

同定. 第 84 回日本生化学会大会. 2011 年 9 月 23 日 (国立京都国際会館).

[2] 北川 順子、望月 万里、森田 明典、村田 寛、菅原 二三男、池北 雅彦. カバノアナタケから同定された抗癌剤候補化合物 DDTCT の作用機構解析. 第 84 回日本生化学会大会. 2011 年 9 月 22 日 (国立京都国際会館).

[3] 七尾 友久、大籠 友博、森田 明典、吉見 陽児、船津 修、池北 雅彦. 細胞接着分子 ICAM-5 の Asn54 に結合する N 型糖鎖の機能解析. 第 84 回日本生化学会大会. 2011 年 9 月 23 日 (国立京都国際会館).

[4] 横山 翔、袴田 真矢、森田 明典、杳村 憲樹、齋藤 隆夫、池北 雅彦. 新規アポトーシス誘導剤 RK96 の作用機構の解明. 第 84 回日本生化学会大会. 2011 年 9 月 23 日 (国立京都国際会館).

[5] 吉野 美那子、森田 明典、小林 新緑、高畠 香織、細井 義夫、池北 雅彦. ゼオシンベクターを用いた放射線感受性遺伝子新規探索法の開発. 日本放射線影響学会第 54 回大会. 2011 年 11 月 17 日 (神戸商工会議所会館).

[6] 内田 孝俊、森田 明典、大谷 聡一郎、花屋 賢悟、王 冰、田中 薫、細井 義夫、青木 伸、池北 雅彦. p53 転写非依存性アポトーシス経路に特異的に作用する亜鉛キレート化剤の作用機構解析. 日本放射線影響学会第 54 回大会. 2011 年 11 月 18 日 (神戸商工会議所会館).

[7] 大谷 聡一郎、森田 明典、MOHD Zulkefeli、伊石 安里、王 冰、田中 薫、岡崎 遥奈、吉野 美那子、細井 義夫、青木 伸、池北 雅彦. p53 分子内の亜鉛

イオン結合部位を標的とする新規放射線防護剤の開発. 日本放射線影響学会第 54 回大会. 2011 年 11 月 18 日 (神戸商工会議所会館).

[8] 谷本 圭司、中村 秀明、河本 健、加藤 幸夫、檜山 英三、檜山 桂子、西山 正彦、森田 明典、細井 義夫. DNA 修復関連遺伝子の低酸素応答性転写抑制機構. 日本放射線影響学会第 54 回大会. 2011 年 11 月 19 日 (神戸商工会議所会館).

[9] 森田 明典、佐藤 元俊、谷本 圭司、細井 義夫. 過酸化水素・放射線による ATM を介した p53 Ser-15 のリン酸化とアポトーシス. 日本放射線影響学会第 54 回大会. 2011 年 11 月 19 日 (神戸商工会議所会館).

[10] 花屋 賢悟、内田 孝俊、森田 明典、大谷 聡一郎、葛岡 朋代、有安、真也、王 冰、田中、薫、細井 義夫、池北 雅彦、青木 伸. p53 の亜鉛イオンをターゲットとする放射線防護剤とそのプロドラッグの開発. 日本薬学会第 132 年会. 2012 年 3 月 31 日 (北海道大学札幌キャンパス).

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

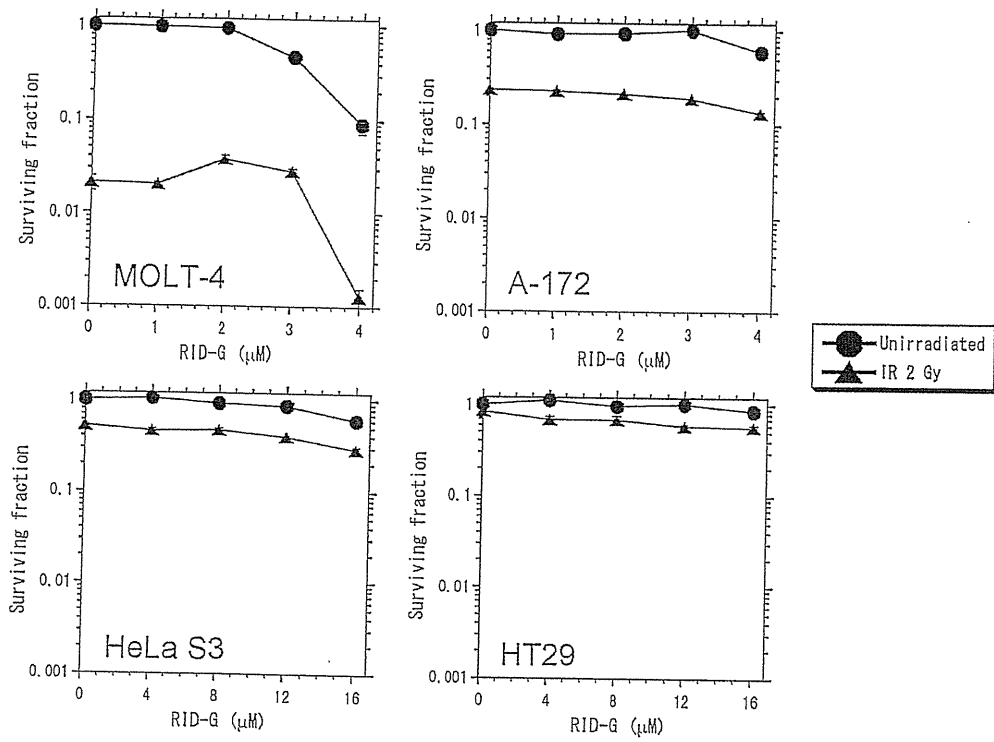


図1. コロニー形成法による放射線増感効果の検討

グラフに示した濃度のRID-Gを1時間処理後、培地交換によりRID-Gを洗浄除去し、直ちにγ線を2 Gy照射し、各RID-G濃度における致死効果を非照射群と比較した。

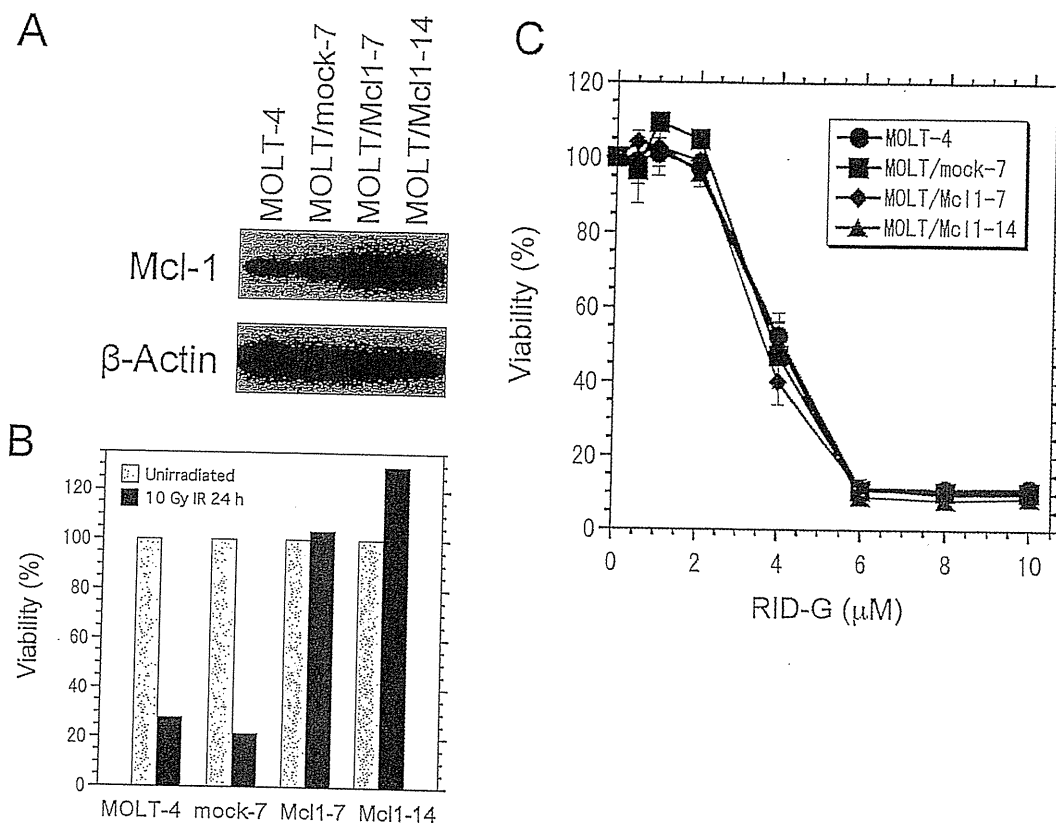


図2. Mcl-1過剰発現によるRID-G抵抗性獲得の有無の検討

Mcl-1発現ベクターは、発現タグ付きのヒトMcl-1ベクターとしてpFLAG-CMV-4 (Sigma) に、発現タグを付与しないベクターとしてpUSEamp(+) (Millipore) に、ヒトMcl-1 (hMcl-1) cDNAをそれぞれクローニングした。なお、Mcl-1クローニングの鋳型cDNAとしては、Mcl-1を高発現するヒト多発性骨髄腫IM-9細胞株から調整したcDNAを使用した。

A. 得られたMcl-1過剰発現株について

pFLAG-CMV4-hMcl-1をMOLT-4細胞に導入後、G418抵抗性クローンを14クローン得た。一方、pUSE-hMcl-1ベクター導入では、多数のコロニーが得られたため、48クローンをランダムに単離・培養した。抗Mcl-1抗体 (clone RC13、Millipore) を用いたイムノブロッティング解析の結果、pFLAG-CMV4-hMcl-1を導入した14クローンにおいては、Mcl-1高発現株は認められなかったものの、pUSE-hMcl-1を導入した48クローンにおいては、Mcl-1を顕著に発現する細胞株が3株認められた。特に発現量の多い2株 (MOLT/Mcl1-7、MOLT/Mcl1-14) を、空ベクター導入細胞株であるMOLT/mock-7細胞株と共に、その後の解析に使用した。

B. 照射時点でのMTT活性値を100%として算出したViability値の比較

非照射コントロール細胞の照射時点での各MTT活性値をそれぞれ100%とした。照射群は、 γ 線10 Gy照射24時間後のMTT比活性を求めた。

C. MTTアッセイによるRID-G感受性の検討

RID-G添加5時間後、RID-G未添加のコントロール細胞のMTT活性値を100%として、各RID-G濃度におけるViability値を算出した。

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：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
研究分担者：長原礼宗(東京電機大学理工学部准教授)

研究要旨 タモキシフェンの構造類縁体であり、タモキシフェンよりも抗がん活性効果の強いリダイフェン-Bの抗がん作用機序を探るべく、本研究ではリダイフェン-B誘導細胞死におけるオートファジーの関与について検討した。リダイフェン-Bの作用により、ヒト肝癌細胞やヒト白血病細胞においてオートファジーのマーカータンパク質であるLC3のリソソームへの局在化、またLC3のI型からII型への変換が生じた。この結果、リダイフェン-Bによる細胞死の際にはオートファジーも誘導されていることが推察された。

A. 研究目的

がん治療のため、本研究では抗がん剤の作用機序を主に細胞レベルで解き明かすことを主眼においた。今日、広く抗がん剤として用いられてきたタモキシフェン(TAM)はエストロゲンレセプターのアンタゴニストとして働き、がん細胞に対して増殖抑制作用を示す。しかし、近年 TAM はエストロゲンレセプターの存在しない癌細胞に対しても細胞死を引き起こすことが報告されている。

リダイフェン B(RID-B)はこの TAM 類縁体である。これまでに、RID-Bの細胞死誘導がエストロゲンレセプター非依存的であることを明らかにした。最近になり TAM はオートファジーを誘導することが報告された。

そこで本年度は、RID-Bの抗がん機序解明の一環としてオートファジー能の有無について検証した。

B. 研究方法

1.RID-Bの細胞傷害性

ヒト白血病T細胞 Jurkat に RID-B を添加後、24時間作用させて MTT 法により細胞傷害性を検討した。

2.LC3 タンパク質のリソソームとの共局在観察

ヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞に RID-B を作用後、Lyso Tracker Red を添加することでリソソームの染色を行った。固定、透過処理後、抗 LC3B 抗体を反応させ、Alexa Fluor 488 標識した 2 次抗体を加えた。反応後、DAPI 染色し、共焦点顕微鏡で観察を行った。そこで LC3 とリソソームをそれぞれ蛍光標識し共局在を観察することでオートファジー誘導の可能性について検証した。

3.LC3 タンパク質の Western blot

Jurkat に RID-B を添加後、タンパク質を回収して SDS-PAGE 後、抗 LC3B 抗体を

用いた Western blot 法により LC3 の変換を検出した。

C. 研究結果

Jurkat 細胞に対し RID-B を 24 時間作用させたところ、低濃度から細胞傷害性が確認され、その IC₅₀ は約 0.4 μM であった。次に、RID-B を HepG2 細胞に 0.4 μM 作用させて、LC3 とリソソームの観察を共焦点顕微鏡で行ったところ、27 時間作用時に顕著な共局在が確認された。この LC3 の変化は、Jurkat 細胞を用いた Western blotting 法においても検出され、0.4 μM の RID-B を 3 時間作用後から、経時的に LC3-I (16 kDa) から、LC3-II (14 kDa) への遷移が生じた。

D. 考察

ヒト白血病 T 細胞 Jurkat はエストロゲンレセプターが存在しない細胞であり、その細胞に RID-B はごく低濃度において細胞傷害性を誘発し、またその傷害時にはオートファジーのマーカであるタンパク質 LC3 の変化が起きることが判明した。LC3 はオートファジーの過程において LC3-I から LC3-II へと変換される。その後 LC3-II はオートファゴソーム内に蓄積され、やがてリソソームと融合しオートリソソームとなる。本研究において、RID-B 作用により LC3 とリソソームの共局在が観察されたこと、また LC3-II への変換が起こったことから、RID-B 誘導細胞死においてオートファジーが何らかの関与をしているものと考えられる。

オートファジーは、元来細胞内の不要なタンパク質や細胞小器官を分解し再利用する、栄養飢餓に対抗するための細胞保護的

な現象として知られていた。しかし近年、ある特定な小器官を選択的に分解するバルクオートファジーの存在が明らかとなり、抗がん耐性への関与が取りだたされるとともに、過剰なオートファジーは細胞死を誘導する。次年度は RID-B のオートファジー経路の解明を行い、RID-B の作用点を明らかにして行きたい。

E. 結論

本研究の結果、RID-B の細胞死はオートファジーを伴う細胞死であることが推定された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagahara Y., Nagamori T., Tamegai H., Hitokuwada M., Yoshimi Y., Ikekita M., Shinomiya T. Inulin stimulates phagocytosis of PMA-treated THP-1 macrophages by involvement of PI3-kinases and MAP kinases. *Biofactors*, Vol.37, No.6, 447-454, 2011.

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)

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：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
研究分担者：矢守 隆夫 (公益財団法人がん研究会がん化学療法センター分子薬理部部长)

研究要旨

乳がん治療薬タモキシフェンを起点とする新規構造の化合物群リダイフェン類が本研究代表者 (椎名) によって合成された。本分担研究課題では、リダイフェン類の中からタモキシフェンとは異なる作用機序をもつものを見出し、それをリードとする新たな抗がん剤を開発することを目的とする。この目的を達成するために、われわれは、独自に開発した研究基盤 Cancer Cell Informatics を用いることとした。これは、39 系のヒトがん細胞株パネル (JFCR39) とその薬剤感受性データに基づくものであり、新規抗がん剤の探索法としてその有用性は既実証済みである。今年度は、新規化合物リダイフェン B および G を含む 5 種類のリダイフェンの抗がん活性について Cancer Cell Informatics によって評価した。また、これらの血管新生阻害作用についても試験した。その結果、リダイフェン B および G は、がん細胞増殖活性が高く、血管新生阻害作用をもつことが明らかとなった。また、タモキシフェンや他の抗がん剤とは異なる作用機序をもつことが示唆された。

A. 研究目的

本研究代表者 (椎名) は、乳がん治療薬のタモキシフェンを簡便に合成する画期的合成手法を開発し、その合成方法を活用し、タモキシフェンを起点とするユニークな構造をもつ一群の新規類縁化合物群 (リダイフェン類) を合成した。本分担研究課題では、リダイフェン類の中からタモキシフェンとは異なる作用機序をもつ新規化合物を見出し、それをリードとする新たな抗がん剤を開発することを目的とする。この目的を達成するために、われわれは、独自に開発した研究基盤 Cancer Cell Informatics を用いる。これは、39 系のヒトがん細胞株パ

ネル (JFCR39) とその薬剤感受性データベースに基づくものであり、新規抗がん剤の探索法としてその有用性は既実証済みである (Kong D, Yamori T., Bioorg Med Chem. 2012; 20(6):1947-51)。

B. 研究方法

リダイフェン B, リダイフェン G を含む 5 種類のリダイフェンについて、JFCR-39 (目的の項参照) における平均増殖阻害濃度および増殖阻害スペクトル (フィンガープリント) を測定した。前者は、被検化合物の抗がん活性の指標となるものである。また後者は、被検化合物の作用機序あるい

は分子標的を独自の情報解析から予測するために必要なデータである。実験方法の詳細は、既に報告した方法 (Yamori et al. Cancer Res. 1999; 59(16):4042-9.) にしたがった。

リダイフェン 5 種の血管新生への影響は、ウシ大動脈血管内皮細胞 (BAE 細胞) の、1) 増殖 (WST-8 アッセイ)、2) 遊走 (ポイデンチャンバー法)、3) 管腔形成 (マトリゲル法) に対する阻害効果により評価した。

(倫理面への配慮)

本分担研究課題は、ヒト培養がん細胞およびマウスを用いた非臨床研究であるため倫理的な問題はない。

C. 研究結果

リダイフェン B および G を含む 5 種類のリダイフェンを Cancer Cell Informatics によって評価した。リダイフェン B および G の JFCR39 に対する平均増殖阻害濃度 (1 μM および 0.8 μM) は、タモキシフェンのそれ (8 μM) に比べ約 1/10 低かった。また、リダイフェン B、B-S*3 および B-S*4 の 3 種について構造活性相関を調べたところ、平均増殖阻害濃度は、リダイフェン B からフェニル基とエチル基を除いた構造のリダイフェン B-S*3 では 10 μM 、さらに二重結合を除いた構造の B-S*4 では 44 μM となり、著しく上昇した。

血管新生に与える影響のうち、BAE 細胞の増殖および遊走を抑制する効果は、上記と同様、リダイフェン B および G が最も強力だった。これらの効果は、既存の血管新生阻害剤スニチニブより低濃度で見られた。

管腔形成を抑制する効果は、同じくリダイフェン B と G が高かったものの、その効果は BAE 細胞増殖を抑制する濃度より数倍高く、比較的弱い効果と考えられた。

一方、Cancer Cell Informatics による情報解析によって、リダイフェン B および G のフィンガープリントは、タモキシフェンをはじめ既存の抗がん剤とは相関性の低いことが示された。

D. 考察

JFCR39 におけるがん細胞増殖活性は、リダイフェン B および G では、タモキシフェンと比べより強力であることが判明した。リダイフェン B のフェニル基とエチル基などが増殖阻害活性に重要であることが示唆された。また、がん細胞のみならず宿主における固形がんの増殖に必須の血管新生をも抑える可能性が示された。一方、Cancer Cell Informatics によるフィンガープリントの解析から、リダイフェン B および G は既存の抗がん剤とは異なる作用機序をもつことが示唆された。

E. 結論

新規化合物リダイフェン B および G は、がん細胞増殖活性が高く、血管新生阻害作用をもつことが明らかとなった。また、タモキシフェンや他の抗がん剤とは異なる作用機序をもつことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

書籍

1. 旦慎吾, 矢守隆夫. PI3K/mTOR 経

路阻害薬（西尾和人編「がん分子標的薬治療の現状と展望」2541-2547/2750 ページ）. 東京: ライフ・サイエンス; 2011.

雑誌

1. Ohashi Y, Iijima H, Yamaotsu N, Yamazaki K, Sato S, Okamura M, Sugimoto K, Dan S, Hirono S, Yamori T. AMF-26, a Novel Inhibitor of the Golgi System, Targeting ADP-ribosylation Factor 1 (Arf1) with Potential for Cancer Therapy. *J Biol Chem.* 2012;287(6):3885-3897.
2. Dan S, Okamura M, Mukai Y, Yoshimi H, Inoue Y, Hanyu A, Sakaue-Sawano A, Imamura T, Miyawaki A, Yamori T. ZSTK474, a specific phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, induces G1 arrest of the cell cycle in vivo. *Eur J Cancer.* 2012;48(6):936-943.
3. Haruta K, Mori S, Tamura N, Sasaki A, Nagamine M, Yaguchi SI, Kamachi F, Enami J, Kobayashi S, Yamori T, Takasaki Y. Inhibitory effects of ZSTK474, a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, on adjuvant-induced arthritis in rats. *Inflamm Res.* 2012;in press
4. Yao R, Natsume Y, Saiki Y, Shioya H, Takeuchi K, Yamori T, Toki H, Aoki I, Saga T, Noda T. Disruption of Tacc3 function leads to in vivo tumor regression. *Oncogene.* 2012;31(2):135-148.
5. Miyazaki T, Pan Y, Joshi K, Purohit D, Hu B, Demir H, Mazumder S, Okabe S, Yamori T, Viapiano M, Shin-Ya K, Seimiya H, Nakano I. Telomestatin Impairs Glioma Stem Cell Survival and Growth through the Disruption of Telomeric G-Quadruplex and Inhibition of the Proto-oncogene, c-Myb. *Clin Cancer Res.* 2012;18(5):1268-1280.
6. Kong D, Yamori T. JFCR39, a panel of 39 human cancer cell lines, and its application in the discovery and development of anticancer drugs. *Bioorg Med Chem.* 2012;20(6):1947-1951.
7. Kaneko M, Matsuda D, Ohtawa M, Fukuda T, Nagamitsu T, Yamori T, Tomoda H. Potentiation of bleomycin in jurkat cells by fungal pycnidione. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(1):18-28.
8. 矢守隆夫. アカデミアの立場からの新薬開発支援 がん支援・化学療法基盤支援活動の取り組み. 腫瘍内科「合同シンポジウム「わが国における新規抗がん剤開発の諸問題」～産官学連携をどう進めるか」. 2012;9(3):320-326.
9. 大橋愛美, 矢守隆夫. JFCR39 がん細胞パネルの活用による新たな抗

- がん剤創薬 . 実験医学 . 2012;30(7):1071-1077.
10. 且 慎 吾 , 矢 守 隆 夫 . PI3K-Akt-mTOR 経路とその阻害剤 . がん分子標的治療 . 2012;10(2):101-109.
11. Murakami M, Cabral H, Matsumoto Y, Wu S, Kano MR, Yamori T, Nishiyama N, Kataoka K. Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Sci Transl Med.* 2011;3(64):64ra62.
12. Kong D, Zhang Y, Yamori T, Duan H, Jin M. Inhibitory Activity of Flavonoids against Class I Phosphatidylinositol 3-Kinase Isoforms. *Molecules.* 2011;16(6):5159-5167.
13. Kong D, Yamori T, Kobayashi M, Duan H. Antiproliferative and antiangiogenic activities of smenospongine, a marine sponge sesquiterpene aminoquinone. *Mar Drugs.* 2011;9(2):154-161.
14. Kojima N, Suga Y, Hayashi H, Yamori T, Yoshimitsu T, Tanaka T. Design and synthesis of C35-fluorinated solamins and their growth inhibitory activities against human cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011;21(19):5745-5749.
15. Fuwa H, Suzuki T, Kubo H, Yamori T, Sasaki M. Total synthesis and biological assessment of (-)-exiguolide and analogues. *Chemistry.* 2011;17(9):2678-2688.
16. Donev IS, Wang W, Yamada T, Li Q, Takeuchi S, Matsumoto K, Yamori T, Nishioka Y, Sone S, Yano S. Transient PI3K inhibition induces apoptosis and overcomes HGF-mediated resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant lung cancer. *Clin Cancer Res.* 2011;17(8):2260-2269.
17. Awale S, Linn TZ, Li F, Tezuka Y, Myint A, Tomida A, Yamori T, Esumi H, Kadota S. Identification of chrysopenetin from *Vitex negundo* as a potential cytotoxic agent against PANC-1 and a panel of 39 human cancer cell lines (JFCR-39). *Phytother Res.* 2011;25(12):1770-1775.
18. Anzai K, Sekine-Suzuki E, Ueno M, Okamura M, Yoshimi H, Dan S, Yaguchi S, Enami J, Yamori T, Okayasu R. Effectiveness of combined treatment using X-rays and a phosphoinositide 3-kinase inhibitor, ZSTK474, on proliferation of HeLa cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci.* 2011;102(6):1176-1180.
2. 学会発表
1. 矢守隆夫 . Discovery of

- Molecular-Targeted Drugs by an information-rich Cancer Cell Line Panel “JFCR39 “. 理研・マックスプランク研究所合同シンポジウム.2012 (ドイツ)
2. 吉見直、西村由美子、岡村睦美、磯山翔、矢守隆夫. I3K 阻害剤 ZSTK474 と MEK1/2 阻害剤 AZD6244 の併用による抗腫瘍効果. 第 70 回日本癌学会.2011(名古屋)
 3. 梶原玄誠、西村由美子、且慎吾、矢守隆夫. ZSTK474 長期間暴露による PI3K 阻害剤耐性の誘導. 第 70 回日本癌学会.2011(名古屋)
 4. 岡村睦美、且慎吾、吉見直、井上靖道、今村健志、矢守隆夫. PI3K 阻害剤 ZSTK474 による in vivo G1 アレストの可視化. 第 15 回日本がん分子標的学会.2011 (東京)
 5. 大橋愛美、矢守隆夫. ゴルジ阻害剤の探索を目的とした画像解析法の確立. 第 15 回日本がん分子標的学会.2011 (東京)
 6. 且慎吾、岡村睦美、矢守隆夫. Cancer Cell Informatics を用いた PI3K 阻害剤の効果予測バイオマーカーの探索. 第 15 回日本がん分子標的学会.2011 (東京)
 7. 且慎吾、岡村睦美、関万里子、山崎佳波、向井由美子、矢守隆夫. In vitro and in vivo evaluations of correlation between the activation status of signaling pathways and the efficacy of anticancer compounds in a panel of JFCR39

human cancer cell lines. AACR Annual Meeting.2011 (USA・フロリダ)

H. 知的財産の出願・登録状況 (予定も含む。)

1. 特許取得

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

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 2012-104763

出願年月日：2012/5/1

国内・国外の別：国内

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：リダイフェンのプロテアソーム阻害活性評価に関する研究
研究分担者：水上 民夫(長浜バイオ大学バイオサイエンス学部教授)

研究要旨

プロテアソームは細胞周期・がん化など多様な細胞機能調節タンパク質の選択的分解に関わるプロテアーゼ複合体である。その阻害剤は、細胞周期の停止や増殖因子発現の抑制など複合的作用をもたらす、新しいクラスのがん分子標的治療薬として期待されている。今年度、リダイフェン化合物群の中で最も強いプロテアソーム阻害活性を示す RID-F 誘導体化合物を中心にプロテアソーム阻害活性を評価し、阻害作用に重要な部位、その構造要件を明らかにした。

A. 研究目的

本研究は新規化合物リダイフェン (RID) のプロテアソーム阻害活性を評価し、リダイフェン化合物の有する抗がん作用がプロテアソーム阻害に基づくものであることを明らかにすることを目的とする。今年度は、リダイフェン化合物群の中で最も強いプロテアソーム阻害活性を示す RID-F 誘導体化合物を中心にプロテアソーム阻害活性を評価し、阻害作用に重要な部位、その構造要件を明らかにした。

プロテアソームの担うタンパク質分解機構は、恒常性の維持や細胞の増殖や代謝といった様々な細胞内プロセスの制御において重要な役割を担っている。プロテアソームが適切なタイミングで特定のタンパク質を分解することにより、細胞周期制御やシグナル伝達、免疫応答、アポトーシスなどを適性に制御している。このような生理機

能に基づき、プロテアソーム阻害剤は、抗がん剤としての強い作用があり、実用化もされている。その代表例が、ボルテゾミブ (PS-341、商品名：ベルケード) である。ボルテゾミブの開発はミレニウム・ファーマスーティカルズ社により進められ、治療抵抗性の多発性骨髄腫を対象として、2003年に米国で、次いで2006年に本邦でも認可された。

リダイフェンは、3成分連結反応によるタモキシフェン合成法から派生する誘導体であり、表1、表2の構造式中 R1 および R2 部位に多様性を持つフォーカストケミカルライブラリーを形成する一群の化合物である。

タモキシフェンは乳癌細胞において抗エストロゲン作用を発揮する化合物であり、乳がんの治療薬として広く用いられている。タモキシフェンはエストロゲン受容体に結合することにより、エストロゲンとエスト

ロゲン受容体の結合を阻害し、がん細胞の増殖を抑制する。ところが、興味深いことに RID はエストロゲン受容体の発現していないがん細胞にも増殖抑制効果がある。そこで、この作用がプロテアソーム阻害に基づくものであることを明らかにする。

B. 研究方法

プロテアソーム阻害活性は、ヒト 20S プロテアソームのキモトリプシン様、トリプシン様、PGPH 様活性に対する阻害を調べ、有意な阻害活性が認められた化合物については、他のプロテアーゼ (α キモトリプシン, カテプシン B) に対する阻害活性を測定し、阻害活性の選択性を評価した。実際の反応は、20S プロテアソームに検体を添加し、30℃、10 分間保温後、基質として 20S プロテアソーム切断配列を含む蛍光標識ペプチドを加え、30℃、1 時間反応させる。このとき遊離した蛍光物質 (AMC) を定量することで酵素活性を測定する。阻害活性は、溶媒添加時の酵素活性を 100% として残存活性を測定し、その 50% の活性を阻害する濃度 (IC₅₀) で示した。がん細胞の増殖抑制活性は、ヒト子宮頸がん由来細胞株である HeLa 細胞および急性前骨髄性白血病細胞株である HL-60 細胞の増殖に対する化合物の阻害を測定し、50% 細胞増殖抑制濃度 (CyT₅₀) を求めた。細胞増殖は、3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイ法により測定した。

(倫理面への配慮)

すべての実験は、長浜バイオ大学の各種規程に従い実施した。この基準に照らして、今年度の実施項目について倫理面に問題な

いと判断した。

C. 研究結果

リダイフェンには RID-A ~ G までの基本構造化合物が存在し、そのうちの A, B, D, F にプロテアソーム阻害効果が確認された。特に RID-F に最も強いプロテアソーム阻害作用が確認されたことから RID-F の R2 部位の構造置換体のプロテアソーム阻害活性を詳細に検討した結果、阻害作用に重要な部位、その構造要件を明らかにした。RID-F, RID-F-S*1, RID-F-S*11 において 3 種類のプロテアソーム活性に対する高い阻害活性が確認できた。これらの誘導体は、ビニルベンゼンの共通構造に、0 ~ 2 個の炭素鎖を持つ。一方、これらに比べ導入基の体積が大きい RID-F-S*13, RID-F-S*14 や体積が小さい RID-F-S*15, RID-F-S*16 ではプロテアソーム阻害活性は低下した。このことより、RID-F 誘導体において、強いプロテアソーム阻害効果を発揮するためには、ビニルベンゼン程度の大きさの導入基が適しており、この部分がプロテアソームと直接相互作用している可能性が示唆された。

D. 考察

今年度のこれらの研究成果を基礎として、研究分担者 (長谷川慎・長浜バイオ大学准教授) により、プロテアソームの基質結合ポケットに対する RID 化合物群のドッキングシミュレーション解析が行われ、RID-F の基質結合ポケットへの結合様式について、プロテアソームの酵素サブユニットの活性中心を形成する基質結合ポケットに直接相互作用するという仮説が得られた。今後本仮説をもとに RID-F 誘導体が多

数合成され、さらなる構造活性相関により、より強い阻害活性を示す構造が発見され、次世代のプロテアソーム阻害剤の開発が進展することが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

日本ケミカルバイオロジー学会第6回年会 2011年5月23日 (演題) 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 (発表者) 安田ゆかり 1)、中田健也 2)、梅田絵梨 2)、王エンブン 2)、椎名勇 2)、佐々木隆造 1)、水上民夫 1)、長谷川慎 1) (長浜バイオ大学バイオサイエンス学部 1)、東京理科大学理学部応用化学科 2))

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得

検討中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表 1. RID-A から RID-H までの構造とプロテアソーム阻害活性

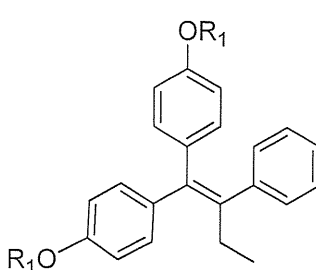
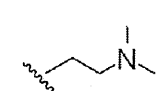
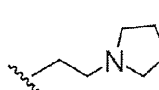
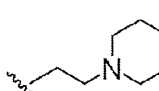
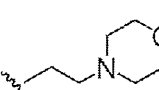
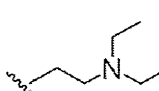
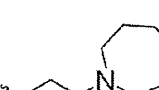
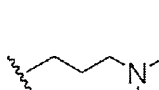
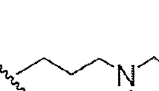
Compound number		IC ₅₀ (μM)			
		CT-L	T-L	PGPH	
1	RID-A	R ₁ = 	3.4	>10	4.1
2	RID-B	R ₁ = 	6.4	>10	6.1
3	RID-C	R ₁ = 	>10	NT	NT
4	RID-D	R ₁ = 	7.2	>10	7.5
5	RID-E	R ₁ = 	>10	NT	NT
6	RID-F	R ₁ = 	0.65	0.36	0.44
7	RID-G	R ₁ = 	>10	NT	NT
8	RID-H	R ₁ = 	>10	NT	NT

表 2. RID-F 誘導体の構造とプロテアソーム阻害活性及びがん細胞増殖抑制活性との相関

Compound number		R ₂ =	20S proteasome inhibition (μM)			CyT ₅₀ in HEK293 (μM)	CyT ₅₀ in HL-60 (μM)
			CT-L	T-L	PGPH		
9	RID-F-S*13	R ₂ =	>10	>10	2.25	>30	NT
10	RID-F-S*14	R ₂ =	0.98	>10	1.05	23.2	>30
11	RID-F-S*12	R ₂ =	1.64	0.23	0.77	27.0	NT
6	RID-F	R ₂ =	0.65	0.36	0.44	4.65	4.03
12	RID-F-S*11	R ₂ =	0.90	0.33	0.79	19.2	2.93
13	RID-F-S*1	R ₂ =	0.58	0.67	0.36	6.04	4.85
14	RID-F-S*16	R ₂ =	2.25	2.25	0.89	13.3	7.27
15	RID-F-S*15	R ₂ =	2.73	2.73	1.72	27.2	15.8

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：リダイフェン相互作用タンパク質同定解析に関する研究
研究分担者：長谷川 慎(長浜バイオ大学バイオサイエンス学部准教授)

研究要旨

リダイフェンのプロテアソームへの阻害作用に関し、相互作用タンパク質の結合様式を明らかにした。プロテアソームは細胞周期・がん抑制・遺伝子転写など多様な機能調節タンパク質の選択的分解に関わっているプロテアーゼ複合体である。その阻害剤は、細胞周期の停止や増殖因子発現の抑制など複合的作用をもたらし、がん細胞をアポトーシスへと導くことから、新しいクラスの癌分子標的薬として期待されている。体内動態やコストの点で、リダイフェンのような非ペプチド基本骨格の阻害剤は、大きな優位性が期待できる。

A. 研究目的

本研究では新規化合物リダイフェン(RID)の抗癌作用メカニズムを明らかにすることを目的とする。今年度は、研究分担者(水上教授)により見出されたRIDのプロテアソーム阻害作用の標的タンパク質を明らかにすることとした。

プロテアソームの担うタンパク質分解機構は、恒常性の維持や細胞の増殖や代謝といった様々な細胞内プロセスの制御において重要な役割を担っている。プロテアソームが適切なタイミングで特定のタンパク質を分解することにより、細胞周期制御やシグナル伝達、免疫応答、アポトーシスなどを適性に制御している。このような生理機能に基づき、プロテアソーム阻害剤は、抗がん剤としての強い作用があり、実用化もされている。その代表例が、ボルテゾミブ(PS-341、商品名：ベルケード)である。

ボルテゾミブの開発はミレニアム・ファーマシューティカルズ社により進められ、治療抵抗性の多発性骨髄腫を対象として、2003年に米国で、次いで2006年に本邦でも認可された。

RIDは、3成分連結反応によるタモキシフェン合成法から派生する誘導体であり、図1の構造式中R1およびR2部位に多様性を持つフォーカストケミカルライブラリーを形成する一群の化合物である。

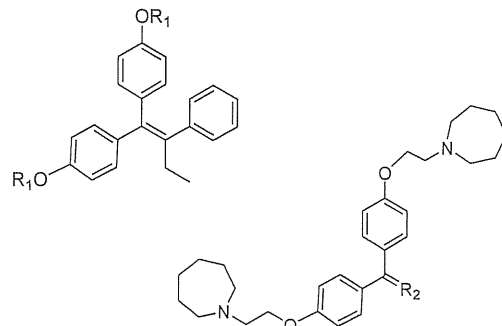


図1 RID 構造多様性導入部位

タモキシフェンは乳癌細胞において抗エストロゲン作用を発揮する化合物であり、乳がんの治療薬として広く用いられている。タモキシフェンはエストロゲン受容体に結合することにより、エストロゲンとエストロゲン受容体の結合を阻害し、がん細胞の増殖を抑制する。ところが、興味深いことにRIDはエストロゲン受容体の発現していないがん細胞にも増殖抑制効果がある。そこで、この作用がプロテアソーム阻害に基づくものであることを明らかにする。

B. 研究方法

精製 20S プロテアソーム活性中心の親和性標識に対する保護効果：活性中心を親和性標識するケミカルプローブとして、biotin-belactosin A はプロテアソーム活性中心へ共有結合形成し、ビオチン検出試薬によりプロット膜上の標識タンパク質バンドを検出することができる (Hasegawa et al. Bioorg. Med. Chem. Lett., 18, 5668)。化合物の添加により、この標識から保護されることは、化合物がプロテアソームの基質結合部位に可逆的拮抗阻害様式で作用することを示す。

また、得られた結果について、統合計算科学システム MOE によるドッキングシミュレーションにより考察した。

(倫理面への配慮)

すべての実験は、長浜バイオ大学の各種規程に従い実施した。この基準に照らして、今年度の実施項目について倫理面に問題ないと判断した。

C. 研究結果

一群のリダイフェン F 構造置換体のプロテアソーム阻害活性を詳細に検討した結果、

阻害作用に重要な部位、その構造要件、阻害様式を明らかにした。タモキシフェン自体にはプロテアソーム阻害作用は見出されなかった一方で、その誘導体について比較的強い阻害作用が見出された。次に、細胞レベルでの作用とプロテアソーム阻害との関連性を示した。そして、計算機シミュレーションにより結合様式について考察した。

D. 考察

これらの実験データを基礎として、統合計算科学システム MOE を用いプロテアソームの基質結合ポケットに対する RID 化合物群のドッキングシミュレーションを行った。このプログラムでは、蛋白質表面の窪みを探索し、そこに親水性または疎水性の仮想原子を配置、これら仮想原子クラスターに対して最も適合する薬剤立体配置を選択する。基質結合部位に RID が結合することは、今年度の研究結果により証明されたことから、蛋白質表面の探索領域を限定でき、精度の高い予測が得られるものと考えられた。解析の結果、RID-F の基質結合ポケットへの結合様式について、プロテアソームの酵素サブユニットの活性中心を形成する基質結合ポケットに直接相互作用するという仮説が得られた。このような結果から、RID の特定部位に関して、系統的に置換基を導入して阻害活性との相関を明らかにすることで、薬剤の改良に資する基礎データが得られたものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

準備中

2. 学会発表

日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年

会 2011年5月23日 (演題) 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(発表者) 安田ゆかり 1)、中田健也 2)、
梅田絵梨 2)、王エンブン 2)、椎名勇 2)、佐々
木隆造 1)、水上民夫 1)、長谷川慎 1) (長浜
バイオ大学バイオサイエンス学部 1)、東京
理科大学理学部応用化学科 2))

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得

検討中

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：抗C型肝炎ウイルス活性評価に関する研究

研究分担者：深澤秀輔 (国立感染症研究所 生物活性物質部 室長)

研究要旨

HCV JFH1株をHuh7. 5. 1細胞に感染させる系を用い、cell-based ELISAによる細胞内のCoreタンパク質の測定、HCVによる細胞増殖阻害効果の解除を指標とする、HCVの全生活環を標的とした抗HCV薬スクリーニング系を構築した。ridaifensの抗HCV活性の評価を行い、いくつかの物質に抗HCV活性が確認された。その中でestrogen receptor antagonist活性が弱く、HCVを強く阻害したRID-PAの作用を解析したところ、HCV生活環の複数の過程を阻害すると考えられた。

A. 研究目的

変異を起こして耐性になりやすいウイルスの治療には多様な標的を持つ抗ウイルス剤が必要とされる。Huh7. 5. 1細胞-JFH1の感染系を用いて、C型肝炎ウイルス (HCV) 治療薬開発のための探索系を確立し、侵入過程や粒子の放出過程を含む、HCVの全ライフサイクルを標的とするスクリーニングを行い、抗HCV薬の候補物質を探索する。

B. 研究方法

抗HCV薬スクリーニング系の構築

HCV JFH1株をHuh7. 5. 1細胞に感染させる系を用いて、放出されたウイルス粒子をPCRチューブに吸着させ、そのままone-step real-time RT-PCRを行うことで、ウイルスRNAを簡便に定量する方法を開発した (Antiviral Research 83:112-117, 2009)。今回はcell-based ELISAによる細胞内Core蛋白質の定量、HCVによる細胞増殖阻害効果の解除を指標とした系を構築し、ridaifenを中心に

種々化合物の抗HCV作用を評価した。

(倫理面への配慮)

培養細胞を使った研究であり、倫理面への配慮は特に必要ない。

C. 研究結果

Huh 7. 5. 1細胞を96穴プレートにまき、HCV JFH1株をMOI=0. 01で感染させた。抗Coreモノクローナル抗体を用いた免疫蛍光抗体法にて細胞内Coreタンパク質を検出すると、4日後にはほぼ全ての細胞がCoreを発現していた。cell-based ELISA系を検討し、peroxidase標識二次抗体を用いることにより、比色による細胞内のHCV Coreタンパク質量の測定が十分可能である条件を確立した。またMOIを高くするとウイルスの力価に応じてHuh 7. 5. 1細胞の増殖が抑制された。HCVの複製を阻害する物質は、HCVによる細胞増殖阻害効果を抑制し、増殖を回復させると考えられることから、細胞増殖阻害の解除を指標とした抗HCV活性評価系

の構築を試みた。Cyclosporin A、tamoxifen等の既知HCV阻害物質の添加により、細胞増殖が回復することを確認した。また無血清培地を用いることにより、測定系の感度が向上した。確立した系を用いて種々化合物をスクリーニングし、gallate-type catechins、7,8-benzoflavoneなどに抗HCV活性を見いだした。さらにtamoxifen誘導体であるridaifensについて、抗HCV活性を評価するとともに、estrogen receptor (ER) antagonist活性を測定した。いくつかのridaifenに抗HCV活性が確認された。その中で比較的ER antagonist活性が弱く、抗HCV活性が強いRID-PAについて、作用点の解析を試みた。RID-PAはHCVが細胞への侵入を完了した後に添加すると、阻害活性が減弱することから、侵入過程を阻害すると考えられた。しかし、阻害活性は完全には消失しないこと、HCVタンパク質のウエスタンブロットやレプリコン細胞を用いた解析から、RID-PAは侵入以降の過程にも作用することが示唆された。

D. 考察

以前報告したウイルスRNAの定量RT-PCRに加え、cell-based ELISAによる細胞内Core蛋白質の測定、HCVによる細胞増殖阻害の解除を指標とする、HCVの全生活環を標的にする抗HCV薬スクリーニング系を2種類確立した。これら2種の系は定量RT-PCR法よりさらに、簡便かつ安価で信頼性が高く、より多くの検体の活性評価が可能である。我々はtamoxifen等のselective estrogen response modulators (SERMs) が侵入、複製を含む、HCV生活環の複数の過程を阻害することを見いだしているが、ridaifensも複数の過程を標的にすることが示唆された。またERに対する作用と、抗HCV活性には明確な相関は見られなかった。今後はより詳しい作用の解析、構造活性相関研究、結合タンパク質の同定等が課題となる。

E. 結論

Huh7.5.1細胞の細胞変性効果の解除、cell-based ELISAによる細胞内のCore蛋白質の測定を指標とする、HCVの全生活環を標的とした抗HCV薬スクリーニング系を構築し、ridaifenの抗HCV活性の評価を行った。ridaifenはtamoxifen等のSERMs同様、HCV生活環の複数の過程を阻害すると考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Fukazawa H, Suzuki T, Wakita T, Murakami, Y. A Cell-Based, Microplate Colorimetric Screen Identifies 7,8-Benzoflavone and Green Tea Gallate Catechins as Inhibitors of the Hepatitis C Virus. Biol. Pharm. Bull., in press

H. 知的財産の出願・登録状況
なし