

201109003A

# 複数の作用メカニズムを同時に発現する 革新的抗がん剤の開発

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

H23 - 政策探索 - 一般 - 003

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 椎名 勇

平成 24 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業（政策創薬探索研究事業）

複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 椎名 勇

平成24（2012）年 5月

## 目 次

I. 総括研究報告	
複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発 椎名 勇	1
II. 分担研究報告	
1. リダイフェンの大量合成法と抗腫瘍性活性評価に関する研究 中田健也	6
2. 新規タモキシフェン類縁体 RID-G の細胞死誘導機構に関する研究 池北雅彦	9
3. 新規タモキシフェン類縁体 RID-G の細胞内局在に関する研究 吉見陽児	12
4. 新規タモキシフェン類縁体リダイフェン-G の放射線増感効果に関する研究 森田明典	15
5. 抗がん剤リダイフェン-B の細胞死誘導機構に関する研究 長原礼宗	21
6. がん細胞パネルによる新規物質の抗がん効果判定に関する研究 矢守隆夫	23
7. リダイフェンのプロテアソーム阻害活性評価に関する研究 水上民夫	28
8. リダイフェン相互作用タンパク質同定解析に関する研究 長谷川 慎	33
9. 抗C型肝炎ウイルス活性評価に関する研究 深澤秀輔	36
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	38
IV. 研究成果の刊行物・別刷	40

平成23年度 厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業(政策創薬探索研究事業))  
総括研究報告書

複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発  
研究代表者：椎名 勇 (東京理科大学理学部教授)

研究要旨：近年、東京理科大学椎名研究室の有機合成技術によって得られる多置換芳香族化合物「リダイフェン」類にタモキシフェンの数十倍の抗腫瘍活性があることが分かり、「リダイフェン」類は新薬のシード化合物として期待されている。さらにこれまでの検討から、「リダイフェン」類は抗乳がん活性に加え、脳腫瘍、大腸がん、肺がん、メラノーマ、卵巣がん、胃がんにも作用する広範囲な抗腫瘍性を有することが明らかとなった。平成23年度(初年度)、椎名 勇は、新規3成分連結反応あるいは2成分カップリングによって「リダイフェン B」の新しい類縁体である構造改変型リダイフェン類(「リダイフェン SB (RID-SB)」シリーズ)の調製に成功し、これらの大量合成法を確立した。また、入手した化合物の機能解析を通じて従来最も活性の高かったリダイフェン B を越える作用を示す分子を発見することができた。平成24年5月1日にこの特許申請を完了し、現在は作用メカニズムの解明に向けて共同研究者が検討を続けている。中田健也は平成23年12月31日まで椎名研究室に所属し「リダイフェン」類の合成に従事した。(平成24年1月1日からは島根大学総合理工学部助教として本研究を継続している。)共同研究者である東京理科大学工学部の池北雅彦は「リダイフェン」類の細胞死誘導機構に関する研究、吉見陽児は「リダイフェン」類の細胞内局在に関する研究を行った。また、外部機関の共同研究者である広島大学原爆放射線医科学研究所の森田明典は「リダイフェン」類の放射線増感効果に関する研究、東京電機大学工学部の長原礼宗は「リダイフェン」類の細胞死誘導機構に関する研究、がん研究会がん化学療法センター分子薬理部の矢守隆夫は「リダイフェン」類の抗がん効果判定に関する研究、長浜バイオ大学バイオサイエンス学部の水上民夫は「リダイフェン」類のプロテアソーム阻害活性評価に関する研究、長谷川 慎は「リダイフェン」類の相互作用タンパク質同定解析に関する研究、国立感染症研究所生物活性物質部の深澤秀輔は「リダイフェン」類の抗C型肝炎ウイルス活性評価に関する研究をそれぞれ行い、抗がん活性発現の機序を分子生物学的な側面から探究した。

研究分担者(所属機関名及び職名)

1. 中田健也  
(島根大学総合理工学部助教)
2. 池北雅彦  
(東京理科大学工学部教授)
3. 吉見陽児  
(東京理科大学工学部助教)

4. 森田明典  
(広島大学原爆放射線医科学研究所助教)
5. 長原礼宗  
(東京電機大学工学部准教授)
6. 矢守隆夫  
(がん研究会がん化学療法センター分子薬理部  
所長補佐 兼 部長)

7. 水上民夫

(長浜バイオ大学バイオサイエンス学部教授)

8. 長谷川 慎

(長浜バイオ大学バイオサイエンス学部准教授)

9. 深澤秀輔

(国立感染症研究所生物活性物質部室長)

A. 研究目的

乳がんは最も発症率の高い腫瘍性疾患の一つであり、最近の乳がんに対する関心の高まりから啓発運動も全国で活発に展開されるようになってきている。これら性機能諸器官に特有ながんの発生は体内のホルモン分泌の異常が発端となることが多く、特に、女性の閉経後のエストロゲンの過剰生産は細胞のがん化を強く促す危険性が指摘されている。天然ステロイド系ホルモンに類似したある種のトリアリールブテン類（タモキシフェン類縁体）はエストロゲン拮抗剤として働き、乳がんや骨粗鬆症の治療薬として広く利用されている。これら人工ホルモン系薬剤の従来の合成法は多段階を要するものであったが、ごく最近我々の研究室では芳香族アルデヒド、アリル型求核剤および芳香族求核剤を組み合わせ用いる3成分連結反応を開発し、この合成法によってこれら種々の薬剤ならびにその類縁体が容易に得られることを明らかとした。特に、我々の独自の有機合成手段によって得られる「リダイフェン」類はタモキシフェンの数十倍の抗腫瘍活性を示すことが分かり、新薬のシードとして期待されている。これまで我々が行った薬理活性試験の結果から、「リダイフェン」類は抗乳がん活性に加え、脳腫瘍、大腸がん、肺がん、メラノーマ、

卵巣がん、胃がんにも作用する広範囲な抗腫瘍性を有することが明らかとなった。さらに、我々が調製した構造変換体の活性評価を進展させたところ、血管新生阻害、プロテアソーム阻害、代謝阻害活性などの特徴的な抗生物特性を発現する事象が次々と見出され、同時並列的な新しい作用メカニズムによる殺がん細胞活性を示すことも分かった。本事業においては、我々が有する独自の有機合成技術を活用して様々な「リダイフェン」類を供給し、これらの構造薬理活性相関の調査を通じて新薬のリード化合物を探索する。さらに、薬理活性を発現した新規人工抗がん剤のビオチン化を順次行ない、これらを分子プローブとして会合タンパクの同定を行なうことによって生体内での隠された作用メカニズムを解明し、革新的な分子標的型治療法の開発を最終的な目標とする。

B. 研究方法

研究代表者である東京理科大学の椎名勇は3成分連結反応あるいは2成分カップリングを用いて多種多様な「リダイフェン」類の合成を行う。特に、平成23年度（初年度）は「リダイフェン B」の新しい類縁体である構造改変型および構造欠損型リダイフェン類（「リダイフェン SB (RID-SB)」シリーズ）の調製に取り組み、前者では芳香族アルデヒド、アリル型求核剤および芳香族求核剤を組み合わせ用いる3成分連結反応、後者では芳香族化合物と炭素求核剤の2成分カップリングを用いてこれを実現する。また、入手した化合物の浮遊性ががん細胞株を用いた抗腫瘍活性試験、39系統固

形がん細胞を用いた抗腫瘍活性試験、エストロゲン非保有白血病細胞を用いた抗腫瘍活性試験、放射線併用下での抗腫瘍活性試験、プロテアソーム阻害活性試験、抗C型肝炎ウイルス活性試験、抗がん剤候補化合物の細胞内標的分子の探索を並列して実施する。

#### (倫理面への配慮)

改変型タンパク質の作製に関しては、遺伝子組換え実験実施の申請を行ない、大学の当該委員会の承認を得ている。遺伝子組換え生物使用等の規制による生物多様性の確保に関わる法律に準じて研究を実施している。代謝ラベル化実験に関しては、RI施設の利用に必要な教育訓練を受講し、放射線業務従事者として登録を行なった。利用に際しては放射線取扱に関わる法令を遵守して研究を実施している。

#### C. 研究結果

平成23年度(初年度)は当初の予定通り研究が進展し、「リダイフェンB」の新しい類縁体である構造改変型リダイフェン類(「リダイフェンSB (RID-SB)」シリーズ)を大量に製造することに成功した。本合成研究の内、前者では芳香族アルデヒド、アリル型求核剤および芳香族求核剤を組み合わせ用いる3成分連結反応、後者では芳香族化合物と炭素求核剤の2成分カップリングを活用した。また、入手した化合物の浮遊性がん細胞株を用いた抗腫瘍活性試験、39系統固形がん細胞を用いた抗腫瘍活性試験、およびエストロゲン非保有白血病細胞を用いた抗腫瘍活性試験を実施したところ、これまで最も活性の高かったリダイフェン

Bを越える作用を示す分子を発見することができた。平成24年5月1日に本研究内容の一部の特許申請を完了し、現在は作用メカニズムの解明に向けて共同研究者が検討を続けている。

#### D. 考察

「リダイフェンB」の新しい類縁体である構造改変型および構造欠損型リダイフェン類(「リダイフェンSB (RID-SB)」シリーズ)の抗腫瘍性能を明らかとするため、新規3成分連結反応あるいは2成分カップリングを用いてRID-SB9、RID-SB10、RID-SB17、RID-SB18、RID-SB22、RID-SB23、RID-SB24、RID-SB25、RID-SB26、RID-SB27、RID-SB28を合成し、WST-8法によりこれらの細胞傷害性評価を行った。構造上の特徴として、上記類縁体はRID-SB9<RID-SB10<RID-SB22<RID-SB23<RID-SB17<RID-SB24<RID-SB25<RID-SB26<RID-SB27<RID-S28<RID-SB18の順に側鎖の炭素鎖を伸長した構造を有している。検討の結果から側鎖の炭素数が1であるRID-SB9は高い細胞傷害性を示さないが、側鎖の炭素数が2から6であるRID-SB10、RID-B-SB22、RID-SB23、RID-SB17、RID-SB24は良好な細胞傷害性を持つことが分かった。特に、RID-SB10、RID-B-SB22、RID-SB23、RID-SB17はこれまで最も高活性であったリダイフェンBよりも強い抗腫瘍性を示すことが明らかとなった。一方、側鎖の炭素数が6であるRID-SB24はリダイフェンBと同等の活性を示し、側鎖の炭素数が7以上のRID-SB25、RID-SB26、RID-SB27、RID-SB28、RID-SB18にかけて

は徐々に細胞傷害能が低下することを明らかとした。

## E. 結論

今回我々は新規 3 成分連結反応、あるいは 2 成分カップリングによって「リダイフェン B」の新しい類縁体である構造改変型リダイフェン類（「リダイフェン SB (RID-SB)」シリーズ）の調製に成功し、これらを大量に供給する手段を確立した。本合成研究の内、中田健也は平成 23 年 12 月 31 日まで椎名研究室に所属し「リダイフェン」類の合成に従事した。（平成 24 年 1 月 1 日からは島根大学総合理工学部助教として本研究を継続している。）また、入手した化合物の浮遊性がん細胞株を用いた抗腫瘍活性試験、39 系統固形がん細胞を用いた抗腫瘍活性試験、およびエストロゲン非保有白血病細胞を用いた抗腫瘍活性試験を実施したところ、これまで最も活性の高かったリダイフェン B を越える作用を示す分子を発見することができた。さらに作用メカニズムの解明に向け、共同研究者である東京理科大学理工学部の池北雅彦は「リダイフェン」類の細胞死誘導機構に関する研究、吉見陽児は「リダイフェン」類の細胞内局在に関する研究を行った。また、外部機関の共同研究者である広島大学原爆放射線医科学研究所の森田明典は「リダイフェン」類の放射線増感効果に関する研究、東京電機大学理工学部の長原礼宗は「リダイフェン」類の細胞死誘導機構に関する研究、がん研究会がん化学療法センター分子薬理部の矢守隆夫は「リダイフェン」類の抗がん効果判定に関する研究、長浜バイオ

大学バイオサイエンス学部の水上民夫は「リダイフェン」類のプロテアソーム阻害活性評価に関する研究、長谷川 慎は「リダイフェン」類の相互作用タンパク質同定解析に関する研究、国立感染症研究所生物活性物質部の深澤秀輔は「リダイフェン」類の抗 C 型肝炎ウイルス活性評価に関する研究をそれぞれ行い、抗がん活性発現の機序を分子生物学的な側面から探究した。以上の共同研究の詳細は、各々の分担研究報告書に詳細が記述されているので参照されたい。

## F. 健康危険情報

現状では本研究を遂行するにあたって健康上の危険は見当たらず、また共同研究者からも健康危険情報は特に入っていない。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) Anlifeire, A.; Hatori, M.; Morita, A.; Shiina, I.; Nakata, K.; Tosaki, Y.; Wang, Y.-W.; Ikekita, M.; Li, G. Ridaiifen-G Induces Caspase-independent Atypical Cell Death Chinese; *Journal of Cell Biology* **2011**, *33*, 635–644.

### 2. 学会発表

(1) 安田ゆかり・中田健也・梅田絵梨・王エンブン・椎名 勇・佐々木隆造・水上民夫・長谷川 慎; タモキシフェン誘導体のプロテアソーム阻害作用の評価 (P-073); 日本ケミカルバイオロジー学会 第 6 回年会; 東京工業大学 大岡山キャンパス (2011 年 5 月 24 日)

(2) 中田健也・椎名 勇；アリルスズを求核剤とする三成分連結反応と構造欠損型タモキシフェンの合成；第15回日本がん分子標的治療学会学術集会；ホテル日航東京（2011年6月24日）

(3) Isamu Shiina, Kenya Nakata; Effective Synthesis of Artificial Estrogen-type Anti-tumor Agents, Tamoxifen and Other New Derivatives Using Three-component Coupling Reaction; International Symposium on Technologies against Cancer 2011 (ISTC 2011), タワーホール船堀（2011年9月1-2日）

(4) 吉見陽児・羽鳥麻奈美・友光裕子・船越絢香・戸田年総・山本 卓・中田健也・梅田絵梨・王エンブン・椎名 勇・池北雅彦；新規タモキシフェン類縁体 Ridaifen に親和性を有するタンパク質の同定；第36回日本医用マススペクトル学会年会；ホテル阪急エキスポパーク（2011年9月15-16日）

#### H. 知的財産の出願・登録状況

（予定も含む。）

##### 1. 特許取得

(1) 産業財産権の名称：新規化合物及びその製造方法並びに抗がん剤

発明者：東京理科大 椎名勇、中田健也／がん研究会 矢守隆夫

権利者：東京理科大学(70%)、がん研究会(30%)

産業財産権の種類、番号：特願 2012-087973

出願年月日：2012年4月6日

国内・国外の別：国内（PCT 移行予定）

(2) 産業財産権の名称：新規化合物及びその製造方法並びに抗がん剤

発明者：東京理科大 椎名勇、中田健也／

東京電機大学 長原礼宗／がん研究会 矢守隆夫

権利者：東京理科大学(50%)、東京電機大学(30%)、がん研究会(20%)

産業財産権の種類、番号：特願 2012-10476

出願年月日：2012年5月1日

国内・国外の別：国内（PCT 移行予定）

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



平成23年度 厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業(政策創薬探索研究事業))  
分担研究報告書

複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発  
研究代表者：椎名 勇 (東京理科大学理学部教授)

分担研究課題名：リダイフェンの大量合成法と抗腫瘍性活性評価に関する研究

研究分担者：中田健也 (島根大学総合理工学研究科助教)

#### 研究要旨

複数の芳香環を有する四置換オレフィン類は選択的エストロゲンレセプター調整因子(SERM<sub>s</sub>)として体内で作用することが知られており、特に、タモキシフェンは抗エストロゲン作用により乳がん細胞の異常増幅を阻害する有効な第一候補薬剤として世界的に広く用いられている。今回、本研究者は独自に開発した芳香族アルデヒド、アリルシランおよびアニソールの3成分縮合体反応を活用して疑似的な対称性を有するタモキシフェンの類縁体を調製し、それらの抗腫瘍性能をヒト癌細胞スクリーニング(JFCR 39)を用いて評価した。その結果、いずれの場合もタモキシフェンと同等の細胞増殖阻害活性を有することを明らかとした。さらに、これらは既存のSERM<sub>s</sub>とは異なる新規作用メカニズムを発現している可能性が見出された。

#### A. 研究目的

タモキシフェンは選択的エストロゲン受容体調整剤(SERM<sub>s</sub>)の一つであり、抗エストロゲン作用により乳がん細胞の異常増幅を阻害する有効な薬剤として広く使用され、現在この構造を改良したSERM関連化合物が世界的に汎用されるに至っている。このような背景のもと、最近、本研究者は独自に開発した多成分連結反応を用いるタモキシフェンならびにそれら類縁体の短工程合成法を確立した。今回、この手法の有用性を示すとともに新規な抗がん剤の創出を目的として、多彩な疑似的な対称性を有するタモキシフェン誘導体を合成し、その抗腫瘍性能をヒト癌細胞スクリーニング

(JFCR 39)を用いて評価することとした。

#### B. 研究方法

近年、本研究者は芳香族アルデヒド、アリルトリメチルシラン、ならびに芳香族求核剤をルイス酸触媒の存在下で混合したところ、対応するジアリールプテン類が高収率で得られることを見いだした。続いてこの鍵中間体に対して塩基触媒を作用させると、目的の主骨格を有するタモキシフェンが調製でき、最後に対応する側鎖を導入することでタモキシフェンの短工程での効率的な合成を達成した。本研究課題では同様の手法を用いて疑似対称型タモキシフェンの基本骨格を構築した後、様々な構造を有する側鎖部位を導入し、その構造活性相

関を体系的に調査することで特徴ある抗腫瘍活性化化合物の創製を図った。

#### (倫理面への配慮)

本研究者は有機合成化学を基盤として目的化合物の設計、合成を主な研究分担としているため該当しない。

#### C. 研究結果

ルイス酸触媒の存在下で芳香族アルデヒド、シンナミルシランおよびアニソールを混合したところ、対応するジアリールブテン類が効率良く得られた。この分子を鍵化合物とし、種々の側鎖を有する疑似対称型タモキシフェン類を高収率で調製した。次いで、本研究協力者らによってこれらを用いたヒト白血病 HL-60 細胞、ならびに JFCR 39 スクリーニングが実施されたところ、がん細胞のエストロゲンレセプターへの介在によらず、いずれの場合も同等の細胞増殖阻害活性を有することが明らかとなり、既存の SERMs とは異なる新規作用メカニズムを発現している可能性が示唆された。

#### D. 考察

薬理活性試験の結果から、従来の SERMs の特徴として考えられていた抗乳がん活性に加えて、今回合成したある種の疑似対称型タモキシフェンは、既存の SERMs とは異なる作用メカニズムを発現している可能性が示された。したがって、さらに構造変換を施すことにより、より特徴的な分子生物科学的性質を発現する事象が見い出されると期待できる。

#### E. 結論

多成分縮合反応による疑似対称型タモキシフェン誘導体の迅速合成による新規

SERM 類の簡便な合成設計が実現できた。抗腫瘍性活性評価より新規な作用機序の発現が見出された。この方法により微細構造の異なる種々の疑似ホルモン剤が短工程で得られるため、多彩な乳がん治療薬の調製が容易に行えるものと考えられる。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Anlifeire, A.; Hatori, M.; Morita, A.; Shiina, I.; **Nakata, K.**; Tosaki, Y.; Wang, Y.-W.; Ikekita, M.; Li, G. Ridaifen-G Induces Caspase-independent Atypical Cell Death Chinese; *Journal of Cell Biology* 2011, 33, 635-644.

##### 2. 学会発表

(1) 安田ゆかり・**中田健也**・梅田絵梨・王エンブン・椎名 勇・佐々木隆造・水上民夫・長谷川 慎; タモキシフェン誘導体のプロテアソーム阻害作用の評価 (P-073); 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会; 東京工業大学 大岡山キャンパス (2011年5月)  
(2) **中田健也**・椎名 勇; アリルスズを求核剤とする三成分連結反応と構造欠損型タモキシフェンの合成; 第15回日本がん分子標的治療学会学術集会; ホテル日航東京 (2011年6月)

(3) Isamu Shiina, **Kenya Nakata**; Effective Synthesis of Artificial Estrogen-type Anti-tumor Agents, Tamoxifen and Other New Derivatives Using Three-component Coupling Reaction; International Symposium on Technologies against Cancer 2011 (ISTC 2011), タワーホール船堀 (2011年9月)

(4) 吉見陽児・羽鳥麻奈美・友光裕子・船越絢香・戸田年総・山本 卓・中田健也・梅田絵梨・王エンブン・椎名 勇・池北雅彦；新規タモキシフェン類縁体Ridaiifenに親和性を有するタンパク質の同定；第36回日本医用マススペクトル学会年会；ホテル阪急エキスポパーク（2011年9月）

#### H. 知的財産の出願・登録状況

（予定も含む。）

##### 1. 特許取得

(1) 産業財産権の名称：新規化合物及びその製造方法並びに抗がん剤

発明者：東京理科大 椎名勇、中田健也／東京電機大学 長原礼宗／がん研究会 矢守隆夫

権利者：東京理科大学(50%)、東京電機大学(30%)、がん研究会(20%)

産業財産権の種類、番号：特願 2012-10476

出願年月日：2012年5月1日

国内・国外の別：国内（PCT 移行予定）

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

平成23年度 厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業 (政策創薬探索研究事業))  
分担研究報告書

複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発  
研究代表者：椎名 勇 (東京理科大学理学部教授)

分担研究課題名：新規タモキシフェン類縁体 RID-G の細胞死誘導機構に関する研究  
研究分担者：池北雅彦 (東京理科大学理工学部教授)

研究要旨

新規に合成されたタモキシフェン類縁体のうち、特に RID-G と命名された化合物に見出された強い細胞死誘導の分子機構の解明は新しい抗がん剤の開発のブレイクスルーとなると期待される。本研究では RID-G による細胞死の作用点となるタンパク質分子が存在すると仮定して RID-G と親和性のある分子の探索を試みた。特に RID-G による細胞死が抗アポトーシス分子 Bcl-2 の過剰発現によって抑制されないことに注目し、Bcl-2 ファミリー分子と RID-G との親和性を念頭に置いた解析を行った。また、Bcl-2 ファミリー分子はミトコンドリアに局在することから、RID-G による細胞死におけるミトコンドリアの関与についてミトコンドリア数を減少させた細胞を用いた検討を実施した。

A. 研究目的

新規に合成されたタモキシフェン類縁体のうち、特に RID-G と命名された化合物に強い細胞死誘導活性が見出された。RID-G による細胞死誘導は、1)ミトコンドリアの膜電位を低下させるが、2)カスパーゼの阻害剤により抑制されない、3)抗アポトーシス分子 Bcl-2 の過剰発現によっても抑制されないという既知の作用機序とは異なる興味深い特徴を示す。そのため RID-G の細胞死誘導の分子機構の解明は新しい抗がん剤の開発に寄与するものと期待される。

RID-G により誘導される細胞死に RID-G に特異的に結合する分子が関与しており、その分子が細胞死を誘導する引き金となっていると考え、本研究では RID-G による細胞死が抗アポトーシス分子 Bcl-2 の過剰発

現によっても抑制されない点に注目し Bcl-2 ファミリーと呼ばれるアポトーシスの制御分子と RID-G との相互作用の有無について定性的な検討を行うことを目的とした。実際に Bcl-2 の阻害剤が新しいタイプの抗がん剤として注目されており RID-G も同様な作用を有する可能性がある。

B. 研究方法

HeLa 細胞溶解液を RID-G を固定した担体を充填したカラムに供し、カラムに保持された画分中に Bcl-2 ファミリー分子が存在しているか否かについて Bcl-2 ファミリーに対する抗体を用いたウエスタンブロットを行い解析した。特に Bcl-2、Bcl-xL、Bax、Bak および Mcl-1 の 5 分子を対象とした。また、エチジウムブロマイド処理によりミトコンドリア数を減じた細胞に RID-G を

作用させ、その細胞死誘導能を通常の細胞と比較することで RID-G により誘導される細胞死へのミトコンドリアの関与について併せて検討した。

#### (倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたって、相手方の同意・協力を必要とする研究、個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究、生命倫理・安全対策に対する取り組みを必要とする研究など法令等に基づく手続きが必要な研究は含まれない。また、改変型タンパク質の作製に関しては、遺伝子組換え実験実施の申請を行ない、大学の当該委員会の承認を得て、遺伝子組換え生物使用等の規制による生物多様性の確保に関わる法律に準じて研究を実施した。

#### C. 研究結果

検討した Bcl-2 ファミリーのうち Bcl-2 と Bax は RID-G アフィニティーカラムに強い相互作用を示した。Bcl-xL とは弱い親和性が認められた。Bak と Mcl-1 との反応は認められなかった。RID-G の類縁体 RID-B を用いて行った実験では、RID-G と RID-B はこれらの Bcl-2 ファミリー分子に対して同一の結合プロファイルを示した。また、ミトコンドリア数を減少させた細胞は RID-G による細胞死誘導に対して抵抗性を示す傾向が認められた。

#### D. 考察

RID-G が親和性を示した分子 Bcl-2、Bax および Bcl-xL はそれぞれアポトーシスに対してはそれぞれ抑制、促進および抑制的に働く分子とされる。また、結合が認められなかった Mcl-1 と Bak はそれぞれアポトーシスの抑制および促進分子とされる。従っ

て、RID-G は必ずしもアポトーシス抑制分子とのみ結合する訳ではなく、現時点では Bcl-2 ファミリー分子への RID-G の結合性に統一的な解釈を与えることは難しい。また、Bcl-2 ファミリー分子内での相互作用も存在することを考慮する必要もある。ここで試されていない Bcl-2 ファミリー分子 (BCL2L2 など) についても同様の解析を行った後に結論を出したい。ミトコンドリア数を減じた細胞を用いた実験では RID-G による細胞死誘導にミトコンドリアが関与していることが示唆される。しかしながら、RID-G による細胞死はカスパーゼの関与なしに誘導されていると考えられることから、ミトコンドリアを介したカスパーゼ非依存的な細胞死の経路が働いていることが予想される。Bcl-2 はベクリンを介したオートファジーを阻害することが知られており、今後は Bcl-2 ファミリー分子とオートファジーとの関わりを視野にいたした研究を実施する必要があると思われる。

#### E. 結論

RID-G は Bcl-2 と Bax および Bcl-xL と相互作用することが示唆された。RID-G による細胞死はミトコンドリアを介するが、カスパーゼ非依存的であると考えられることから、RID-G が誘導する細胞死は Bcl-2 ファミリー分子を介したオートファジーと関わる可能性がある。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Ridaifen-G Induces Caspase-independent Atypical Cell Death. Anniwaer Anlifeire1, Manami Hatori, Akinori Morita, Isamu Shiina, Kenya Nakata, Yu-Ta Tosaki,

Yan-Wen Wang, Masahiko Ikekita, Guan Li  
 Chinese Journal of Cell Biology, 33(6)  
 pp 635-644, 2011

## 2. 学会発表

第84回日本生化学会大会「新規細胞死誘導剤リダイフェン-Gの薬物標的分子の同定」

## H. 知的財産の出願・登録状況

(予定も含む。)

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

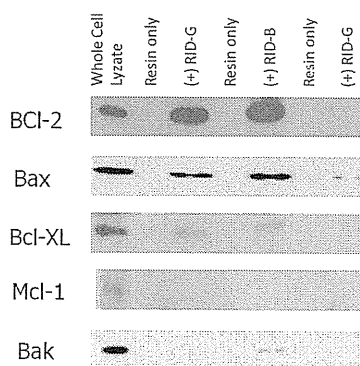
なし

### 3. その他

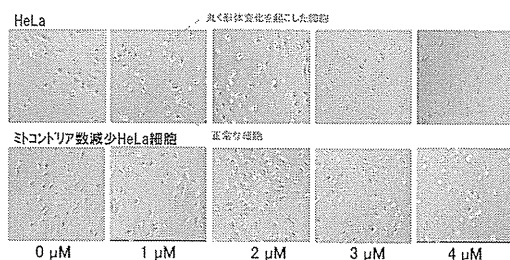
特記事項なし

## Figures

### RID-G親和性画分中のBcl-2ファミリー分子の検出

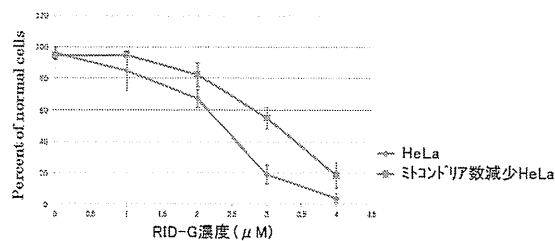


### ミトコンドリア数減少細胞のRID-Gに対する感受性評価



RID-G: 0, 1, 2, 3, 4 μM, 4 hours

### ミトコンドリア数減少細胞のRID-Gに対する感受性評価



平成23年度 厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業(政策創薬探索研究事業))  
分担研究報告書

複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発  
研究代表者：椎名 勇(東京理科大学理学部教授)

分担研究課題名：新規タモキシフェン類縁体 RID-G の細胞内局在に関する研究  
研究分担者：吉見陽児(東京理科大学理工学部助教)

研究要旨

新規に合成されたタモキシフェン類縁体のうち、特に RID-G と命名された化合物に見出された強い細胞死誘導の分子機構の解明は新しい抗がん剤の開発のブレイクスルーとなると期待される。本研究では RID-G による細胞死を特に細胞内小器官の関与という切り口で解析し、細胞内に取り込まれた RID-G がいずれの細胞内小器官に蓄積するのかを明らかにすることとした。細胞死に深く関与していることが知られるミトコンドリア、リソソームへの局在について焦点を当て、その特異的マーカーと蛍光標識 RID-G を用い共焦点顕微鏡による画像解析により RID-G の細胞内局在の解析を行った。

A. 研究目的

新規に合成されたタモキシフェン類縁体のうち、特に RID-G と命名された化合物に強い細胞死誘導活性が見出された。RID-G による細胞死誘導は、1)ミトコンドリアの膜電位を低下させるが、2)カスパーゼの阻害剤により抑制されない、3)抗アポトーシス分子 Bcl-2 の過剰発現によっても抑制されないという既知の作用機序とは異なる興味深い特徴を示す。そのため RID-G の細胞死誘導の分子機構の解明は新しい抗がん剤の開発に寄与するものと期待される。細胞内に取り込まれた RID-G の細胞内局在を明らかにすることは RID-G の作用点を絞り込む上で有力な情報を与えるとの考えに基づき、本研究では RID-G による細胞死を特に細胞内小器官の関与という切り口で解析し、細胞内に取り込まれた RID-G が

いずれの細胞内小器官に蓄積するのかを明らかにすることを目的とした。RID-G が細胞内に取り込まれ蓄積することを確認した後、細胞死に深く関与していることが知られるミトコンドリア、リソソームへの局在について焦点を当て解析を行うものとした。

B. 研究方法

ビオチン標識した RID-G を HeLa 細胞に一定時間作用させたのち細胞を固定し、蛍光標識したストレプトアビジン処理することにより RID-G の細胞分布を蛍光で表した。この蛍光を共焦点レーザー蛍光顕微鏡により観察し RID-G の細胞への経時的な取り込みと最適な RID-G の処理時間を検討した。引き続き、ミトコンドリアおよびリソソームをその特異的マーカー(マイトトラックター、抗 HSP-60 抗体および抗 LAMP-1 抗体)で染色し共焦点顕微鏡によ

る画像解析により RID-G の分布とこれらの細胞内小器官への局在を比較解析した。

#### (倫理面への配慮)

本研究を遂行するにあたって、相手方の同意・協力を必要とする研究、個人情報の取り扱いの配慮を必要とする研究、生命倫理・安全対策に対する取り組みを必要とする研究など法令等に基づく手続きが必要な研究は含まれない。また、改変型タンパク質の作製に関しては、遺伝子組換え実験実施の申請を行ない、大学の当該委員会の承認を得て、遺伝子組換え生物使用等の規制による生物多様性の確保に関わる法律に準じて研究を実施した。

#### C. 研究結果

RID-G は MTT アッセイにより細胞死誘導が認められる濃度(約 3~4  $\mu$ M)より低い濃度(1  $\mu$ M)で細胞内に取り込まれ、およそ 1 時間という短時間に細胞内へ蓄積され特徴的なドット状の染色像を与えることが示された。また、マイトトラッカーおよび抗 HSP-60 抗体によるミトコンドリアの染色像との比較では RID-G はミトコンドリアと異なる領域に局在していた。抗 LAMP-1 抗体を用いたリソソームとの局在の比較でも RID-G はリソソームとは異なる領域に蓄積していることが示された。

#### D. 考察

RID-G が低濃度で短時間に細胞内にドット状に蓄積することが確認された。恐らく蓄積部位では生理機能に何らかの影響が生じていることが推測される。時間的に早い段階で蓄積が観察されることから、この蓄積がストレスとなることが引き金となり細胞死を誘導している可能性も考えられる。

また、RID-G の蓄積部位はタイプ I 型の細胞死(アポトーシス)で重要な役割を果たすミトコンドリアやタイプ II 型の細胞死(オートファジー)での役割が注目されるリソソームとは異なっており、これらの細胞内小器官は直接の作用点でないようにも思われる。しかしながら、ミトコンドリアやリソソームを経由後にそれらとは異なる領域に蓄積している可能性もあることから、作用点と蓄積部位の関係についての議論は蓄積部位の特定を待ってからなされるべきである。現時点では次の候補としてオートファゴソームあるいは初期エンドソームへ局在していることを想定し、引き続きこれらの細胞内小器官への局在を解析する考えである。

#### E. 結論

RID-G は細胞死誘導が認められる濃度より低い濃度で細胞内に取り込まれ、およそ 1 時間という短時間に細胞内へ蓄積され特徴的なドット状の染色像を与えた。また、細胞内に取り込まれた RID-G はミトコンドリアあるいはリソソームとは異なる分布を示した。RID-G の蓄積部位を特定すべく、引き続きオートファゴソームあるいは初期エンドソームへの局在の有無について解析を進めたい。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

第 84 回日本生化学会大会「新規細胞死誘導剤リダイフェン-G の薬物標的分子の同定」

#### H. 知的財産の出願・登録状況



(予定も含む。)

1. 特許取得

なし

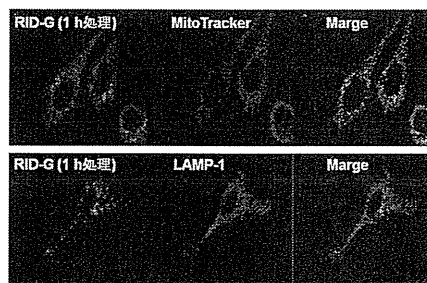
2. 実用新案登録

なし

3. その他

特記事項なし

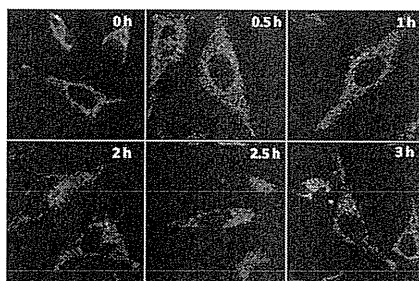
RID-Gの細胞内局在  
リソソーム, ミトコンドリアマーカーとの共染色



細胞: HeLa, RID-G: 1  $\mu$  M, 1 hour

Figures

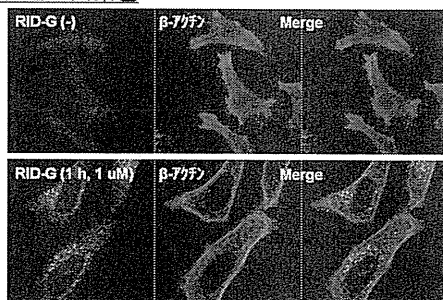
RID-Gの細胞内への取り込み(経時変化)  
ミトコンドリアマーカーとの共染色



緑: RID-G

細胞: HeLa, RID-G: 1  $\mu$  M 赤: hsp60 (ミトコンドリアマーカー)

RID-Gの細胞内への取り込み  
 $\beta$ -アクチンとの共染色



細胞: HeLa, RID-G: 1  $\mu$  M, 1 hour

平成23年度 厚生労働科学研究費補助金  
(創薬基盤推進研究事業(政策創薬探索研究事業))  
分担研究報告書

複数の作用メカニズムを同時に発現する革新的抗がん剤の開発  
研究代表者: 椎名 勇 (東京理科大学理学部教授)

分担研究課題名: 新規タモキシフェン類縁体リダイフェン-G の放射線増感効果に関する研究  
研究分担者: 森田 明典 (広島大学原爆放射線医科学研究所助教)

#### 研究要旨

タモキシフェン類縁体リダイフェン (RID) は、研究代表者らによって開発された擬似対称型タモキシフェンの迅速合成法 (三成分連結法) を用いて合成された一連の新規化合物である。39 種のヒト培養癌細胞を用い、合成した RID-B, D, G, H の増殖抑制効果を検討したパネルアッセイでは、その作用スペクトラムからいずれも既存の抗癌剤にない新規の作用機序が期待された。また、東京理科大学工学部応用生物科学科の池北研究室を中心とする研究分担者グループにおいて、RID-G の誘導する細胞死が、典型的なアポトーシスとは異なるカスパーゼ非依存性の細胞死であり、ミトコンドリア活性の顕著な低下を伴うことが報告されていた (G. 1. 論文発表 文献[1])。さらに、アミノ基ラベル RID-G を CNBr 活性化セファロースに結合させ、細胞可溶化液から結合分子のアフィニティー精製を行った結果、RID-G は、Bcl-2、Bcl-xL、Bax と高い結合活性を示し、Mcl-1、Bak との結合は殆ど認められなかったこと、また、Bcl-2 過剰発現させた U937 細胞においても親株と感受性の違いは認められなかったことから、RID-G がいくつかの Bcl-2 ファミリー分子に結合して不活性化させ、ミトコンドリア経路の細胞死を誘導するというモデルが想定されていた (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会, 2010 年 12 月)。

#### A. 研究目的

本研究では、RID-G の放射線増感効果の有無の検討として、顕著な放射線増感効果が報告されている Bcl-2 阻害剤 HA14-1 と同様の薬剤処理を行い、放射線感受性修飾効果を検討した (Oncogene 26, 652-661, 2007; Radiother. Oncol., 89, 227-230, 2008.)。

また、これまでの研究経緯から、抗アポトーシス性の Bcl-2 ファミリーメンバーであり、RID-G に低親和性を示した Mcl-1 遺

伝子過剰発現による RID-G 感受性の変化を検討した。その目的は、RID-G 誘導細胞死が Bcl-2 ファミリーメンバーによって制御する細胞死かどうか検証することにあった。

#### B. 研究方法

RID-G の放射線増感効果の検討では、浮遊培養細胞株であり p53 依存性の放射線誘発アポトーシスを引き起こすヒト T 細胞性

白血病細胞株 MOLT-4 細胞 (G. 1. 論文発表 文献[3]) の他、接着培養株であるヒト神経膠芽腫 A-172、ヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa S3 細胞、ヒト結腸腺がん由来細胞株 HT29 を用い、放射線感受性の異なる 4 株の RID-G 増感効果の有無を検討した。

なお、4 株の放射線感受性は、MOLT-4 > A-172 > HeLa S3 > HT29 の順に高感受性を示す (別紙 図 1 参照)。

また、Mcl-1 過剰発現実験には、Mcl-1 発現量の少ない MOLT-4 細胞株を用いた。

(倫理面への配慮)

特記事項なし

## C. 研究結果

### 1. コロニー形成法による放射線増感効果の検討

本実験では、顕著な放射線増感効果が報告されている Bcl-2 阻害剤 HA14-1 と同様に、放射線と RID-G の相乗効果が期待された。しかしながら、別紙 図 1 に示したように非照射群と 2 Gy 照射群の dose-response curve は MOLT-4 細胞を除いてほぼ平行で、RID-G による増感効果は相加的な効果しか得られないことが明らかとなった。MOLT-4 細胞に至っては、2-3  $\mu$ M の RID-G 濃度においてわずかな放射線防護効果すら認められた。これらの結果は、放射線が誘発する細胞死経路と RID-G が誘導する細胞死経路がオーバーラップしていないことを端的に示す結果と考えられ、RID-G は既存のよく知られた細胞死経路とは別の経路を辿って細胞を死に至らしめていることが推察された。

### 2. Mcl-1 過剰発現による RID-G 抵抗性獲得の有無の検討

本実験では、FLAG タグを付加したヒト Mcl-1 発現ベクター pFLAG-CMV4-hMcl-1 の MOLT-4 細胞への導入では、高発現株が得られなかった。一般に FLAG タグを付加すると、付加しない場合に比べてタンパク質がより多く発現することが知られている。ヒト胎児腎細胞由来 293T 細胞を用いた一過性発現系においても、pFLAG-CMV4-hMcl-1 と pUSE-hMcl-1 では、pFLAG-CMV4-hMcl-1 の方がより多くの Mcl-1 を発現していたことから (結果非掲載)、MOLT-4 細胞においても同様にヒト FLAG-Mcl-1 の方が高発現されたと考えられた。Bcl-2 が非常に高発現されると本来の抗アポトーシス活性を発揮せず、逆にアポトーシスを引き起こすことが報告されており (Cancer Res., 59, 4119-4128, 1999)、今回のヒト FLAG-Mcl-1 導入においても過剰発現による致死毒性のため、高発現株は死滅してしまった可能性が示唆された。

一方、pUSE-hMcl-1 導入で得られたタグなしの Mcl-1 高発現株では、別紙 図 2 B で示したように顕著な放射線抵抗性を示したものの、RID-G に対する感受性は、親株や空ベクター導入細胞株と全く同様の感受性を示した (別紙 図 2 C)。この結果から、RID-G 誘導細胞死は RID-G に低親和性を示す Mcl-1 を過剰発現させたとしても抑制することが出来ない細胞死であることが明らかとなった。

## D. 考察

昨年度、第 33 回日本分子生物学会年会・

第 83 回日本生化学会大会合同大会にて、Bcl-2 の過剰発現が RID-G 耐性に有効でないことの一つの解釈として、RID-G が誘導する細胞死の標的分子が一連の Bcl-2 ファミリー分子である可能性が発表されていた。しかしながら、本研究結果は、Bcl-2 ファミリーとは別の標的分子が存在し、カスパーゼ阻害剤でも、抗アポトーシス性の Bcl-2 ファミリー分子の過剰発現でも抑制することのできないタイプの細胞死である可能性を強く示唆する結果と考えられた。

RID-G 誘導細胞死の研究は、これまで浮遊細胞中心に研究が進められてきたが、今回の研究では 3 種の接着性がん細胞も用いた。その観察過程における特筆すべき変化として細胞の球状化と剥離が顕著であった。RID-G に高感受性を示した A-172 細胞においては、3-4  $\mu\text{M}$  処理においてわずか 1 時間で細胞の剥離が既に進行していた。これらの結果は、細胞の形状を維持するのに必要な細胞骨格分子、細胞接着分子に RID-G が強い影響を及ぼしている可能性を示唆している。また、DNA 損傷を起点とする放射線誘導の細胞死経路と、細胞骨格分子、細胞接着分子の機能不全を起点とする細胞死経路が重ならないために、放射線との併用効果が相加効果しかもたらさなかったと考えることも可能である。

## E. 結論

1. RID-G による放射線増感効果は相加的である。
2. RID-G 誘導細胞死は、RID-G に低親和性を示す Mcl-1 を過剰発現させたとしても抑制することが出来ない細胞死である。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- [1] A. Anlifeire, M. Hatori, A. Morita, I. Shiina, K. Nakata, Y. Tosaki, Y.-W. Wang, M. Ikekita, and G. Li. Ridaiifen-G induces caspase-independent atypical cell death. *Chinese J. Cell Biol.* 33, 635–644. (2011).
  - [2] R. Ikeda, M. Kurosawa, T. Okabayashi, A. Takei, M. Yoshiwara, T. Kumakura, N. Sakai, O. Funatsu, A. Morita, M. Ikekita, Y. Nakaike, and T. Konakahara. 3-(3-Phenoxybenzyl)amino-  $\beta$  -carboline: A novel antitumor drug targeting  $\alpha$  -tubulin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 21, 4784-4787. (2011).
  - [3] A. Ito, A. Morita, S. Ohya, S. Yamamoto, A. Enomoto, and M. Ikekita. Cycloheximide suppresses radiation-induced apoptosis in MOLT-4 cells with Arg72 variant of p53 through translational inhibition of p53 accumulation. *J. Radiat. Res.*, 52, 342-350. (2011).
  - [4] T. Ohgomori, T. Nanao, A. Morita, and M. Ikekita. Asn54-linked glycan is critical for functional folding of intercellular adhesion molecule-5. *Glycoconjugate J.* 29, 47-55. (2012).
- ### 2. 学会発表
- [1] 羽鳥 麻奈美、森田 明典、椎名 勇、中田 健也、戸崎 雄太、王 エンブン、戸田 年総、大籠 友博、矢守 隆夫、吉見 陽児、池北 雅彦. 新規アポトーシス誘導剤リダイフェン-G の薬物標的分子の