

1. 抗 β -アクチン抗体 (Clone AC-15、Sigma 社) と蛍光標識抗イムノグロブリン抗体による間接蛍光抗体染色法
2. pAcGFP1-Actin (Clontech 社) 導入によるアクチン構造の蛍光可視化
3. 重合型アクチン (F-アクチン) に特異的に結合するファロイジンの蛍光標識抗体 (Alexa 488-phalloidin、Invitrogen 社) による蛍光染色

蛍光顕微鏡観察は、BZ-9000 (キーエンス社)、フローサイトメトリーは、FACS Calibur (Becton-Dickinson 社) を用いた。

(倫理面への配慮)

特記事項なし

C. 研究結果

1. 間接蛍光抗体染色法によるアクチン構造の観察

まず始めに、間接蛍光抗体染色法によるアクチン構造の変化を観察した。一次抗体は、遊離のアクチン (G-アクチン) と重合型アクチン (F-アクチン) を区別しない、抗 β -アクチンモノクローナル抗体 AC-15 を用いた。その結果、ヒト神経膠芽腫 A-172 細胞、ヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa 細胞、HeLa S3 細胞の 3 株のいずれに対しても、RID-G は 3-10 μM の処理濃度下で 1-2 時間内にアクチン構造を変化させ、同時に細胞の球状化と剥離を引き起こしていることが明らかとなった。代表的な染色像として A-172 細胞の例を別紙 図 1 に示す。

次に、フローサイトメーターを用いて本抗体によって検出されるアクチンシグナル強度の変化を検討したが、蛍光顕微鏡下で観察されるダイナミックなアクチン構造変

化を、フローサイトメトリーでは検出することはできなかった。このことは、細胞 1 個当たりのアクチンシグナル総量が RID-G 処理後も変化しないことを意味しており、使用した抗体は G-アクチンと F-アクチンを区別しないため、細胞内のアクチン総量に変化は生じていないものと考えられた。

2. pAcGFP1-Actin 導入によるアクチン構造の蛍光可視化

本実験では、可視化のための緑色蛍光タンパク質 AcGFP1 をヒト β -アクチンに融合させた AcGFP1-Actin 発現ベクター (pAcGFP1-Actin) を用いた。

A-172 細胞、HeLa S3 細胞、ヒト肝芽腫由来細胞株 Hep G2 細胞の 3 株に導入後、G418 存在下で選択培養し、Hep G2 細胞で 3 つ、HeLa S3 細胞で 1 つの AcGFP1-Actin 高発現クローンが得られた一方、A-172 細胞では、得られた G418 耐性クローンのいずれもが低蛍光クローンであった。

A-172 由来の低蛍光クローン 3 株、および高発現クローン 4 株 (Hep G2 3 株、HeLa S3 1 株) を含む、計 7 株のフローサイトメトリー解析を行った。その結果、HeLa S3 由来株は RID-G 応答性に乏しく、A-172 由来 3 株は RID-G 処理後の細胞膜の脆弱化が激しかったため、解析に適さないことが判明した。安定した再現性が得られた Hep G2 由来株の例を別紙 図 2 に示す。しかしながら、Hep G2 由来 3 株における RID-G 処理後の蛍光強度低下は、いずれも 10 μM 以上の高濃度下でないと観察されなかったため、より鋭敏なアクチン構造変化検出系の考案を進めた。

3. 蛍光標識ファロイジンによるアクチン構造変性の解析

間接蛍光抗体染色法によるアクチン染色や AcGFP1-Actin 発現によるアクチン構造の蛍光可視化は、アクチンの重合状態にかかわらず蛍光を発することから、RID-G 処理後、まもなく起こるアクチン構造の初期変化を、蛍光強度を指標として捉えることが可能な系ではないと判断した。

また、言い換えると、これらの結果は初期の数時間にアクチンの分解や漏出が生じていないことを示しており、RID-G によるアクチン構造の変化は、脱重合化によるものではないかと推察された。

そこで、重合型アクチン (F-アクチン) に特異的に結合するファロイジンの蛍光標識体 (Alexa 488-phalloidin) を用い、F-アクチンの減少をフローサイトメトリーで検出する系の確立を目指した。

初めに接着細胞株を検討したが、RID-G 処理後の細胞膜の脆弱化と細胞剥離用のトリプシン処理による細胞溶解が著しく、フローサイトメトリーには適さなかった。そこで、トリプシン処理が不要の浮遊細胞を検討し、ヒト T 細胞白血病細胞株である MOLT-4 細胞を用いることにより、再現性良く F-アクチンのシグナル強度低下を検出できることが明らかとなった (図 3)。これらの結果から、RID-G 濃度依存的にアクチン構造の脱重合が生じていることが明らかとなった。

D. 結論

1. RID-G は、アクチン構造変性作用を有している。

2. 蛍光標識ファロイジンを用いることによって、RID-G による細胞内 F-アクチン減少をフローサイトメトリーで検出することが可能となった。

3. RID-G は、細胞内の F-アクチンを濃度依存的に脱重合させる。

E. 考察

RID-G の細胞死誘導効果が、細胞の重要な支持構造であるアクチン繊維の脱重合によるものだとすると、アクチンが多くの細胞にとって必要不可欠な分子であるだけに、このようなアクチン構造変性作用は、がんの化学療法への応用において高い副作用が懸念される有害作用と考えられた。

今後は、確立したフローサイトメトリーによる F-アクチン減少の検出系を用い、各種 RID の細胞死誘導活性との相関を検討したい。特に、アクチン構造に影響を及ぼさずに細胞致死効果を示す化合物を見つけ出すことが、RID シリーズ中から抗がん剤候補化合物を見つけ出す上で重要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

[1] B. Wang, K. Tanaka, A. Morita, Y. Ninomiya, K. Maruyama, K. Fujita, Y. Hosoi, and M. Neno. Sodium orthovanadate (vanadate), a potent mitigator of radiation-induced damage to the hematopoietic system in mice. *J. Radiat. Res.*, (2013). DOI: 10.1093/jrr/rrs140 (on-line publication ahead of print).

[2] Y. Furusawa, Y. Fujiwara, M. A. Hassan, Y. Tabuchi, A. Morita, A. Enomoto, and T.

Kondo. Inhibition of DNA-dependent protein kinase promotes ultrasound-induced cell death including apoptosis in human leukemia cells. *Cancer Lett.* 322, 107-112, (2012). DOI: 10.1016/j.canlet.2012.02.020.

2. 学会発表

[1] 有安 真也、森田 明典、高橋 一平、澤 晶子、葛岡 朋代、内田 孝俊、大谷 聡一郎、細井 義夫、青木 伸. p53 を標的とする放射線防護剤の探索と機構解析. 日本化学会第 93 春季年回. 2013 年 3 月 25 日. 立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀県).

[2] 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. 第 85 回日本生化学会大会. 2012 年 12 月 16 日. マリンメッセ福岡 (福岡県).

[3] 北川 純子、吉見 陽児、望月 万里、森田 明典、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 85 回日本生化学会大会. 2012 年 12 月 15 日. マリンメッセ福岡 (福岡県).

[4] 内田 知紗、望月 万里、吉見 陽児、森田 明典、羽染 芳宗、井田 紀子、船津 修、菅原 二三男、池北 雅彦. 新規抗癌剤候補化合物 DDTCT 誘導性細胞増殖抑制に関連する遺伝子の解析. 第 85 回日本生化学会大会. 2012 年 12 月 15 日. マリンメッセ

福岡 (福岡県).

[5] 葛岡 朋代、森田 明典、大谷 聡一郎、花屋 賢悟、有安 真也、高橋 一平、王 冰、池北 雅彦、細井 義夫、青木 伸. 一時的に p53 を選択的に阻害する放射線防護剤の設計及び合成. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 2012 年 10 月 13 日. 昭和大学旗の台キャンパス (東京都).

[6] 森田 明典、花屋 賢悟、大谷 聡一郎、高橋 一平、王 冰、田中 薫、池北 雅彦、永田 靖、青木 伸、細井 義夫. p53 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 55 回大会. 2012 年 9 月 7 日. 東北大学川内北キャンパス (宮城県).

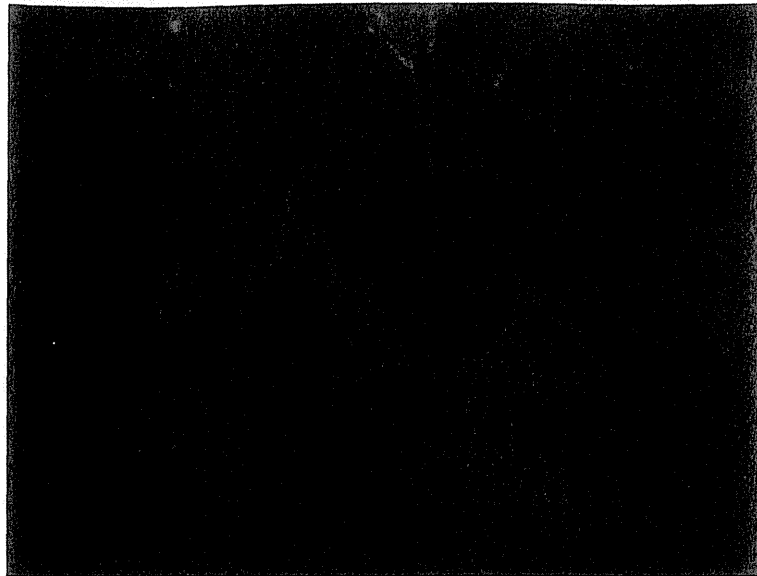
[7] 高橋 一平、森田 明典、花屋 賢悟、内田 孝俊、王 冰、田中 薫、池北 雅彦、永田 靖、青木 伸、細井 義夫. p53 に作用する 8-キノリノール誘導体 KH-3 の作用機構解析. 日本放射線影響学会第 55 回大会. 2012 年 9 月 7 日. 東北大学川内北キャンパス (宮城県).

[8] 森田 明典、内田 孝俊、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誘導経路に作用する 8-キノリノール誘導体 KH-13 の作用機構解析. 第 50 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会. 2012 年 6 月 30 日. 健康文化村カルチャーリゾート フェストーネ (沖縄県).

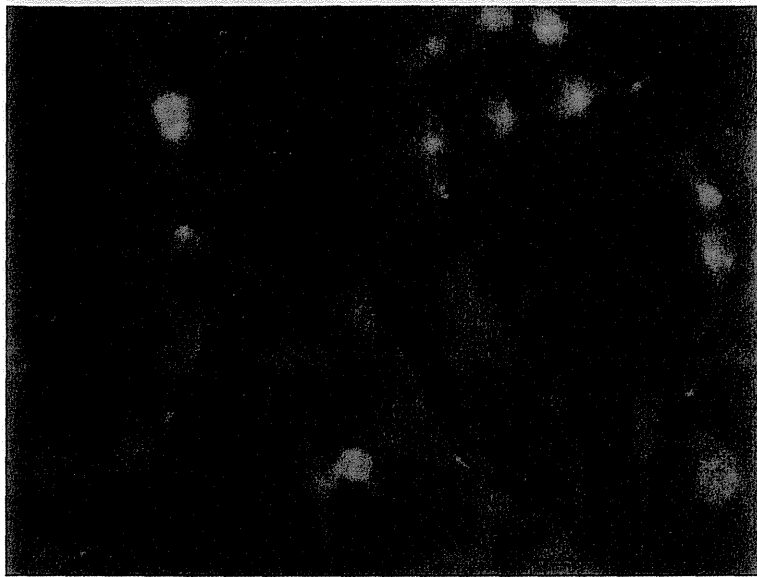
H. 知的財産の出願・登録状況

(予定も含む。)

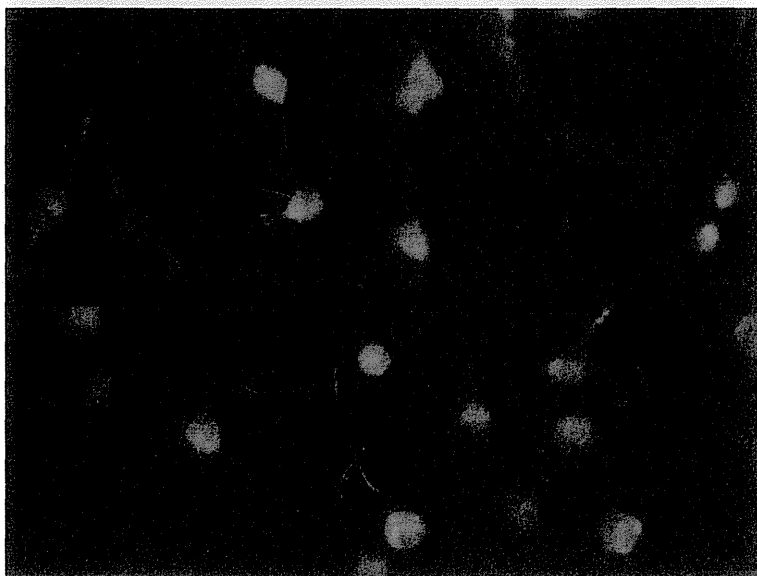
- | | |
|------------|--------|
| 1. 特許取得: | なし |
| 2. 実用新案登録: | なし |
| 3. その他: | 特記事項なし |



非処理



3 μ M RID-G
1時間処理



4 μ M RID-G
1時間処理

図1. 間接蛍光抗体染色法によるアクチン構造の観察

ヒト神経膠芽腫A-172細胞を用い、各処理後、固定、染色、観察を行った。

抗アクチン抗体は、Alexa 488標識二次抗体（緑色）で染色した。また、核観察用にDAPI（青色）を用いた。

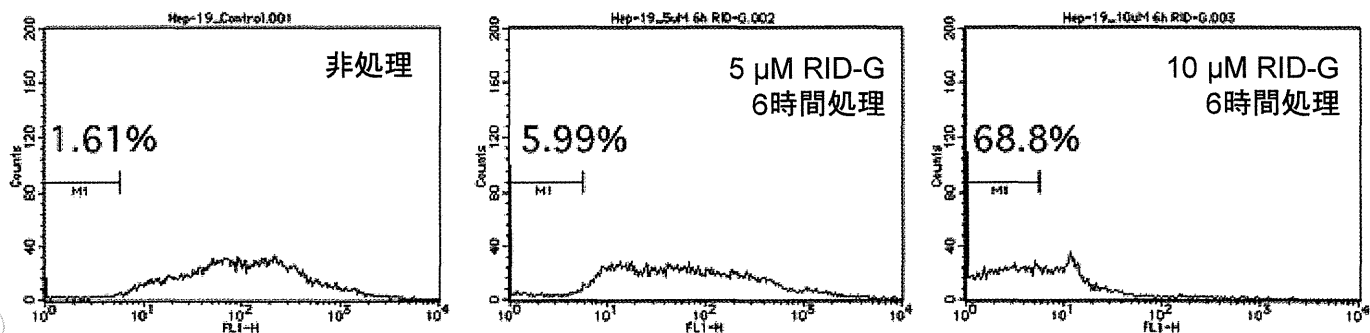


図2. AcGFP1-Actin導入Hep G2由来株 (clone No. 19) におけるアクチン構造変性
トリプシン処理後、PBSで洗浄した各細胞サンプルの蛍光強度をフローサイトメーターを用いて解析した。

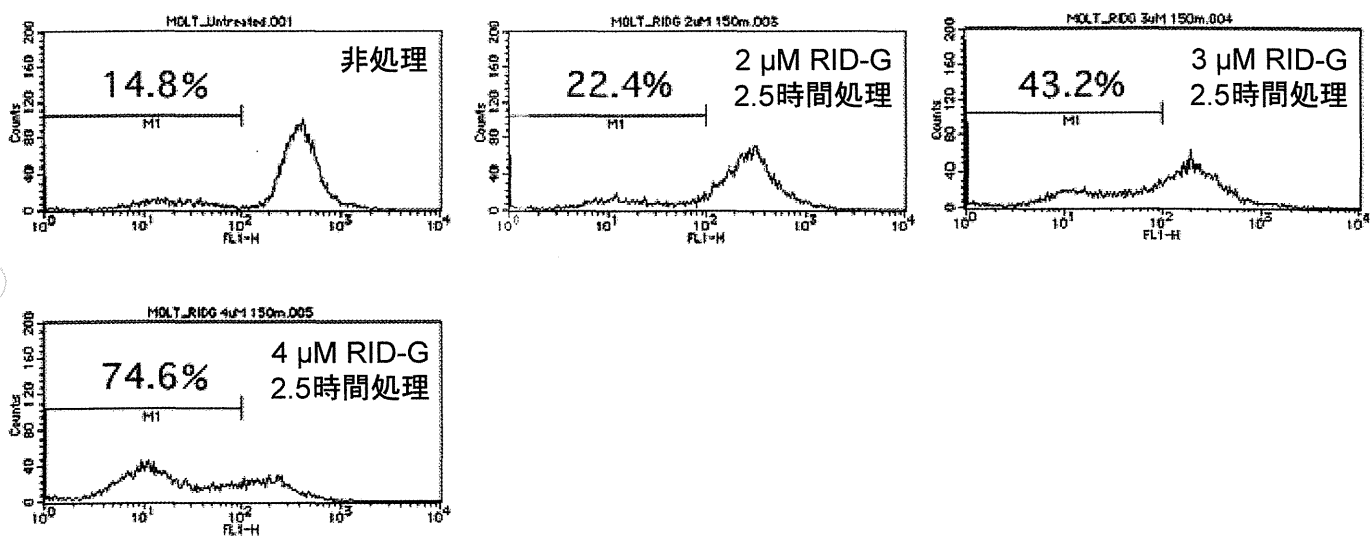


図3. 蛍光標識ファロイジンによるアクチン構造変性の解析
ヒトT細胞白血病細胞株MOLT-4細胞を用い、各処理後、固定、染色、フローサイトメーターによる解析を行った。Alexa 488標識ファロイジンを用いて蛍光染色した。

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：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の抗がん作用機序の一端としてアポトーシスの他にオートファジーも誘発することが明らかになった。そこで本研究ではリダイフェン-B誘導細胞死におけるアポトーシスとオートファジーの関係性について着目し、検討した。リダイフェン-Bの作用によって誘導されたアポトーシスはアポトーシス抑制タンパク質 Bcl-2の強制発現によって阻害された。しかし、Bcl-2強制発現はリダイフェン-B誘導オートファジーを抑制しなかった。Bcl-2は一般的なオートファジー経路である mTOR 関与系を阻害することが知られている。以上の結果、リダイフェン-Bによるオートファジーは特殊な経路で誘導されており、アポトーシスとは独立して引き起こされていることが考えられた。

A. 研究目的

がん治療のため、本研究では新規抗がん剤として有望なリダイフェン B(RID-B)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。これまでに、RID-Bの細胞死(アポトーシス)誘導がそのオリジナルである化合物、タモキシフェンの標的であるエストロゲンレセプター非依存的に起きることを明らかにした。また昨年度は、RID-Bは細胞死誘導時にオートファジーが起きていることを明らかにしてきた。

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ことが指摘されている。また、アポトーシス抑制タンパク質である Bcl-2はオートファジーにおいてもオートファジー関連因子である Beclin 1と結合することでオートファジーを抑制することから、アポトーシスとオートファジーとの密接的な関与が示唆されている。

そこで本研究では細胞に Bcl-2を過剰発現させ、RID-Bによるアポトーシス、オートファジー誘発能を比較することにした。

B. 研究方法

1. RID-Bの細胞傷害性

ヒト白血病 T細胞 Jurkat、また Bcl-2を過剰発現した Jurkat (bcl-2)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. DNA 断片化検出

Jurkat、および Jurkat(bcl-2)に RID-B を添加後、細胞膜に孔を開けてヨウ化プロピジウムで DNA を染色し、細胞内 DNA 量をフローサイトメーターを用いて定量した。

3. Western blot

Jurkat、および Jurkat(bcl-2)に RID-B を添加後、タンパク質を回収して SDS-PAGE 後、抗 LC3 抗体、抗 Beclin 1 抗体、抗 Bcl-2 抗体を用いた Western blot 法により LC3 の変換、Beclin 1 および Bcl-2 量を検出した。

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、IC₅₀は約 0.4 μM であった。Bcl-2 を過剰に発現した Jurkat (bcl-2)細胞では 0.4 μM の RID-B を作用させてもほとんど生存率の低下は検出されなかった (図 1)。

また、RID-B は Jurkat 細胞の DNA を顕著に断片化したが、RID-B は Jurkat (bcl-2)

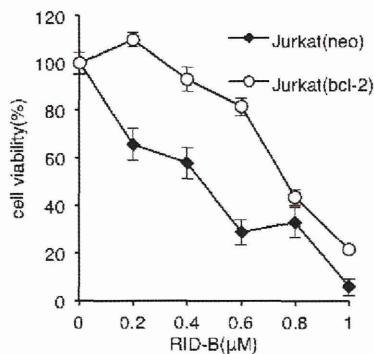


図1.RID-B添加による生存率変化

細胞にはほとんど DNA 傷害を引き起こさなかった (図 2)。

次に、RID-B を 0.4 μM 作用させて、オートファジー進行時に引き起こされる LC3-I (16 kDa)から、LC3-II (14 kDa)への

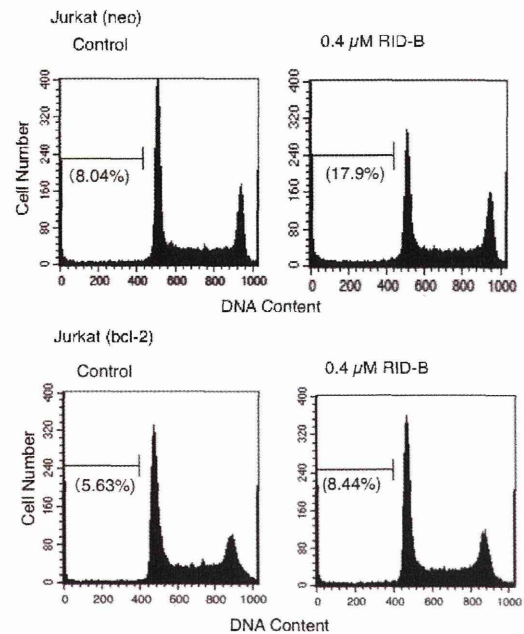


図2.RID-B添加によるDNA断片化

遷移を Western blotting 法で観察した。その結果、Jurkat 細胞、Jurkat (bcl-2)細胞双方の細胞において RID-B を作用させると LC3-I から、LC3-II への遷移が生じた。Beclin 1 の発現量は RID-B 作用によって変化はなかった (図 3)。

D. 考察

本研究の結果、RID-B 誘導アポトーシス

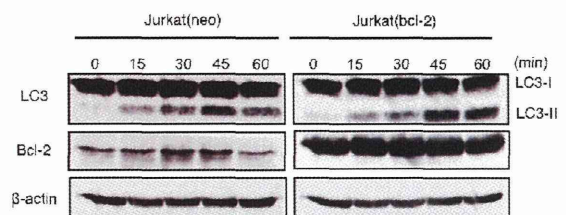


図3.RID-B添加によるLC3の遷移

は Bcl-2 で抑制され、RID-B 誘導オートファジーは Bcl-2 で抑制されなかったことから、アポトーシスとオートファジーは別々の事象であることが示唆された。

これまでも、RID-B 誘導アポトーシスはミトコンドリアが関与することを明らかにしており、ミトコンドリアに局在する抗アポ

トースタンパク質 Bcl-2 によって RID-B 誘導アポトーシスが抑制されるという今回の結果は以前の結果を支持するものである。

Bcl-2 はオートファジーにおいても Beclin 1 と結合することで一般的なオートファジー経路である mTOR 阻害型オートファジー経路の抑制を引き起こすことが知られているが、本研究において Bcl-2 の過剰発現が RID-B 誘導オートファジーを抑制しなかったことは、RID-B 誘導オートファジーが mTOR 経路の阻害ではなく、特殊な経路により引き起こされていることを示唆している。

今後、RID-B によるアポトーシス、オートファジー誘発の発端を明らかにすることで RID-B の作用機序を明らかにして行きたい。

E. 結論

本研究の結果、RID-B 誘導アポトーシスとオートファジーは互いの関与が低いことが明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagahara Y., Suzuki E., Sekine Y., Uchiro H., Yoshimi Y., Shinomiya T., Ikekita M. SUTAF, a novel β -methoxyacrylate derivative, promotes neurite outgrowth with extracellular signal-regulated kinase and c-jun N-terminal kinase activation. Eur. J. Pharmacol., Vol.694, No.1-3, 53-59, 2012.

2. 学会発表

1. 酒本 聖也、梅田 絵梨、渡邊 千尋、植竹 祥子、椎名 勇、長原 礼宗. 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経路の解明、日本薬学

会第 133 年会 (横浜) .

2. 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. 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、日本薬学会第 133 年会 (横浜) .

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：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：旦 慎吾 (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副部長)

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、タモキシフェンおよび合成したリダイフェン類 48 種について、1) 39 系のヒトがん細胞株パネル (JFCR39) に対する抗がん試験、2) タモキシフェンのメインターゲットであるエストロゲン受容体 α (ER α) への結合能測定試験を行った。その結果、その大半 (40 種) はタモキシフェンより強い抗がん効果を有することが示された。また、これらのリダイフェン類のうち ER α 結合能を完全に失っている化合物を見出した。構造活性相関を解析したところ、中心の二重結合の C2 位のフェニル基、エチル基、またはその両者を欠いているものは、ER α 結合能の著しい低下を来すが、二重結合そのものを保持している SB1 や SB8 などは高い抗がん効果を維持していた。また、JFCR39 に対する抗がんスペクトルを比較したところ、これらの化合物はタモキシフェンとは異なるスペクトルを示すこと、ER α を発現していないがん細胞にも高い抗がん効果を示すことがわかった。このことから、これらのリダイフェン類は、タモキシフェンとは違う作用機序で抗がん効果を示すものと結論された。

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に実証済みである (Kong D. and Yamori T., *Bioorg Med Chem.* 2012; 20(6):1947-51)。一方、タモキシフェンは、乳がん細胞においてエストロゲンとエストロゲン受容体の結合を競合

的に阻害することにより、がん細胞の増殖を抑制すると考えられている。合成したリダイフェン類について、エストロゲン受容体 α (ER α) への結合能を測定することにより、タモキシフェンとの差別化を試みた。

B. 研究方法

合成した 48 種類のリダイフェンについて、JFCR39 各細胞株についての増殖阻害濃度 (GI50) を測定した。また、これらのデータから、JFCR39 の平均 GI50 値および増殖阻害スペクトル (フィンガープリント) を算出した。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.) に従った。

ER α 結合能の測定には、HitHunter Enzyme Fragment Complementary (EFC) Estrogen Receptor Assay Kit (Discoverx 社製) と遺伝子組み換え ER α タンパク質 (Thermo 社製) を利用した。

(倫理面への配慮)

本分担研究課題は、ヒト培養がん細胞を用いた非臨床研究であるため倫理的問題はない。

C. 研究結果

48 種類のリダイフェン類について、JFCR39 に対する平均 GI50 値を測定した。タモキシフェンの平均 GI50 値と比較したところ、その多くがタモキシフェンより高

い抗がん効果を示すことが明らかとなった。第一世代リダイフェン類縁体については、H を除くすべてでタモキシフェンの平均 GI50 値 (7.4 μ M) に比べ低く、高い抗がん効果を示した。また、第二世代のリダイフェン類のうち、中心の炭素二重結合 C2 位のエチル基を除いたリダイフェン B 誘導体 (SB1) の抗がん効果はほとんど変化せず、フェニル基 (SB2)、またはエチル基とフェニル基の両官能基 (SB3) を除いた類縁体も数倍程度の平均 GI50 値の上昇を来すものの比較的高い抗がん効果を保持していた。しかし、両官能基に加え二重結合を欠失した SB4 では平均 GI50 が 43.7 μ M となり、抗がん効果が顕著に低下した。

一方、ER α 結合能について検討したところ、C2 位のエチル基またはフェニル基のどちらか一方でも欠失させた誘導体は、増殖阻害活性に顕著な変化がないにもかかわらず、その ER α 結合能が顕著に低下することがわかった。特に、SB1 や SB1 のフェニル基をプロピル基に置換した SB8 は、平均 GI50 値はそれぞれ 1.38、1.82 μ M とタモキシフェンより高い抗がん活性を保持していたが、ER α 結合能は完全に喪失していた。また、SB1、および SB8 のフィンガープリントをタモキシフェンのそれと比較したところ、r 値がそれぞれ 0.199、0.314 と、有意な類似性は認められなかった。

D. 考察

48 種類のリダイフェン類について、JFCR39 に対する抗がん効果 (平均 GI50 値) および ER α 結合能を測定し、構造活

性相関を検討したところ、ER α 結合能には C2 位のフェニル基・エチル基の双方を必要とするが、高い抗がん効果には両官能基は必ずしも必要としないことが明らかとなった。実際、今回見出した SB1、SB8 は、ER α 結合能を喪失していたが、JFCR39 に対する平均 GI50 値はタモキシフェンより低く抗がん効果は高かった。また、これら化合物は、JFCR39 に対するフィンガープリントがタモキシフェンと大きく異なることから、エストロゲン-ER 結合の α 競合阻害とは違う作用メカニズムで抗がん効果を発揮すると考えられた。実際、JFCR39 細胞株のうち ER α を発現しているのは MCF-7 および SK-OV3 の 2 細胞株のみであり、その他の 37 細胞株に対する抗がん効果は ER 非依存的であると考えられた。

E. 結論

本研究の成果により、タモキシフェンのメインターゲットである ER α 結合能を喪失しているにもかかわらず、タモキシフェンより強い抗がん活性を有するリダイフェン SB1・SB8 を同定することに成功した。リダイフェン SB1・SB8 ないしこれらを用いたリードとしたタモキシフェンとは異なる作用メカニズムを有するリダイフェン類縁体の抗がん剤としての開発が期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

書籍

1. 矢守隆夫, 上原至雅, 深澤秀輔, 吉田稔, 井本正哉, 清宮啓之, 馬島哲夫, 水上民夫, 川田学, 長田裕之,

且慎吾, 松浦正明, 掛谷秀昭, 富田章弘. 特集・制がん剤の分子標的スクリーニング成績 「化学療法基盤情報支援班」報告-制がん候補物質のスクリーニング成績・第 15 報- 癌と化学療法. 2013 (in press)

2. 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.

雑誌

1. Guo WZ, Wang Y, Umeda E, Shiina I, Dan S, Yamori T. Search for Novel Anti-tumor Agents from Ridaifens Using JFCR39, a Panel of Human Cancer Cell Lines. Biol Pharm Bull. 2013 (in press)
2. Ushijima M, Mashima T, Tomida A, Dan S, Saito S, Furuno A, Tsukahara S, Seimiya H, Yamori T, Matsuura M. Development of a gene expression database and related analysis programs for evaluation of anticancer compounds. Cancer Sci. 2013;104(3):360-368.
3. Shiina I, Umezaki Y, Ohashi Y, Yamazaki Y, Dan S, Yamori T. Total synthesis of AMF-26, an antitumor agent for inhibition of the Golgi system, targeting ADP-ribosylation factor 1. J Med Chem. 2013;56(1):150-159.
4. 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.
5. Isoyama S, Yoshimi H, Dan S, Okamura M, Seki M, Irimura T, Yamori T. Development of an immunohistochemical protein quantification system in conjunction with tissue microarray technology for identifying predictive biomarkers for phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors. *Biol Pharm Bull.* 2012;35(9):1607-1613.
 6. Isoyama S, Dan S, Nishimura Y, Nakamura N, Kajiwara G, Seki M, Irimura T, Yamori T. Establishment of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor-resistant cancer cell lines and therapeutic strategies for overcoming the resistance. *Cancer Sci.* 2012;103(11):1955-1960.
 7. 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.
2. 学会発表
1. 郭文智、椎名勇、旦慎吾、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. 第71回日本癌学会.2012 (札幌)
 2. 旦慎吾、磯山翔、西村由美子、中村直起、梶原玄誠、玉城尚美、矢守隆夫. Identification of IGF1R as a responsible gene and a therapeutic target for acquired and intrinsic resistance to PI3K inhibitors. 第9回(2013年)日米がん合同会議.2013 (ハワイ)
 3. 旦慎吾、磯山翔、西村由美子、梶原玄誠、矢守隆夫. Identification of IGF1R as a Predictive Biomarker for Intrinsic Resistance to PI3K Inhibitors and a Therapeutic Target for Improving the Drug Efficacy. EORTC-NCI-AACR Symposium.2012 (Ireland Dublin)
 4. 旦慎吾、磯山翔、西村由美子、梶原玄誠、矢守隆夫. PI3K 阻害剤の治療抵抗性に関わる IGF1R の過剰発現とそれを標的とした治療戦略. 第71回日本癌学会.2012 (札幌)
 5. 旦慎吾. PI3 キナーゼ阻害剤の同定とそのトランスレーショナルリサーチ. 第21回乳癌基礎研究会.2012 (埼玉)
 6. 旦慎吾、磯山翔、矢守隆夫. PI3K 阻害剤の治療抵抗性に関わる IGF1R の過剰発現とそれを利用した治療戦略. 第16回日本がん分子標的学会.2012 (北九州・小倉)
 7. Ohashi Y, Iijima H, Yamaotsu N, Yamazaki K, Okamura M, Sugimoto K, Hirono S, Dan S, Yamori T. A Novel Golgi Disruptor, AMF-26, Targets ADP-ribosylation Factor 1

- (Arf1) with Potential for Cancer Therapy. The 17th Japanese Foundation for Cancer Research International Symposium on Cancer Chemotherapy (ISCC).2012 (東京)
8. 磯山 翔, 旦慎吾, 西村由美子, 梶原玄誠, 入村達郎, 矢守隆夫. Identification of IGF1R as a responsible factor for acquired resistance to PI3K inhibitors. The 17th Japanese Foundation for Cancer Research International Symposium on Cancer Chemotherapy (ISCC).2012 (東京)
9. Ohashi Y, Iijima H, Yamaotsu N, Yamazaki K, Okamura M, Sugimoto K, Hirono S, Dan S, Yamori T. Development of a Novel Inhibitor of ADP-ribosylation Factor 1 (Arf1) That Has Potential for Cancer Therapy. EORTC-NCI-AACR Symposium.2012 (Ireland Dublin)
10. Okamura M, Dan S, Yoshimi H, Yamori T. ZSTK474, a specific PI3K inhibitor, induces mesenchymal to epithelial transition in vivo. EORTC-NCI-AACR Symposium.2012 (Ireland Dublin)
11. Isoyama S, Dan S, Nishimura Y, Kajiwara G, Nakamura N, Irimura T, Yamori T. Establishment of PI3K Inhibitor-resistant Cancer Cell Lines and the Therapeutic Strategies for Overcoming the Acquired Resistance. EORTC-NCI-AACR Symposium.2012 (Ireland Dublin)
12. 大橋愛美、山崎佳波、佐藤重男、岡村睦美、杉本憲治、旦慎吾、矢守隆夫. 新規ゴルジ阻害剤 AMF-26 の Arf1 活性化阻害能と抗腫瘍効果. 第 71 回日本癌学会.2012 (札幌)
13. 磯山翔、旦慎吾、西村由美子、梶原玄誠、矢守隆夫. PI3K 阻害剤の獲得耐性に関連する IGF1 遺伝子の同定. 第 71 回日本癌学会.2012 (札幌)
14. 大橋愛美、岡村睦美、杉本憲治、旦慎吾、矢守隆夫. 新規ゴルジ阻害剤 AMF-26 の作用機序と抗腫瘍効果. 第 16 回日本がん分子標的学会.2012 (北九州・小倉)
15. 磯山翔、旦慎吾、矢守隆夫. PI3K 阻害剤長期暴露による獲得耐性細胞の樹立と耐性化に関連する分子の同定. 第 16 回日本がん分子標的学会.2012 (北九州・小倉)
16. Ohashi Y, Iijima H, Yamaotsu N, Yamazaki K, Sato S, Okamura M, Sugimoto K, Dan S, Hirono S, Yamori T. Identification of a new inhibitor of the Golgi system, targeting ADP-ribosylation Factor 1 (Arf1) with potential for cancer therapy. 2012AACR Annual Meeting.2012 (USA・シカゴ)
- 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

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：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。本研究では、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。

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群の示す抗がん作用の少なくともひとつの経路が、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。昨年度に引き続き、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

を適切に制御している。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：バルケード) 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。プロテアソーム阻害剤は、次世代化学療法として期待されている開発ターゲットのひとつである。

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がん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。本研究では、この作用がプロテアソーム阻害に基づくものであるという仮説を得て、そのエビデンスを蓄積しつつある。

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 (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°C、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°C、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

昨年度の研究成果として、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 (表 1)。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 (表 2)。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。

今年度は、その成果を踏まえて表 3 に示す化合物群について検証を進めた。RID-F の R2 部分にアルキル鎖を導入することで、芳香環の欠失による影響、置換基の大きさによる効果から結合様式について情報を得た。その結果、RID-F-S*22 よりも小さな

置換基を有する誘導体にのみプロテアソーム阻害活性が見られた。このことから、RID-F の結合ポケットの大きさは、炭素原子数 7 個分と見積もられた。また、芳香環の欠失によりやや阻害活性が低下したことから、結合様式における π - π 相互作用の存在が示唆された。

D. 考察

これらの研究成果を裏付けることとして、研究分担者（長谷川慎・長浜バイオ大学准教授）により、培養細胞に RID 化合物群への投与が検証された結果、プロテアソーム阻害と深く関連するユビキチン修飾タンパク質の蓄積とアポトーシス誘導が見出された。

今後も 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

投稿中

2. 学会発表

日本ケミカルバイオロジー学会第 8 回年会「新規タモキシフェン誘導体リダイフェン-F に見出されたプロテアソーム阻害作用の構造活性相関研究」長谷川慎 1)、○田中誠 1)、安田ゆかり 1)、塩生真史 1)、佐々木隆造 1)、水上民夫 1)、中田健也 2)、梅田絵梨 2)、王エンブン 2)、渡邊千尋 2)、植竹祥子 2)、椎名勇 2) (2013 年 6 月 19 日発表予定)

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 (昨年度実施分)

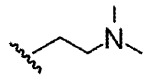
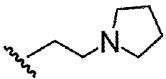
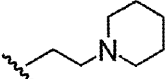
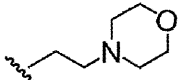
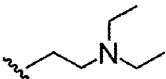
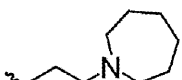
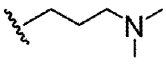
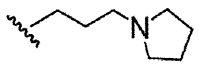
Compound number	OR ₁	R ₁ O	R ₁	IC ₅₀ (μM)		
				CT-L	T-L	PGPH
1	RID-A		R ₁ = 	3.4	>10	4.1
2	RID-B		R ₁ = 	6.4	>10	6.1
3	RID-C		R ₁ = 	>10	NT	NT
4	RID-D		R ₁ = 	7.2	>10	7.5
5	RID-E		R ₁ = 	>10	NT	NT
6	RID-F		R ₁ = 	0.65	0.36	0.44
7	RID-G		R ₁ = 	>10	NT	NT
8	RID-H		R ₁ = 	>10	NT	NT

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 (昨年度実施分)

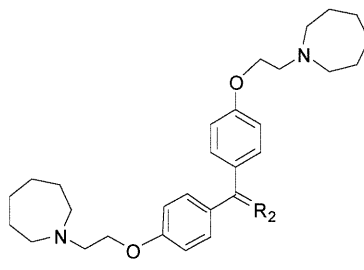
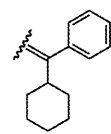
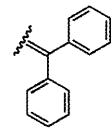
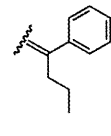
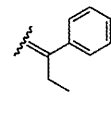
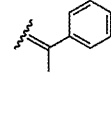
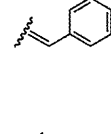
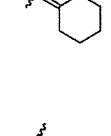
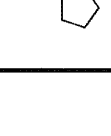
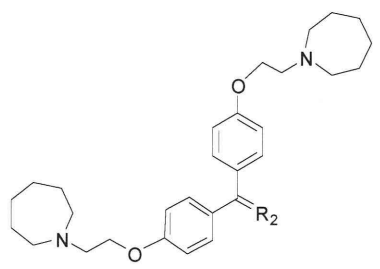
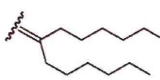
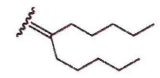
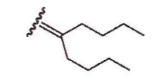
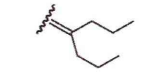
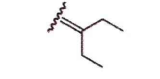
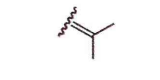

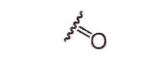

Compound number		20S proteasome inhibition (μM)			CyT ₅₀ in HEK293 (μM)	CyT ₅₀ in HL-60 (μM)	
		CT-L	T-L	PGPH			
9	RID-F-S*13	R ₂ = 	>10	>10	2.25	>30	NT
10	RID-F-S*14	R ₂ = 	0.98	>10	1.05	23.2	>30
11	RID-F-S*12	R ₂ = 	1.64	0.23	0.77	27.0	NT
6	RID-F	R ₂ = 	0.65	0.36	0.44	4.65	4.03
12	RID-F-S*11	R ₂ = 	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

表 3. 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 (本年度実施分)

Compound number		R ₂	IC ₅₀ (μM)*			CyT ₅₀ in HEK293 (μM)**	CyT ₅₀ inH (μM)*
			CT-L	T-L	PGPH		
16	RID-F-S*24	R ₂ = 	>10	>10	>10	>30	>30
17	RID-F-S*17	R ₂ = 	>10	>10	>10	NT	>30
18	RID-F-S*23	R ₂ = 	>10	>10	>10	>30	23.6
19	RID-F-S*22	R ₂ = 	3.15	>10	2.75	>30	>30
20	RID-F-S*10	R ₂ = 	1.68	0.92	0.85	6.33	4.71
21	RID-F-S*9	R ₂ = 	1.67	>10	1.30	11.1	6.44
22	RID-F-S*2	R ₂ = 	1.47	1.85	1.23	27.7	19.6
23	RID-F-S*5	R ₂ = 	1.53	9.47	1.60	13.9	>30
24	RID-F-S*3	R ₂ = 	1.22	0.96	0.91	9.23	5.63