

# 増殖抑制と薬剤抵抗性改善作用をもつ 大腸がん治療薬



岐阜薬科大学  
生命薬学大講座 生化学研究室  
五十里 彰

## 日本におけるがんデータ

がんによる死亡者数：37.4万人（2018年）

大腸がんが女性で最多（男女計で第2位）

がんの医療費：4.5兆円（2018年）← 全体の14.4%

抗がん剤市場：1.2兆円 → 2025年には1.5兆円（予測）

平成30年 厚生労働省 人口動態調査  
国立がんセンターがん対策情報センター  
富士経済

## 世界におけるがんデータ

がんの罹患数：1810万人（2018年）

大腸がんの患者数：180万人（2018年）

がんによる死亡者数：960万人（2018年）

がんの医療費：60兆円

# 大腸がんの薬物療法の変遷

1950

2000

5-FU  
(1957-)

5-FU+ロイコボリン  
(1980-)

イリノテカン  
(1994-)

オキサリプラチン  
(2002-)

ベバシズマブ (2004-)  
セツキシマブ (2004-)

パニツムマブ (2006-)

ラムシルマブ (2015-)

ペムブロリズマブ(2018-)

IFL療法

FOLFIRI療法

分子標的薬療法

免疫CP療法

臓器別治療

ゲノム医療

1. 既存の抗がん剤に対して低感受性のがん（難治がん）が存在する。

分子標的薬の治療対象となる大腸がん患者は約40%

2. 抗がん剤抵抗性（耐性）を改善する治療薬がない

P-糖タンパク質阻害剤：ゾスキダル

3. がんの再発を予防する薬がない

既存抗がん剤の感受性を回復・亢進させる薬剤が  
治療奏功率を向上させ、医療費の高騰を防ぐ。

# 治療抵抗性の獲得機序

1. 抗がん剤排出の増加

抗がん剤

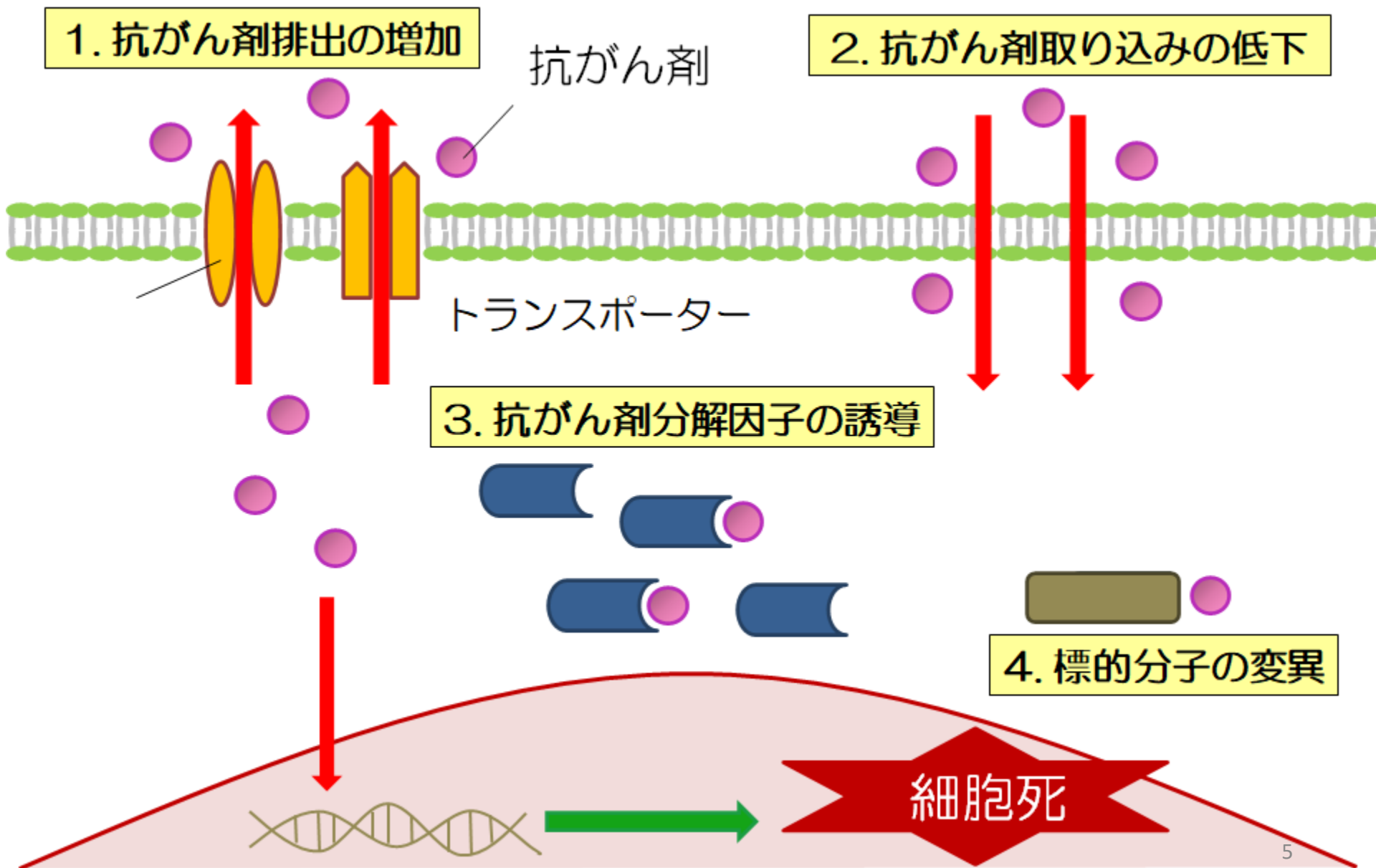
2. 抗がん剤取り込みの低下

トランスポーター

3. 抗がん剤分解因子の誘導

4. 標的分子の変異

細胞死



# がん微小環境の形成による 治療抵抗性の獲得

酸素

栄養素

抗がん剤

低酸素度の亢進

低栄養度の亢進

抗がん剤濃度の低下

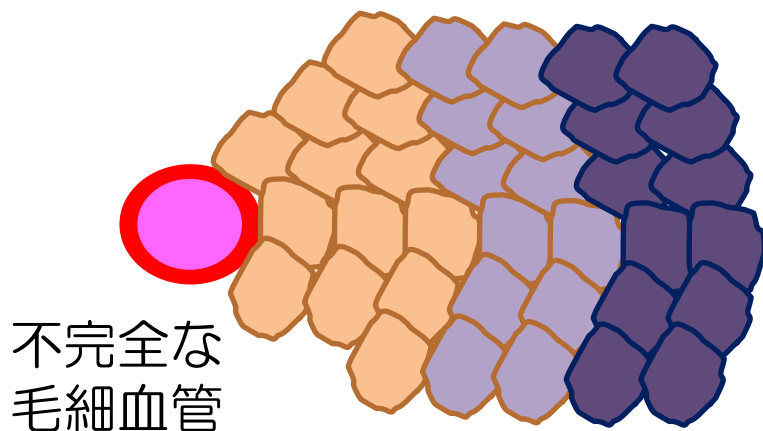


微小環境内部のがん細胞は

- ✓ ストレス環境により薬剤抵抗性が高い
- ✓ 親水性薬剤の透過性が低い
- ✓ 高分子量の薬剤の透過性が低い



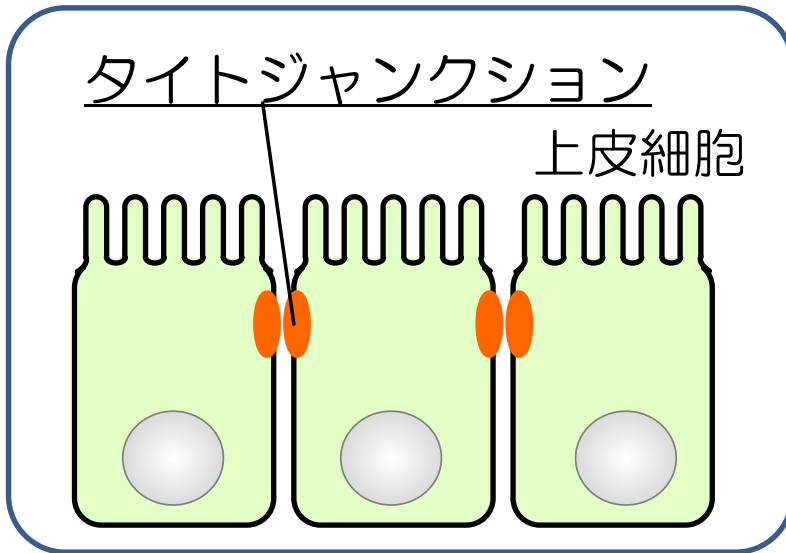
新たな標的分子と薬剤の開発<sup>6</sup>



不完全な  
毛細血管

がん微小環境

# クローディン (CLDN) の特徴



## タイトジャンクションの構成因子

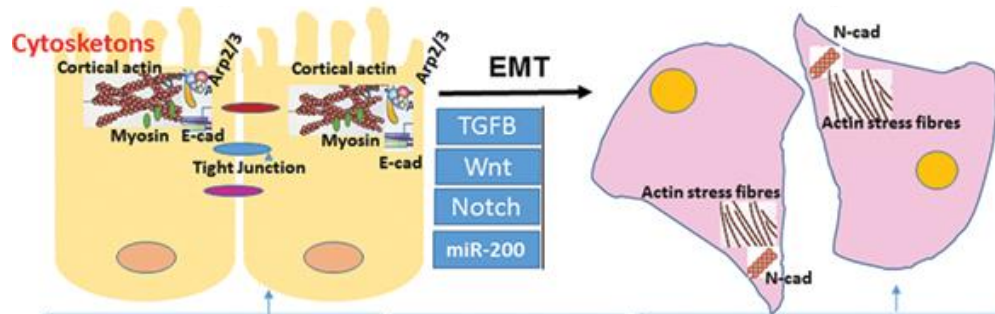
- CLDN1~27
- オクルディン

## タイトジャンクションの役割

- 細胞増殖の制御
- 分化の制御
- 細胞間透過性の制御

上皮系

間様系



細胞間接着構造の消失による上皮間葉転換 (EMT) が、増殖・浸潤・転移能の獲得に重要である。

Zhang X *et al.*, Cytoskeleton (2017)

### Epithelial markers

E-cadherin  
Claudins  
Occludins  
Desmoplakin  
Mucin-1  
Cytokeratin-8, -9, -18

### Transcription Factors

Snail  
Zeb1/2  
Slug  
bHLH  
Twist1/2

### Mesenchymal markers

Fibronectin  
FSP1  
Vitronectin  
Vimentin  
Smooth-muscle actin  
FGFR2 IIIb and IIIc specice variants

CLDNの発現は低下するのか？

# がん組織におけるCLDNサブタイプの異常発現

## 多くの固形がん組織でCLDNsが高発現する

CLDNs	組織
CLDN1	大腸、胃、前立腺、 肝臓、膵臓
CLDN2	大腸、肝臓、食道
CLDN3	胃、肺、腎臓、 精巣、卵巣
CLDN4	腎臓、精巣、卵巣、肺、 胃、膵臓、甲状腺
CLDN5	肺、膵臓
CLDN6	胃

CLDNs	組織
CLDN7	胃、大腸、舌、卵巣 甲状腺、乳房、肝臓
CLDN9	胃
CLDN10	肝臓、肺
CLDN12	大腸
CLDN16	卵巣、乳房
CLDN18	肺、膵臓

Tabaries S *et al.*, Oncogene (2017)  
Ding L *et al.*, Canc. Manag. Res. (2013)

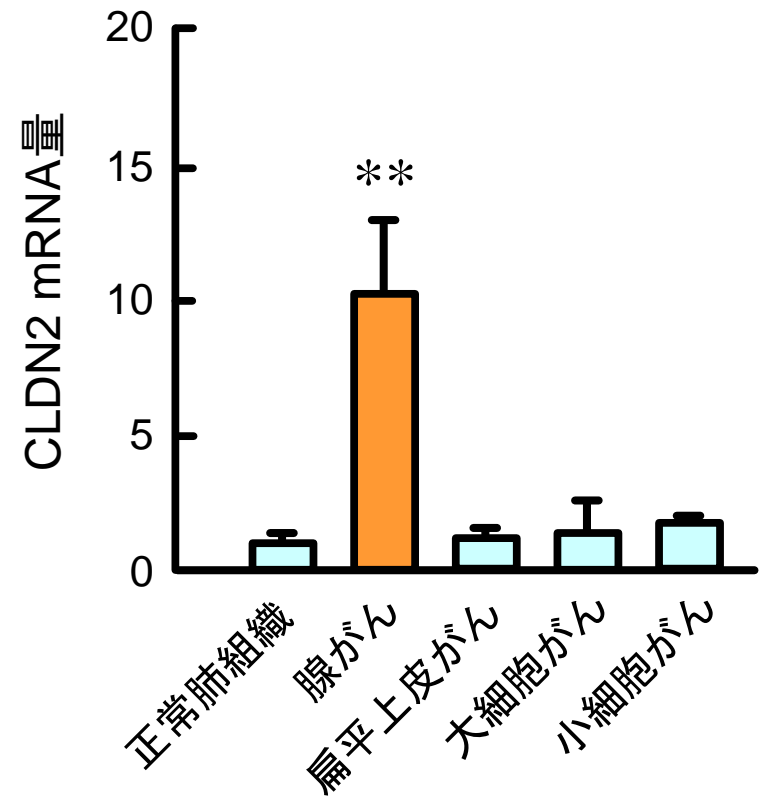
正常組織に未発現・低発現のCLDNサブタイプが高発現することにより、がん細胞のタイトジャンクションの機能を変化させる。



## Lung Cancer cDNA Array (OriGene 社)

		患者数
男性		59
女性		31
正常		12
がん種	ステージ	
腺がん	I	21
	II	8
	III	12
	IV	4
扁平上皮がん	I	11
	II	10
	III	4
	IV	1
大細胞がん	I	2
	II	1
	III	1
小細胞がん	I	1
	III	2

## リアルタイムPCR解析



肺腺がん細胞におけるCLDN2の発現を低下させ、抗がん剤抵抗性を改善する新しいタイプの抗がん剤を開発した。



発明の名称：抗がん剤抵抗性改善作用を有する

クローディン-2結合性低分子化合物の開発

出願番号：特願2020-18075

出願人：岐阜市

発明者：五十里 彰、松永 俊之

# がん組織におけるCLDNサブタイプの異常発現

## 多くの固形がん組織でCLDNsが高発現する

CLDNs	組織
CLDN1	大腸、胃、前立腺、 肝臓、膵臓
CLDN2	大腸、肝臓、食道
CLDN3	胃、肺、腎臓、 精巣、卵巣
CLDN4	腎臓、精巣、卵巣、肺、 胃、膵臓、甲状腺
CLDN5	肺、膵臓
CLDN6	胃

CLDNs	組織
CLDN7	胃、大腸、舌、卵巣 甲状腺、乳房、肝臓
CLDN9	胃
CLDN10	肝臓、肺
CLDN12	大腸
CLDN16	卵巣、乳房
CLDN18	肺、膵臓

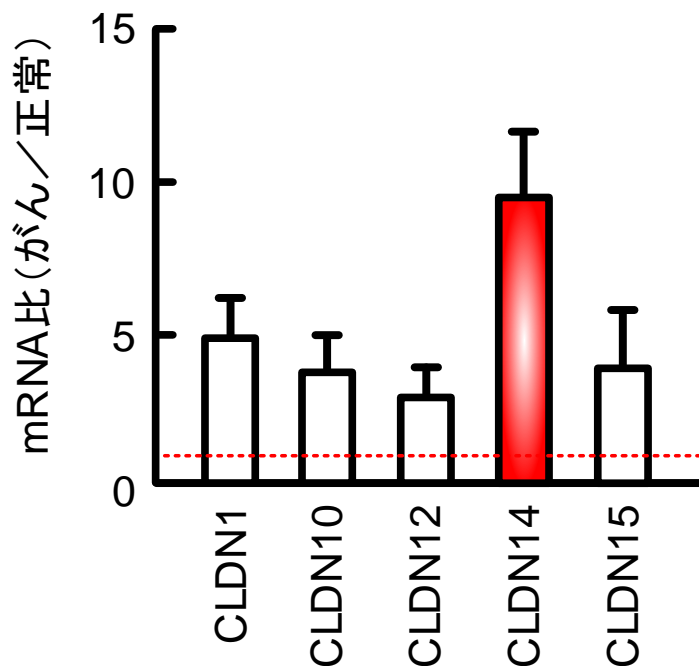
Tabaries S *et al.*, Oncogene (2017)  
Ding L *et al.*, Canc. Manag. Res. (2013)

各がん組織でCLDNサブタイプの発現パターンが異なる。

Lung Cancer cDNA Array (OriGene 社)

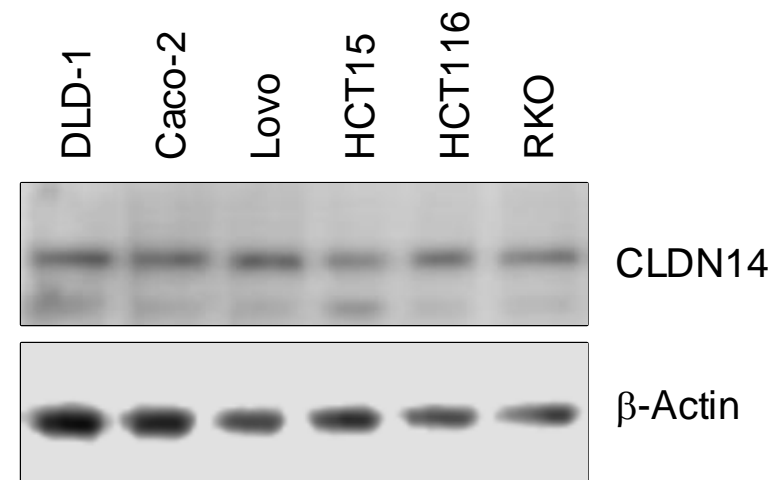
	人数
健常者	3
大腸がん患者	9

## リアルタイムPCR解析

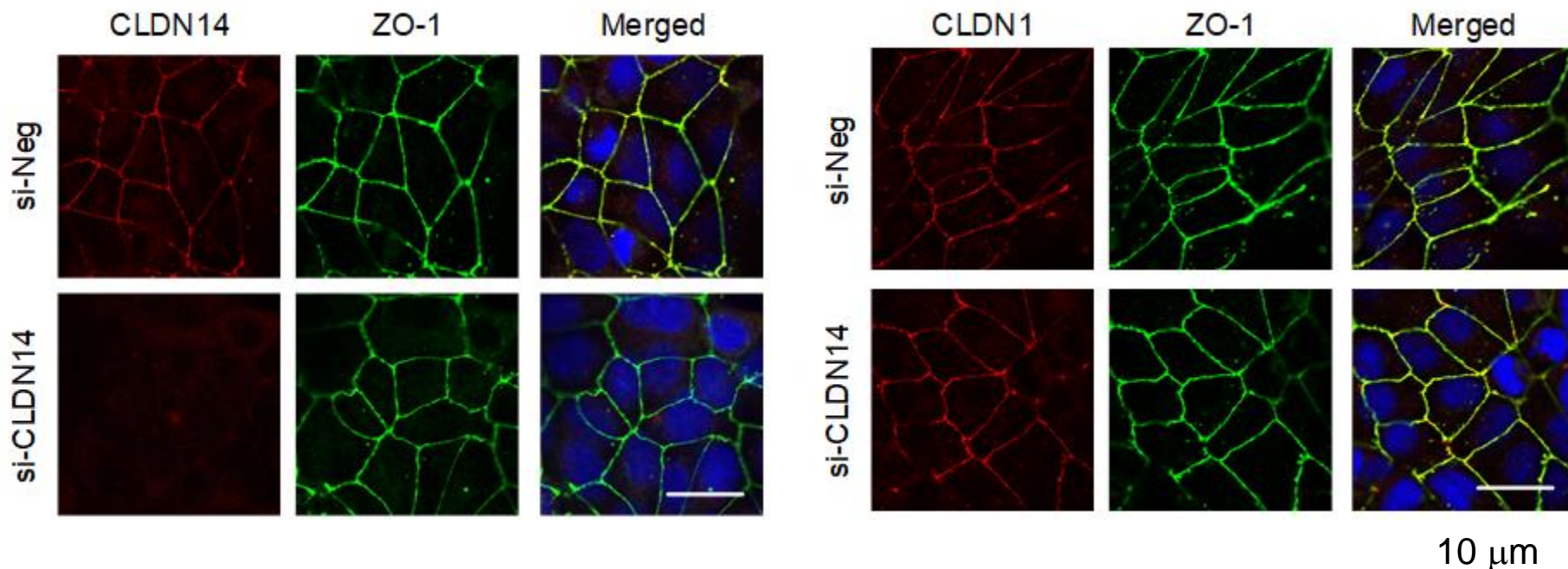


## ウェスタンブロット解析

ヒト大腸がん由来培養細胞

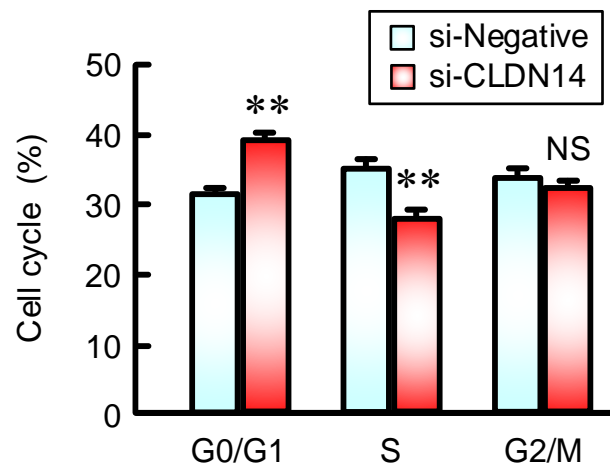
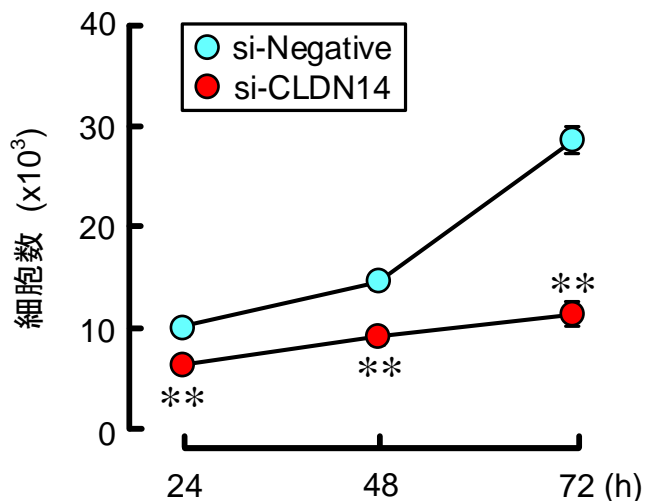


## 蛍光免疫染色解析

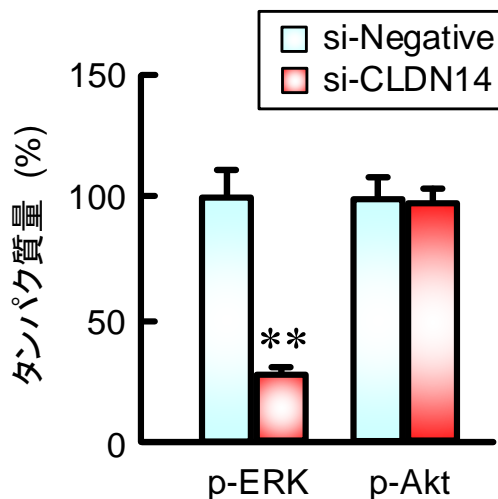
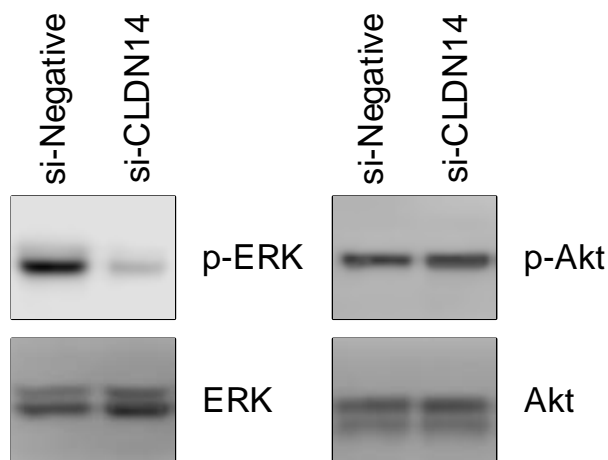


CLDN14は裏打ちタンパク質のZO-1とともに細胞の隣接部位に分布していた。CLDN14発現のノックダウンにより、CLDN1の細胞分布は変化しなかった。

## 細胞増殖に対するCLDN14ノックダウン (KD) の効果

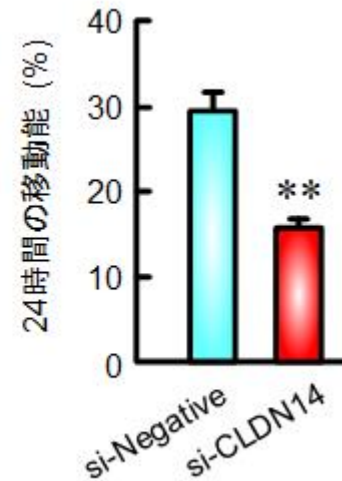
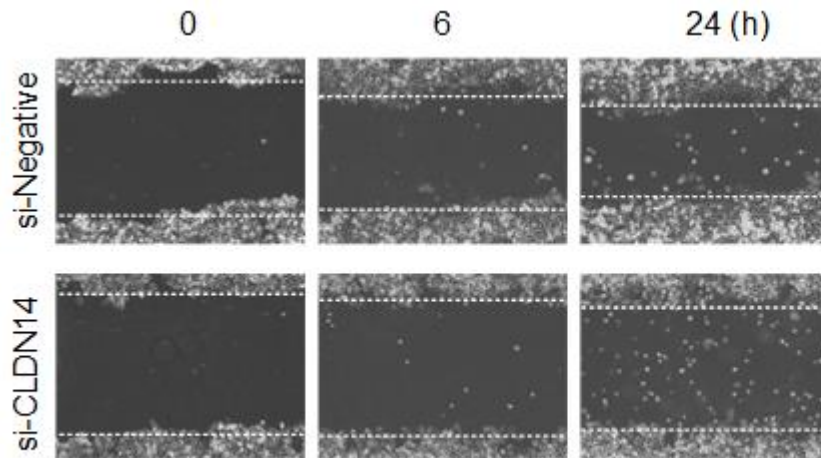


CLDN14KDは  
増殖能 down

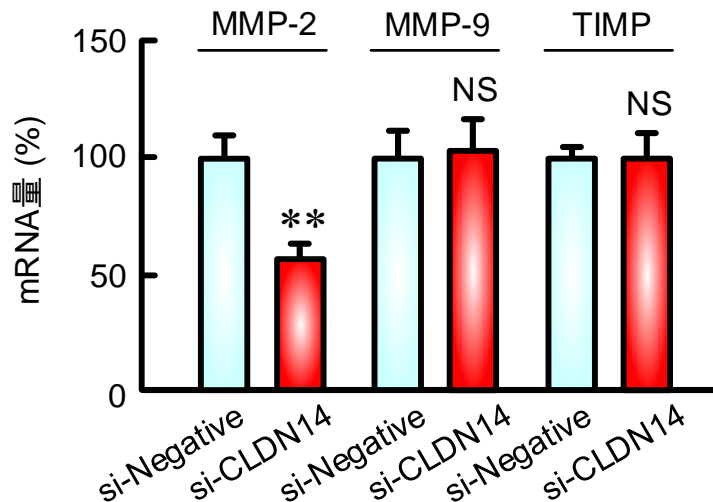


CLDN14KDは  
増殖シグナル down

## 細胞移動に対する CLDN14 KDの効果

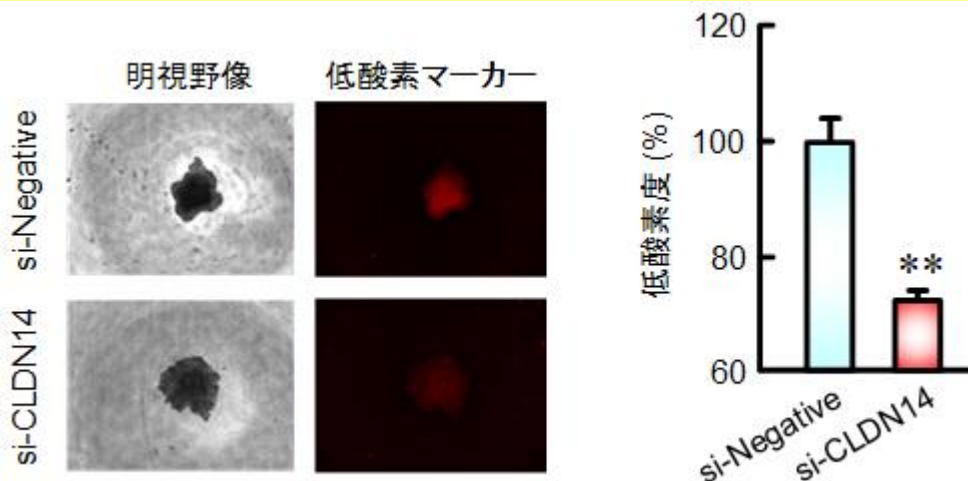


CLDN14KDは  
移動能 down



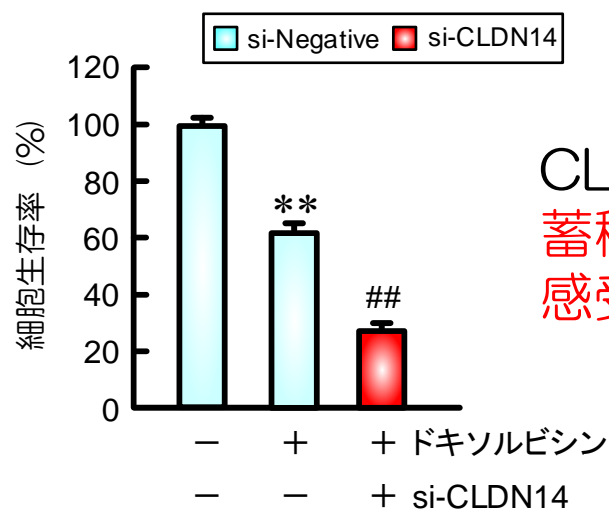
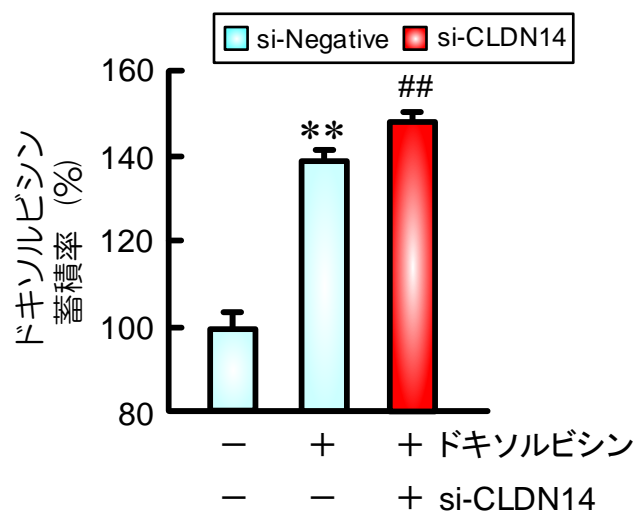
CLDN14KDは  
移動促進因子 down

## スフェロイドの低酸素ストレスに対する CLDN14 KD の効果



CLDN14KDは  
低酸素度 down

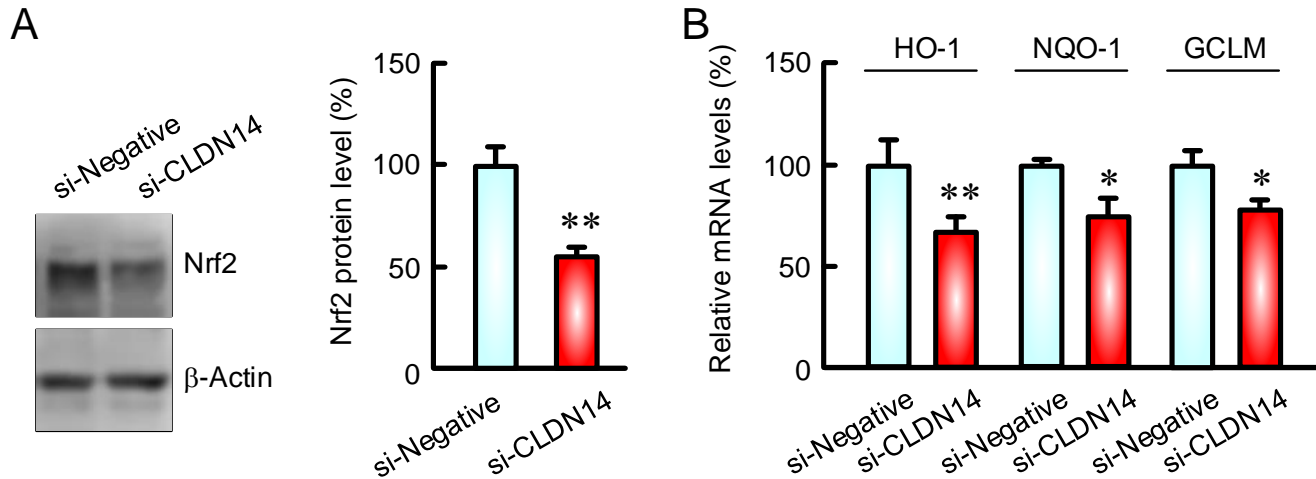
## スフェロイドの抗がん剤抵抗性に対する CLDN14 KD の効果



CLDN14KDは  
蓄積 up  
感受性 up

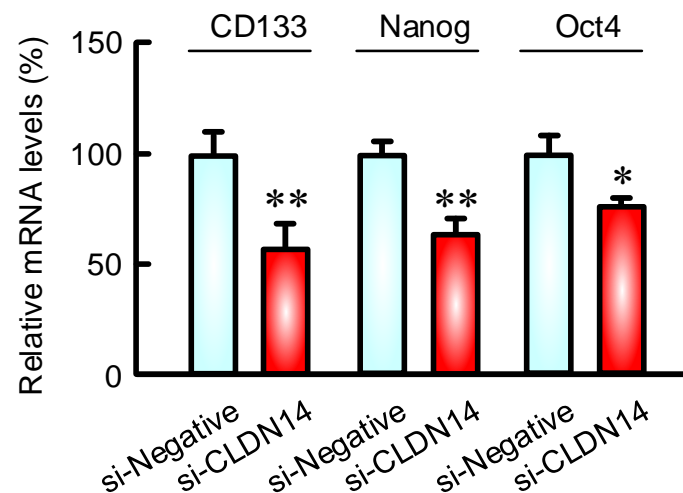
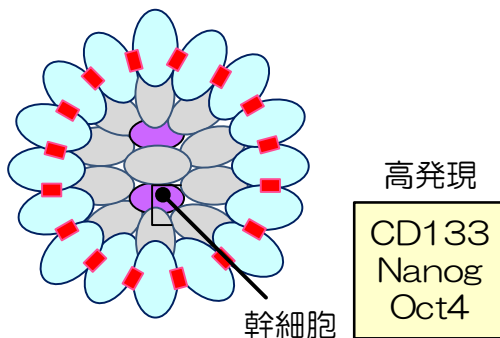


## ストレスシグナルに対する CLDN14 KDの効果

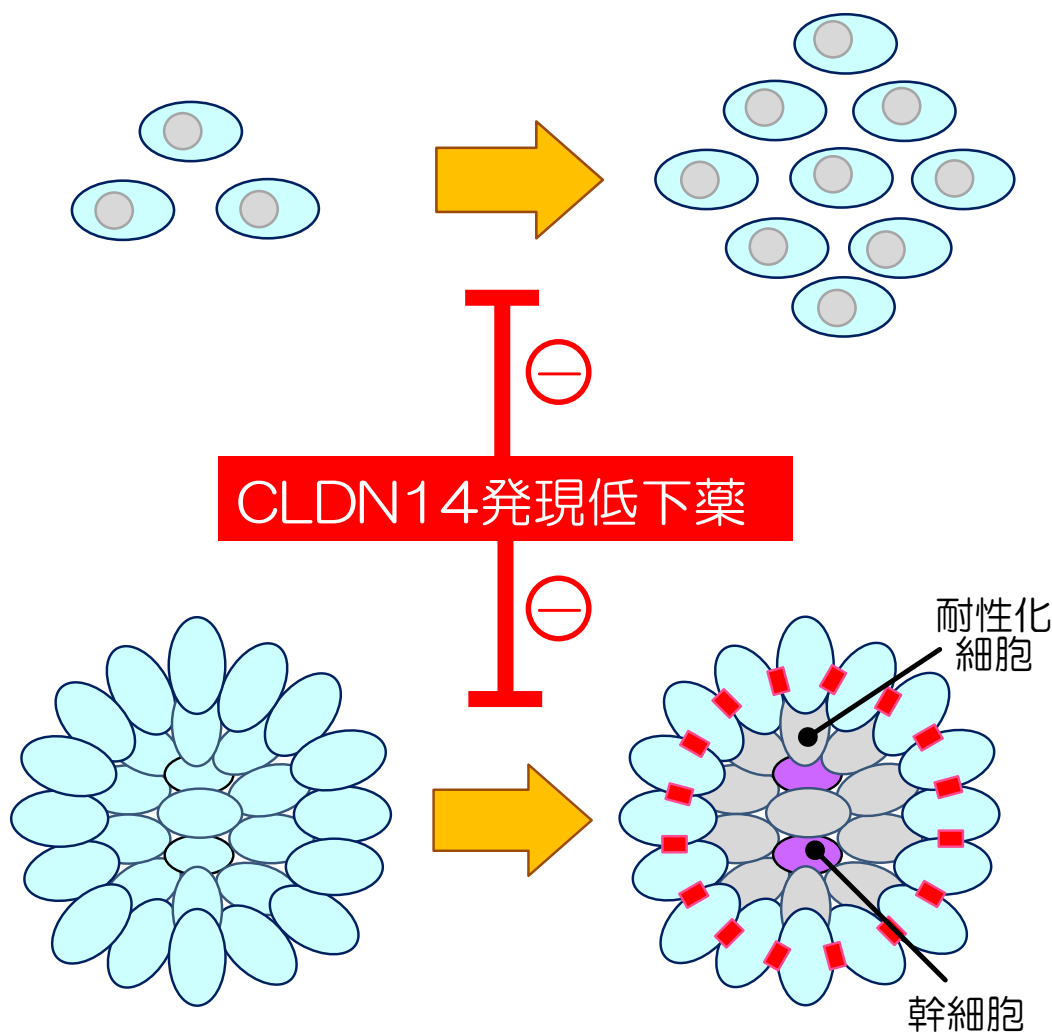


CLDN14KDは  
ストレス down

## 幹細胞の生存に対する CLDN14 KDの効果



CLDN14KDは  
幹細胞 down

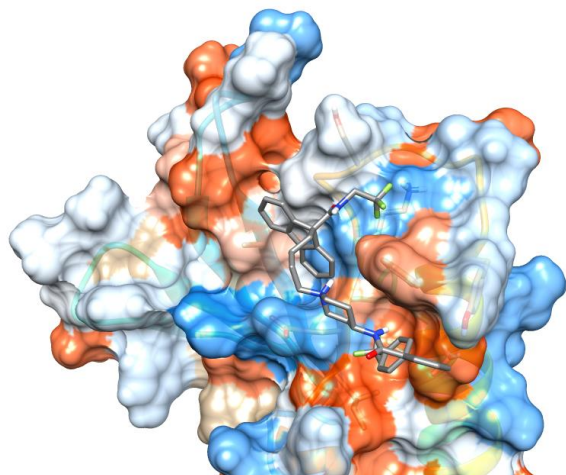


① 増殖細胞に対して、  
増殖・移動能の阻害

② 微小環境細胞に対して、  
抗がん剤耐性の改善  
がん再発の予防

しかし、CLDN14発現低下薬は国内外で未開発である。

## ドッキング シミュレーション

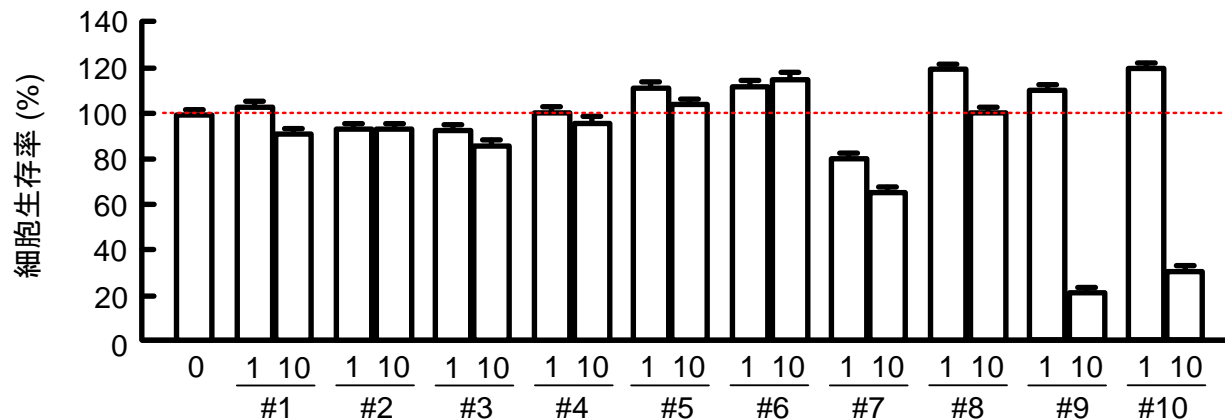


CLDN14ドッキングモデル

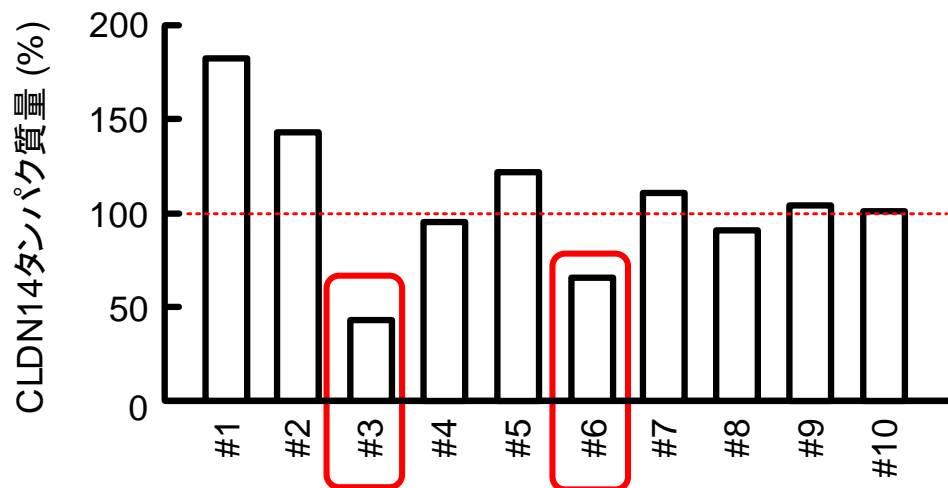


化合物の順位付け  
(e-Drug3D、約1,700個)

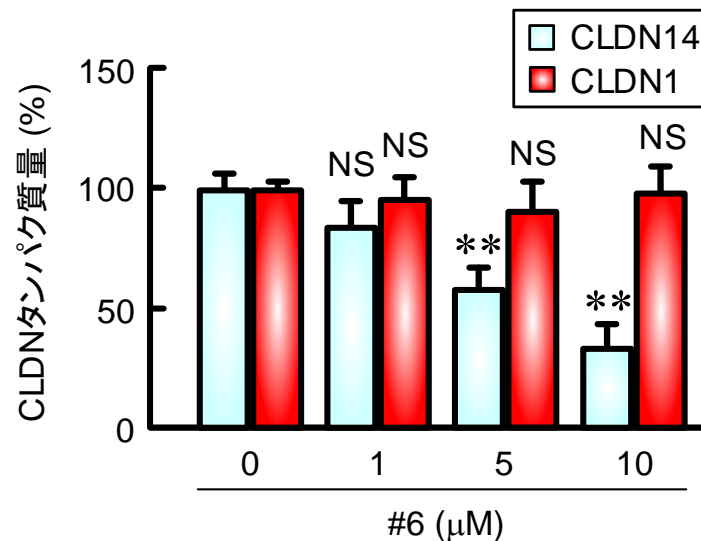
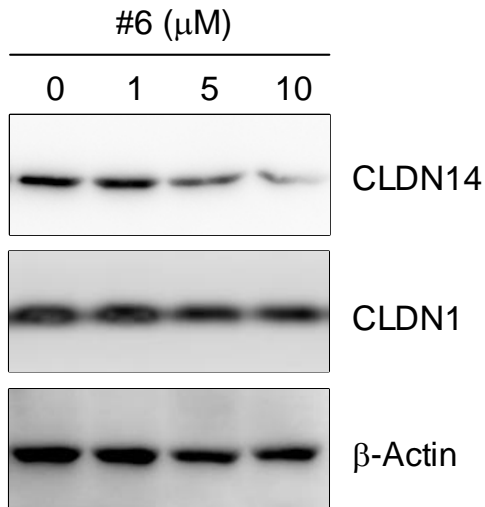
## 細胞毒性解析



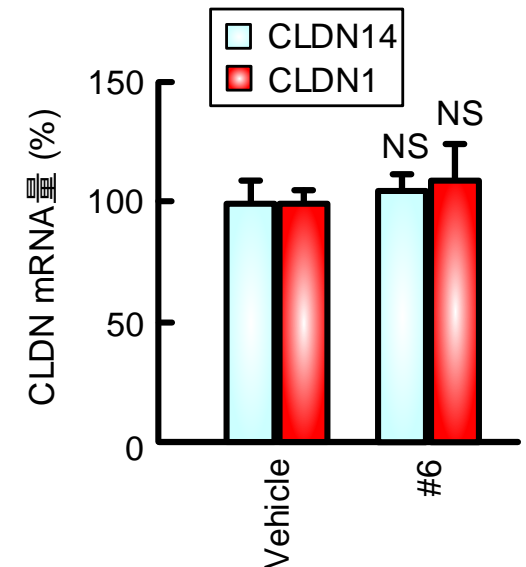
## ウェスタンブロット解析



## ウェスタンブロット解析

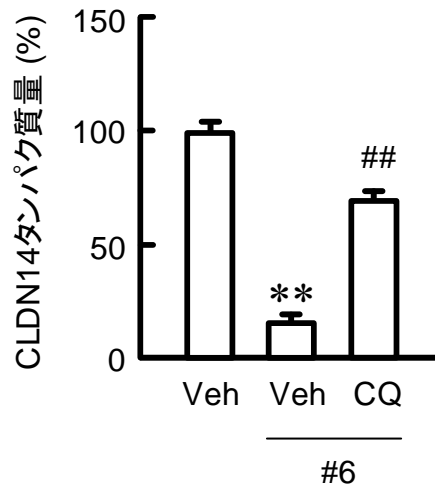
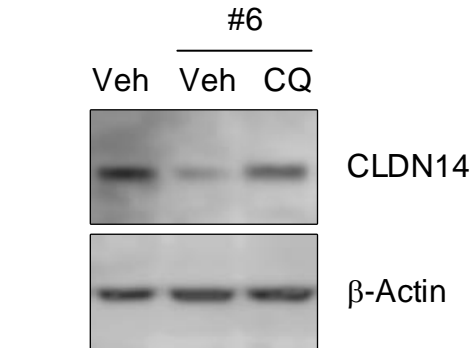


## リアルタイムPCR解析



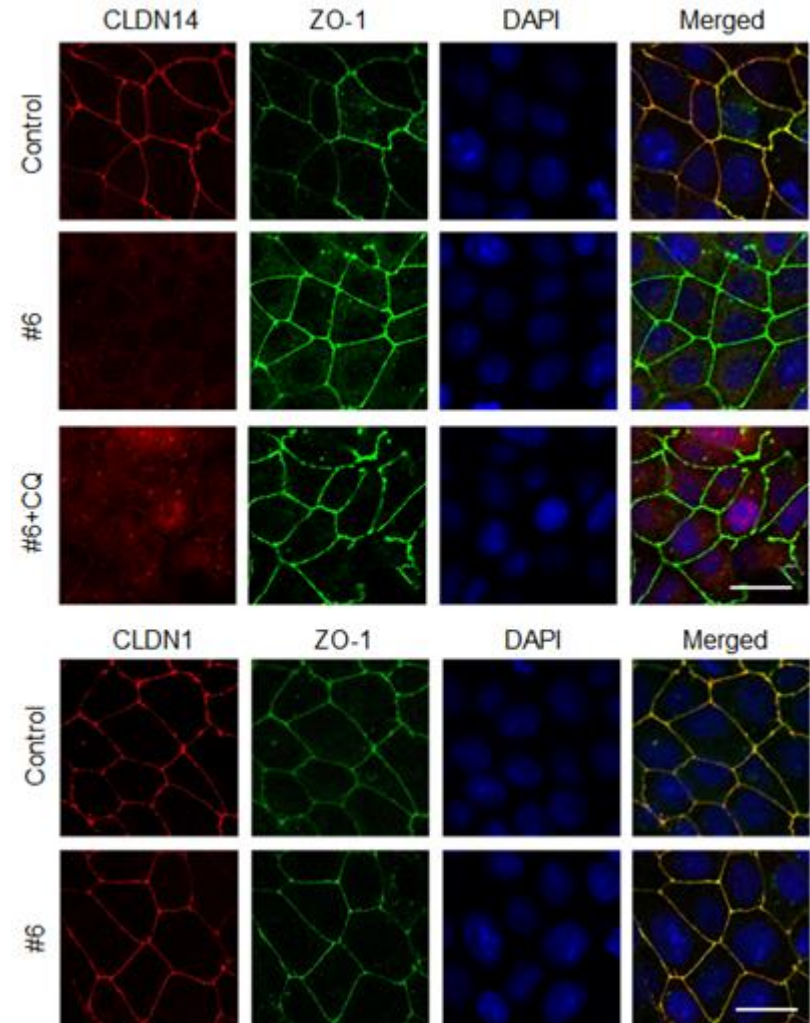
#6は、濃度依存的にCLDN14のタンパク質量を低下させたが、CLDN1は影響を受けなかった。また、mRNA量も変化しなかった。

## ウェスタンブロット解析



CQ: リソソーム阻害剤

## 蛍光免疫染色解析



#6はリソソームにおけるCLDN14の分解を促進した。

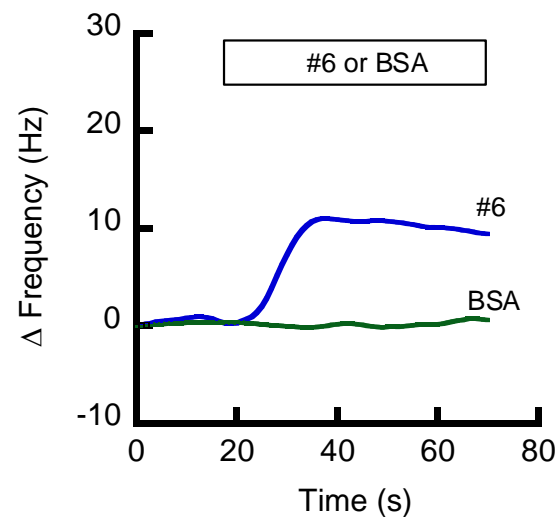
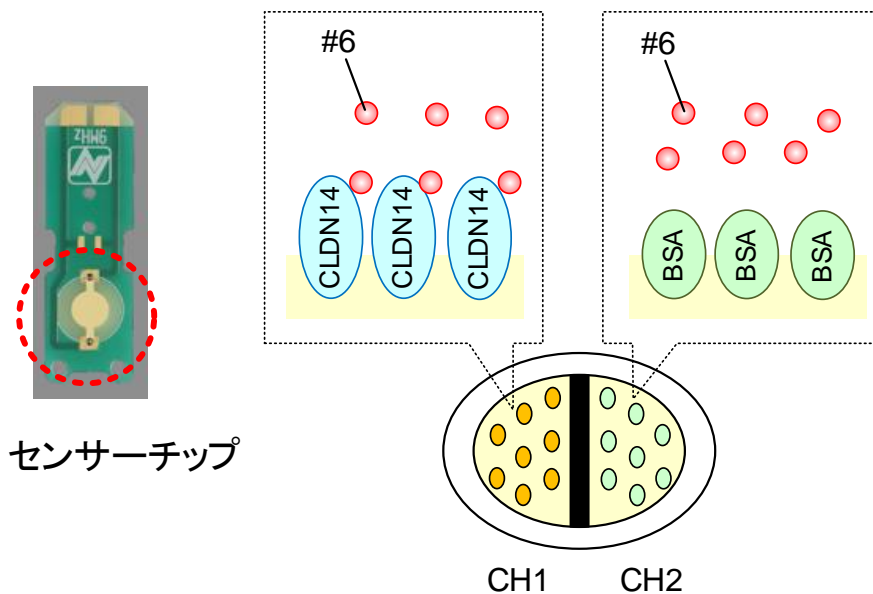
# CLDN14と#6の結合

## 水晶振動子マイクロバランス (QCM) 解析



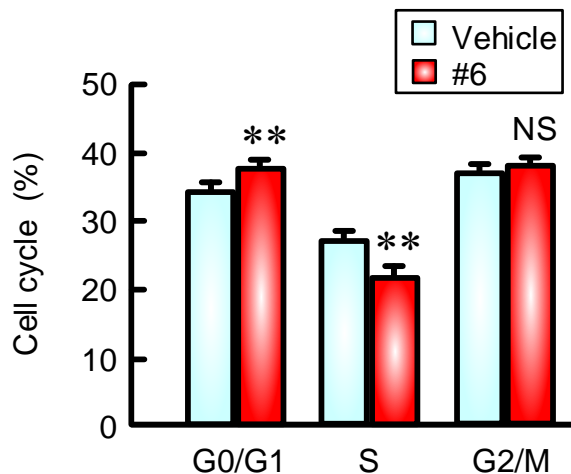
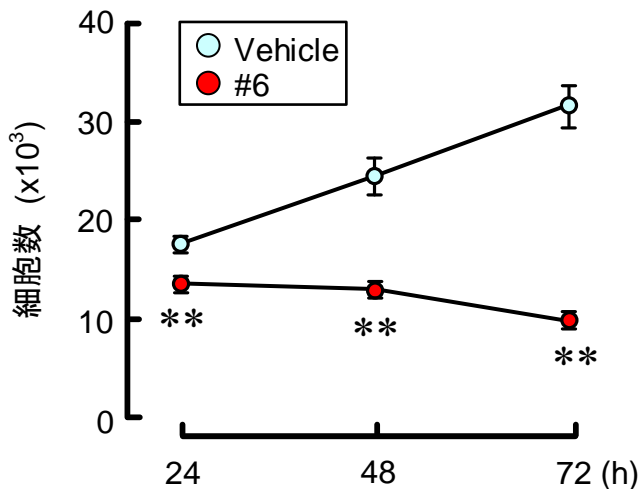
NAPiCOS  
日本電波工業

#6は  
CLDN14に結合

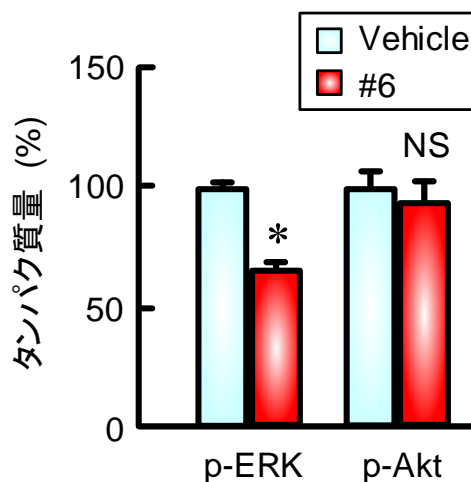
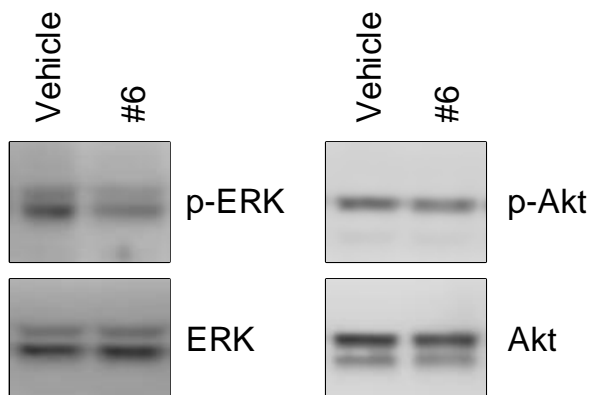


# #6の抗がん効果 ①

## 細胞増殖に対する#6の抑制効果

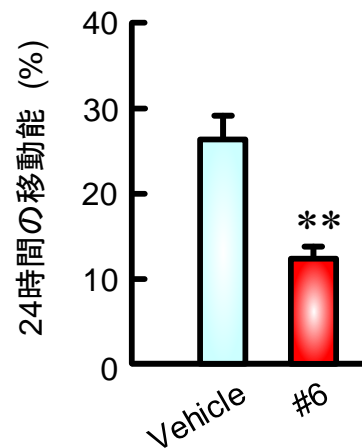
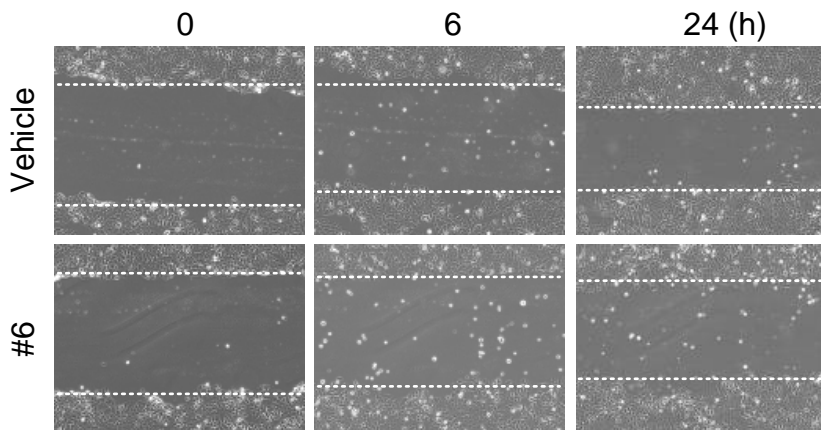


#6は  
増殖能 down

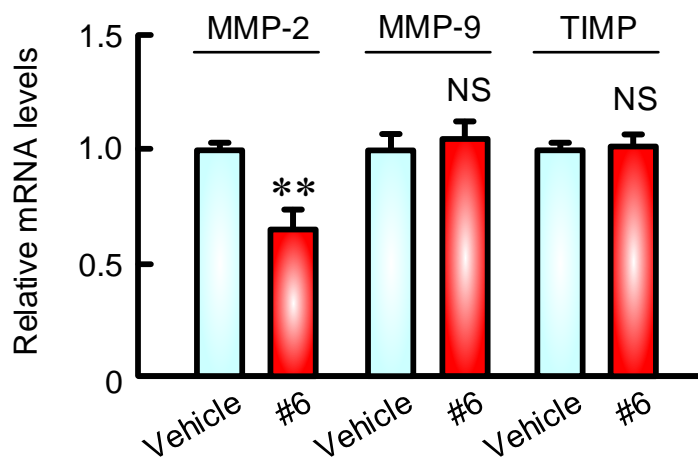


#6は  
増殖シグナル down

## 細胞移動に対する#6の抑制効果



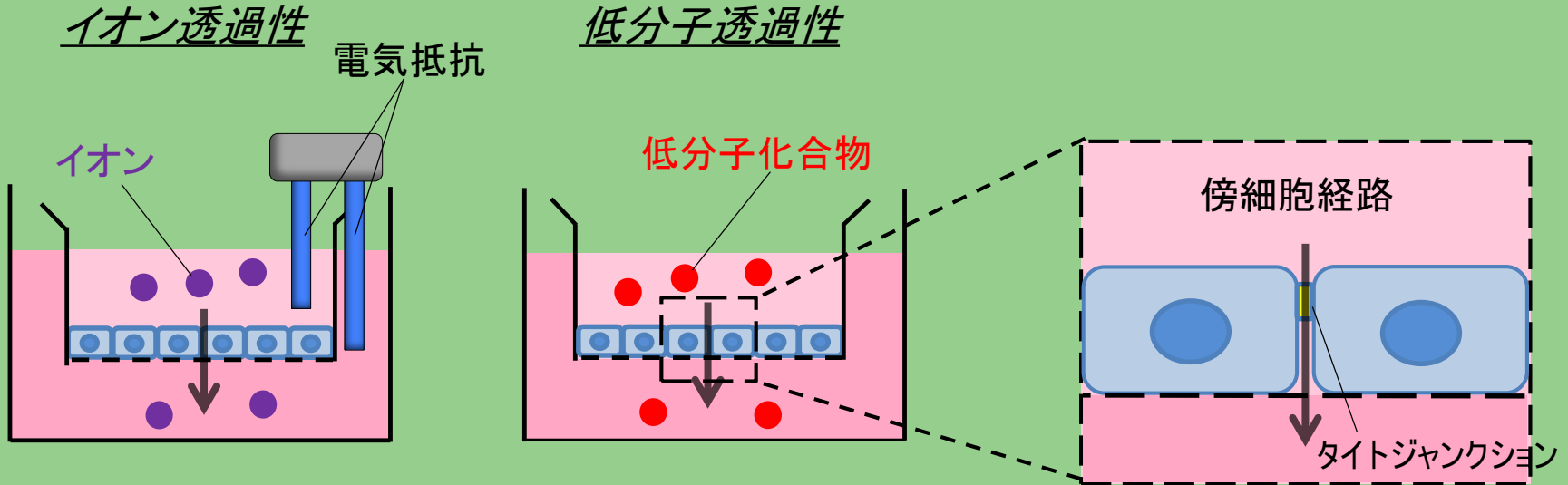
#6は  
移動能 down



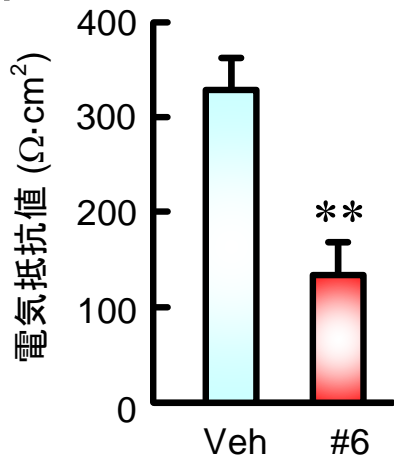
#6は  
移動促進因子 down



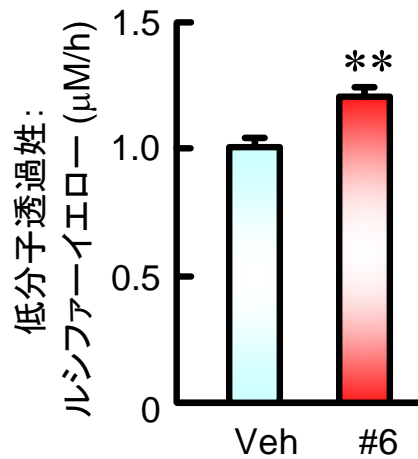
# 細胞間透過性に対する#6の効果



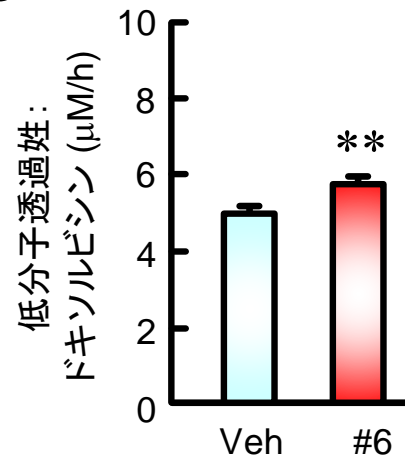
A



B

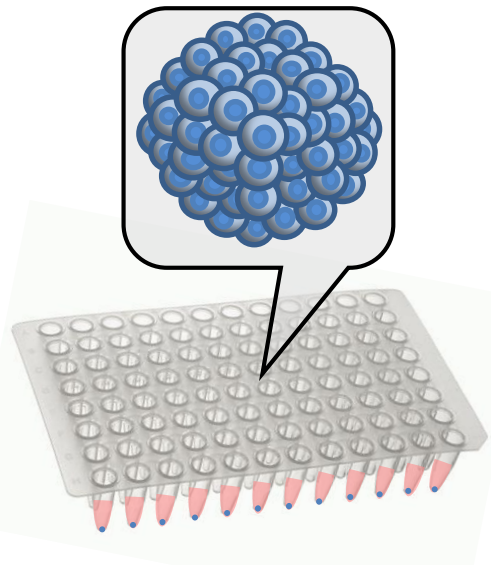


C

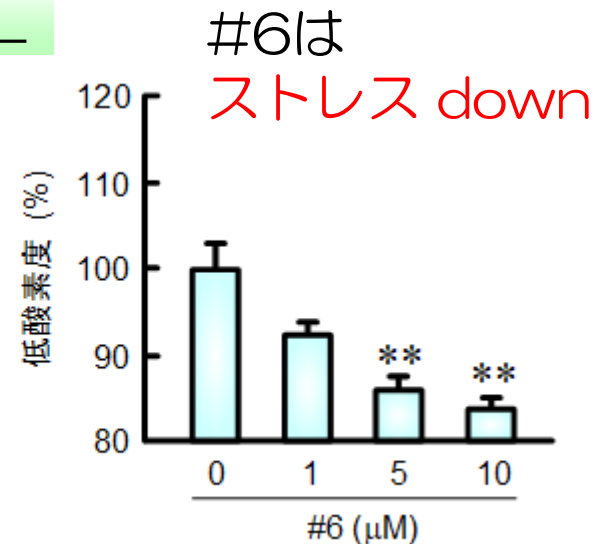
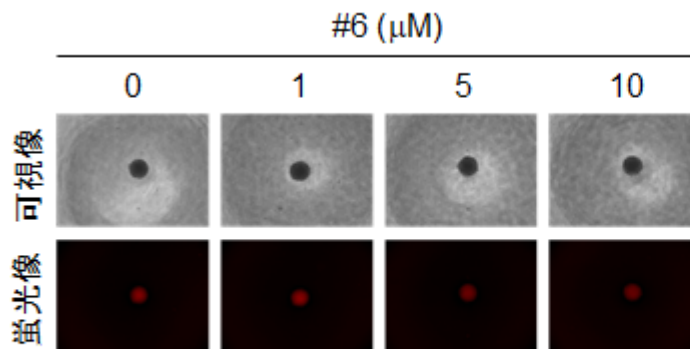


#6は  
電解質透過性 up  
低分子透過性 up

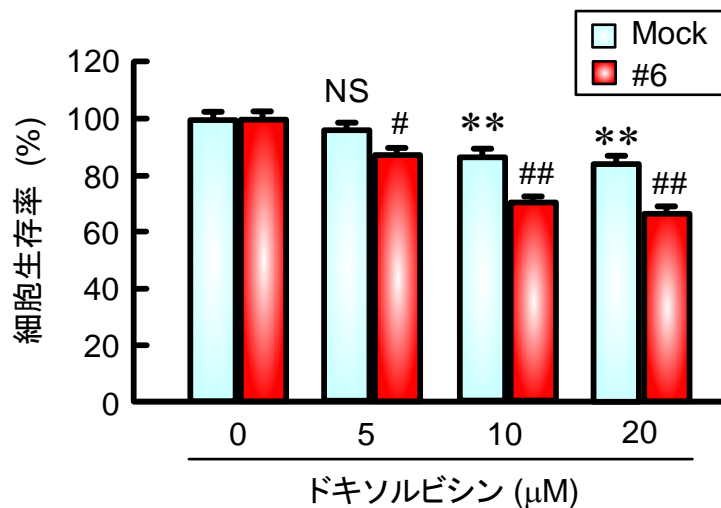
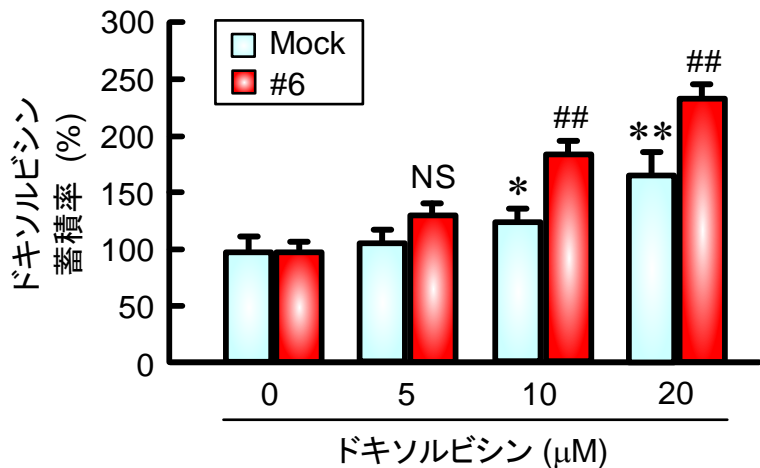
# 抗がん剤感受性に対する#6の効果 ①



## 低酸素ストレス (3D)



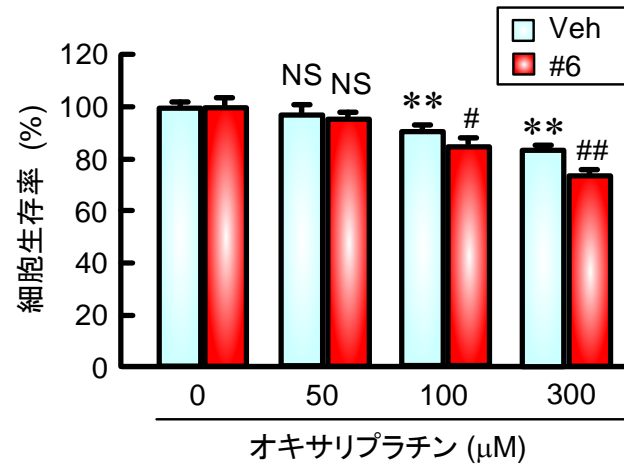
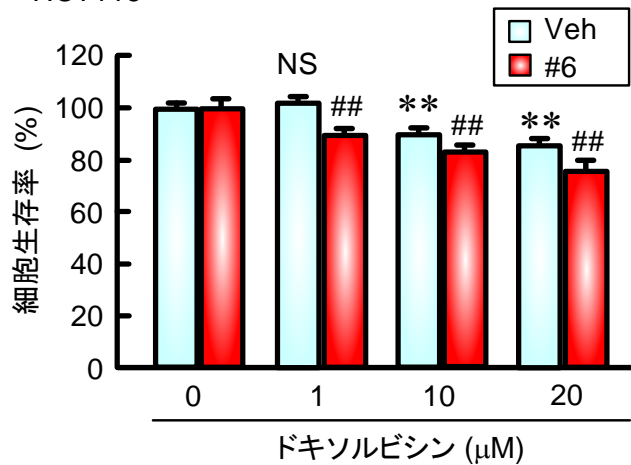
## 抗がん剤感受性 (3D)



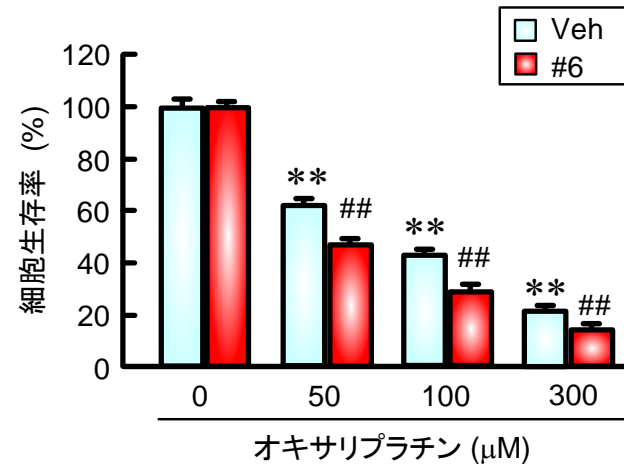
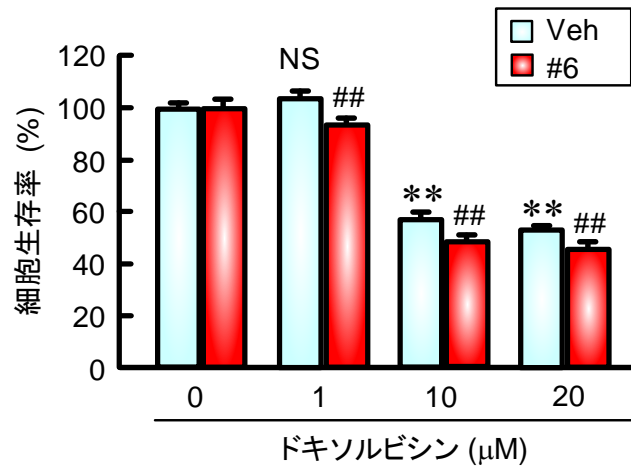
#6は  
蓄積量 up  
感受性 up

## 抗がん剤感受性 (3D)

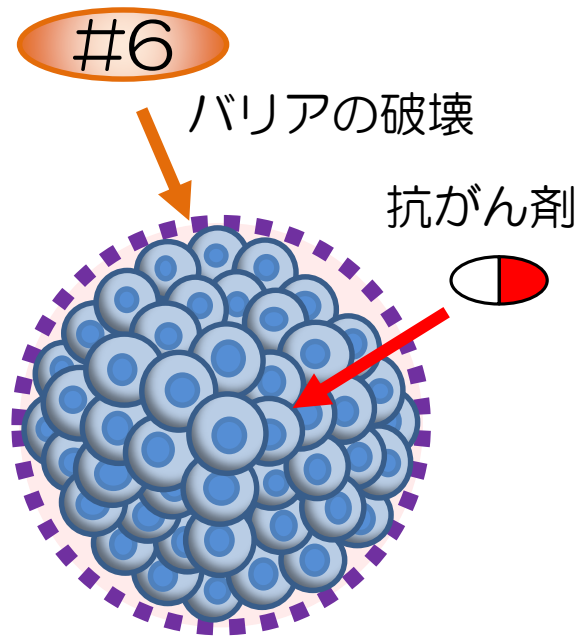
A HCT116



B Lovo



#6は  
感受性 up



効果

- ✓ 大腸がん細胞の増殖を抑制
- ✓ 大腸がん細胞の移動を抑制
- ✓ 抗がん剤感受性を亢進
- ✓ 幹細胞数を減少

#6は大腸がん細胞の増殖抑制と薬剤抵抗性改善作用をもつ新しいタイプの抗がん剤である。

抗体と比較して

- ✓ 化学合成が可能である
- ✓ 製造コストが安い
- ✓ 高い品質が保証される
- ✓ 免疫原性が低い
- ✓ 細胞間を通過しやすい

発明の名称：抗癌剤

出願番号：特願2021-043591

出願人：岐阜市

発明者：五十里 彰、松永 俊之

## CLDN14の高発現が原因となる疾患の治療薬としての利用

他臓器がんへの利用 → 肝臓がん治療薬

肝臓がん組織にCLDN14が高発現する。

Li CP *et al.*, *Carcinogenesis* 37, 557-566 (2016)

Ca<sup>2+</sup>ホメオスタシスとCLDN14の関係 → Ca<sup>2+</sup>再吸収の機能改善

副甲状腺機能低下症患者では、腎尿細管のCLDN14発現が増加し、Ca<sup>2+</sup>再吸収が抑制される。

Sato T *et al.*, *PNAS* 114, E3344-E3353 (2017)

遺伝性難聴とCLDN14の変異の関係 → 遺伝性難聴の病態解明

CLDN14をコードする遺伝子の変異は常染色体劣性難聴DFNB29の原因となる。

Wilcox ER *et al.*, *Cell* 104, 165-172 (2001)

岐阜薬科大学 生化学研究室

教授・五十里 彰

TEL: 058-230-8124

E-mail: ikari@gifu-pu.ac.jp

岐阜薬科大学 知的財産評価委員会事務局

TEL: 058-230-8100

FAX: 058-230-8105

E-mail: syomuk@gifu-pu.ac.jp

