかになりつつある。また、構造 A-B をもつ化合物により熱による細胞増殖抑制の増強が起こったが、ヒット化合物による細胞増殖抑制の増強には劣ることが明らかになりつつある。さらに、構造 C を嵩高い化学構造に変更した構造 A-B-嵩高い構造 C を持つ化合物は、ヒット化合物よりも細胞増殖の抑制が増強されることも明らかになりつつある。このことから、リード骨格として構造 A-B が重要で、構造 C は細胞増殖抑制の効果に関与していることが示唆されつつある。

5. まとめ

本研究では、SAFB 顆粒の形成を抑制することで、熱による細胞死誘導効率が増強されるヒット化合物の生物学的特性を明らかにした。また、*in vivo* においてハイパーサーミアとヒット化合物を併用することで高い抗腫瘍効果が観察された。このことから、ヒット化合物はハイパーサーミアの効果を増強する温熱増感剤候補であることが示唆された。

また、ヒット化合物よりもより効果の高いリード化合物の開発を行うにあたり、リード骨格の同定を試みた。その結果、リード骨格として、構造 A-B が重要で、構造 C は増殖抑制への効果に関与していることが示唆されつつある。今後は、より詳細なリード骨格を同定したのち、有機合成によりリード化合物の開発へと発展させていく必要がある。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団天野工業技術研究所から多大なご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- 1) Lianne E.M. Vriend, Nathalie van den Tempe, Arlene L. Oei, Mike L'Acosta1, Frederique J. Pieterse1, Nicolaas A.P. Franken, Roland Kanaar and Przemek M. Krawczyk, "Boosting the effects of hyperthermia-based anticancer treatments by HSP90 inhibition" *Oncotarget*, 8, 97490-97503 (2017)
- 2) Kazunori Watanabe, Takashi Ohtsuki, "Inhibition of HSF1 and SAFB Granule Formation Enhances Apoptosis Induced by Heat Stress" *Int J Mol Sci* 22, 4982 (2021)
- 3) G Los, P Sminia, J Wondergem, P H Mutsaers, J Havemen, D ten Bokkel Huinink, O Smals, D Gonzalez-Gonzalez, J G McVie, "Optimisation of intraperitoneal cisplatin therapy with regional hyperthermia in rats" *Eur J Cancer* 27, 472-477 (1991)
- 4) Venkatramreddy Velma, Shaloam R Dasari, Paul B Tchounwou, "Low Doses of Cisplatin Induce Gene Alterations, Cell Cycle Arrest, and Apoptosis in Human Promyelocytic Leukemia Cells" *Biomark Insights* 11, 113-121 (2016)