

がん細胞のバリア破壊による 治療抵抗性の改善



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

がんの罹患数 : 87.6万人 (2013年)
がんによる死亡者数 : 37.3万人 (2017年)
部位別では肺がんが最も多い
がんの医療費 : 4兆2500億円 (2017年)
抗がん剤市場 : 1兆円 → 2025年には1兆4000億円

平成29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 : 1800万人 (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

非小細胞肺がんの薬物療法の変遷

1970

第1世代

マイトマイシンC
シクロホスファミド
ビンクリスチン

第2世代

エトポシド
ビンデシン

1980

シスプラチン

1990

第3世代

イリノテカン
パクリタキセル
ドセタキセル
ゲムシタビン

2000

分子標的薬
(EGFR阻害剤)

ゲフィチニブ

エルロチニブ

アファチニブ

(ALK阻害剤)

クリゾチニブ

(免疫CP阻害剤)

ニボルマブ

EGFR-TKI

細胞障害性抗がん剤

ファーストライン

第1世代 + 第2世代
(多剤併用療法)

シスプラチン +
第2世代

プラチナ製剤 + 第3世代

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。

プラチナ製剤の多剤併用療法の奏功率は約37%

Kubota K *et al.*, J Clin. Oncol. (2004)

EGFR-TKIの治療対象となる肺腺がん患者は約53%

Kohno T *et al.*, Nat. Med. (2012)

2. 抗がん剤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

抗がん剤

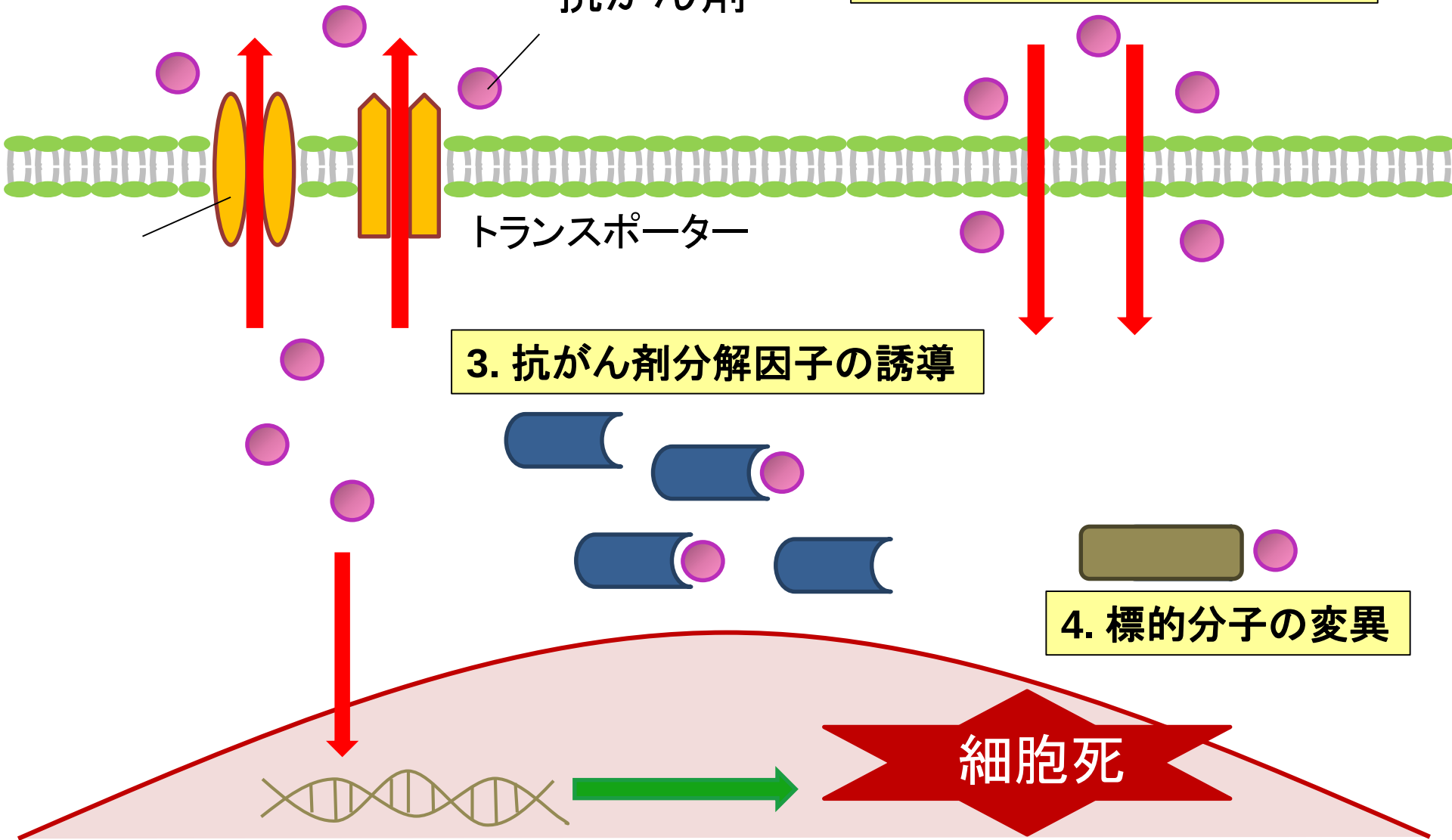
トランスポーター

2. 抗がん剤取り込みの低下

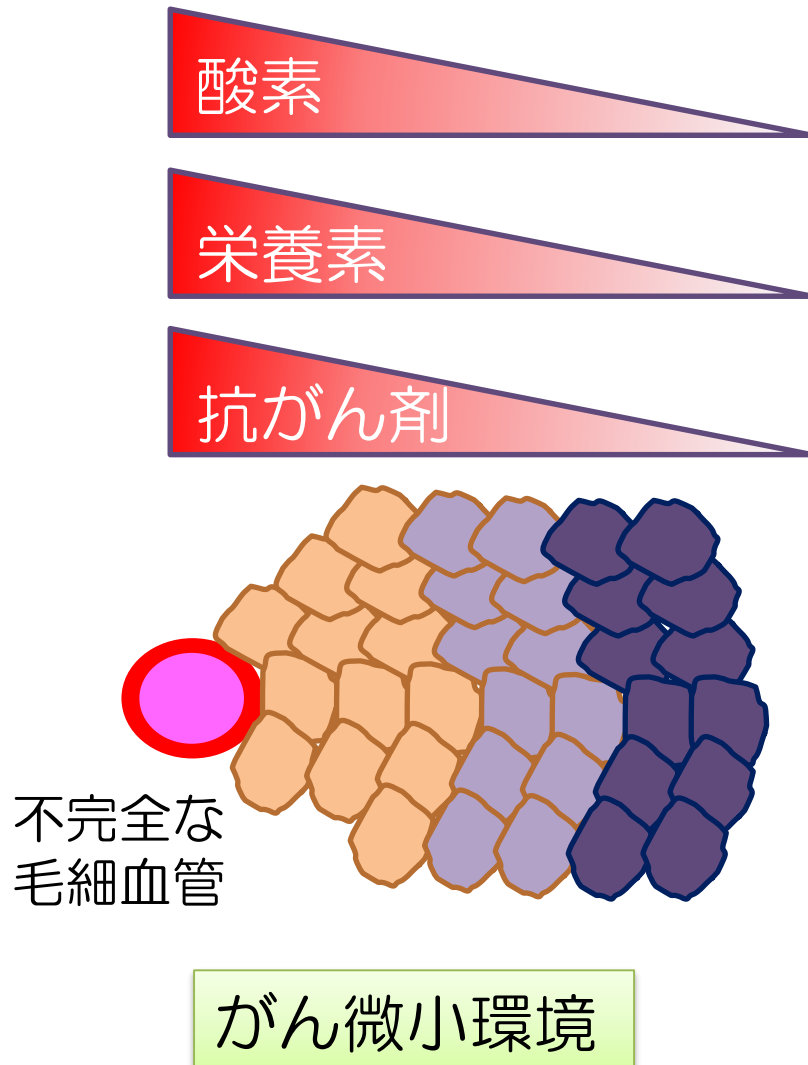
3. 抗がん剤分解因子の誘導

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



低酸素度の亢進
低栄養度の亢進
抗がん剤濃度の低下



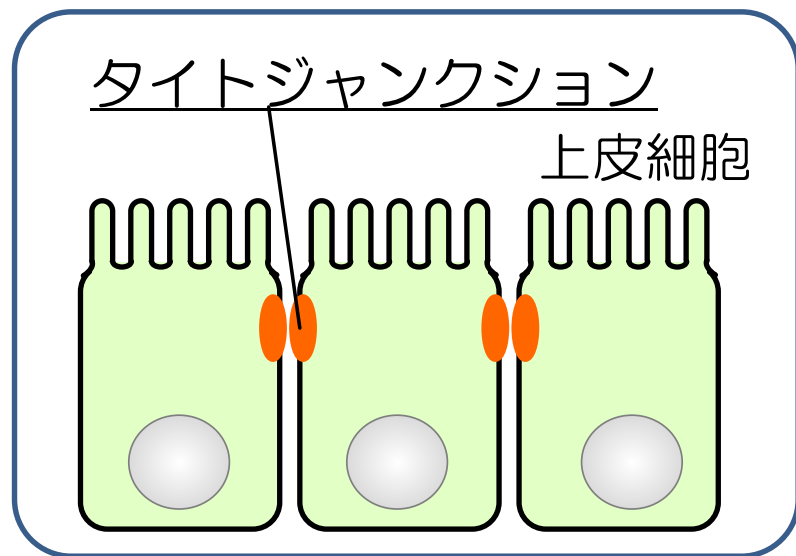
微小環境内部のがん細胞は

- ✓ 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

クローディン (CLDN) の特徴

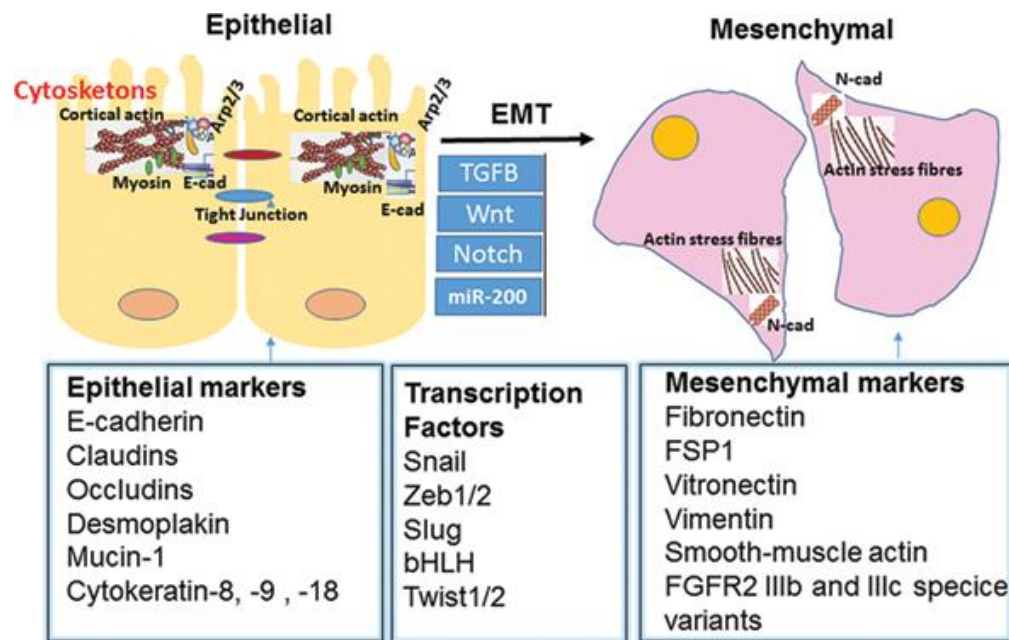


タイトジャンクションの構成因子

- 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



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)

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

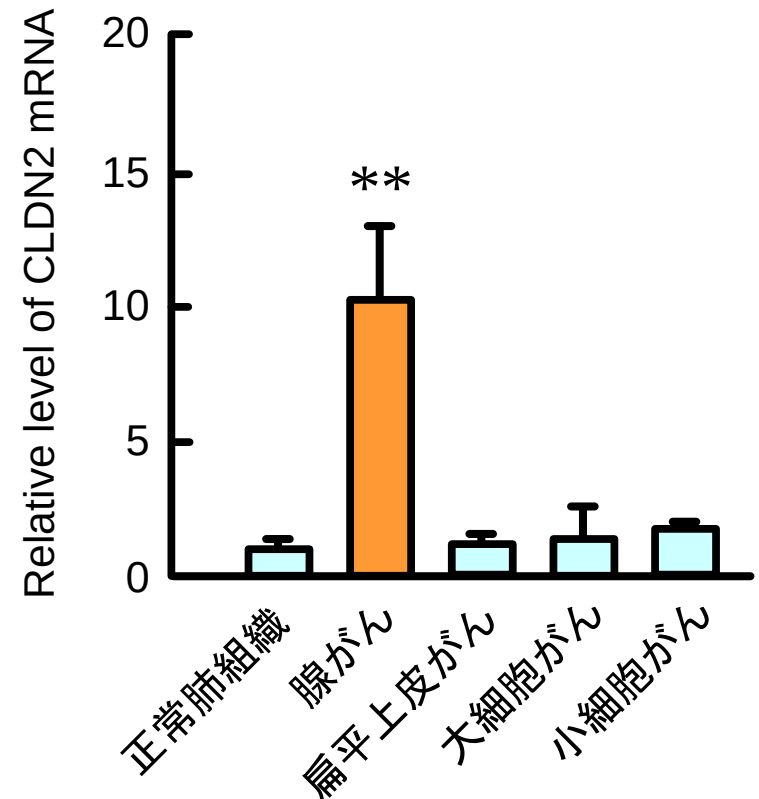
Tabaries S *et al.*, Oncogene (2017)
Ding L *et al.*, Canc. Manag. Res. (2013)

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)

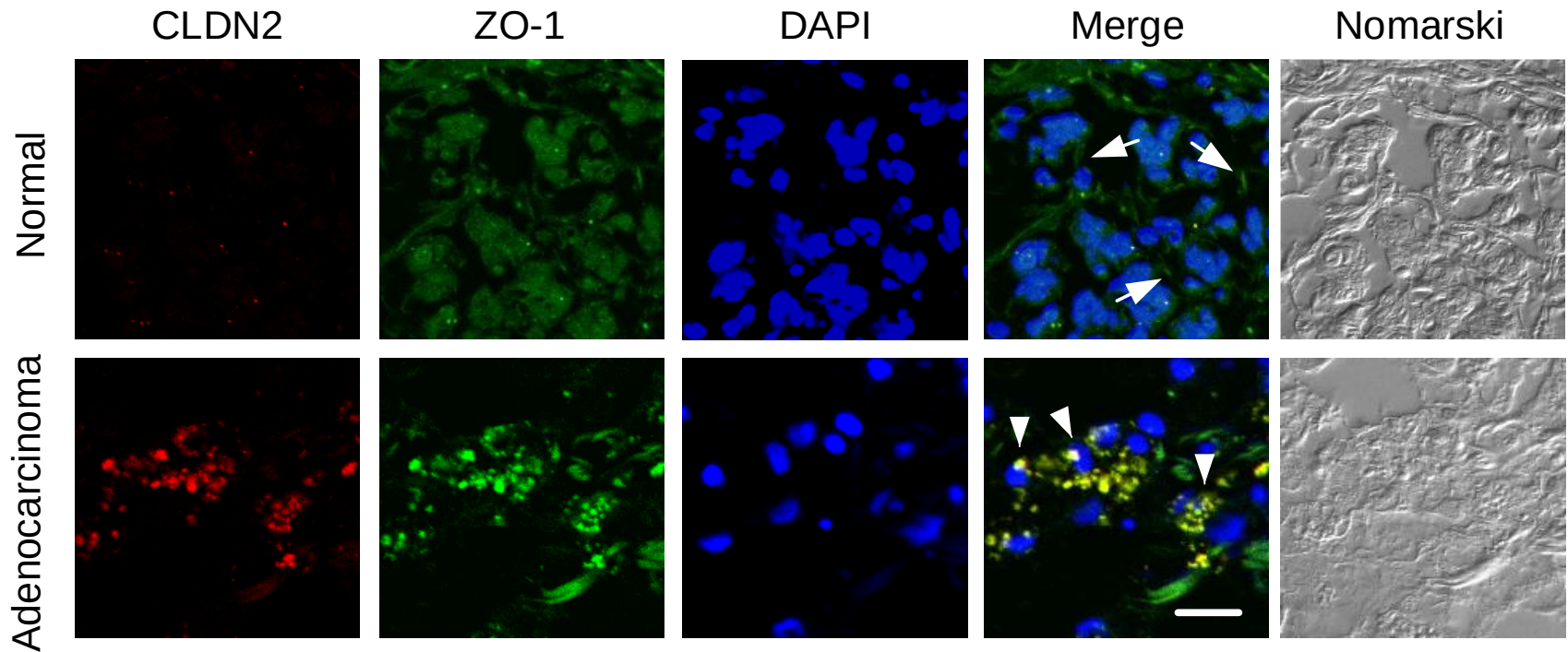
		患者数
男性		59
女性		31
正常		12
がん種	ステージ	
腺がん	I	21
	II	8
	III	12
	IV	4
扁平上皮がん	I	11
	II	10
	III	4
	IV	1
大細胞がん	I	2
	II	1
	III	1
小細胞がん	I	1
	III	2

リアルタイムPCR解析



肺腺がん組織でのCLDN2 タンパク質の分布

蛍光免疫染色解析

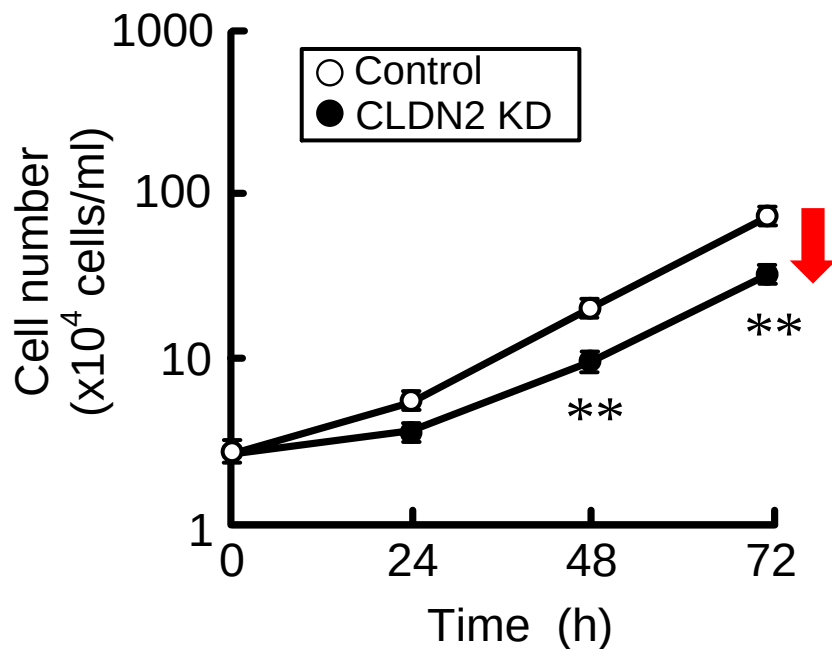


Ikari A *et al.*, Biochim. Biophys. Acta (2012)

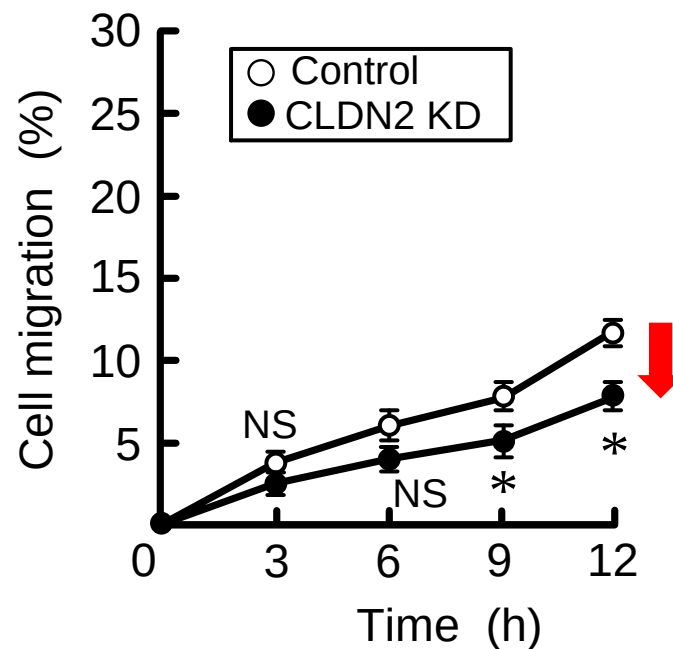
肺腺がん組織にCLDN2タンパク質が高発現する。

CLDN2のノックダウンによる 細胞増殖の抑制

細胞増殖能解析

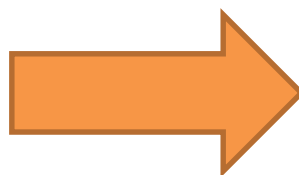


細胞浸潤能解析



Ikari A et al., Life Sci. (2010)

CLDN2発現の増加



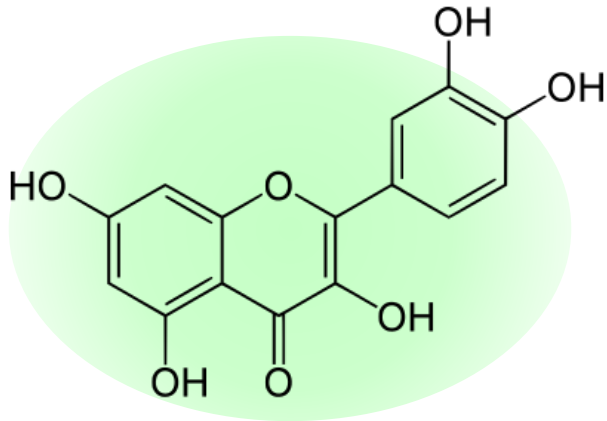
増殖能



浸潤能

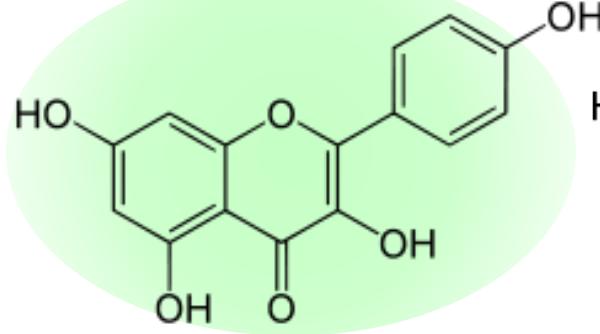


CLDN2発現を低下させる食品成分



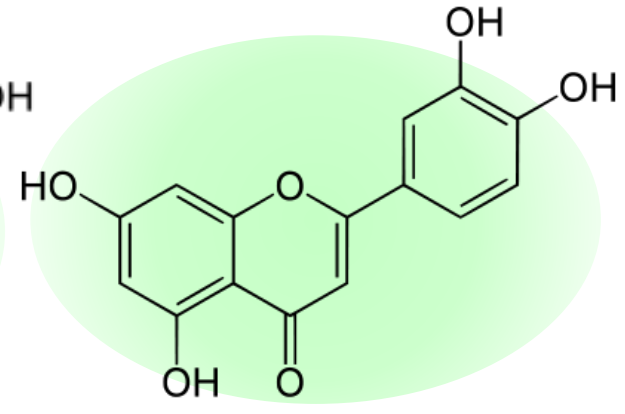
ケルセチン

Nutrients (2015)

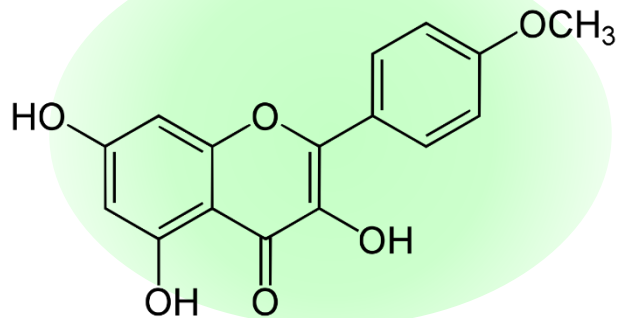


ルテオリン

Nutrients (2017)

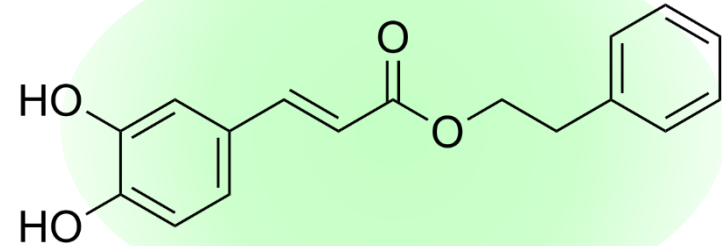


ケンフェロール



ケンフェリド

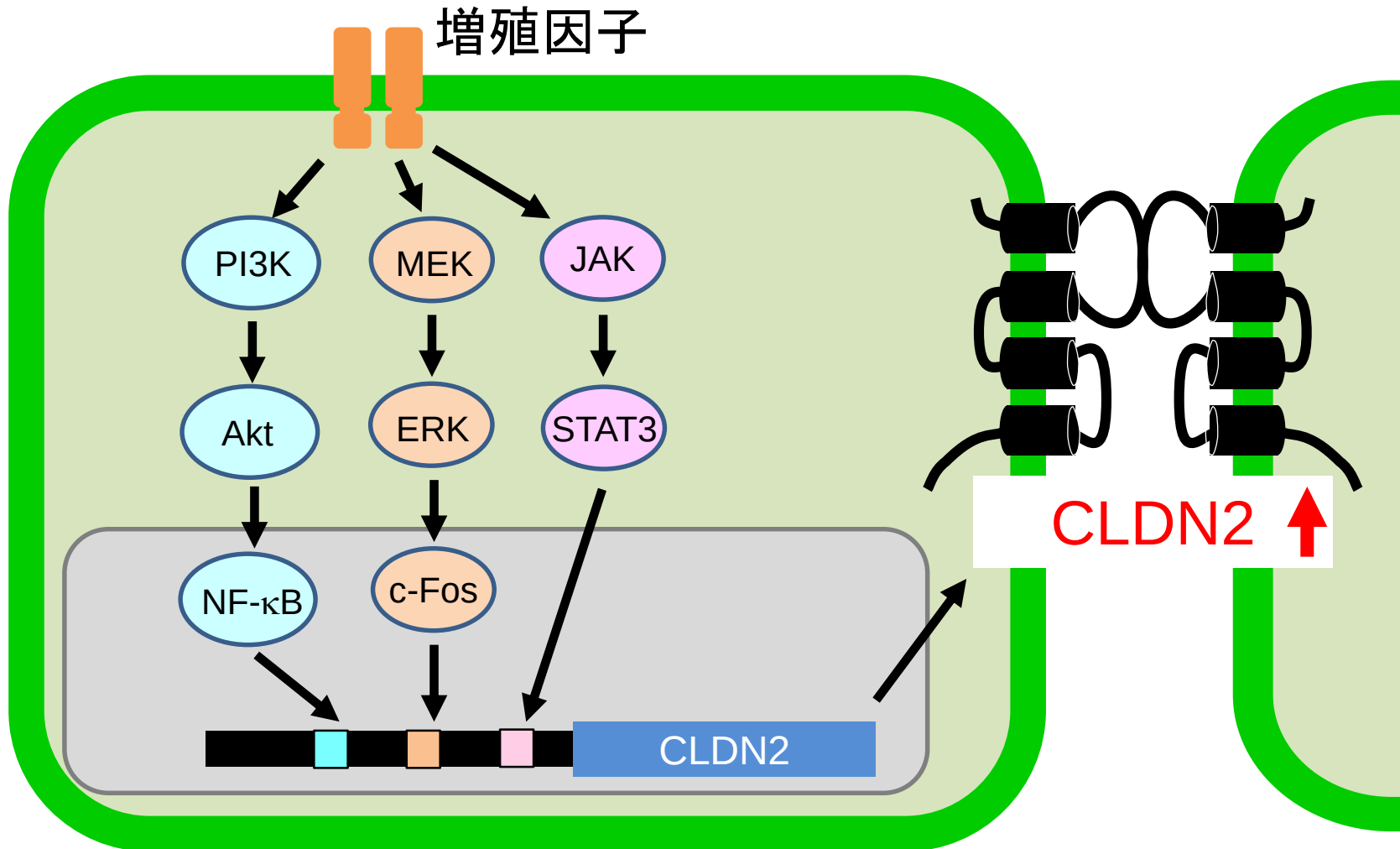
Nutrients (2020)



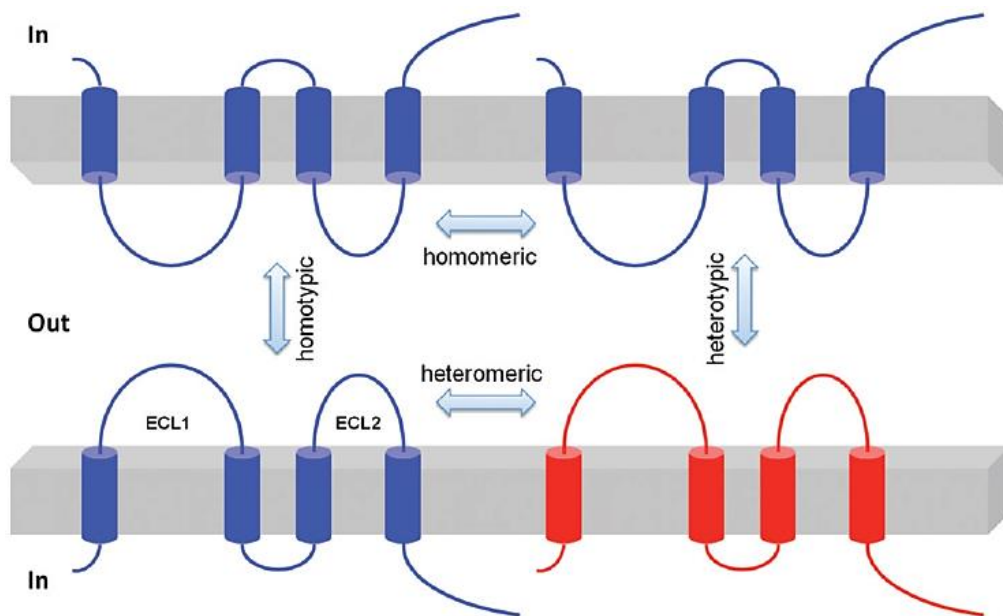
カフェ酸フェネチルエステル

J. Nutr. Biochem. (2018)

食品成分の作用はCLDN2に選択的でない。



細胞内シグナルの阻害では特異性が低い。
正常細胞の働きにも影響を及ぼす。



CLDNが形成するポア

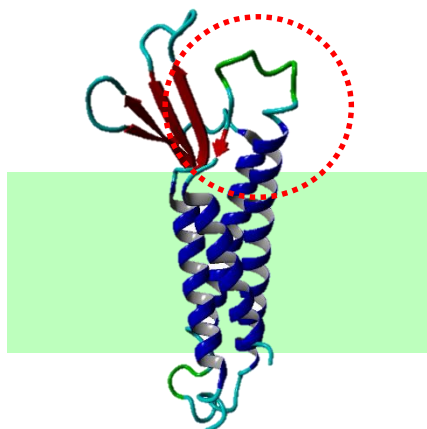
第1細胞外ループ：イオン選択性

第2細胞外ループ：サイズ選択性

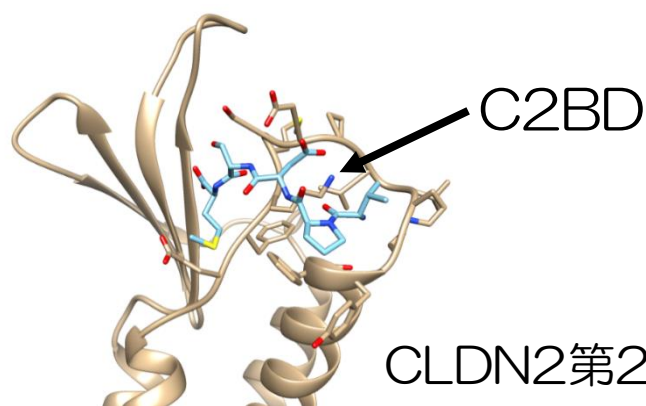
500 Da程度までの
低分子は通過が可能

Hou J, Tissue Barriers (2015)

CLDN2の推定立体構造



Claudin-2 Binding Drugs



CLDN2第2細胞外ループ

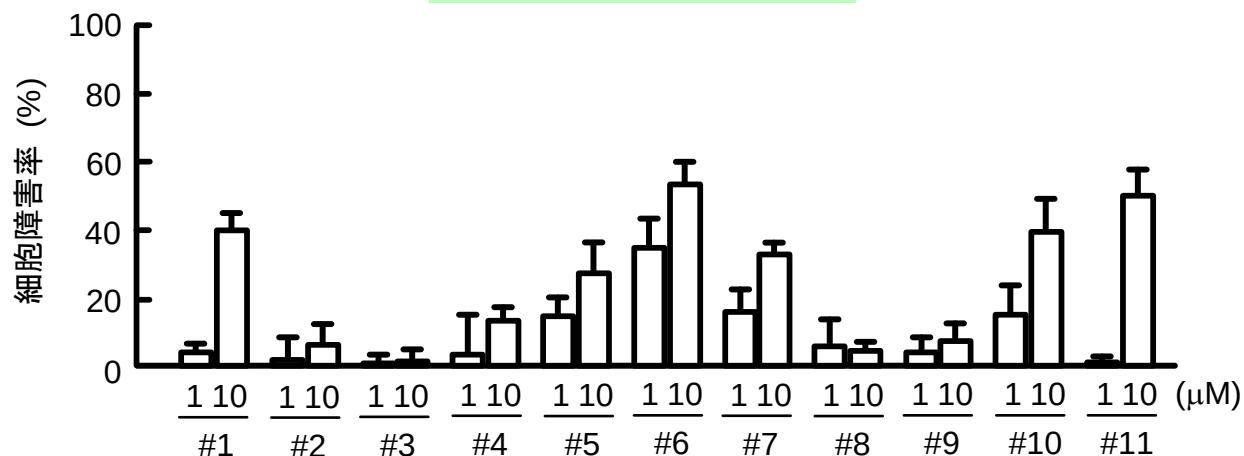
CLDN2の発現を低下させるC2BDの探索

ドッキング シミュレーション

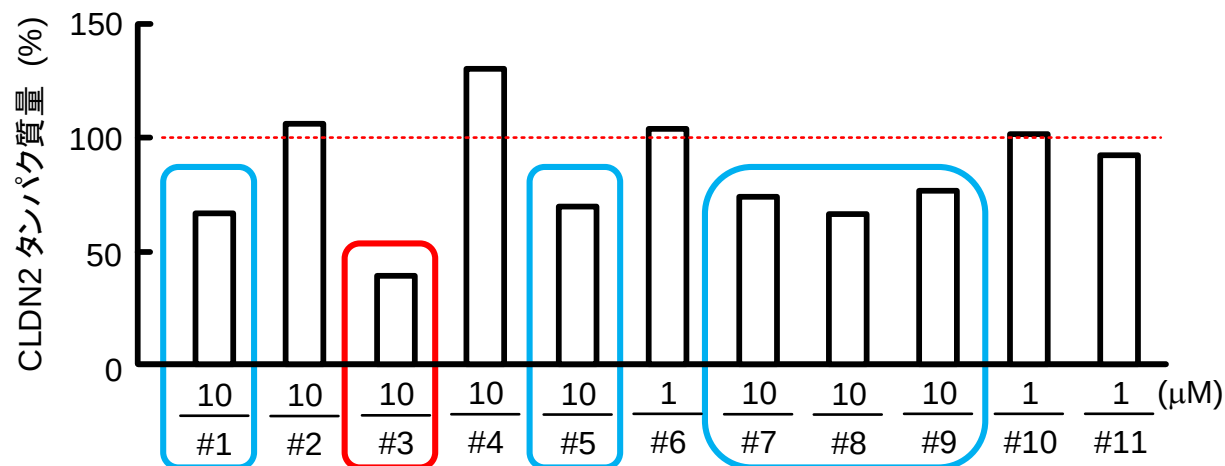
順位	化合物名
1	#1
2	Acyclovir
3	#3
4	Fluphenazine
5	#5
6	Deslanoside
7	#7
8	#8
9	#9
10	Paliperidone
11	Lomitapide

化合物3 (#3) を選定

細胞毒性解析

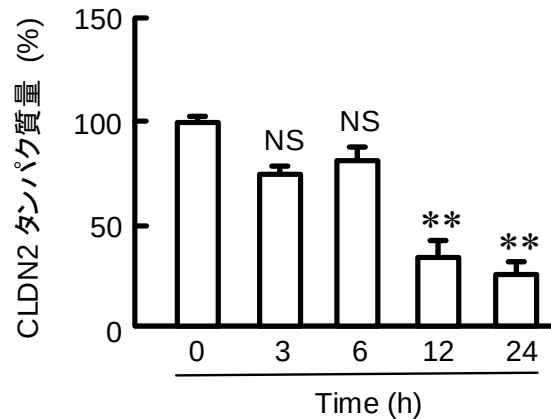
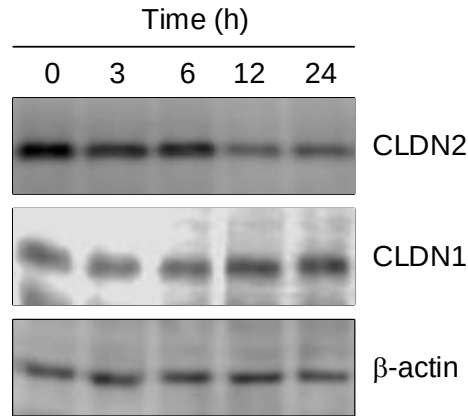
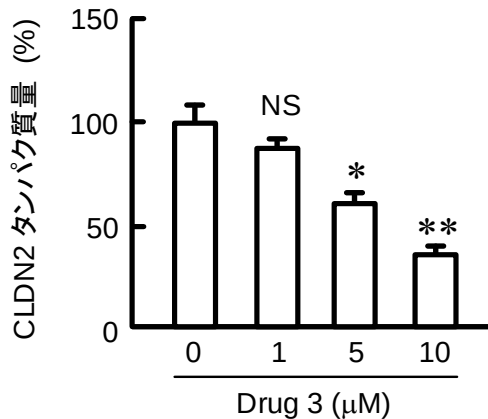
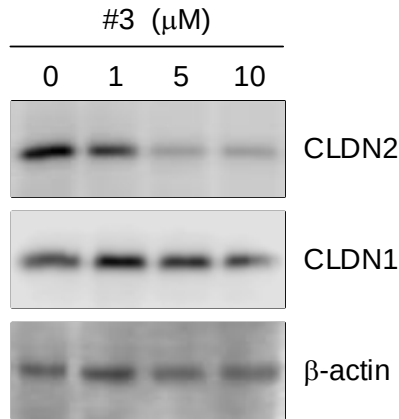


ウェスタンブロット解析

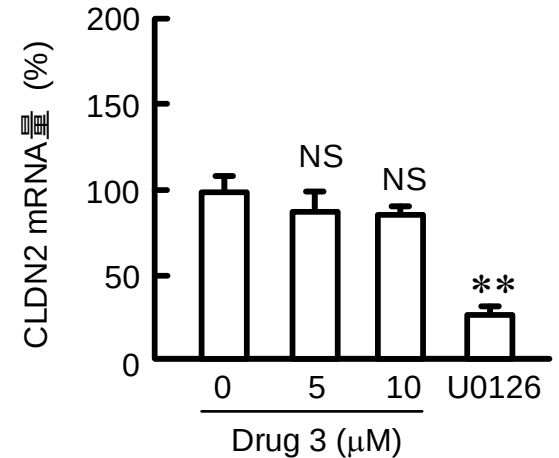


#3の濃度・時間依存的効果

ウェスタンブロット解析



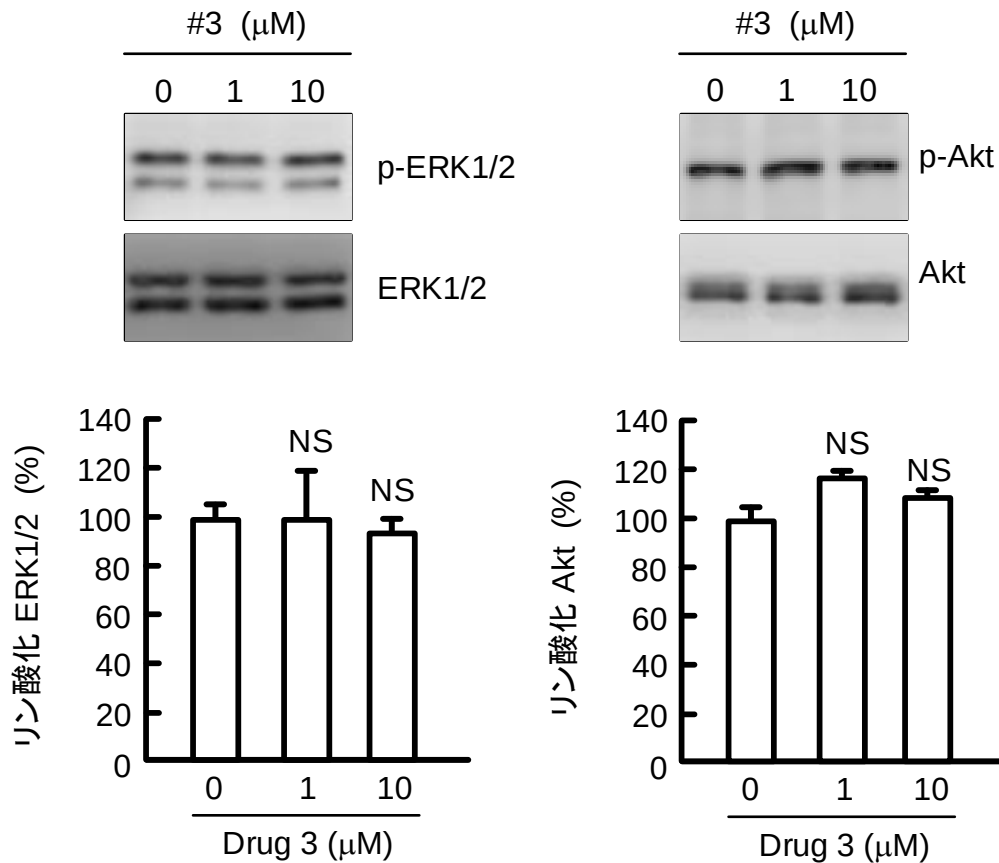
リアルタイムPCR解析



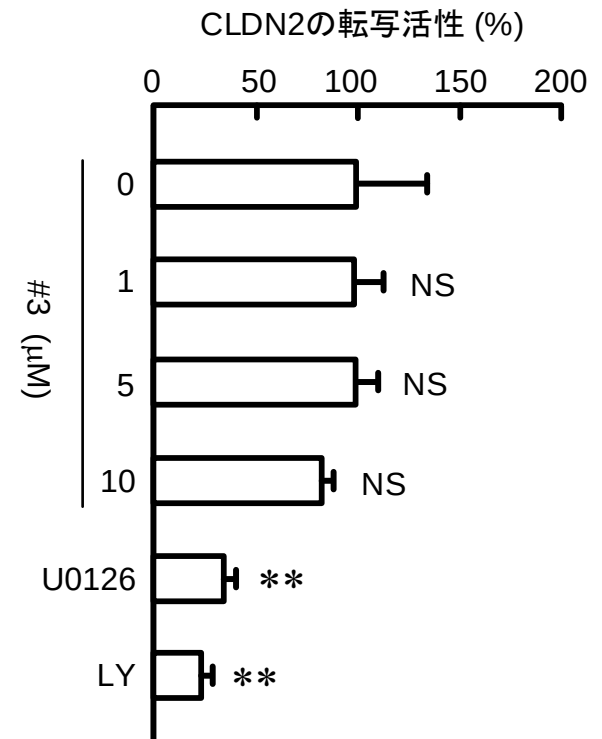
#3は、濃度・時間依存的にCLDN2のタンパク質量を低下さ、CLDN1は影響を受けなかった。また、mRNA量も変化しなかった。

シグナル伝達に対する#3の効果

ウェスタンブロット解析

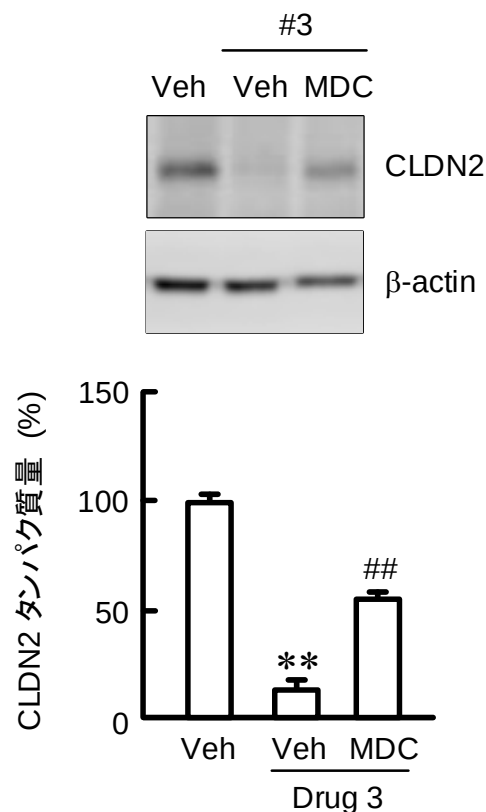


レポーター解析

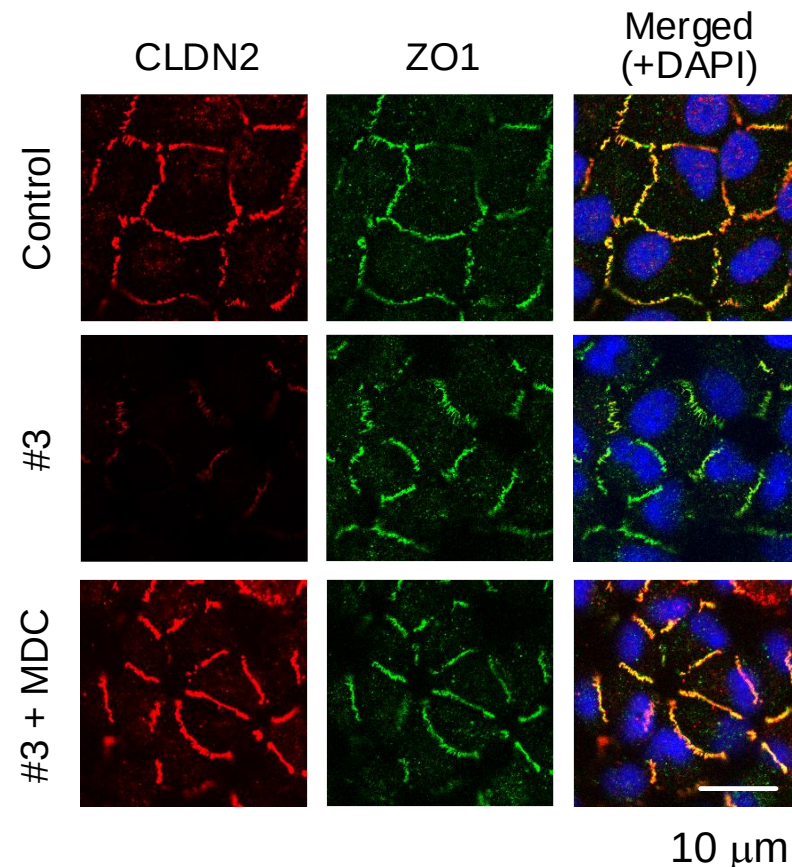


#3は、細胞内シグナル伝達因子の活性やCLDN2の転写活性を変化させなかった。

ウェスタンブロット解析



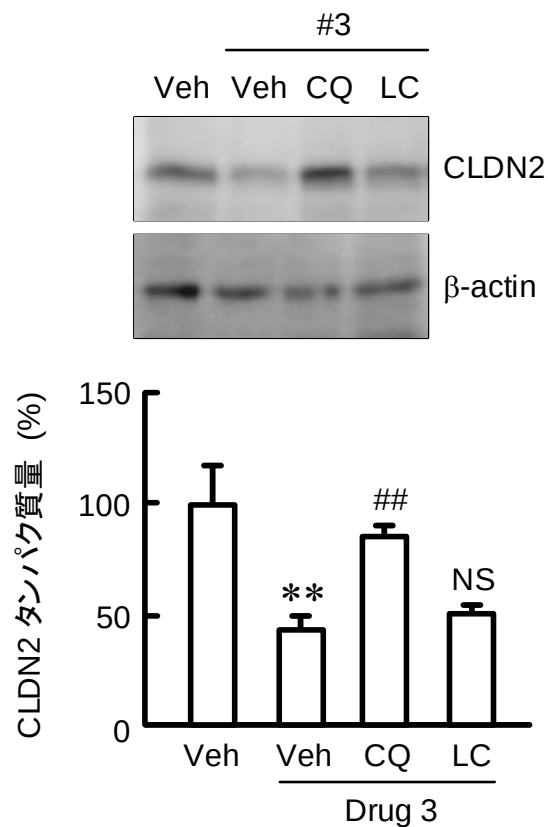
蛍光免疫染色解析



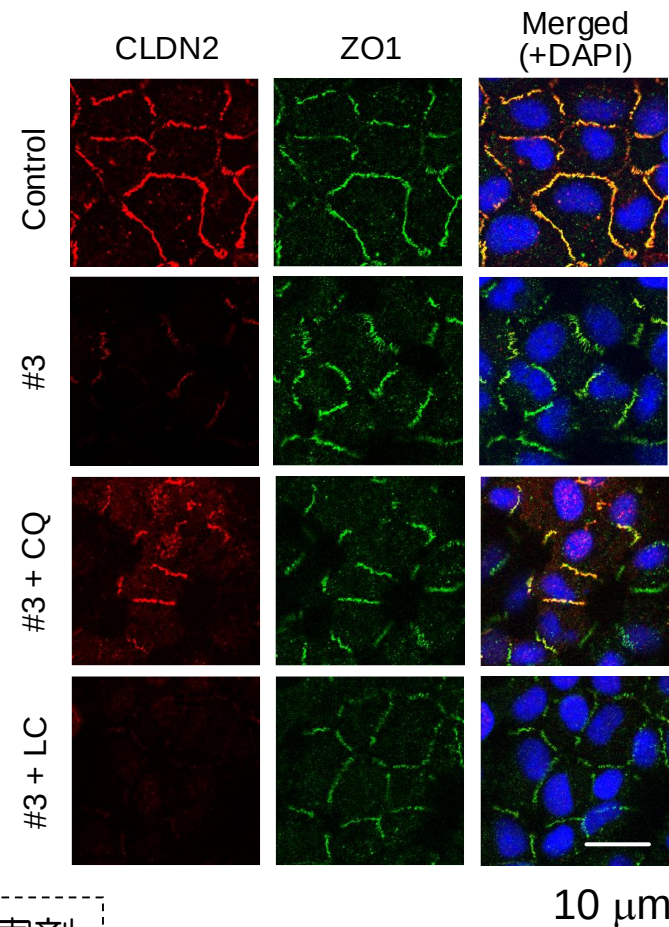
MDC：クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤

#3は、クラスリン依存性経路を介してCLDN2のエンドサイトーシスを促進する。

ウェスタンブロット解析



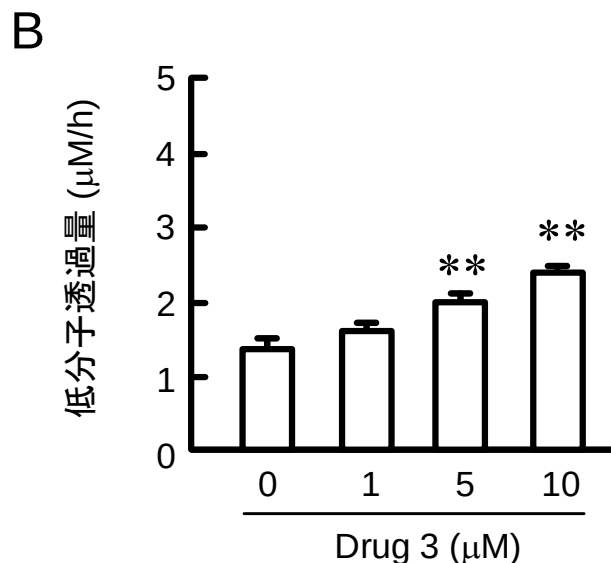
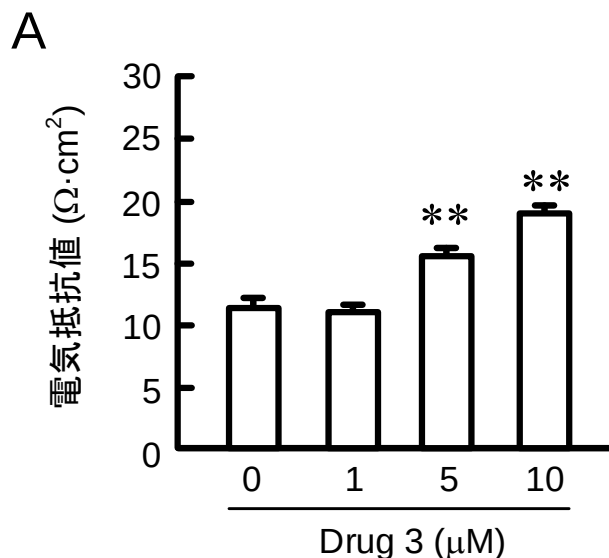
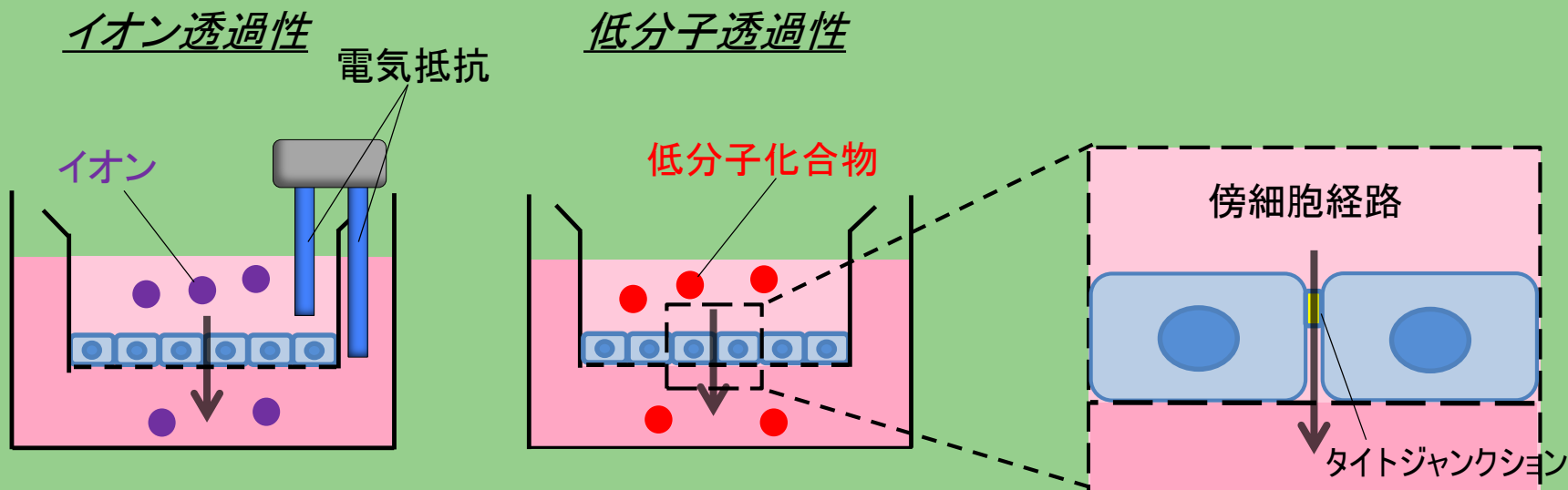
蛍光免疫染色解析



CQ : リソソーム阻害剤、LC : プロテアソーム阻害剤

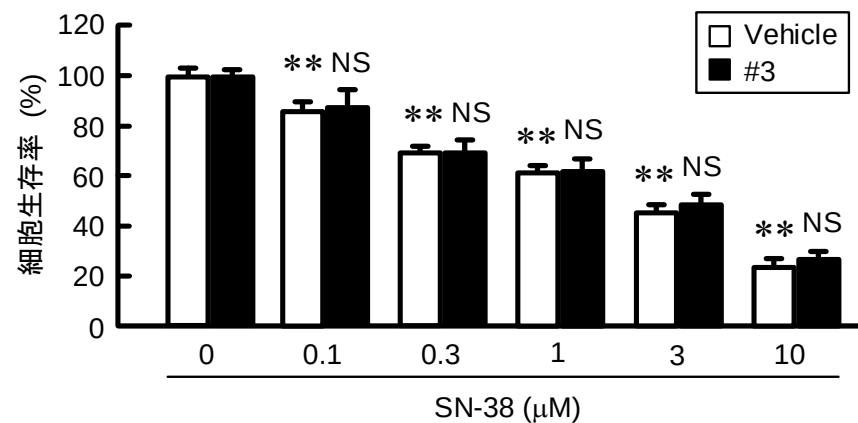
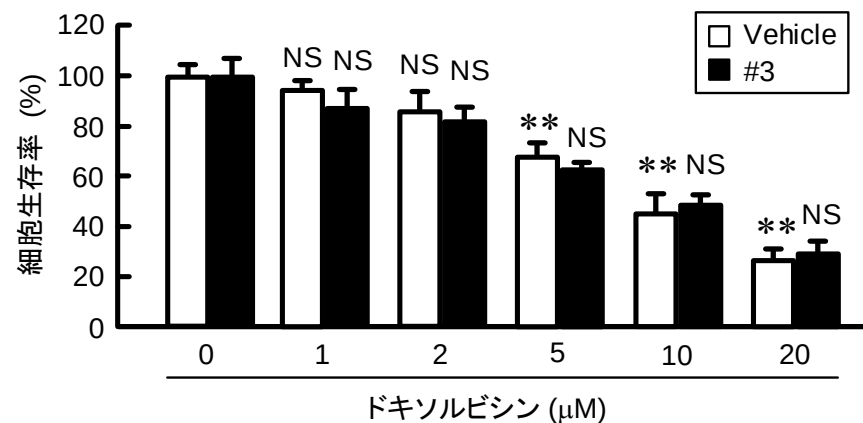
#3は、リソソームにおけるCLDN2の分解を促進する。

細胞間透過性に対する#3の効果

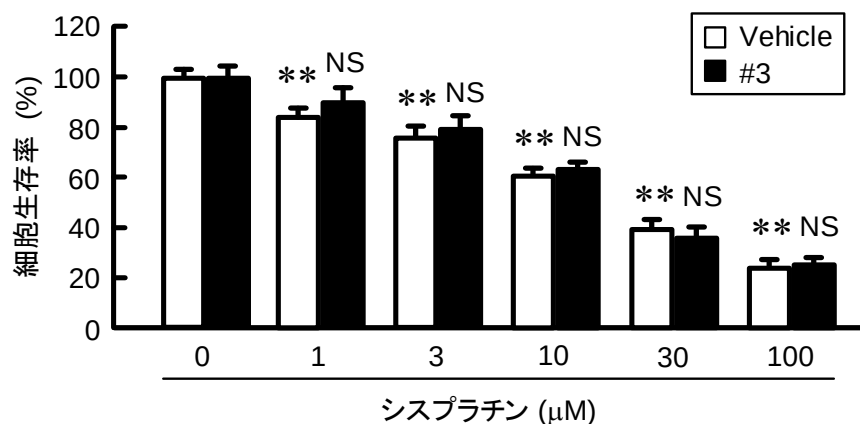


#3は、イオン透過性を低下させたが、低分子化合物の透過性を増加させた。

抗がん剤感受性 (2D)

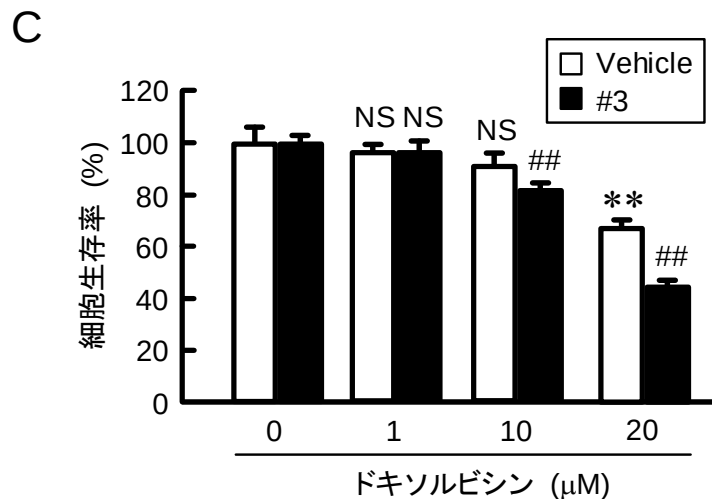
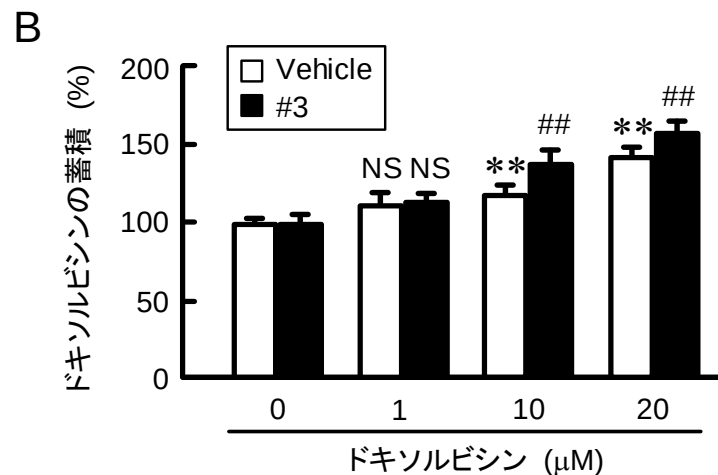
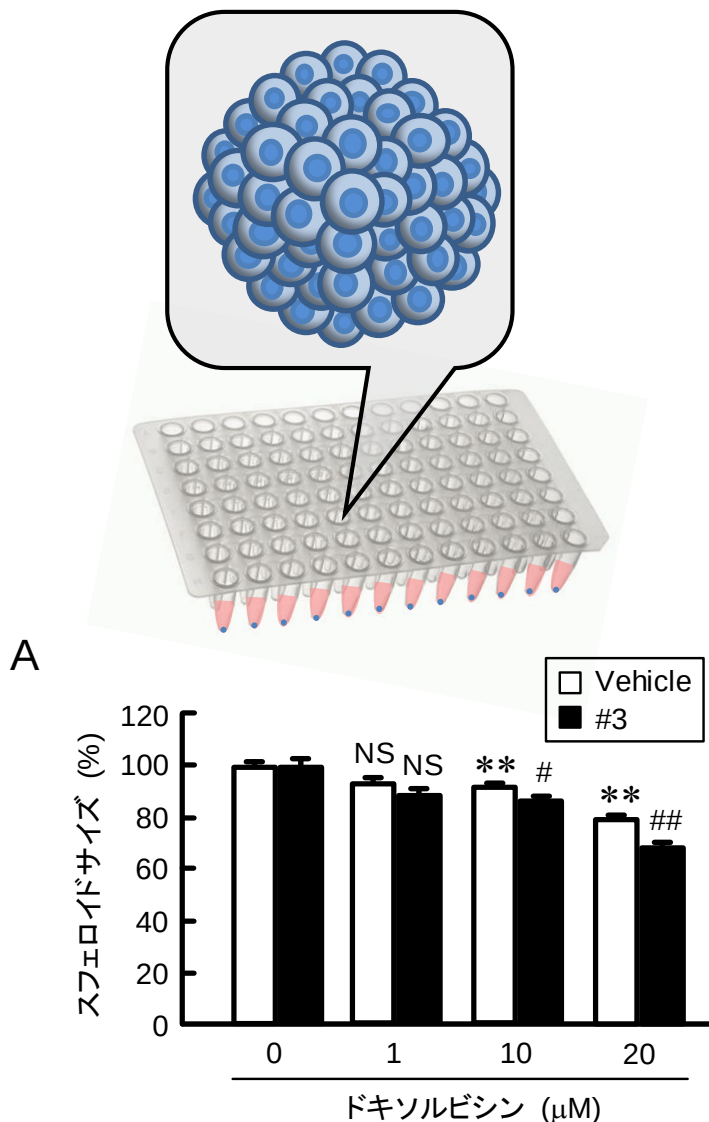


SN-38：イリノテカン活性代謝物



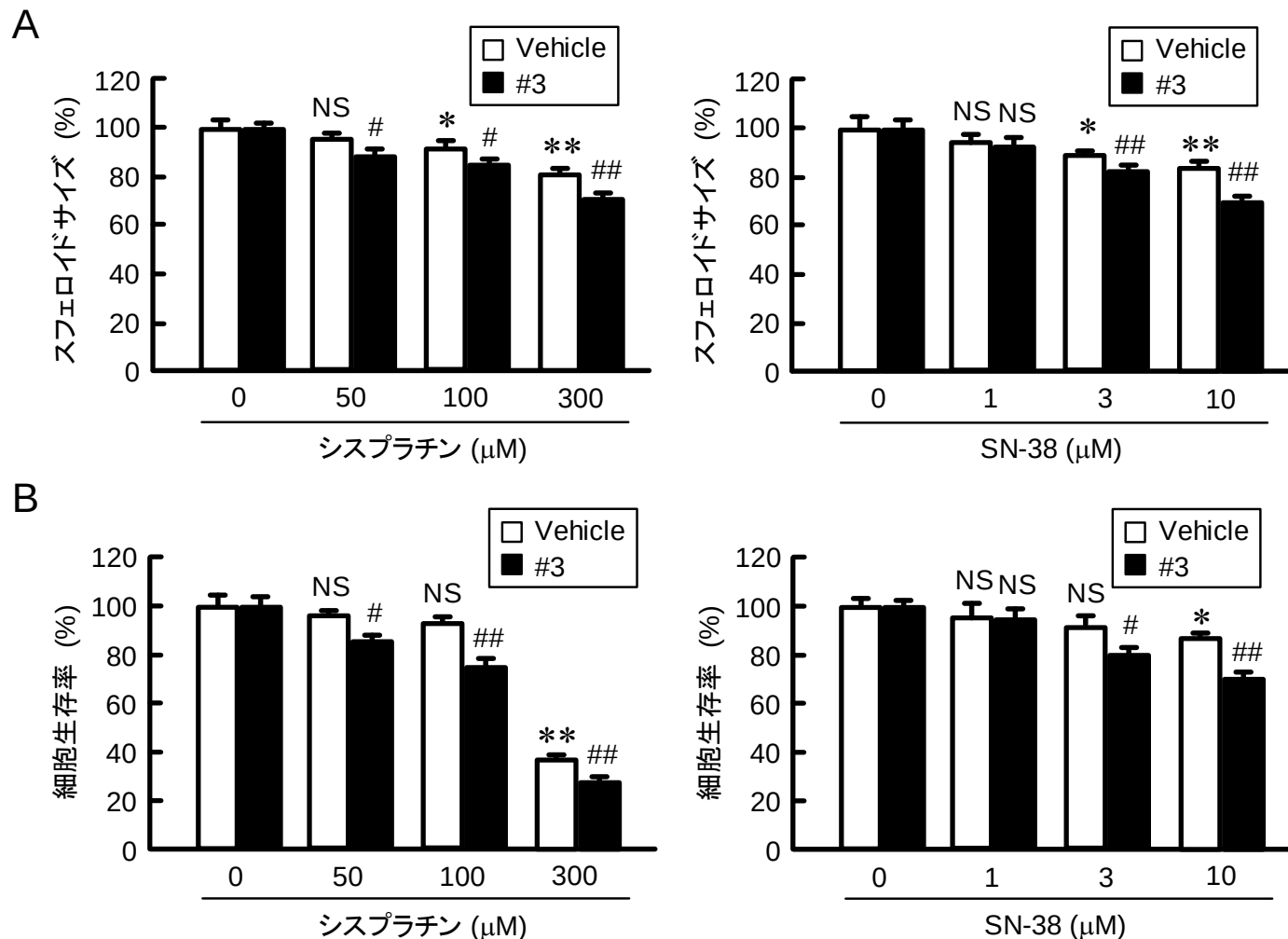
2次元培養下で、#3は抗がん剤感受性を変化させなかった。

抗がん剤感受性 (3D)



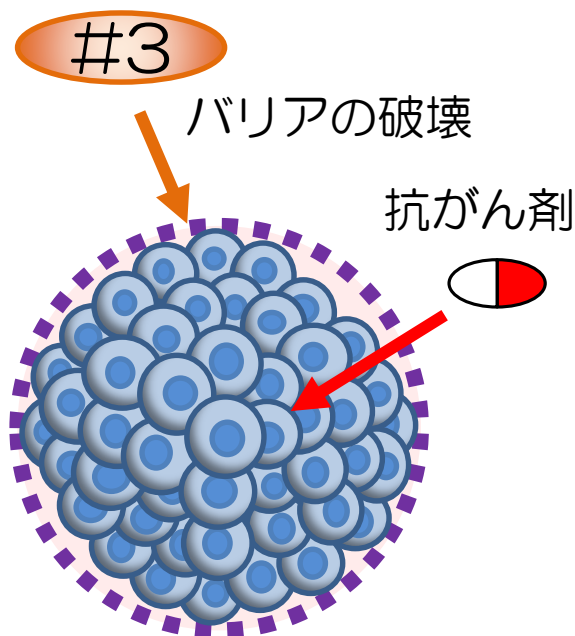
3次元培養下で、#3はドキソルビシン感受性を増強した。

抗がん剤感受性 (3D)



#3はシスプラチン、SN-38感受性も増強した。

#3の効果とメリット



効果

- ✓ 肺腺がん細胞の増殖を抑制
- ✓ 肺腺がん細胞の浸潤を抑制
- ✓ 抗がん剤感受性を亢進

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
- ✓ 免疫原性が少ない
- ✓ 細胞間を通過しやすい

CLDN2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

大腸、肝臓、食道がん組織にCLDN2が高発現する。

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

Ding L *et al.*, Cancer Man. Res. 5, 367-375 (2013)

がん再発予防薬としての利用

CLDN2は大腸がん幹葉細胞の自己複製能を促進する。

Paquet-Fifield S *et al.*, Cancer Res., 78, 2925-2938 (2018)

炎症性腸疾患への利用

潰瘍性大腸炎やクローン病患者の腸管にCLDN2が高発現する。

Luettig J *et al.*, Tissue Barriers 3, e977176 (2015)

薬や機能性食品成分の経皮吸収を促進

皮膚の表皮角化細胞の細胞間バリアは、CLDN1やCLDN4などで形成される。

Furuse M *et al.*, J. Cell Biol. 156, 1099-1111 (2002)



難吸収性薬剤の吸収改善、経口投与が難しい患者への投与

薬や機能性食品成分の腸管吸収を促進

ウェルシュ菌エンテロトキシンの受容体結合領域は腸管のCLDN4に結合し、薬剤の腸管吸収を促進する。

Kondoh M *et al.*, Mol. Pharmacol. 67, 749-756 (2005)



難吸収性薬剤の吸収改善、機能性食品成分の吸収促進

経皮吸収型製剤や経腸吸収製剤を開発製造される企業と、吸収促進剤の開発に向け、共同研究を希望。

発明の名称：抗がん剤抵抗性改善作用を有する
クロロディン-2結合性低分子化合物

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

岐阜薬科大学

事務局庶務会計課

TEL: 058-230-8100

FAX: 058-230-8200

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