

大腸がん微小環境の 抗がん剤抵抗性改善薬の開発



岐阜薬科大学 薬学部
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

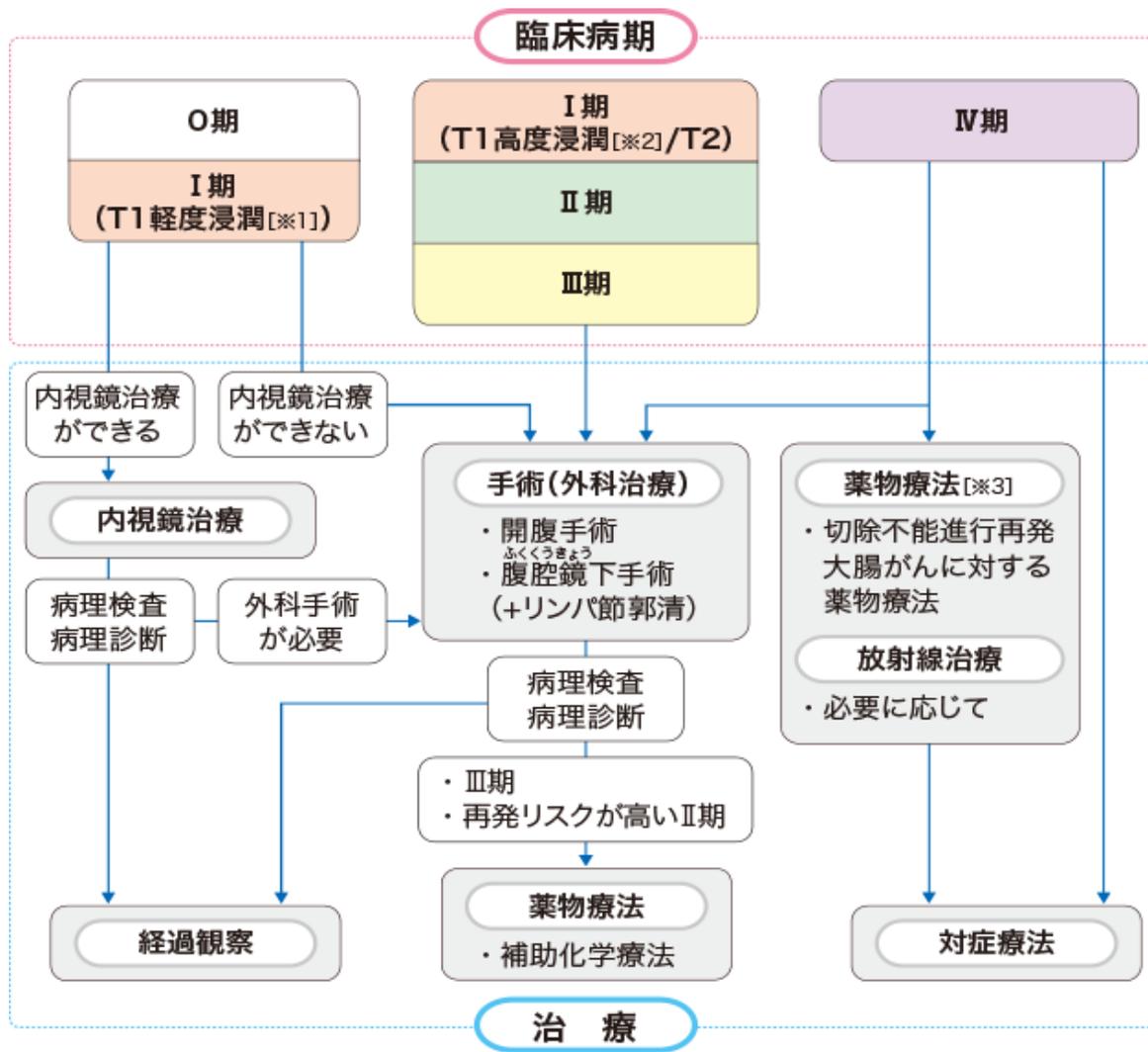
がんの罹患数：1810万人（2018年）

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

大腸がんの治療選択



※1 軽度浸潤：粘膜下層に1mm未満で広がっていること
 ※2 高度浸潤：粘膜下層に1mm以上広がっていること
 ※3 使用する薬を決めるために、薬物療法開始前にがんの遺伝子検査を行う

一次治療

FOLFOX*1 / CapOX*2 + ベバシズマブ

FOLFIRI*3 + ベバシズマブ

FOLFOX + セツキシマブ / パニツムマブ

FOLFIRI + セツキシマブ / パニツムマブ

5-FU + LV / カベシタビン + ベバシズマブ

FOLFOXIRI*4

*1 フォリン酸 + フルオロウラシル + オキサリプラチン

*2 カペシタビン + オキサリプラチン

*3 フォリン酸 + フルオロウラシル + イリノテカン

*4 フルオロウラシル + レボホリナート + オキサリプラチン + イリノテカン

1. 既存抗がん剤に対して低感受性がん（難治がん）が存在する
2. 分子標的薬の対象患者が限定される（大腸がんは約40%）
3. 抗がん剤に対して抵抗性（耐性）を獲得しやすい
4. 抗がん剤抵抗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
5. がんの再発を予防する薬がない

既存の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

2. 抗がん剤取り込みの低下

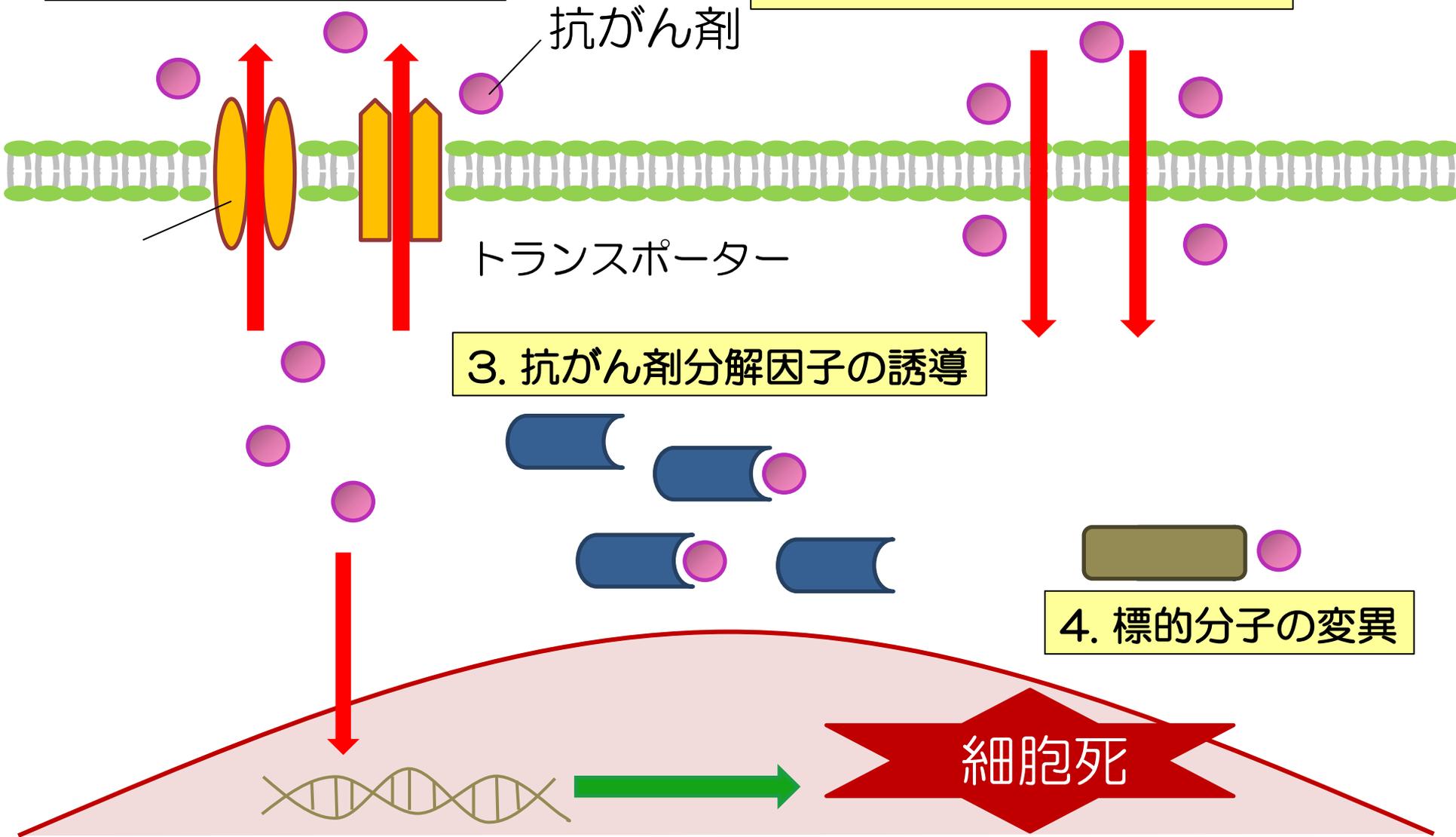
抗がん剤

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

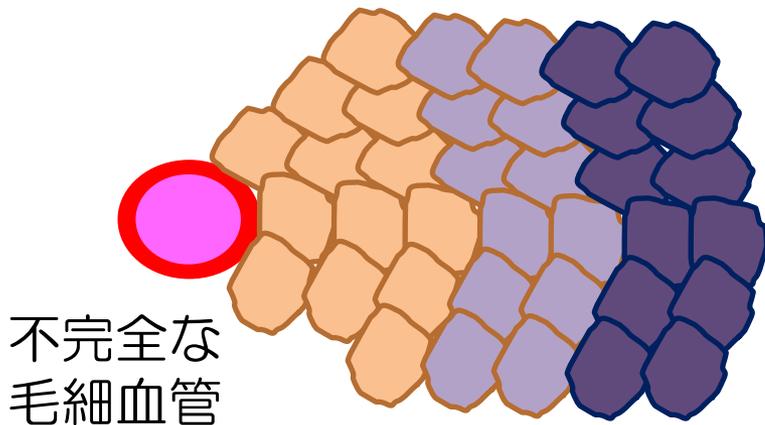


微小環境内部のがん細胞は

- ✓ 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

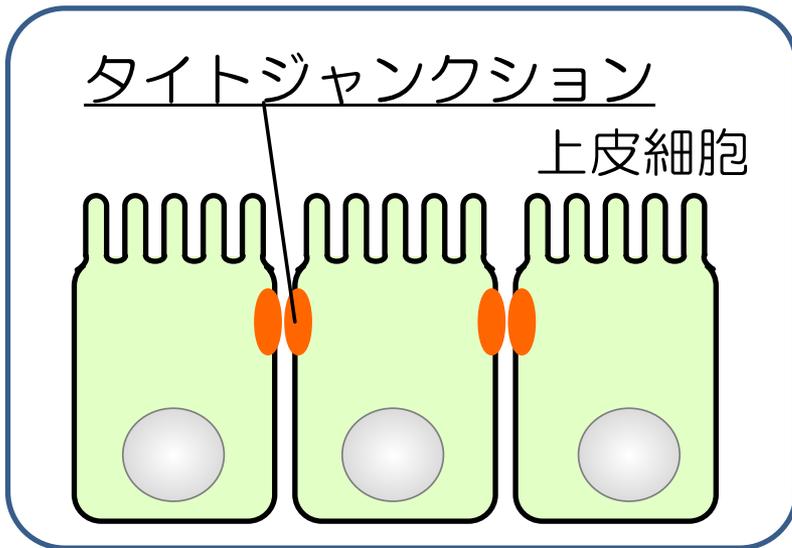


新たな標的分子と薬剤の開発



不完全な
毛細血管

がん微小環境



タイトジャンクションの構成因子

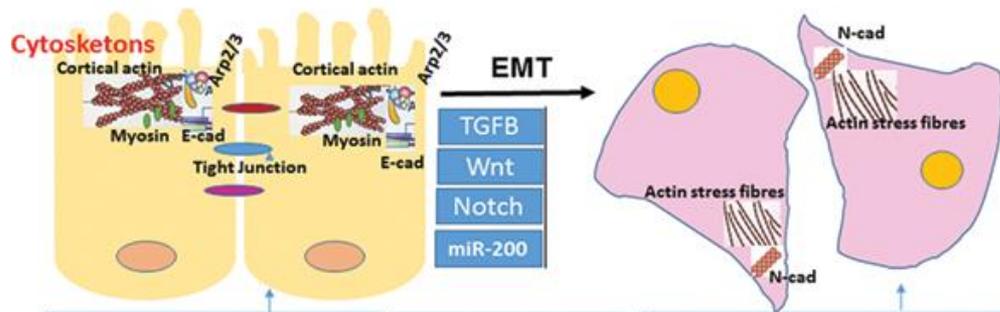
- CLDN1~27
- オクルディン

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 specie 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

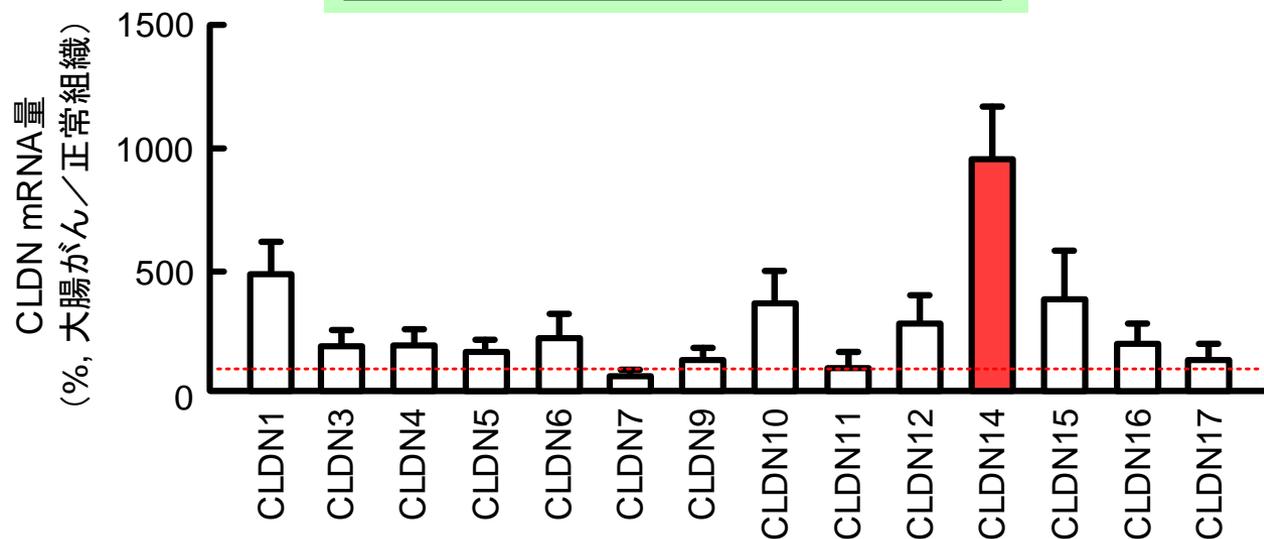
Tabaries S *et al.*, Oncogene (2017)
Ding L *et al.*, Canc. Manag. Res. (2013)

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。

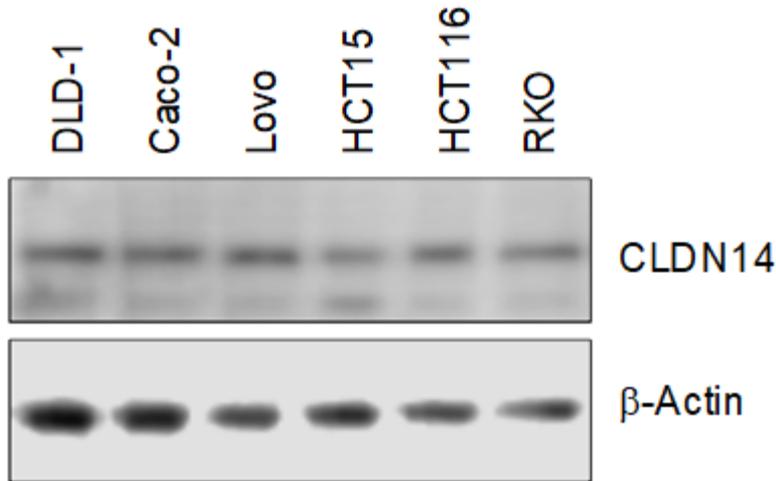
Colon Cancer cDNA Array

	検体数
男性	8
女性	4
正常	3
大腸がん	9

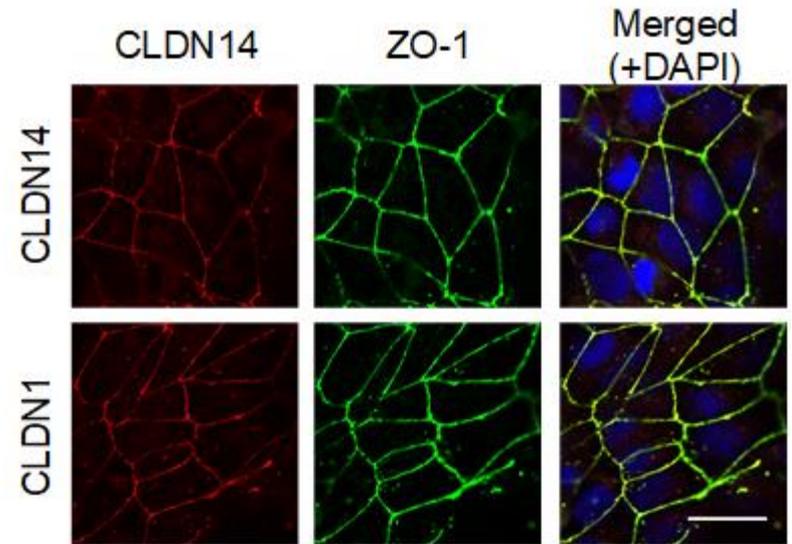
リアルタイムPCR解析



ウエスタンブロット解析



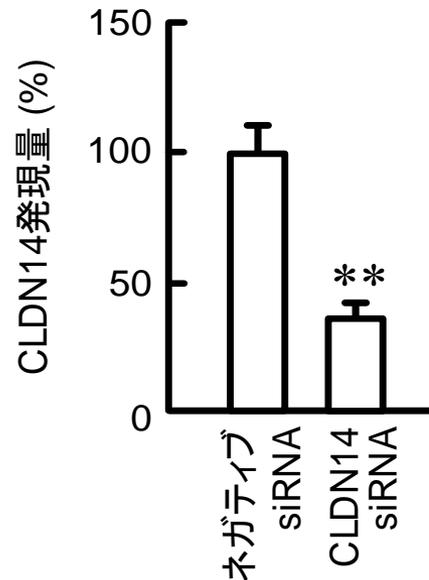
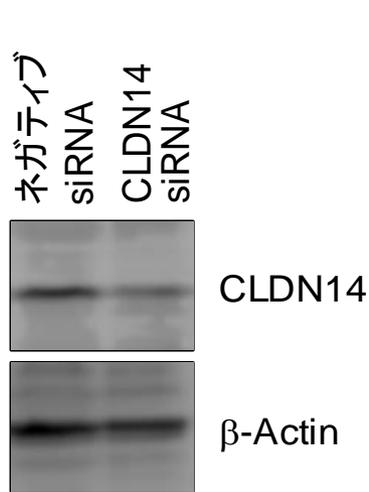
蛍光免疫染色解析



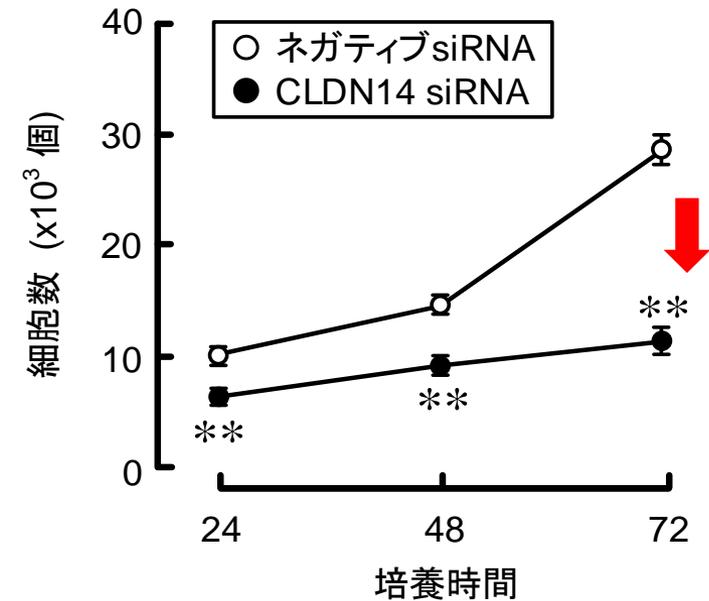
ヒト大腸がん細胞にCLDN14タンパク質が発現している。

CLDN14ノックダウンによる 細胞増殖の抑制

ウェスタンブロット解析



細胞増殖能解析

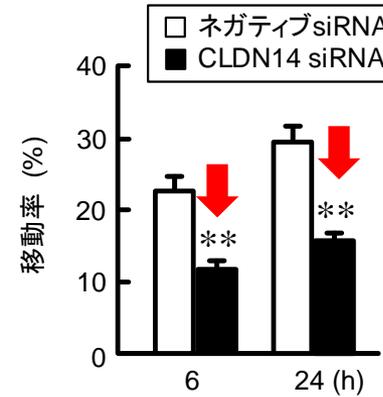
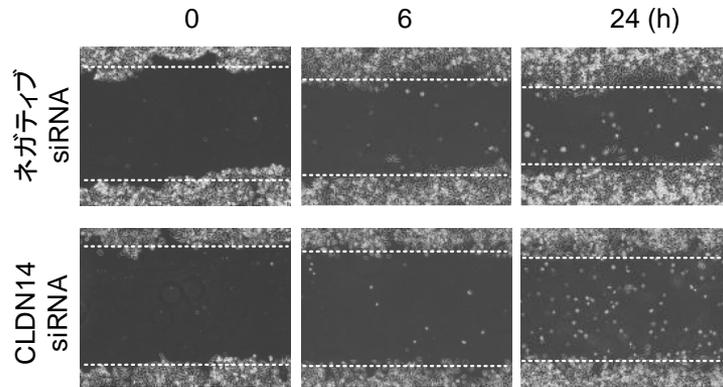


CLDN14は大腸がん細胞の増殖を亢進させる。

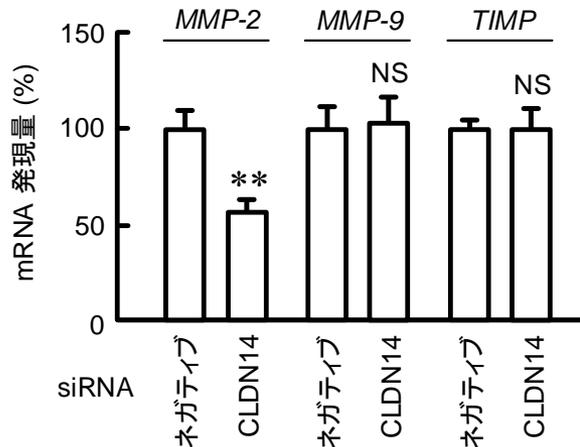
CLDN14ノックダウンによる細胞遊走の抑制

細胞遊走能解析

A



B

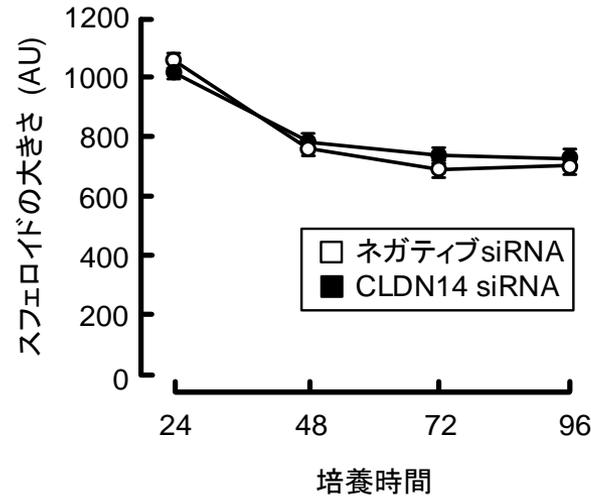
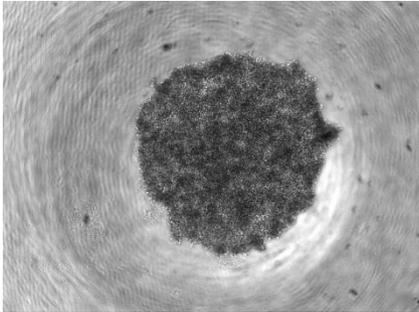


MMP-2, MMP-9 : 細胞遊走の制御に関わる酵素
TIMP : MMPの阻害作用をもつ内因性因子

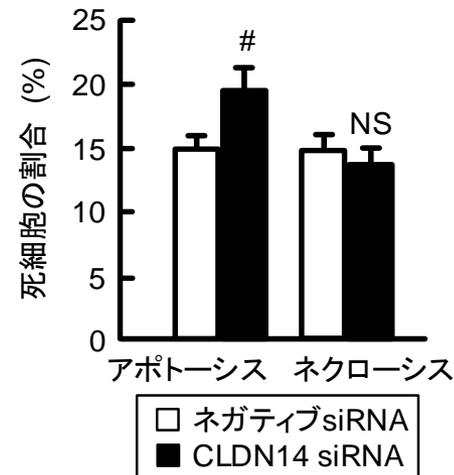
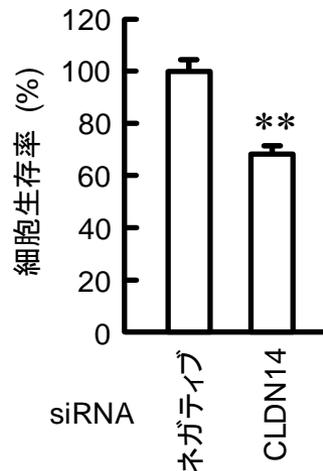
CLDN14は大腸がん細胞の遊走を亢進させる。

スフェロイド細胞の生存に 対するCLDN14発現の影響

スフェロイド

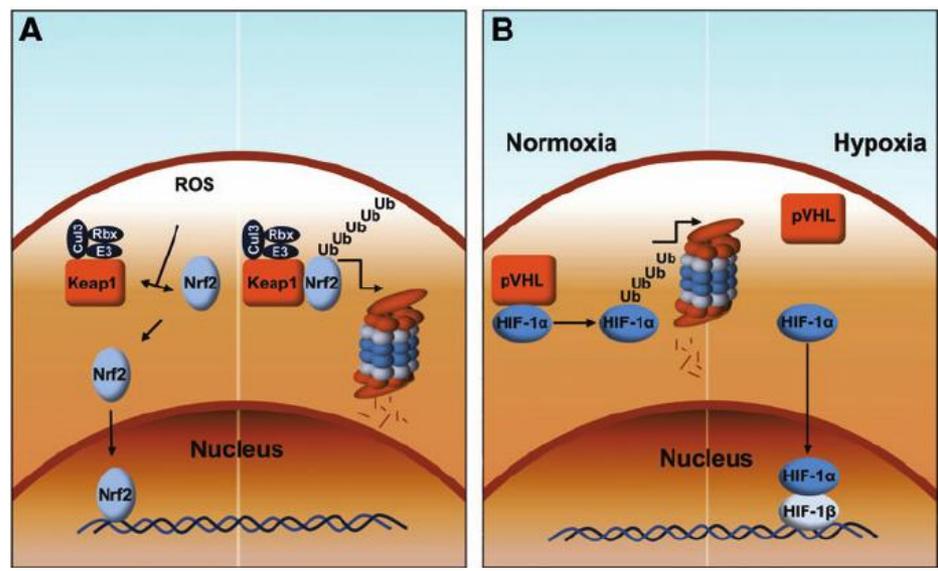


細胞生存率



CLDN14はスフェロイドにおける細胞死を抑制する。

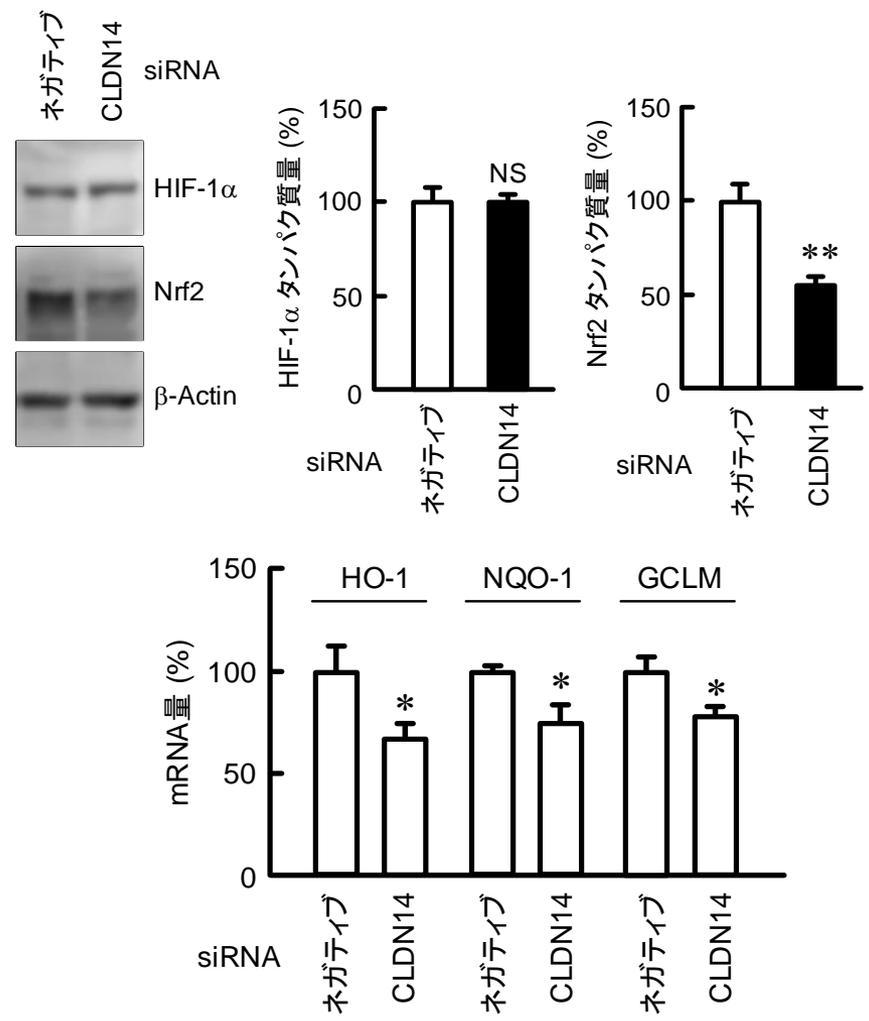
ストレス誘導機構



Wilck N *et al.*, Antioxidants and Redox Signaling 21, 2344-2363 (2014)

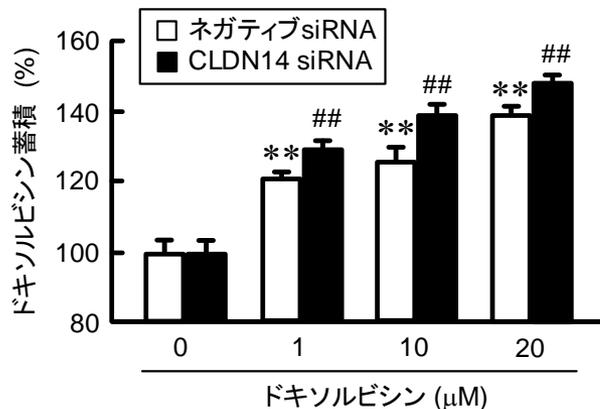
CLDN14はNrf2シグナルを活性化する。

ストレス誘導因子の発現

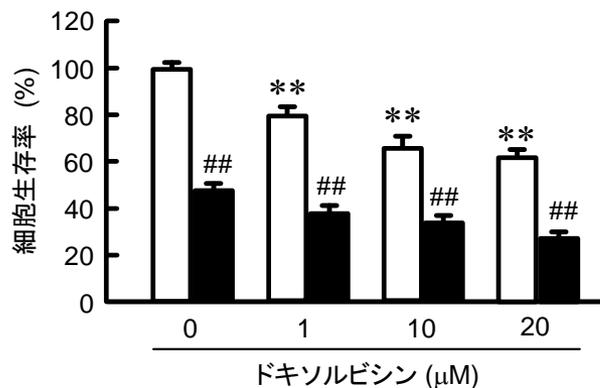
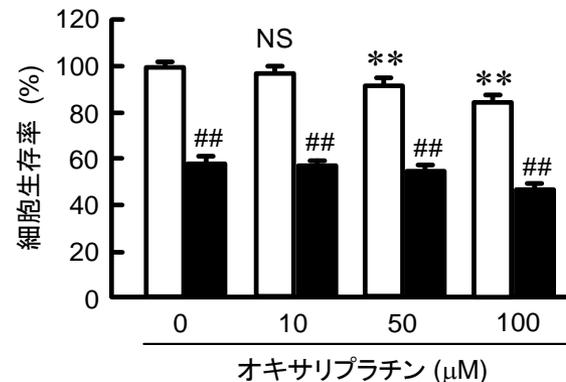


スフェロイド細胞の抗がん剤感受性 に対するCLDN14発現の影響

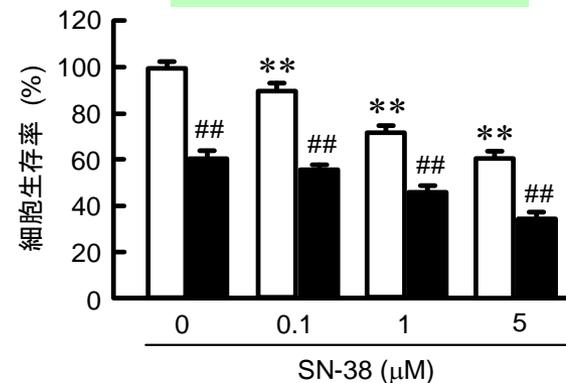
ドキシソルビシン感受性



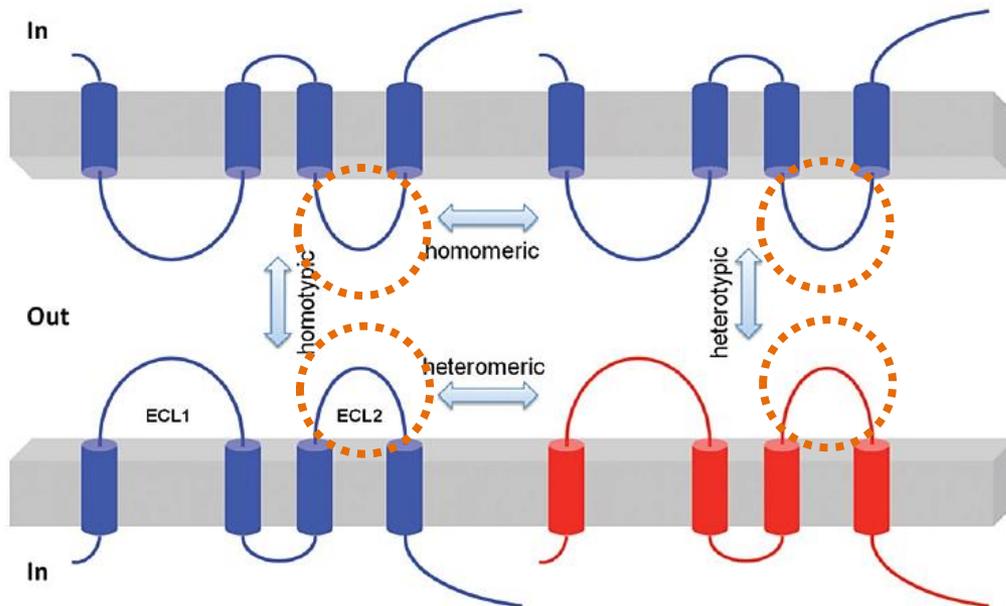
オキサリプラチン感受性



SN-38感受性



CLDN14は抗がん剤感受性を亢進させるため、
大腸がんの新規治療標的になる。



細胞外ループの役割

- 第1細胞外ループ：イオンの選択
- 第2細胞外ループ：CLDNの結合

Hou J., Tissue Barriers (2015)

144 158
CLDN2 --- RDFYSPLVPDSMKFE ---

CLDN14 --- QNFY**N**PL**L**PSG**M**KFE ---

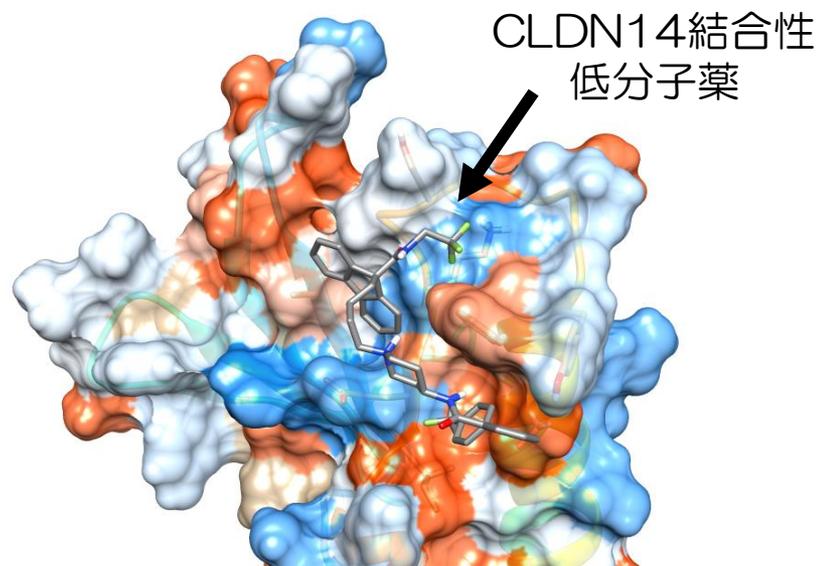
60%の相同性

CLDN-2結合性低分子薬
特願2020-018075

ドッキングシミュレーション

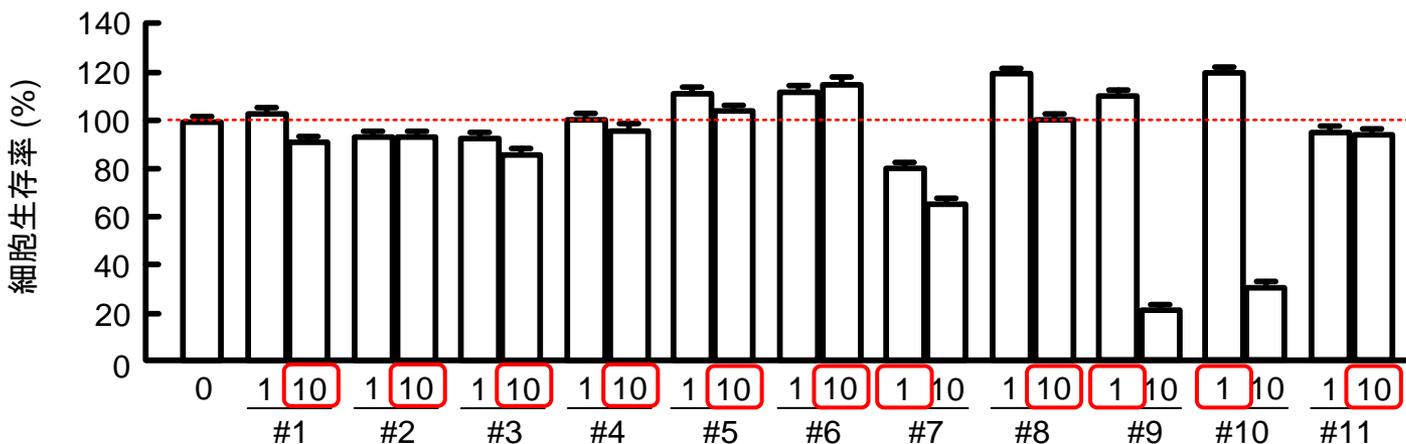
順位	化合物名
1	#1
2	#2
3	#3
4	#4
5	#5
6	#6
7	#7
8	#8
9	#9
10	#10
11	#11
⋮	

FDA承認化合物ライブラリー
(e-Drug3D、約1,700種類)

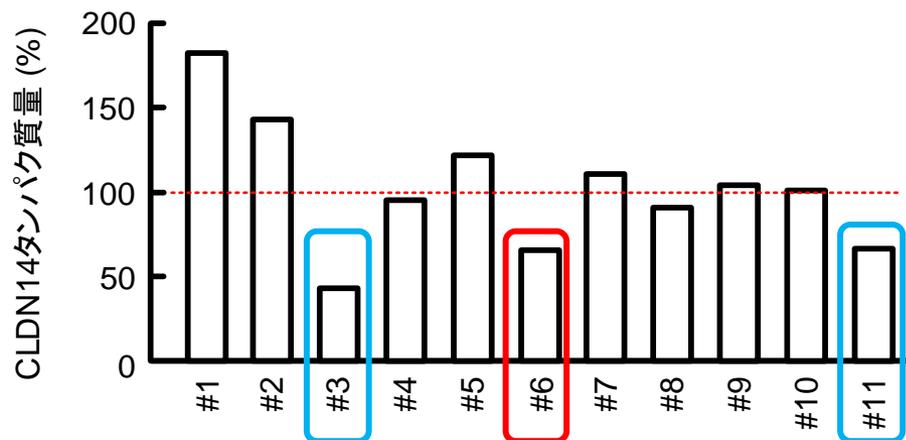


CLDN14ドッキングモデル

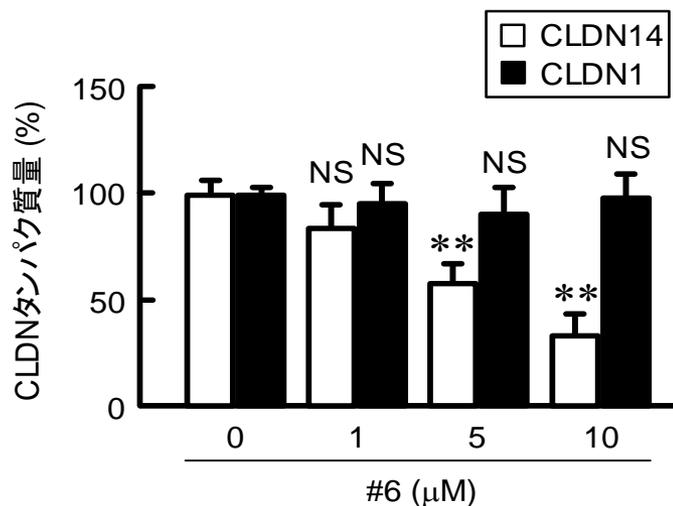
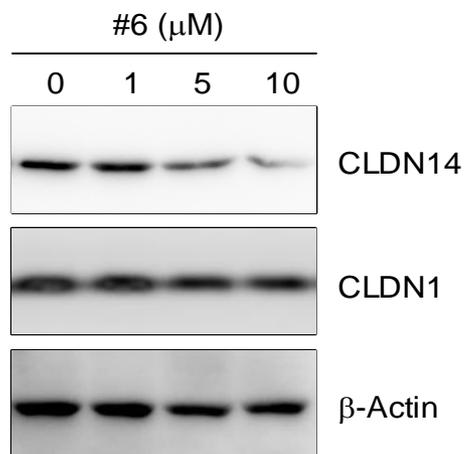
細胞毒性解析



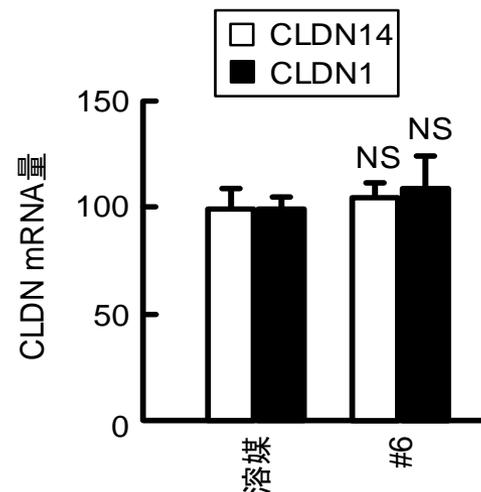
ウェスタンブロット解析



ウェスタンブロット解析

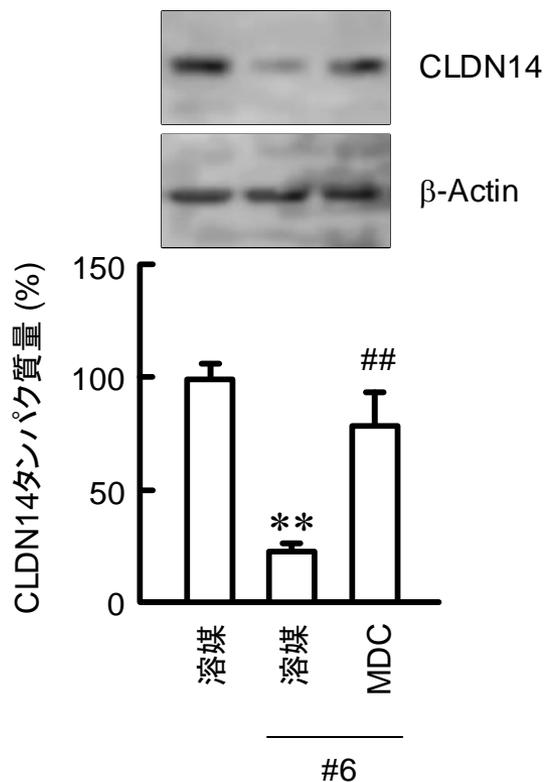


リアルタイムPCR解析

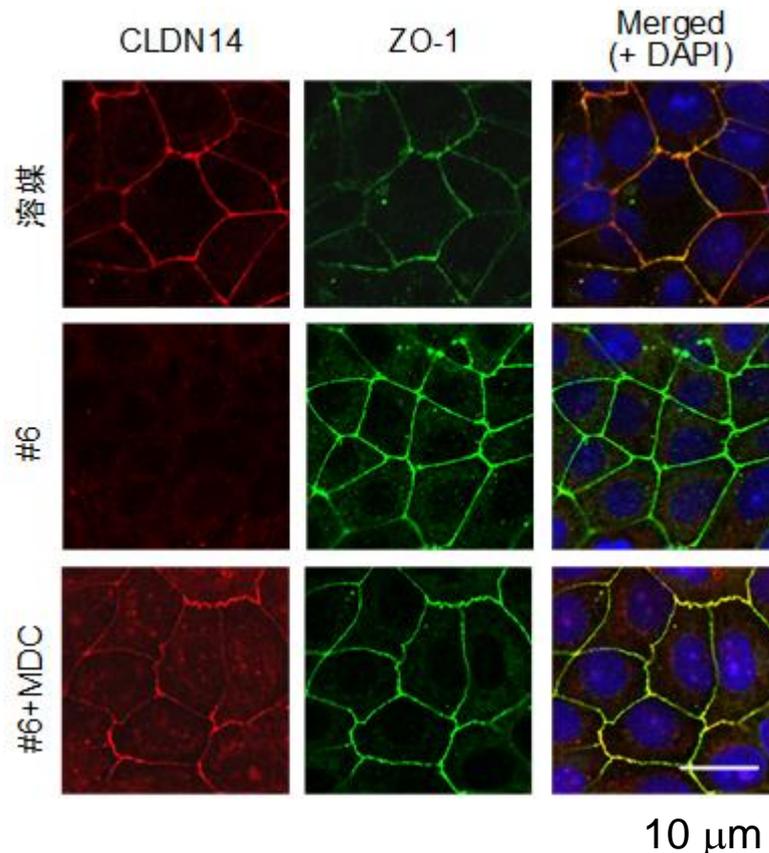


#6は、濃度依存的にCLDN14のタンパク質量を低下させたが、CLDN1は影響を受けなかった。また、mRNA量も変化しなかった。

ウェスタンブロット解析



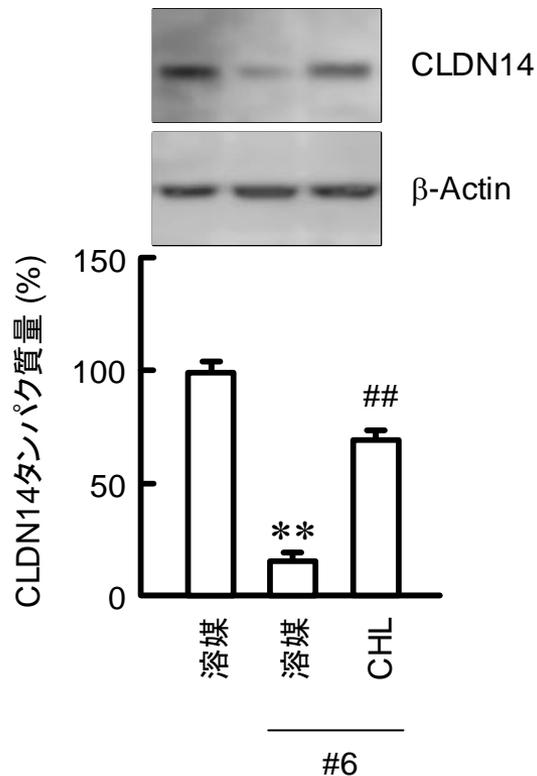
蛍光免疫染色解析



MDC：クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤

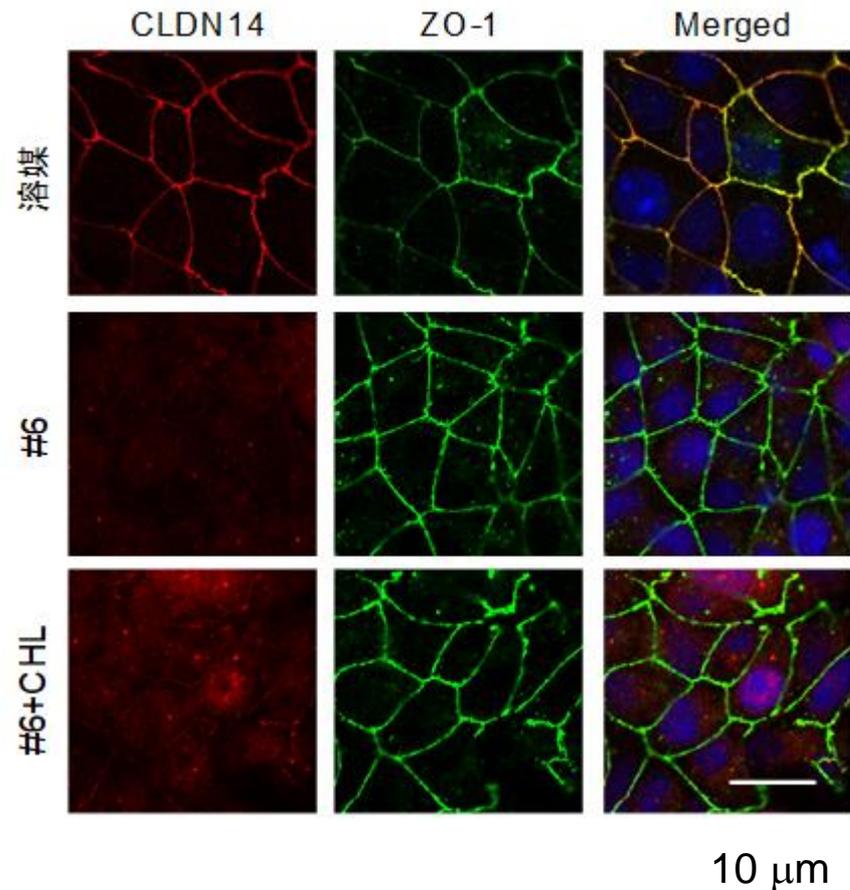
#6はクラスリン依存性経路を介してCLDN14の
エンドサイトーシスを促進した。

ウェスタンブロット解析



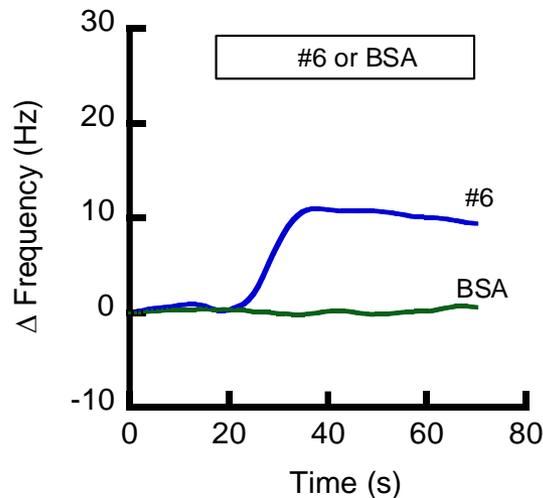
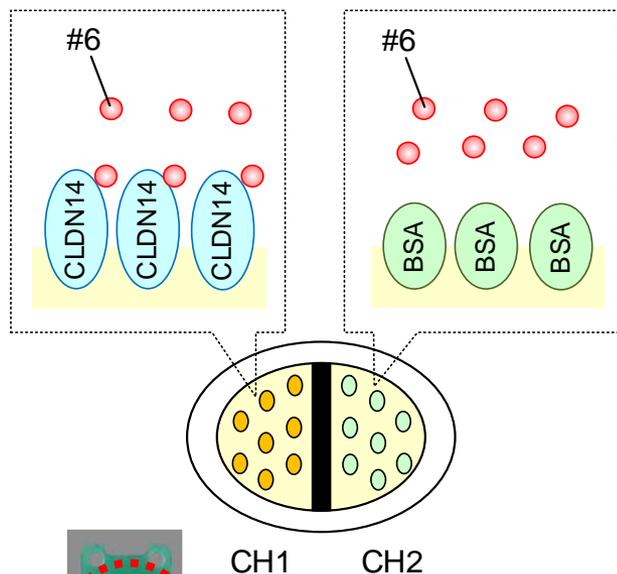
CHL：リソソーム阻害剤

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。

水晶振動子マイクロバランス解析



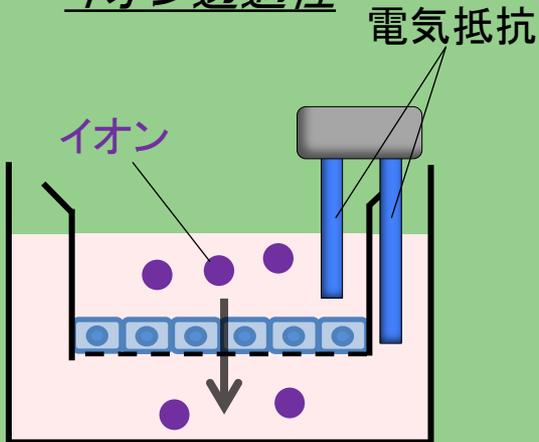
NAPICOS Lite
(日本電波工業)



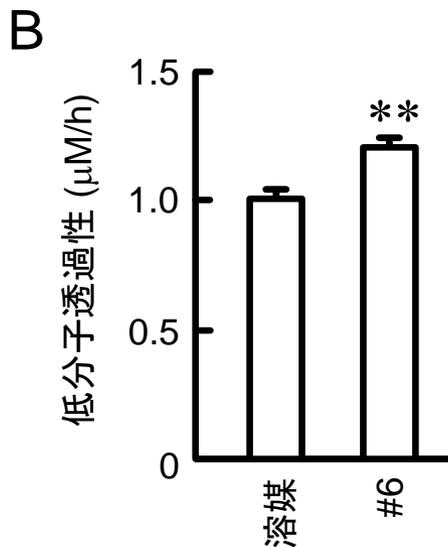
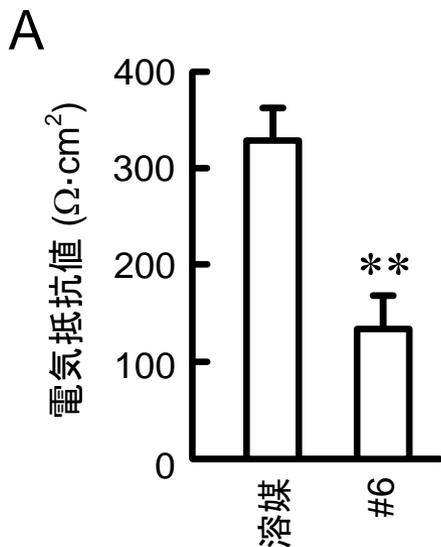
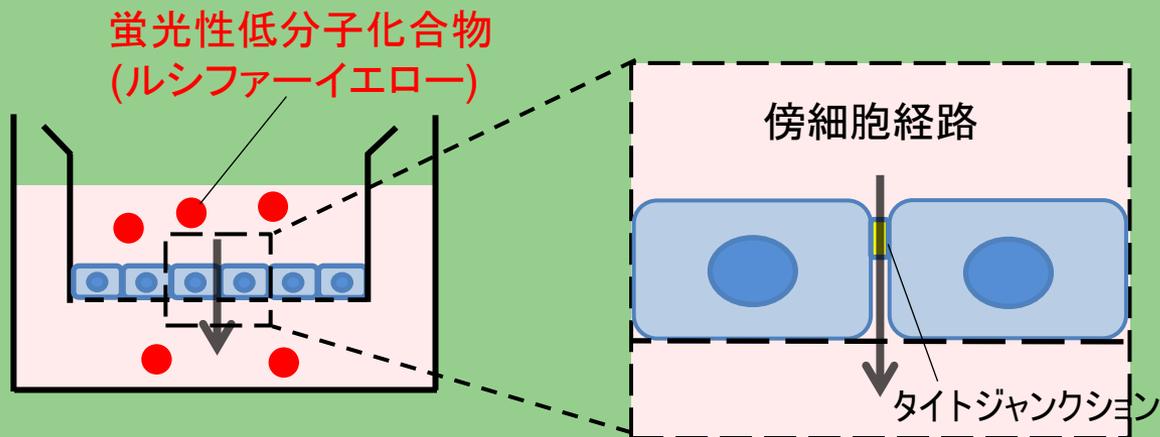
#6はCLDN14リコンビナントタンパク質と直接結合した。

細胞間透過性に対する#6の効果

イオン透過性

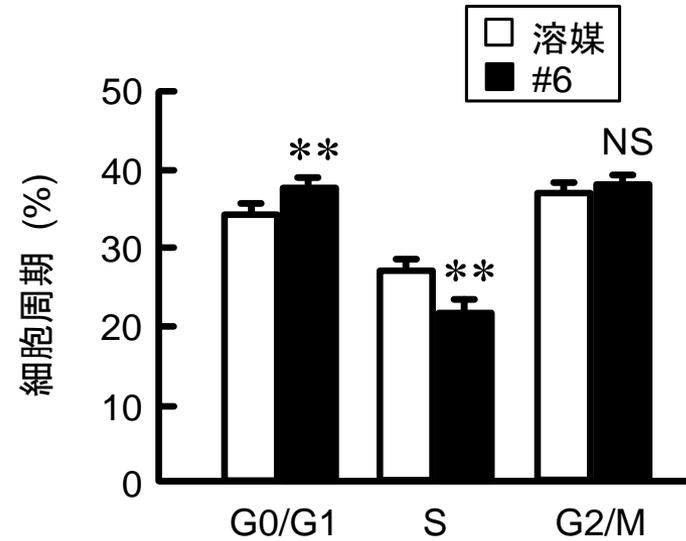
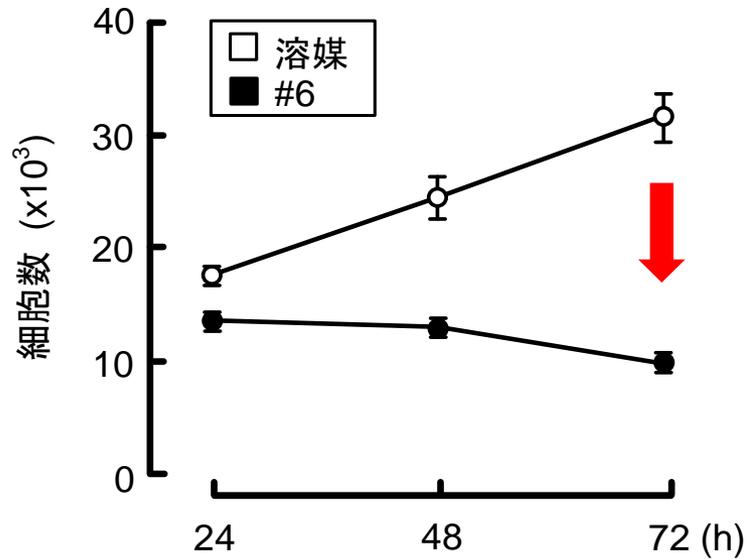


低分子透過性



#6はイオン透過性を低下させたが、低分子化合物の透過性を増加させた。

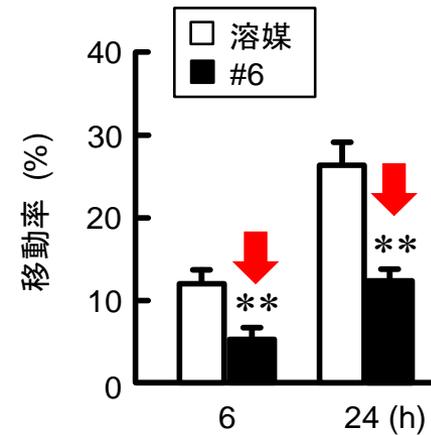
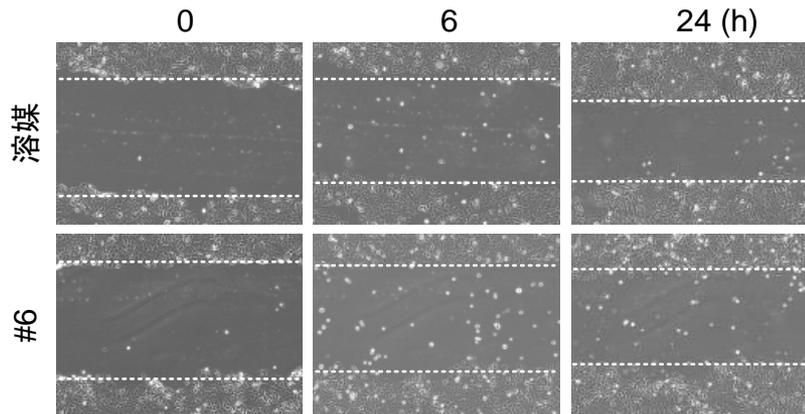
細胞増殖能解析



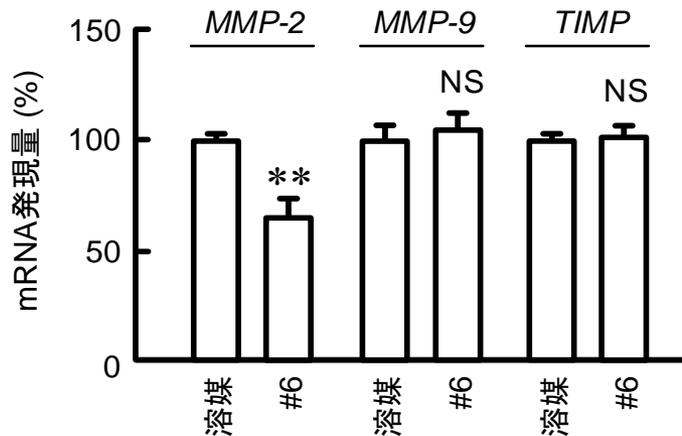
#6は大腸がん細胞の増殖を阻害した。

細胞遊走能解析

A

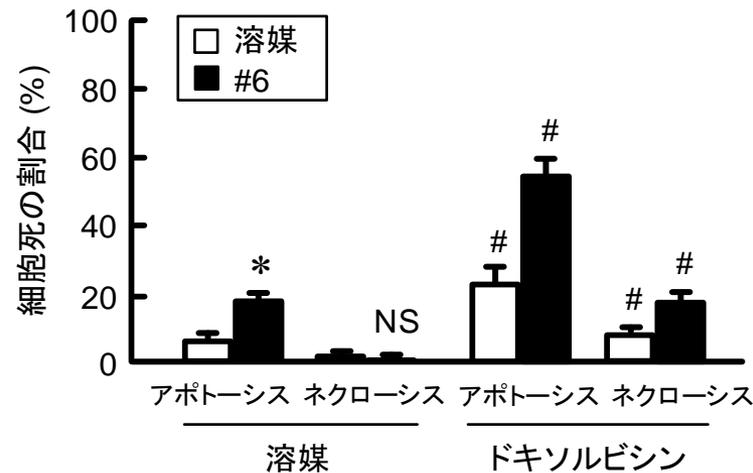
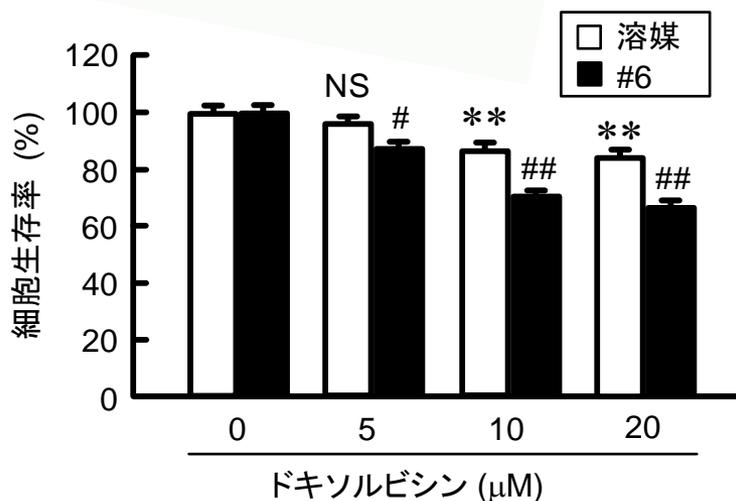
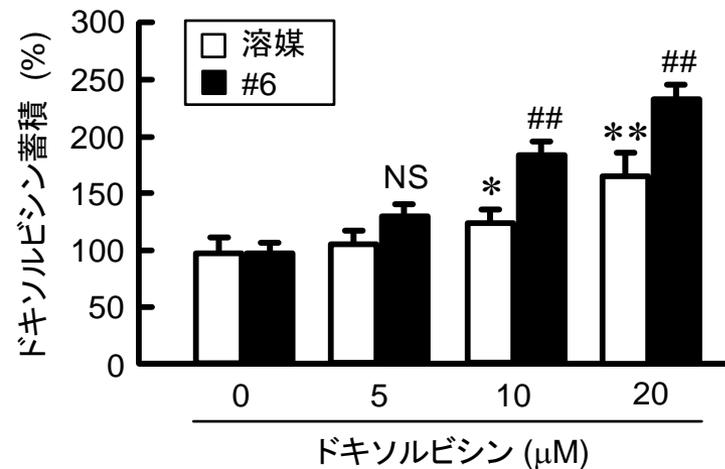
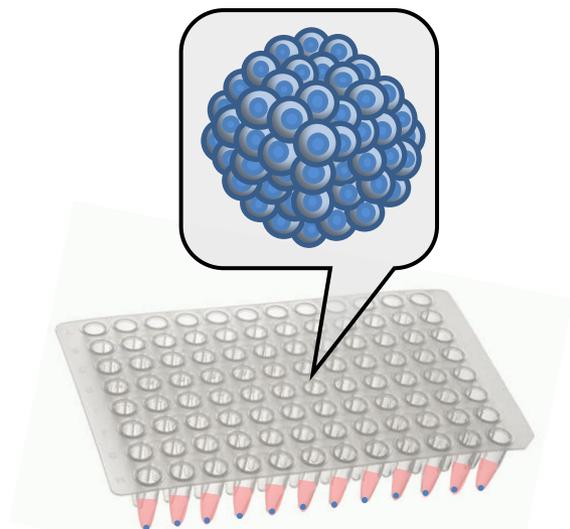


B



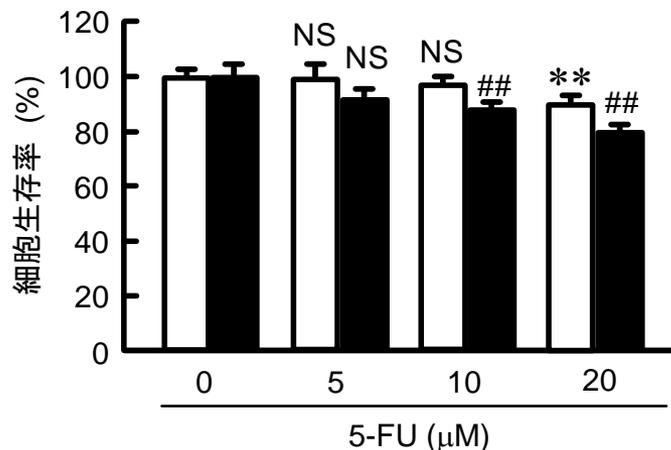
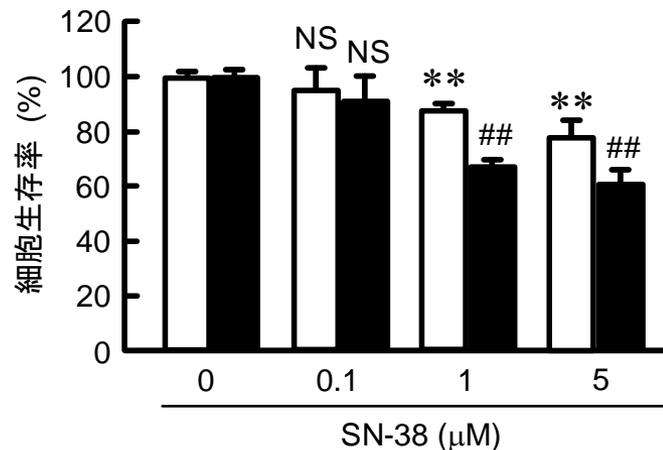
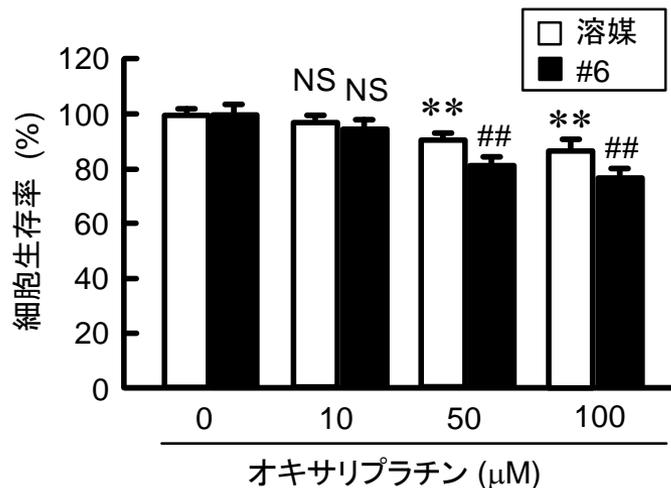
#6は大腸がん細胞の
遊走を阻害した。

抗がん剤感受性



3次元培養下で、#6はドキシソルビシン感受性を増強させ、アポトーシスによる細胞死が増加した。

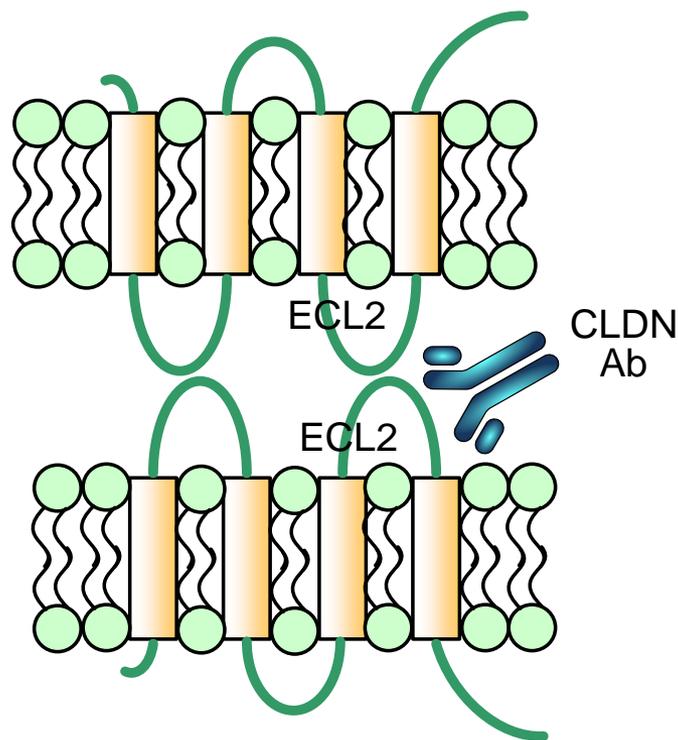
抗がん剤感受性



オキサリプラチン：白金製剤
SN-38：イリノテカンの活性代謝物
5-FU：フッ化ピリミジン系代謝拮抗剤

#6はオキサリプラチン、SN-38、5-FUの感受性も増強させた。

1. 標的分子は酵素やトランスポーターでない
2. CLDN14を標的とした薬剤は未開発である
3. 抗体よりもサイズが小さい低分子薬である

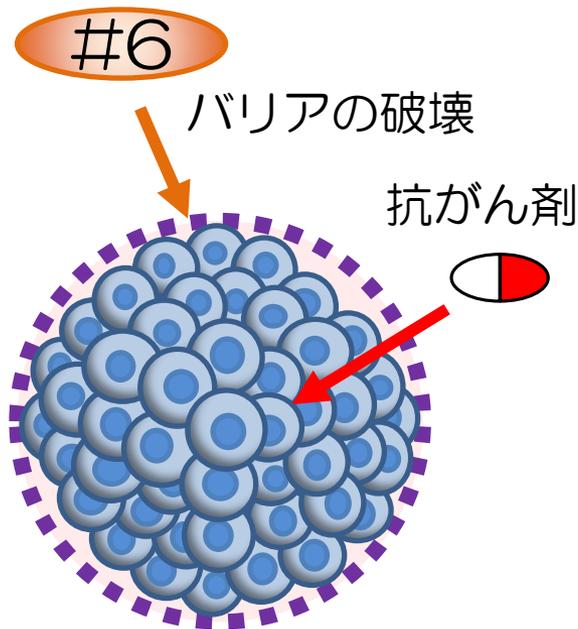


タイトジャンクションの
隙間の広さは6~8 Å

分子量 500 Da以上の分子は
接近が困難

抗体はタイトジャンクションの
CLDNに結合するのか？

CLDN1, 3, 4, 5, 18抗体の開発



効果

抗体と比較して

- ✓ 大腸がん細胞の増殖を抑制
- ✓ 大腸がん細胞の遊走を抑制
- ✓ 抗がん剤感受性を亢進

- ✓ 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

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、食道がん組織にCLDN14が高発現する。

Li J *et al.*, *Oncotarget* 8, 96249-96262 (2017)

Ca²⁺ホメオスタシスとCLDN14の関係

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、Ca²⁺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

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)

発明の名称：大腸癌

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

(岐阜薬科大学)

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

