

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表 椎名 勇

平成 25 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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 椎名 勇

平成25（2013）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	-----	7
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	---	10
3. 新規タモキシフェン類縁体 RID-G のオートファジー誘導に関する研究 吉見陽児	-	13
4. 新規タモキシフェン類縁体リダイフェン-G が有するアクチン構造 森田明典	変性作用に関する研究	--- 17
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	-----	23
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 且 慎吾	-----	26
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	-----	32
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	-----	38
9. 抗C型肝炎ウイルス活性評価に関する研究 深澤秀輔	-----	41
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	-----	44
IV. 研究成果の刊行物・別刷	-----	46

平成24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。本年度(平成24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完全対称型リダイフェン類(「リダイフェン HB (RID-HB)」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し、平成24年5月1日にこの特許申請を完了した。さらに本年度はリダイフェン B そのものの作用メカニズムの解明にも成功し、その内容を論文発表すると共に平成24年10月16日には米国特許仮出願に申請した(特許は論文発表前に申請済)。研究体制として、共同研究者である島根大学総合理工学部中田健也は新しい「リダイフェン」類の合成に従事している。また、東京理科大学理工学部の池北雅彦および吉見陽児は「リダイフェン」類のオートファジー誘導に関する研究を行った。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」類のアクチン構造変性作用に関する研究、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且 慎吾は「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
(東京理科大学理工学部教授)
3. 吉見陽児
(東京理科大学理工学部助教)

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
(東京電機大学理工学部准教授)
6. 且 慎吾
(がん研究会がん化学療法センター分子薬理部副部長)

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

天然ステロイド型ホルモンを模倣したオリゴアレーン化合物はエストロゲン拮抗剤 (SERMs) として働き、乳がんや骨粗鬆症の治療薬として注目を浴びている。ごく最近我々の研究室では複数の反応点を一挙に連結し、その位置ならびに立体選択性を制御する新手段を確立することで多種多様な化合物群を簡便に生産する手段を確立した。特に、我々が創案した「リダイフェン」類はエストロゲンレセプター (ER) の有無に関わらず抗腫瘍性を発現し、ER ネガティブ細胞のみならず ER ポジティブ細胞でもタモキシフェンよりも強い抗腫瘍活性を示すことが分かっている。本研究では、(1) 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、(2) 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。さらに最近では分子細胞学的な研究を通じて、がん細胞のアポトーシスが促されるとともにがん種によってはオートファジーが誘起されることを解明している。以上の関連研究を背景とし、本申請は、東京理科大学が保有する基本技術を活用して、既知の機序に加え新規作用メカニズムを合わせ持つ革新的な抗がん剤を世に送り出し、世界中の多くのがん患者を救う目的で立案された企画

である。ここでは新規薬剤の開発を行なうとともにその権利化を推進し、広範な市場と産業の開拓を図る。計画が成功裏に進めば、厚生労働行政の施策下で革新的な新薬が開発されることとなり、世界的にみても強烈なインパクトを与える事業になると期待できる。

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、本年度(平成24年度)は「リダイフェン B」の新しい類縁体である完全対称型リダイフェン類(「リダイフェン HB (RID-HB)」シリーズ)(第三世代リダイフェン)の調製に取り組み、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、あるい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、アクチン構造変性作用試験、オートファジー活性試験、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

本年度（平成24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完全対称型リダイフェン類（「リダイフェン HB (RID-HB)」シリーズ）を大量に製造することに成功した。本合成研究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、あるい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し、平成24年5月1日にこの特許申請を完了した。さらに本年度はリダイフェン B そのものの作用メカニズムの解明にも成功し、その内容を論文発表すると共に平成24年10月16日には米国特許仮出願に申請した（特許は論文発表前に申請済）。

D. 考察

平成24年度の検討結果により、我々の保有する有機合成技術によって「リダイフェン B」の類縁体である新規化合物

「リダイフェン HB (RID-HB)」シリーズを大量供給可能とし、これらの SAR を通じて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。ここで見出した新規化合物については物質特許を申請した（p.6 の特許業績(1)（特願 2012-104763, 2012.5.1)）。上記特許中、新規化合物の有効性はエストロゲン非保有白血病細胞活性試験 [長原研究室] ならびに 39 系統固形がん細胞活性試験 [がん研究会] において試験し、既存薬剤に比べてより高い細胞増殖阻害能を有することを調べている。その他、浮遊性がん細胞活性試験 [池北研究室]、プロテアソーム阻害活性試験 [水上研究室]、および抗 C 型肝炎ウイルス活性試験 [深澤研究室] を様々な化合物を用いて実施し、リダイフェン B と同等以上の活性を有する分子を絞り込んでいる。平成24年度は抗腫瘍性発現の鍵となる作用メカニズムの解明に関し飛躍的な進展が見られた。すなわち、リダイフェン B が結合するタンパク質が GIGYF2 (GYF プロテイン 2 に作用する Grb10 タンパク質) であることが分かり、アミノ酸配列の 745-1030 残基部分との間で複合体が形成されることを突き止めた。この上流の作用が最終的に PI3K/Akt シグナル系に影響を与え、リン酸化を阻害することでがん細胞のアポトーシスを誘導していると考えられる。すでにこの結果は米国特許仮出願を完了し、論文発表も行った。（p.6 の特許業績(2)（出願番号 61/714,236, 2012.10.16)）（p.4 の論文業績 1)。以上のように本研究は研究計画概

要に沿って進展しており平成25年度以降も実用的な薬剤供給に耐え得る優れた有機合成化学的プロセス手法を確立すると同時に、有望なリード化合物の発見を目標として検討を行う。

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完全対称型リダイフェン類（「リダイフェン HB (RID-HB)」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。本研究の内、研究代表者である椎名 勇と島根大学総合理工学部の中田健也は新しい「リダイフェン」類の合成に従事した。一方、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」類のオートファジー誘導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」類のアクチン構造変性作用に関する研究、東京電機大学理工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且 慎吾は

「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) Senko Tsukuda, Tomoe Kusayanagi, Eri Umeda, Chihiro Watanabe, Yu-ta Tosaki, Shinji Kamisuki, Toshifumi Takeuchi, Yoichi Takakusagi, Isamu Shiina, Fumio Sugawara, Ridaifen B, a Tamoxifen Derivative, Directly Binds to Grb10 Interacting GYF Protein 2, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **21**, 311-320 (2013).

(2) Isamu Shiina, Yuma Umezaki, Yoshimi Ohashi, Yuta Yamazaki, Shingo Dan, Takao Yamori, Total Synthesis of AMF-26, an Antitumor Agent for Inhibition of the Golgi System, Targeting ADP-Ribosylation Factor 1, *Journal of Medicinal Chemistry*, **56**, 150-159

(2013).

(3) Wen-zhi Guo, Yanwen Wang, Eri Umeda, Isamu Shiina, Shingo Dan, Takao Yamori, Search for Novel Anti-tumor Agents from Ridaifens Using JFCR39, a Panel of Human Cancer Cell Lines, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **36**, 印刷中 (2013).

(4) Midori Takeyoshi, Seiya Sakemoto, Isamu Shiina, Kenya Nakata, Keiko Fujimori, Yanwen Wang, Eri Umeda, Chihiro Watanabe, Shoko Uetake, Takao Yamori, Shingo Dan, Yoji Yoshimi, Takahisa Shinomiya, Masahiko Ikekita, Novel Tamoxifen Derivative Ridaifen-B Induces Bcl-2 Independent Autophagy without Estrogen Receptor Involvement, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 印刷中 (2013).

2. 学会発表

(1) 渡邊千尋・梅田絵梨・殿井貴之・椎名勇；三種の芳香族炭素資源を活用した疑似対称型トリアリールブテンの合成と抗腫瘍活性；第2回 CTC ワークショップ；東京理科大学 野田キャンパス (2012年4月28日)

(2) 郭 文智・椎名 勇・且 慎吾・矢守隆夫；JFCR39パネルを用いたリダイフェン類からの新規抗がん剤の探索 (P-2376) 第71回日本癌学会学術総会；ロイトン札幌 (2012年9月20日)

(3) Keita Hiruma, Moyuru Hayashi, Yoko Kaneda, Keiko Fujimori, Isamu Shiina, Motoyuki Shimonaka ; A novel tamoxifen derivative, ridanfen-B, induces apoptosis of human hepatoma cell line, HuH-7 ; TOIN 7th International Symposium on Biomedical

Engineering ; TOIN Memorial Academium, Yokohama (2012年11月10日)

(4) 山本 卓・吉見陽児・四宮貴久・羽鳥麻奈美・長原礼宗・梅田絵梨・渡邊千尋・植竹祥子・椎名 勇・池北雅彦；リダイフェン G は強力なオートファジー誘導剤である (3P-255)；第85回日本生化学会大会；福岡国際会議場、マリンメッセ福岡 (2012年12月16日)

(5) 比留間啓太・林もゆる・金田蓉子・藤森景子・椎名 勇・下仲基之；新規タモキシフェン類縁体, リダイフェン B・D, のラット初代培養細胞およびヒト肝がん細胞 (HuH-7)に対する影響 (3P-529)；第85回日本生化学会大会；福岡国際会議場、マリンメッセ福岡 (2012年12月16日)

(6) 羽鳥麻奈美・山本 卓・友光裕子・椎名 勇・梅田絵梨・戸田年総・大籠友博・岩本真知子・森田明典・渡邊千尋・植竹祥子・矢守隆夫・吉見陽児・四宮貴久・池北雅彦；新規細胞死誘導剤リダイフェン G の作用機構の解析並びに標的分子の同定 (3P-525)；第85回日本生化学会大会；福岡国際会議場、マリンメッセ福岡 (2012年12月16日)

(7) 長原礼宗・酒本聖也・梅田絵梨・渡邊千尋・植竹祥子・吉見陽児・四宮貴久・池北雅彦・椎名 勇；新規タモキシフェン類縁体リダイフェン B によるオートファジー誘導 (3P-246)；第85回日本生化学会大会；福岡国際会議場、マリンメッセ福岡 (2012年12月16日)

(8) アリルシランを活用した三成分連結反応および二重結合異性化反応による抗腫瘍剤リダイフェン類の人工合成；梅田絵梨・

渡邊千尋・植竹祥子・椎名 勇；日本薬学会第 133 年会；パシフィコ横浜（2013 年 3 月 28 日）

(9) 完全対称型リダイフェン類の合成ならびに白血病細胞に対する増殖抑制効果；梅田絵梨・渡邊千尋・植竹祥子・吹田博章・武吉 緑・長原礼宗・椎名 勇；日本薬学会第 133 年会；パシフィコ横浜（2013 年 3 月 28 日）

(10) 新規タキモシフェン類縁体リダイフェン-B によるオートファジー誘導経路の解明；酒本聖也・梅田絵梨・渡邊千尋・植竹祥子・椎名 勇・長原礼宗；日本薬学会第 133 年会；パシフィコ横浜（2013 年 3 月 29 日）

出願年月日：2012 年 10 月 16 日

国内・国外の別：国外

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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) 産業財産権の名称：GRB10 Interacting GYF Protein 2 Modulator

発明者：東京理科大 椎名勇、菅原二三男

権利者：東京理科大学

産業財産権の種類、番号：米国特許仮出願、61/714,236

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 (島根大学大学院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 (SERMs)として体内で作用することが知られており、特に、1,1,2-トリアリール-1-ブテン骨格をもつ(Z)-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。本研究者はすでに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三成分連結反応を活用することでタモキシフェンの短工程合成法を確立している。今回、この反応に様々な置換基を有するアリル型シリル反応剤を適用することで疑似的な対称性を有するリダイフェン類縁体を調製し、それらの抗腫瘍性能を Jurkat 細胞に対する増殖阻害活性について評価した。その結果、二重結合部位の置換基の構造活性相関を体系的に明らかとするとともに、いくつかのリダイフェンでは(Z)-タモキシフェンよりも強い増殖阻害活性を示すことがわかった。さらに、これらは既存の 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。

A. 研究目的

(Z)-タモキシフェンは選択的エストロゲン受容体調整剤(SERMs)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第一選択薬として広く利用され、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、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の短工程合成法を明らかとしており、より高活性で合成上有利な疑似対称型1,1,2-トリアリール-1-ブテンであるリダイフェン類の調製法の開発に取り組んでいる。今回、この手法を活用して、二重結合部位

の置換基の種類ならびに形式が異なる種々の疑似的な対称性を有するリダイフェン誘導体を合成し、その抗腫瘍性能を Jurkat 細胞に対する増殖阻害活性について評価することで新規な抗がん剤の創出を目的とした。

B. 研究方法

近年、本研究者はルイス酸触媒の存在下で、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の三成分連結反応により対応するジアリールブテン類が高収率で得られることを見いだした。本課題では上記手法において、様々な置換基を有するアリル型シリル反応剤を適用することで多彩な三成分縮合体の合成を実施

した。得られた成績体に塩基を作用させて二重結合の転移を行い基本骨格である 1,1-ジアリール-1-ブテンを構築した後、アミノ基側鎖を導入して、疑似対称型タモキシフェン類を調製した。さらに、その構造活性相関を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

用いたアリル型シリル反応剤の種類に関わらず、ルイス酸触媒の存在下で芳香族アルデヒドならびにアニソールとの多成分縮合反応はいずれも円滑に進行し、対応するジアリールブテン類が効率良く得られた。これらの分子を鍵中間体として、実験計画に従い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 Jurkat 細胞に対する増殖阻害活性の評価が実施されたところ、いくつかのリダイフェンでは(Z)-タモキシフェンよりも強い増殖阻害活性を示すことがわかり、二重結合部位の置換形式ならびに種類の違いによる薬理活性機能にも変化が見られた。さらに、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、本実験計画で創製した複数の芳香環を有する多置換オレフィン類の構造活性相関を明らかとすることができた。さらに、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リダイフェンは、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だされると期待できる。

E. 結論

様々なアリル型シリル反応剤を応用することで、二重結合部位に異なる置換基をもつ疑似対称型タモキシフェン誘導体の迅速合成反応が可能となり、これにより新規 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二重結合部位の置換基の構造活性相関を解明することに成功し、新規な作用機序の発現が見いだされた。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) Midori Takeyoshi, Seiya Sakemoto, Isamu Shiina, Kenya Nakata, Keiko Fujimori, Yanwen Wang, Eri Umeda, Chihiro Watanabe, Shoko Uetake, Takao Yamori, Shingo Dan, Yoji Yoshimi, Takahisa Shinomiya, Masahiko Ikekita, Novel Tamoxifen Derivative Ridaifen-B Induces Bcl-2 Independent Autophagy without Estrogen Receptor Involvement, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 印刷中 (2013).

2. 学会発表

なし

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24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 に親和性のある分子の探索を試みた。担体に結合した RID-G を用いたアフィニティークロマトグラフィーを行なった後、回収されたタンパク質成分を二次元電気泳動により分離したところ、いくつかの成分が得られた。主要なものについて質量分析法により分子の同定を試みたところ Galectin-1 であると同定された。

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られる。本研究では担体に結合させた RID-G を用いてアフィニティークロマトグラフィーを行い、親和性を有す

る成分についてプロテオミクスの手法を用いて網羅的に解析することを試みることにした。

B. 研究方法

U937 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のタンパク質成分を二次元電気泳動により分離した。分離された成分のうち主要なものについて、ゲルから切り出しペプチドマスフィンガープリント法によりタンパク質の同定を試みた。さらに、可能であれば同定結果を確認するために、候補成分として検索された分子に対する特異的抗体を用いたウエスタンブロットを行い、同定結果の信憑性についての確認を行った。

(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 アフィニティークラムによって精製されたタンパク質成分を二次元電気泳動に供すると、Figure (b)にみられるように Oriole によって染色される複数のスポットが確認された。このうち、主要なスポットとして検出された分子量約 10 kD のスポットを切り出し、トリプシン消化後に得られたペプチドの質量分析を行ったところ、このスポットのタンパク質は Galectin-1 である可能性が高いという結果が得られた。引き続き得られたスポットの成分が Galectin-1 であることを Galectin-1 に対する特異的抗体を用いた染色により試みた (Figure (a))。その結果、同じ位置のスポットが特異的抗体によっても染色されることが確認された。なお、このほかのスポットに関しても同様の操作を行い分子の同定を行なっている。

D. 考察

RID-G に親和性があるタンパク質分子をアフィニティークロマトグラフィーによって探索を行ったところ、Galectin-1 が RID-G に親和性を有する候補タンパク質候補である可能性が浮上した。分子量から考えても、また、Galectin-1 による特異的抗体に

よって染色されることを考えても検出された分子が Galectin-1 である可能性は極めて高いと考えている。共同研究者の団らによる DNA マイクロアレイを用いた種々の株細胞の Galectin-1 遺伝子発現量と RID-G に対する感受性の相関の解析結果 (data not shown) では、Galectin-1 の発現量が多い細胞は RID-G に感受性が低くなる傾向が認められた。すなわち、Galectin-1 の発現量が多い細胞ほど RID-G による細胞死を起こしにくくなる可能性が示唆された。現在、Galectin-1 発現量と RID-G 感受性の相関について解析を進めている。ある種の Galectin は細胞内でシグナル伝達分子として機能し、細胞死の調節分子である Bcl-2 と相互作用することが知られている。RID-G による細胞死に Galectin-1 が関わる可能性を調査することは今後の検討に値する課題である。

E. 結論

アフィニティークロマトグラフィーによって RID-G と親和性があるタンパク質分子の探索を行ったところ、Galectin-1 をはじめとする複数の分子が候補として同定された。Galectin-1 が RID-G による細胞死に関与している可能性が強く示唆される。

1. 論文発表

Midori Takeyoshi, Seiya Sakemoto, Isamu Shiina, Kenya Nakata, Keiko Fujimori, Yanwen Wang, Eri Umeda, Chihiro Watanabe, Shoko Uetake, Takao Yamori, shingo Dan, Yoji Yoshimi, Takahisa Shinomiya, Masahiko Ikekita
Novel tamoxifen derivative Ridaifen-B induces Bcl-2 independent autophagy

without estrogen receptor involvement
Biochemical and Biophysical Research
Communications (In press)

2. 学会発表

○第 85 回日本生化学会大会

山本卓、吉見陽児、四宮貴久、羽鳥麻奈実、
長原礼宗、梅田絵梨、渡邊千尋、植竹祥子、
椎名勇、池北雅彦

「新規細胞死誘導剤リダイフェン-G は強
力なオートファジー誘導剤である」

○第 85 回日本生化学会大会

長原礼宗、酒本聖也、梅田絵梨、渡邊千
尋、植竹祥子、吉見陽児、四宮貴久、池北
雅彦、椎名勇

「新規タモキシフェン類縁体リダイフェン
-B によるオートファジー誘導」

○第 85 回日本生化学会大会

羽鳥麻奈実、山本卓、友光裕子、椎名勇、
梅田絵梨、戸田年総、大籠友博、岩本真知
子、森田明典、渡邊千尋、植竹祥子、矢守
隆夫、吉見陽児、四宮貴久、池北雅彦

「新規細胞死誘導剤リダイフェン G の作
用機構の解析並びに標的分子の同定」

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得

なし

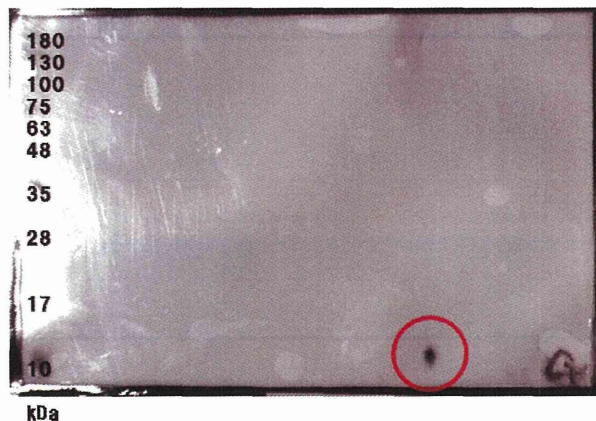
2. 実用新案登録

なし

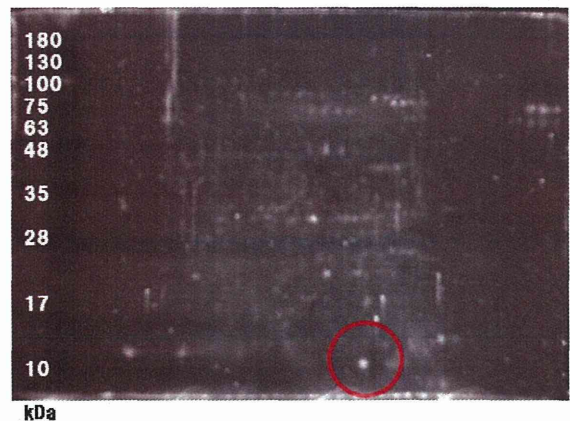
3. その他

特記事項なし

Figures



a) 抗Galectin-1抗体による染色



b) Orioleによる染色

Orioleによる染色された主要スポット(b図、赤丸によって囲まれた白点)
はGalectin-1に対する抗体を用いても染色された

平成24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 のオートファジー誘導に関する研究

研究分担者：吉見陽児 (東京理科大学工学部助教)

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。これまでの研究で細胞内に取り込まれた RID-G はリソソームへ蓄積すると結論された。また、リソソームとの関連からオートファジーについて調べたところ、RID-G が既存の薬剤と比べ低い濃度で短時間にオートファジーを誘導していることが明らかとなった。

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。また、典型的なアポトーシス(Type I 細胞死)とは異なる細胞死が誘導されていると考えられることから、RID-G によりオートファジーと伴う細胞死(Type II 細胞死)が惹起されている可能性について調査を行うこととした。

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。オートファゴソームおよびリソソームをその特異的マーカー (抗 LC3B 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

これらの細胞内小器官への局在を比較解析した。また、オートファジーの検出マーカーである LC3 の細胞内量を計測することでオートファジーの誘導レベルを測定し、RID-G と既存のオートファジー誘導剤との間で誘導レベルの比較検討を行った。

(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

細胞内に取り込まれた RID-G は仔細な検討の結果、LAMP-1 と局在が一致することが明らかとなった。これより、RID-G はリソソームに蓄積している可能性が極めて高いと考えられる。この、細胞内への蓄積は 15 分から 30 分で顕著になり 1 時間でほぼ平衡状態に達していることが確認された。RID-G のリソソームへの蓄積が考えられたことから、オートファジー誘導についての検討を加えたところ、オートファジー誘導の指標である、細胞内での LC3B の増加が認められた。この LC3B の増加は既存のオートファジー誘導剤として知られる試薬に比べ $1\mu\text{M}$ の低濃度かつ 1 時間程度の短時間で起きていることが示された。ウェスタンブロットによる細胞内 LC3 量の検

出結果でも RID-G によるオートファジー誘導を示す結果が得られた。

D. 考察

RID-G の蓄積が認められるリソソームでは、恐らくその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。これまで得られた結果はオートファジーが誘導されたという解釈の他に、リソソームの機能が障害されたと解釈することでも説明し得る。今後の実験ではオートファジーが誘導されたのかリソソームの機能が障害されたのか明らかにすることが一つの課題となる。時間的に早い段階でリソソームへの RID-G の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。具体的にはリソソームからリソソーム酵素などが細胞質へと漏出することが引き金となり細胞死が誘導されることがあるのではないかと考えている。カテプシンをはじめとするリソソーム酵素と RID-G による細胞死の関連について検討する必要がある。

E. 結論

RID-G は細胞内に投与後 15 分程度でドット状に蓄積され始め、1 時間でほぼ飽和状態となる。蛍光顕微鏡観察結果からはリソソームあるいはオートファゴソームに蓄積していると考えられた。RID-G 処理により LC3B および LC3-II が検出されるようになることから、RID-G は既存の試薬よりも強力にオートファジーを誘導していることが示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Midori Takeyoshi, Seiya Sakemoto, Isamu

Shiina, Kenya Nakata, Keiko Fujimori,
Yanwen Wang, Eri Umeda, Chihiro
Watanabe, Shoko Uetake, Takao Yamori,
shingo Dan, Yoji Yoshimi, Takahisa
Shinomiya, Masahiko Ikekita

Novel tamoxifen derivative Ridaifen-B
induces Bcl-2 independent autophagy
without estrogen receptor involvement

Biochemical and Biophysical Research
Communications (In press)

2. 学会発表

○第 85 回日本生化学会大会

山本卓、吉見陽児、四宮貴久、羽鳥麻奈実、
長原礼宗、梅田絵梨、渡邊千尋、植竹祥子、
椎名勇、池北雅彦

「新規細胞死誘導剤リダイフェン-G は強
力なオートファジー誘導剤である」

○第 85 回日本生化学会大会

長原礼宗、酒本聖也、梅田絵梨、渡邊千
尋、植竹祥子、吉見陽児、四宮貴久、池北

雅彦、椎名勇

「新規タモキシフェン類縁体リダイフェン
-B によるオートファジー誘導」

○第 85 回日本生化学会大会

羽鳥麻奈実、山本卓、友光裕子、椎名勇、
梅田絵梨、戸田年総、大籠友博、岩本真知
子、森田明典、渡邊千尋、植竹祥子、矢守
隆夫、吉見陽児、四宮貴久、池北雅彦

「新規細胞死誘導剤リダイフェン G の作
用機構の解析並びに標的分子の同定」

H. 知的財産の出願・登録状況

(予定も含む。)

1. 特許取得

なし

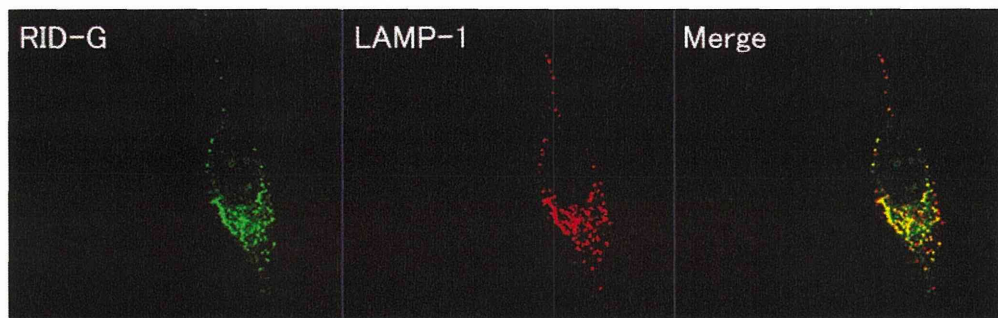
2. 実用新案登録

なし

3. その他

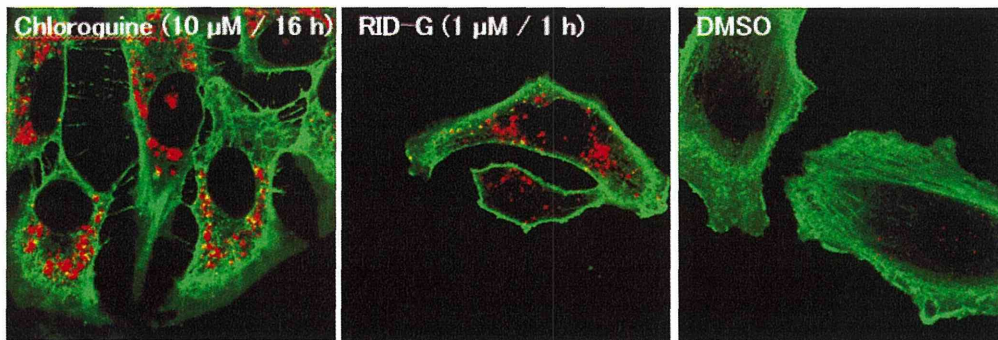
特記事項なし

Figures



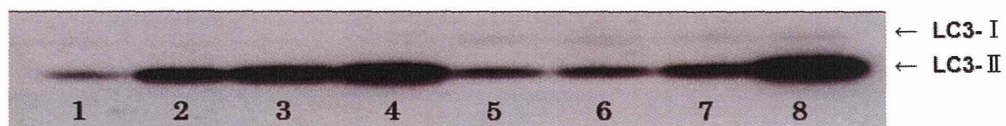
RID-Gの細胞内への取り込み ~リソソームマーカーとの共染色~

RID-Gのリソソームへの局在を調べるために、細胞内に取り込まれたRID-Gとリソソームマーカー(LAMP-1)との二重染色を行い共焦点レーザー顕微鏡で観察した。(緑: RID-G, 赤: LAMP-1)



RID-Gはオートファゴソームの形成を誘導する

RID-GによってHeLa細胞に誘導されるオートファジーをオートファゴソームのマーカーであるLC3B抗体を用いた免疫染色により検出した。(緑:β-actin, 赤:LC3B)



RID-Gはオートファジーを強力に誘導する

RID-G誘導のオートファジーをLC3抗体を用いてWBにより検出した。オートファジーが誘導されるとLC3-IIが増加する。

1: 薬剤未処理, 2: RID-G (1 μM, 1 h), 3: RID-G (2 μM, 1 h), 4: RID-G (3 μM, 1 h), 5: DMSO (1 h),
6: Chloroquine (0.1 μM, 8 h), 7: Chloroquine (1 μM, 8 h), 8: Chloroquine (10 μM, 8 h)

平成24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 が有するアクチン構造変性作用に関する研究

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がん剤にない新規の作用機序が期待された。昨年度の分担研究では、カスパーゼ阻害剤や Bcl-2 過剰発現によって抑制することのできない細胞死を誘導する RID-G の放射線増感効果等について検討した。その結果、RID-G による放射線増感効果は単に相加的であること、また、RID-G に低親和性を示したことから、RID-G 抵抗性の付与が期待された Mcl-1 の過剰発現によっても RID-G 誘導細胞死が抑制できないことも明らかとなった。本年度は、リダイフェン-G が有するアクチン構造変性作用に着目し、その変性作用を評価するシステムの確立を目指した。

A. 研究目的

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、昨年度の研究では 3 種の接着性がん細胞も用いた。その観察過程における顕著な変化として細胞の球状化と剥離が挙げられる。RID-G に高感受性を示したヒト神経膠芽腫 A-172 細胞においては、3-4 μM 処理においてわずか 1 時間で細胞の剥離が進行していた。これらの結果から、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が示唆された。

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った。

そこで、まず、RID-G の細胞骨格変性作用の有無を検討してみたところ、推察通りアクチン骨格の顕著な変化が認められたため、本研究では、RID-G が有するアクチン構造変性作用を評価するシステムの確立を目指した。

B. 研究方法

アクチン構造変性の観察、検出方法として、以下の 3 つの方法を検討した。