

平成25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：タモキシフェン類縁体リダイフェンの放射線防護効果
に関する研究

研究分担者：森田 明典 (徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部(医学系)准教授)

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、MOLT-4 細胞では、2-3 μM の RID-G 濃度において放射線防護効果が認められたが、4 μM では細胞毒性による生存率の低下を示すことが明らかとなった。また、細胞毒性についてはアクチン細胞骨格の崩壊との関連が示唆されていた。本年度は、がんの放射線治療に有用な正常組織防護剤の開発を目指し、RID-G も含めた 8 種のリダイフェンの放射線防護効果とその毒性について活性評価を行った。

A. 研究目的

がんの放射線療法における正常組織の副作用軽減剤として、放射線防護剤は有用である。本研究では、8 種の RID シリーズの放射線防護効果の有無の検討として、放射線高感受性の p53 依存性アポトーシスを示すヒト T 細胞白血病細胞株 MOLT-4 細胞を用いた。

本細胞は白血病細胞株ではあるが、野生型の p53 を有し、放射線高感受性間期死を示すモデル細胞として古くから繁用されている細胞株である。また、本細胞の放射線誘発アポトーシスを抑制する化合物中から動物実験においても防護効果を発揮する化

合物も発見されている (Cell Death Differ 13, 499-511, 2006; Cancer Res 70, 257-265, 2010.)。

B. 研究方法

MOLT-4 細胞に対するリダイフェンの放射線防護活性、ならびに細胞毒性についての活性評価方法として、細胞死判定指標およびエンドポイントの異なる以下の 3 つの方法で検討した。

1. 軟寒天 (ソフトアガー) コロニー形成法により、播種 3 週間後のコロニー数を計数することによって、照射後の増殖能の喪失 (増殖死: reproductive death) に対する抑制効果を調べた。

2. 細胞の代謝作用による還元反応を利用した WST-8 アッセイ (Cell Counting Kit-8, Dojindo) を照射 20 時間以内の急性の細胞死の指標とした。
3. アポトーシス判定法として FITC 標識 アネキシン V (アネキシン V-FITC, MBL) 染色法を用い、照射 20 時間以内の急性のアポトーシスをフローサイトメトリー解析した。

WST-8 アッセイは、プレートリーダー Multiskan JX (サーモフィッシュャーサイエントフィック社) を、フローサイトメーターは、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. 軟寒天コロニー形成法による放射線防護活性評価

軟寒天コロニー形成法による検討の結果、2 Gy 照射した MOLT-4 細胞にリダイフェンを併用したところ、全てのリダイフェンで有意な放射線防護効果が認められたが、顕著な効果を示したのは、RID-C, RID-D, RID-F であった (図 1-1, 図 1-2)。リダイフェンシリーズと似た化学構造をもつタモキシフェン、およびエストラジオールについても放射線防護効果を検討したところ、エストラジオールについては放射線防護効果が認められなかったが、タモキシフェンについては有意な放射線防護効果が認められたことから (図 1-3)、リダイフェンとタモキシフェンに共通する基本骨格が防護活性に寄与している可能性が示唆された。ま

た、化合物間の比較では、2 Gy 照射コントロール細胞と比べ、RID-D (12 倍)、RID-C (5.0 倍)、RID-F (3.7 倍) の順に顕著な防護効果を示した (図 1-4)。対タモキシフェンでは、RID-D, RID-C, RID-F は、それぞれ 5.6 倍、2.3 倍、1.7 倍の防護活性を示した。これらの結果から、本防護活性の向上には、タモキシフェン基本骨格から伸びる 2 本の側鎖の末端が 6 員環以上であることが有効であることが示唆された。

2. WST-8 アッセイによる放射線防護活性評価

本実験では、細胞毒性の検討を重視したため、照射 1 時間後の培地交換は行わず、各化合物は添加開始から 21 時間後の WST-8 試薬添加まで処理した。本アッセイでは、10 Gy 照射群では試験したいずれの化合物でも細胞死抑制効果は認められなかった。また、非照射群では RID-D 以外の化合物は高濃度で薬剤単独の細胞毒性が認められた (図 2-1, 図 2-2)。

3. アネキシン V-FITC 法による放射線防護活性評価

本実験では、コロニー形成法で防護活性が顕著であった RID-C, RID-D, RID-F に検討化合物を絞り、コロニー形成法と同様に化合物処理時間は、照射前後の 1 時間とした。また、十分なアポトーシスを誘導させるため、5 Gy 照射とした。本染色法を指標としてアポトーシス解析を行なったが、RID-C, D, F とともにアポトーシス抑制効果は認められず、コロニー形成能の向上を裏付ける結果は得られなかった (図 3)。

D. 結論

1. RID-D, -C, -F は、8 種のリダイフェンの中で顕著な放射線防護活性を有している。
2. WST-8 アッセイを指標とした場合、照射 20 時間以内の急性の細胞死の抑制に 8 種のリダイフェンは有効ではなかった。
3. RID-D の細胞毒性は、8 種のリダイフェン中最も低い。
4. アネキシン V-FITC 染色を指標とした場合、RID-D, -C, -F は、照射 20 時間以内の急性のアポトーシス抑制に有効ではなかった。

E. 考察

RID-C, D, F は、信頼のおける防護活性評価法であるコロニー形成法において特に顕著な放射線防護効果を示したが、アネキシン V-FITC 染色法と WST-8 アッセイを指標とすると、3 化合物のいずれも細胞死抑制効果が見られなかった。これらの結果は、今回実施した 3 つの生死判定法の内、コロニー形成法のみが長期間培養による増殖活性の有無を指標としているため、時間的なエンドポイントの違いによるものと考えられた。すなわち 3 化合物のいずれも細胞の照射後の急性のアポトーシスを抑制する活性はないものの、遅発性の細胞死を抑制する活性を有しているものと考えられた。この遅発性の細胞死については、非アポトーシス型の細胞死が抑制されていることも考えられ、DNA 修復や細胞周期等、アポトーシス以外の放射線応答の変化について今後調べる必要があると考えられた。また、

各化合物の構造活性相関についてみると、本防護活性の向上には、タモキシフェン基本骨格から伸びる 2 本の側鎖の末端が 6 員環以上であることが有効であることが示唆された。さらに、リダイフェンが有する細胞毒性とアクチン骨格変性作用との相関についても検証を進める予定である。

G. 研究発表

1. 論文発表

- [1] [A. Morita](#), K. Tanimoto, T. Murakami, T. Morinaga, and Y. Hosoi. Mitochondria are required for ATM activation by extranuclear oxidative stress in cultured human hepatoblastoma cell line Hep G2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 443, 1286-1290, (2014). DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.139.
- [2] [A. Morita](#), S. Ariyasu, S. Ohya, I. Takahashi, B. Wang, K. Tanaka, T. Uchida, H. Okazaki, K. Hanaya, A. Enomoto, M. Neno, M. Ikekita, S. Aoki, and Y. Hosoi. Evaluation of Zinc (II) chelators for inhibiting p53-mediated apoptosis. *Oncotarget* 4, 2439-2450, (2013).
- [3] A. Enomoto, T. Fukasawa, N. Takamatsu, M. Ito, [A. Morita](#), Y. Hosoi, and K. Miyagawa. The HSP90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin modulates radiosensitivity by downregulating serine/threonine kinase 38 via Sp1 inhibition. *Eur. J. Cancer* 49, 3547-3558, (2013). DOI: 10.1016/j.ejca.2013.06.034.

2. 学会発表

[1] 森田 明典. p53 制御による放射線防護. 放医研不定期講演会. 2014 年 2 月 14 日. 放射線医学総合研究所 (千葉県).

[2] 青木 伸, 有安 真也, 森田 明典, 澤晶子, 高橋 一平, 王 冰, 星 美里, 内田 孝俊, 大谷 聡一郎, 細井 義夫. 放射線治療の副作用を低減させる薬剤の設計と合成. 第 31 回 メディシナルケミストリーシンポジウム. 2013 年 11 月 21 日. アステールプラザ (広島県).

[3] 森田 明典, 村上 智樹, 森永 剛司, 谷本 圭司, 細井 義夫. 酸化ストレスによる ATM 活性化の細胞内局在の検討. 日本放射線影響学会第 56 回大会. 2013 年 10 月 19 日. ホテルクラウンパレス青森 (青森県).

[4] 高橋 一平, 森田 明典, 青木 伸, 花屋 賢悟, 有安 真也, 王 冰, 田中 薫, 笹谷 めぐみ, 谷本 圭司, 細井 義夫, 永田 靖, 稲葉 俊哉. 新規アポトーシス抑制剤 KH-3 の作用機構解析. 日本放射線影響学会第 56 回大会. 2013 年 10 月 18 日. ホテルクラウンパレス青森 (青森県).

[5] 有安 真也, 森田 明典, 高橋 一平, 王 冰, 澤 晶子, 星 美里, 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設計と合成. 第 56 回日本薬学会関東支部大会. 第 7 回 バイオ関連化学シンポジウム. 2013 年 9 月 27 日. 名古屋大学東山キャンパス (愛知県).

[6] I. Takahashi, A. Morita, S. Aoki, B. Wang, Y. Hosoi, Y. Kaneyasu, M. Kenjo, T. Kimura, Y. Murakami, and Y. Nagata.

The Mechanism of A Novel

Radioprotector, 8-Quinololinol Derivative KH-3. 55th Annual Meeting of American Society for Radiation Oncology. 2013 年 9 月 22 日. Atlanta (U.S.A.).

[7] 細井 義夫, 森田 明典, 谷本 圭司, 上原 芳彦, 村田 泰彦. 活性酸素による ATM の核外での活性化. 第 51 回日本放射線腫瘍学会生物部会学術大会. 2013 年 7 月 6 日. 東北大学医学部星陵キャンパス (宮城県).

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 |

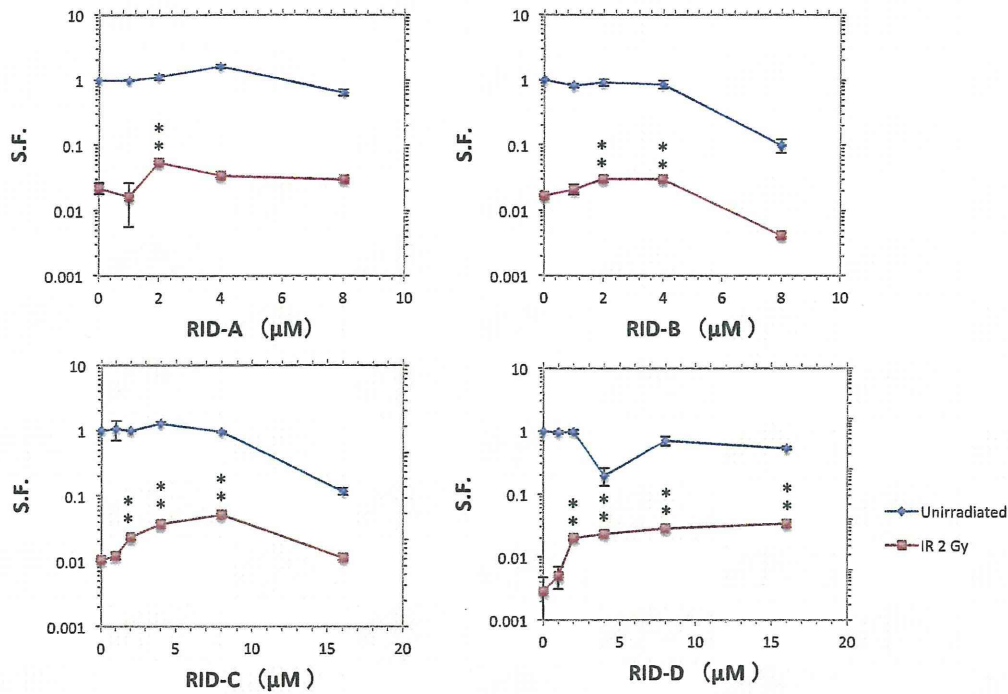


図1-1. コロニー形成法による放射線防護効果の検討 (RID-A-D)

グラフに示した濃度のリダイフェンを1時間処理後、2 Gy照射、またはシャム照射(非照射室温放置)し、直ちに培地交換によりリダイフェンを洗浄除去し、照射細胞と非照射細胞をプレーティングした。防護効果は、生存率(S.F.)を2 Gy照射コントロール細胞と比較した(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)。

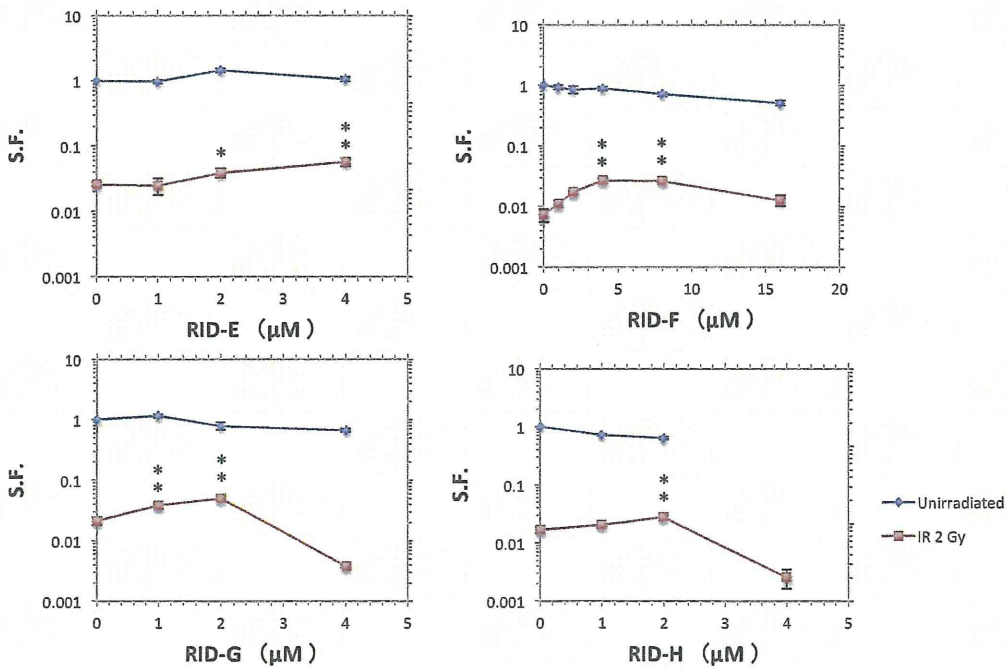


図1-2. コロニー形成法による放射線防護効果の検討 (RID-E-H)

グラフに示した濃度のリダイフェンを1時間処理後、2 Gy照射、またはシャム照射(非照射室温放置)し、直ちに培地交換によりリダイフェンを洗浄除去し、照射細胞と非照射細胞をプレーティングした。防護効果は、生存率(S.F.)を2 Gy照射コントロール細胞と比較した(* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$)。

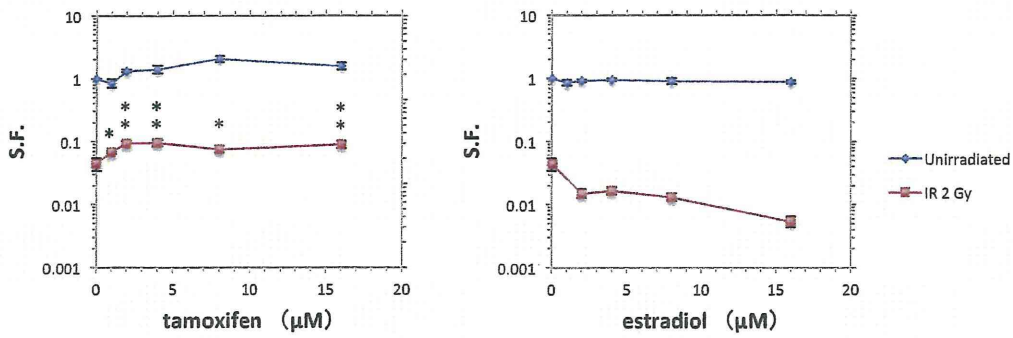


図1-3. コロニー形成法による放射線防護効果の検討 (タモキシフェンとエストラジオール)
 グラフに示した濃度のタモキシフェンとエストラジオールを1時間処理後、2 Gy照射、またはシャム照射(非照射室温放置)し、直ちに培地交換により各化合物を洗浄除去し、照射細胞と非照射細胞をプレーティングした。防護効果は、生存率(S.F.)を2 Gy照射コントロール細胞と比較した(* : p<0.05, ** : p<0.01)。

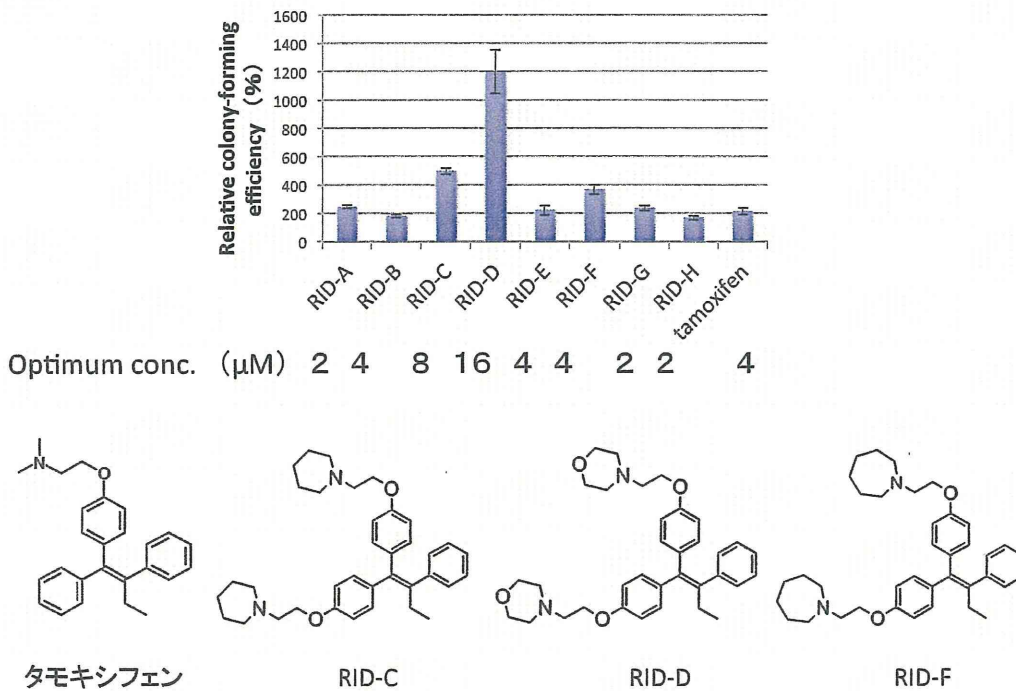


図1-4. コロニー形成法による放射線防護効果の検討
 至適濃度における放射線防護効果をまとめた。

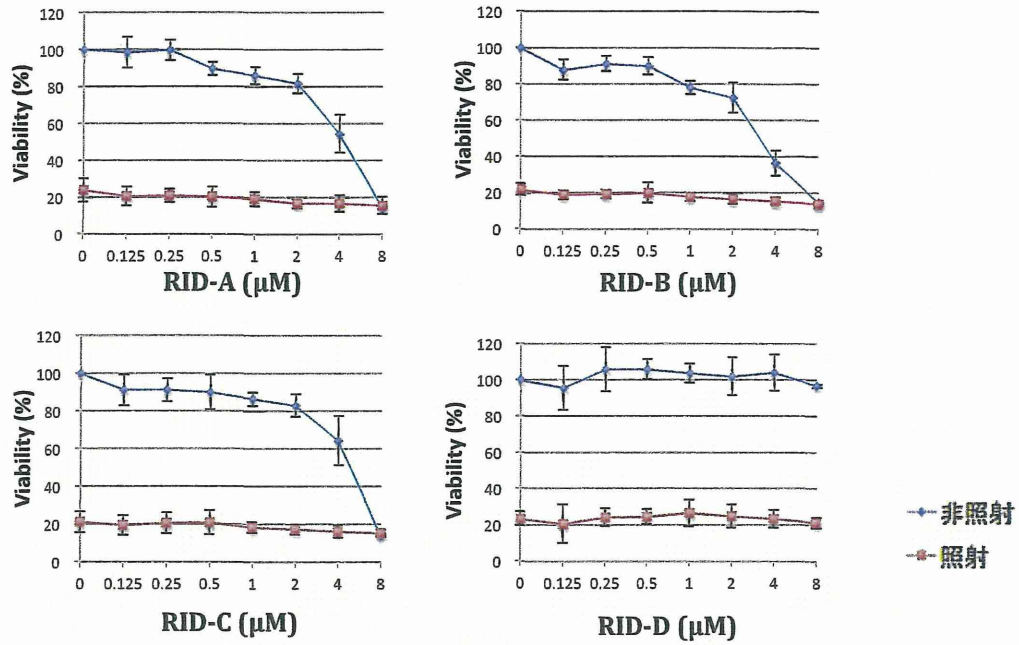


図2-1. WST-8アッセイによる各リダイフェンの放射線併用効果と細胞毒性 (RID-A-D)

グラフに示した濃度のリダイフェンを1時間処理後に、10 Gy照射、またはシャム照射(非照射室温放置)し、培地交換せずに20時間後、WST-8アッセイによる細胞生存率の測定を行った。

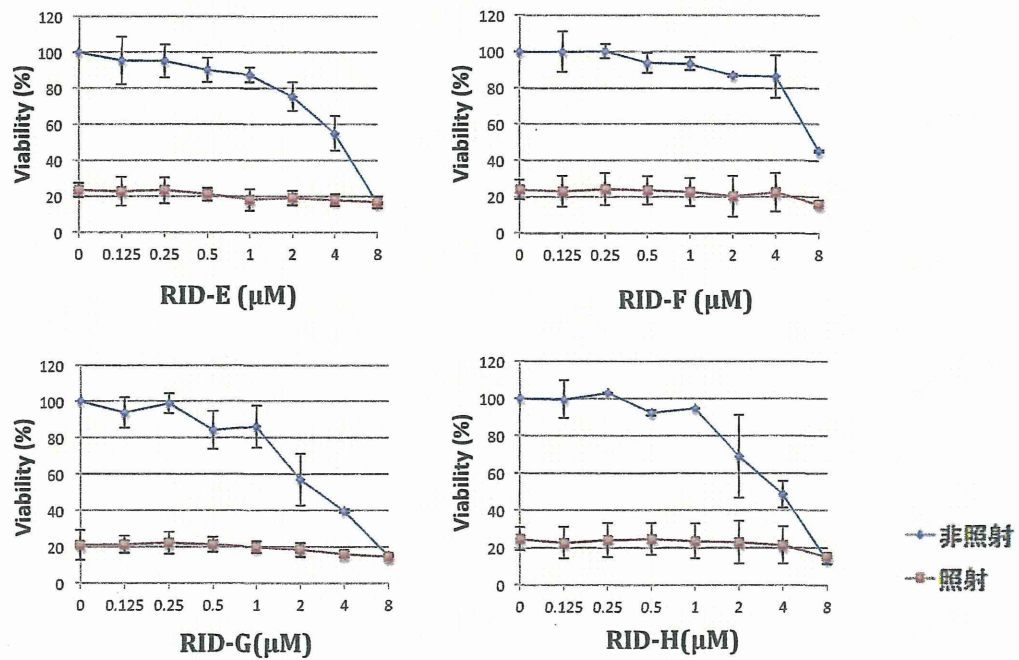


図2-2. WST-8アッセイによる各リダイフェンの放射線併用効果と細胞毒性 (RID-E-H)

グラフに示した濃度のリダイフェンを1時間処理後に、10 Gy照射、またはシャム照射(非照射室温放置)し、培地交換せずに20時間後、WST-8アッセイによる細胞生存率の測定を行った。

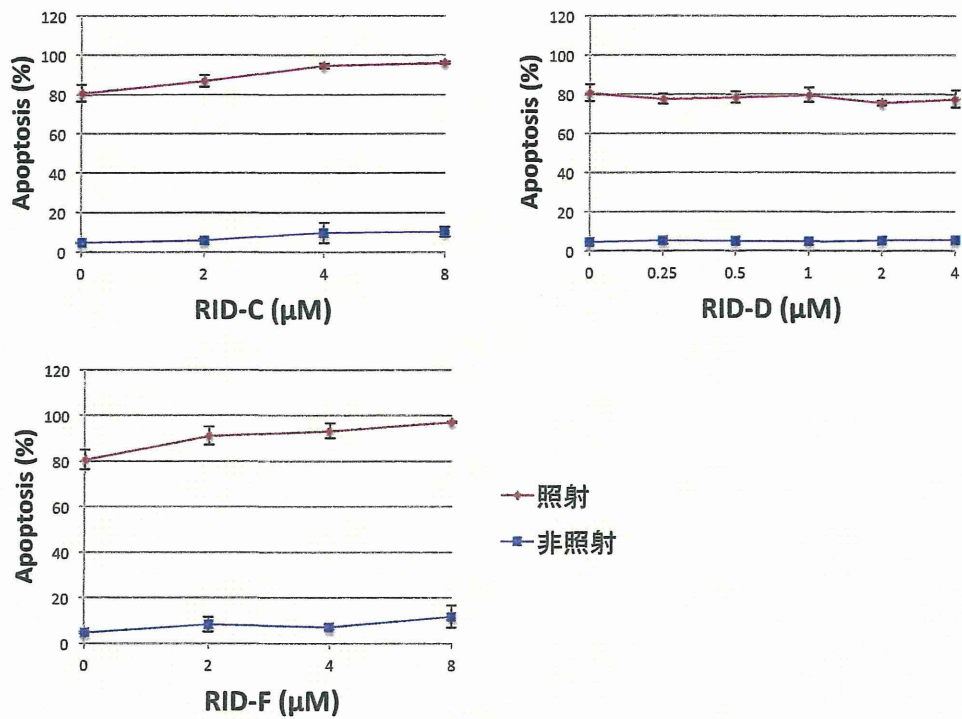


図3. Annexin V-FITC染色法で測定したRID-C, D, Fの放射線併用効果と細胞毒性

グラフに示した濃度のリダイフェンを1時間処理後、5 Gy照射、またはシャム照射(非照射室温放置)し、直ちに培地交換によりリダイフェンを洗浄除去し、20時間後Annexin V-FITC染色法による細胞生存率の測定を行った。

平成25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誘導アポトーシスとオートファジーの関連性について詳細に検討すべく、各種リダイフェン-Bの構造類縁体を用いて細胞傷害能とオートファジー誘導能の構造活性相関を検討した。結果、細胞傷害能が高いものほど、オートファジー誘導能も高いことが判明した。以上の結果、リダイフェン-Bは構造的にアポトーシス、オートファジーを併せて起こしやすい化合物であると推察された。

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の作用によって、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とは無関係に起きることを明らかにした。またRID-Bはオートファジーも誘導することを見いだした。

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、がん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。昨年は、このRID-Bによるアポトーシス誘導はBcl-2で完全に抑制されるが、RID-Bによるオートファジー誘導はBcl-2で抑制されないことから、別々の作用点が存在するのではないかという推察に至った。

そこで本研究ではRID-Bによるアポトーシス、オートファジー誘導能を詳細に比較検討すべく、RID-Bの構造類縁体を用いて細胞傷害能、オートファジー誘導能の構造活性相関を検討した。

B. 研究方法

1. RID-Bの細胞傷害性

ヒト白血病T細胞Jurkatに各種RID-B構造類縁体を添加後、4時間作用させてWST-8法により細胞傷害性を検討し、IC₅₀を算出した。

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 1 μM RID-B を 24 時間作用後、固定、透過処理を行い、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 で核を染色し、共焦点顕微鏡で観察を行いオートファジー誘導について検証した。

C. 研究結果

本研究で用いた RID-B の構造類縁体は、オリジナルである化合物のタモキシフェンがエストロゲンレセプターと結合する部分の側鎖の炭素数を変化させた構造である。ヒト白血病 T 細胞 Jurkat に各種 RID-B 構造類縁体を作用させた結果、側鎖の炭素数の長さによって細胞傷害性に違いが生じた (図 1)。

更に、以上の RID-B 構造類縁体においてヒト肝癌細胞株 HepG2 細胞に対するオートファジー誘導能について調べた。オートファジー検出のため、共焦点顕微鏡による LC3 の観察を行った。LC3 はオートファジー時にオートファゴソーム形成のため集積するタンパク質である。その結果、RID-B 構造類縁体の細胞傷害能が高くなるほど細胞内において、LC3 の蓄積が見られることから (図 2)、細胞傷害能が高い構造類縁体であるほど、オートファジーを誘導することが明らかになった。

D. 考察

本研究の結果、細胞傷害能が高い RID-B 類縁体はオートファジー誘導能が高く、逆に細胞傷害能が低い類縁体はオートファジー誘導能が低いという相関があることが明らかになった。側鎖の炭素鎖が短い類縁体は、細胞傷害能、オートファジー能ともに

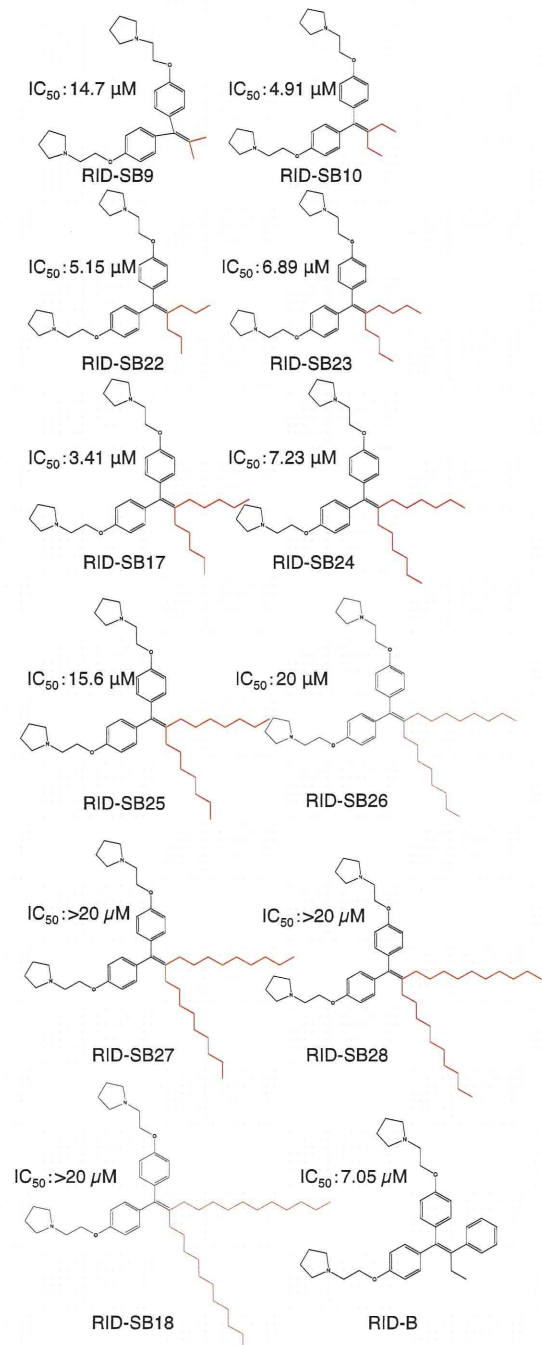


図 1. 各種 RID-B 構造類縁体とその傷害能(IC_{50})
低く、RID-B の未だに不明である標的との結合性が結果的に低下したものと考えられる。また、側鎖の炭素鎖が長い類縁体も、細胞膜の透過性が減少するためか細胞傷害能が低く、オートファジーも誘導されにくいものと推察された。以上、RID-B の活性

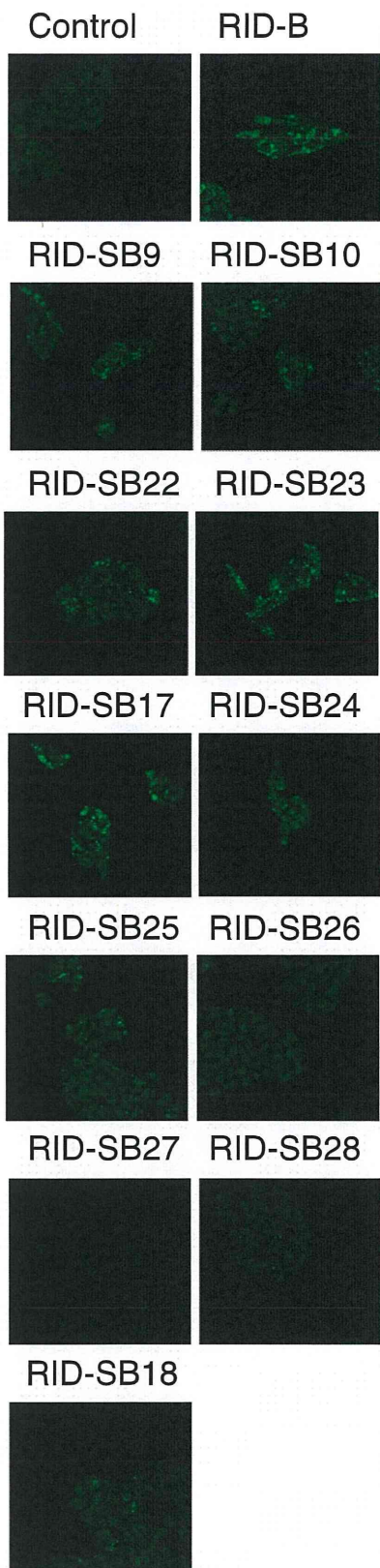


図2. 各種RID-B構造類縁体とLC3の発現の違い
(オートファジー能の検出)

を有する部分（今回改変していない構造部分）はアポトーシス、オートファジーを併せて起こしやすい性質を有するのではないかと考えられる。

今後、RID-Bによるオートファジーおよびアポトーシスの作用機序を明らかにする上でもRID-Bの標的が何であるのかを明らかにしていく必要がある。

E. 結論

RID-B誘導オートファジーはRID-Bによる細胞傷害と誘導の強さが相関しているため、RID-Bは構造的にアポトーシス、オートファジーを併せて引き起こしやすいものと考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Nagahara Y., Takeyoshi M., Sakemoto S., Shiina I., Nakata K., Fujimori K., Wang Y., Umeda E., Watanabe C., Uetake S., Yamori T., Dan S., Yoshimi Y., Shinomiya T., Ikekita M. Novel tamoxifen derivative Ridaifen-B induces Bcl-2 independent autophagy without estrogen receptor involvement. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, Vol.435, No.4, 657-663, 2013.

2. Tamegai H., Takada Y., Okabe M., Asada Y., Kusano K., Katagiri Y.U., Nagahara Y. *Aureobasidium pullulans* culture supernatant significantly stimulates R-848-activated phagocytosis of PMA-induced THP-1 macrophages. *Immunopharm. Immunotoxicol.*, Vol. 35, No. 4, 455-461, 2013.

3. Nagahara Y., Morita M., Nakata T., Iba

A., Shinomiya T. Loss of Bcl-2 expression correlates with increasing sensitivity to apoptosis in differentiating ES cells. *Cell Biol. Int.*, Vol. 38, No. 3, 381-387, 2014.

2. 学会発表

1. 酒本聖也、長原礼宗、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と Bcl-2 の関係、第 86 回日本生化学会大会（横浜）、2013.

2. 山本卓、吉見陽児、四宮貴久、羽鳥麻奈美、長原礼宗、植竹祥子、渡邊千尋、椎名勇、中田一弥、池北雅彦. 新規細胞死誘導剤リダイフェン-G のリソソームへの局在と機能阻害の検出、第 36 回日本分子生物学会年会（神戸）、2013.

3. 岩澤卓弥、酒本聖也、渡邊千尋、植竹祥子、中田健也、椎名勇、長原礼宗. 新規抗癌剤のリソソーム形成能解析、日本薬学会第 134 年会（熊本）、2014.

4. 酒本聖也、岩澤卓弥、渡邊千尋、植竹祥子、中田健也、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は標準的な経路とは異なったオートファジーを誘導する、日本薬学会第 134 年会（熊本）、2014.

平成25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、昨年度まで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、ER α 結合能を完全に失っているにもかかわらずタモキシフェンより高い抗がん効果を示す一連のリダイフェン誘導体を見出した。本年度、これらの誘導体のうちRID-SB8に注目し、その抗がん分子機構を解析した。39種類のがん細胞株に対する抗がん効果を調べた結果、ER α に結合しないRID-SB8は、予想通りER α 発現には非依存的な抗がん効果を示した。また、本剤の抗がん効果の最も高かったヒト神経膠肉腫由来SF539細胞に対し、活性酸素(ROS)を誘導し、ミトコンドリアの膜電位を低下させるとともに、ミトコンドリアに局在するアポトーシス誘導因子(AIF)を核へ移行させ、その結果がん細胞にアポトーシスを誘導することを明らかにした。また、15種類のがん細胞に対し、ROS産生に必要な薬剤濃度と細胞死を起こす薬剤濃度に有意な相関が認められた。このような関連は、タモキシフェンでは認められなかった。以上のことから、RID-SB8は、タモキシフェンとは異なり、ROS産生を介したミトコンドリア依存的な細胞死により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。我々はこれまでに、エストロゲン受容体 α (ER α)への結合能を失ったものの、幅広いがん細胞に対して抗がん効果を示す一連のリダイフェン誘導体を同定した。本研究では、こ

これらの誘導体のうち、RID-SB8 に着目し、その抗がんメカニズムとタモキシフェンのその差別化を試みた。

B. 研究方法

タモキシフェンおよび RID-SB8 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。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。また、細胞生存率は WST-8 アッセイキット (岸田化学) により行った。カスパーゼ活性化は、Caspase-Glo アッセイキット (プロメガ社) を用いて検討した。アポトーシス細胞は、propidium iodide (PI) によるサブ G1 細胞の検出と、FITC 標識アネキシン V によるホスファチジルセリン陽性細胞の検出を併用して、フローサイトメーターを用いて行った。ミトコンドリア膜電位は、JC-1 試薬 (モレキュラープローブズ社) とフローサイトメーターを用いて測定した。ROS の検出は、CM-H2DCFDA 蛍光試薬 (モレキュラープローブズ社) と蛍光プレートリーダーを用いて行った。

(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な問題はない。

C. 研究結果

昨年度の成果から、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いことが示されている。JFCR39 細胞株のうち ER α を発現している MCF-7

を用いて、ER α の発現をノックダウンさせた場合の抗がん効果を検討したところ、タモキシフェンへの感受性が大きく損なわれたのに対し、RID-SB8 への感受性には全く変化がなかった。このことから、RID-SB8 は ER α 非依存的に抗がん効果を発揮することが確かめられた。

RID-SB8 のヒトがん細胞パネル JFCR39 に対する感受性スペクトル (フィンガープリント) から、本剤はヒト神経膠肉腫由来細胞株 SF539 に最も高い抗がん効果を示す。本剤は、SF539 にアポトーシスに特徴的なサブ G1 細胞・ホスファチジルセリン陽性細胞の増加、カスパーゼの活性化を起こすことから、アポトーシスを起こすことが明らかになった。また、ミトコンドリアの膜電位を測定したところ、アポトーシスを起こす 2 μ M 以上で顕著な膜電位の低下を示した。ミトコンドリアを介したアポトーシスは、カスパーゼ依存経路のほかアポトーシス誘導因子 AIF の核移行によるカスパーゼ非依存経路が知られるが、本剤は確かに AIF の核移行を誘導すること、siRNA により AIF の発現をノックダウンすると生存率が部分的に回復することを示した。以上のことから、RID-SB8 がミトコンドリア膜電位を低下させ、カスパーゼ活性化、AIF 核移行を介したアポトーシスを起こすものと結論された。

ミトコンドリア依存的なアポトーシスを起こす薬剤の一部は、活性酸素 (ROS) を発生させることが知られている。RID-SB8 について検討したところ、SF539 細胞において ROS 産生が確認された。ROS のスカベンジャー (NAC=N-アセチルシステイ

ン)を前処置することにより、アポトーシスがほぼ抑制されることから、RID-SB8が誘導するアポトーシスはROS産生を介していることがわかった。一方、タモキシフェンを過剰濃度ですること処理によりROS産生が認められたものの、NAC前処置でアポトーシスは抑制されなかった。また本剤は、SF539を含む、調べた15種類すべてのヒトがん細胞株にROS産生を誘導した。注目すべきことに、ROSを産生させる薬剤濃度と細胞死を起こす濃度に有意な相関が認められた。このような関連は、タモキシフェンでは認められなかった。一方、正常組織由来の細胞株2種にはROS産生を起こさなかった。以上のことから、RID-SB8は、ROS産生を介したミトコンドリア依存的なアポトーシスを起こすこと、この作用はがん細胞に選択的であるものと結論された。

D. 考察

昨年度までの研究で、タモキシフェンのER α への結合は、C2位のフェニル基・エチル基の双方を必要とすることが示されている。RID-SB8は、同フェニル基を欠失するとともに、エチル基がプロピル基に置換されており、ER α に対する結合能を有していない。それにもかかわらず、RID-SB8はJFCR39細胞株に対する平均GI50値がタモキシフェンより低く、高い抗がん効果を示すこと、JFCR39の感受性スペクトル(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 α 結合の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ていた。

本研究で我々は、本剤がタモキシフェンとは異なり、MCF-7細胞に対する抗がん効果がER α の発現ノックダウンにより影響を受けなかったことからER α 非依存的な抗がん効果が確かめられた。また、本研究により、RID-SB8はがん細胞にROS産生を誘導すること、ROSスカベンジャーによりRID-SB8の誘導するアポトーシスが抑制されることから、本剤がROS産生を介してミトコンドリア依存的なアポトーシスを起こすことを明らかとなった。タモキシフェンの誘導するアポトーシスはROSのスカベンジャーではキャンセルされないことから、この活性はタモキシフェンとは本質的に異なるRID-SB8固有の抗がんメカニズムであると考えられる。

E. 結論

本研究で我々は、タモキシフェンとは作用メカニズムが本質的に異なるリダイフェンRID-SB8を同定することに成功した。また、本剤がROS産生を介してがん細胞に特異的にアポトーシスを誘導することを示した。本剤は、新たな活性を持つ新規抗がん剤リード化合物として期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

雑誌

1. Guo WZ, Shiina I, Wang Y, Umeda E, Watanabe C, Uetake S, Ohashi Y, Yamori T, Dan S. Ridaifen-SB8, a novel tamoxifen derivative, induces apoptosis via reactive oxygen species-dependent signaling pathway. *Biochem Pharmacol.*

- 2013;86(9):1272-1284.
2. 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;36(6):1008-1016.
 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. Jin M, Zhou Q, Lee E, Dan S, Duan HQ, Kong D. AS252424, a PI3Kgamma Inhibitor, Downregulates Inflammatory Responsiveness in Mouse Bone Marrow-Derived Mast Cells. *Inflammation.* 2014 (in press)
 5. Fukui Y, Narita K, Dan S, Yamori T, Ito A, Yoshida M, Katoh T. Total synthesis of burkholdacs A and B and 5,6,20-tri-epi-burkholdac A: HDAC inhibition and antiproliferative activity. *Eur J Med Chem.* 2014;76:301-313.
 6. 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 science.* 2013;104(3):360-368.
 7. Nagahara Y, Takeyoshi M, Sakemoto S, Shiina I, Nakata K, Fujimori K, Wang Y, Umeda E, Watanabe C, Uetake S, Yamori T, Dan S, Yoshimi Y, Shinomiya T, Ikekita M. Novel tamoxifen derivative Ridaifen-B induces Bcl-2 independent autophagy without estrogen receptor involvement. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;435(4):657-663.
 8. Kojima N, Fushimi T, Tatsukawa T, Yoshimitsu T, Tanaka T, Yamori T, Dan S, Iwasaki H, Yamashita M. Structure-activity relationships of hybrid annonaceous acetogenins: Powerful growth inhibitory effects of their connecting groups between heterocycle and hydrophobic carbon chain bearing THF ring on human cancer cell lines. *Eur J Med Chem.* 2013;63C:833-839.
 9. Hossain MI, Switalska M, Peng W, Takashima M, Wang N, Kaiser M, Wietrzyk J, Dan S, Yamori T, Inokuchi T. Design, synthesis, and in vitro cancer cell growth inhibition evaluation and antimalarial testing of trioxanes installed in cyclic 2-enoate substructures. *Eur J Med Chem.* 2013;69:294-309.
- 書籍
1. 旦慎吾. がん細胞パネル-バイオインフォマティクスによる新たな分子標的抗がん剤創薬とバイオマーカー探索. *日本臨牀.* 2014;72(2):102-108.
 2. 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, 旦慎吾, 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 化学療法基盤支援活動報告-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;40:116-146.

2. 学会発表

1. 郭文智、椎名勇、矢守隆夫、旦慎吾. Ridaifen-SB8, a novel tamoxifen derivative, induces apoptosis via Reactive Oxygen Species-dependent signaling pathway. 第 17 回日本がん分子標的学会.2013 (京都)
2. 礒山翔、梶原玄誠、玉城尚美、吉見直、中村直起、岡村睦美、西村由美子、矢守隆夫、旦慎吾. Evelopment of combination therapy with an IGF1R inhibitor and a PI3K inhibitor ZSTK474 in cancer cells exhibiting the intrinsic resistance to PI3K inhibitors. EORTC-NCI-AACR Symposium.2013 (米国・ボストン)
3. 礒山翔、旦慎吾、吉見直、西村由美子、中村直起、梶原玄誠、玉城尚美、岡村睦美、矢守隆夫. Identification of biomarkers for predicting efficacy of ZSTK474, a PI3K inhibitor / PI3K 阻害剤 ZSTK474 の感受性予測バイオマーカーの探索. 第 72 回日本癌学会.2013 (横浜)
4. 大橋愛美、旦慎吾、矢守隆夫. Identification of Novel Rac1 Activation Inhibitors / 新規 Rac1 活性化阻害剤の同定. 第 72 回日本癌学会.2013 (横浜)

5. 礒山翔、吉見直、岡村睦美、旦慎吾、矢守隆夫. PI3K 阻害剤 ZSTK474 の感受性予測バイオマーカーの探索. 第 17 回日本がん分子標的学会.2013 (京都)
6. 旦慎吾、礒山翔、西村由美子、中村直起、梶原玄誠、玉城尚美、矢守隆夫. Identification of a new inhibitor of the Golgi system, targeting ADP-ribosylation Factor 1 (Arf1) with potential for cancer therapy. 2013AACR Annual Meeting.2013 (米国・ワシントン D.C.)

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25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：リダイフェンの細胞内作用解析に関する研究
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

リダイフェンのプロテアソーム阻害作用は、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影響を与える。リダイフェンが抗がん剤開発のコンセプトに合致した薬理活性を有することの検証研究を展開した結果、リダイフェンが細胞内でプロテアソームを阻害して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、がん細胞をアポトーシスへと導くことを明らかにした。

A. 研究目的

本研究では新規化合物リダイフェン(RID)の抗がん作用メカニズムと分子構造に基づく分子間作用の詳細を明らかにすることを目的とする。今年度は、RID-Fの細胞内プロテアソーム阻害効果がアポトーシスを誘導するかどうかを検証した。

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：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

マステー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。次世代分子標的抗がん剤として、副作用の少なく体内動態に優れたプロテアソーム阻害剤の開発が期待されている。

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を示す。このことは、RIDの多様なケミカルライブラリーに新規な抗がん活性が含まれることを示唆する。

本研究では、RID-Fの顕著なプロテアソーム阻害作用がもたらす細胞内の増殖制御の効果について検証した。

B. 研究方法

ウェスタンブロットイング：HeLa 細胞 (4×10^5 cells/well) は 12 ウェルプレートで各濃度での RID-F を添加して 24 時間培養した。その後、細胞は抽出用緩衝液 (62.5 mM Tris-HCl, 2% SDS, 10% glycerol, 各種阻害剤) で溶解した。SDS-PAGE の後、ブロットイングを行った。抗ユビキチン抗体、抗 PARP 抗体、抗 Caspase-3 抗体を検出に使用した。

フローサイトメトリー：細胞を 70% メタノールで固定した。次に、Propidium Iodide (PI) で DNA 染色し、フローサイトメトリーで各細胞の DNA 量を計測した。通常よりも DNA 量の少ない細胞画分を、アポトーシス細胞 (Sub-G1 画分) として同定した。

(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、実施項目について倫理面に問題はない。

C. 研究結果

培養細胞に対するリダイフェン F (RID-F) のアポトーシス誘導効果について検討した。まず、HeLa 細胞に RID-F を作用させることにより、ユビキチン化されたタンパク質が蓄積した (図 1 A)。次いで、ポリ (ADP ーリボース) 合成酵素 (PARP) の切断による活性化が観察された (図 1 B)。フローサイトメトリーにより RID-F 処理濃度による細胞死の増減を観察した。RID-F 濃度 10 μ M より顕著に Sub-G1 画分が増加し、対照比較として計測した MG-132 の場合と同程度の割合を示した。(図 2)

D. 考察

プロテアソーム阻害によるタンパク質の異常蓄積は、細胞増殖を抑制し、アポトーシスによる細胞死すら引き起こす。本研究では、RID-F のプロテアソーム阻害効果が細胞増殖抑制、最終的にはアポトーシスを誘導するかどうかを検証した。代表的なプロテアソーム阻害剤 MG132 は、HeLa 細胞にアポトーシスを誘導することが知られている。この化合物を対照として、RID-F の作用を比較した。RID-F およびその誘導体はプロテアソーム阻害を介して、細胞内にユビキチン化タンパク質の異常蓄積を引き起こした。PARP の切断は、アポトーシス誘導の典型的な細胞内事象の一部である。RID-F は、用量依存的にこれらの変化を細胞内に引き起こすことが確認された。また、細胞死に関しても同様の濃度域で引き起こされることが確認された。これらの結果は、RID-F の細胞作用がアポトーシスを引き起こすことを意味する。

G. 研究発表

1. 論文発表

Hasegawa M, Yasuda Y, Tanaka M, Nakata K, Umeda E, Wang Y, Watanabe C, Uetake S, Kunoh T, Shionyu M, Sasaki R, Shiina I, Mizukami T (2014) A Novel Tamoxifen Derivative, Ridaifen-F, Is a Non-peptidic and Small-molecule Proteasome Inhibitor. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 71: 290-305.

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)

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

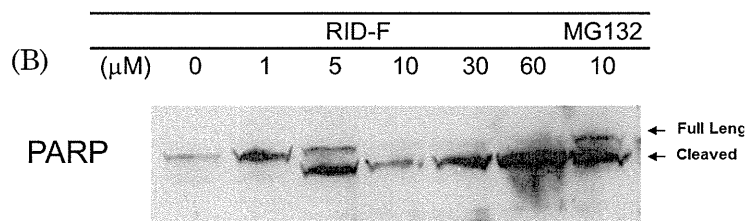
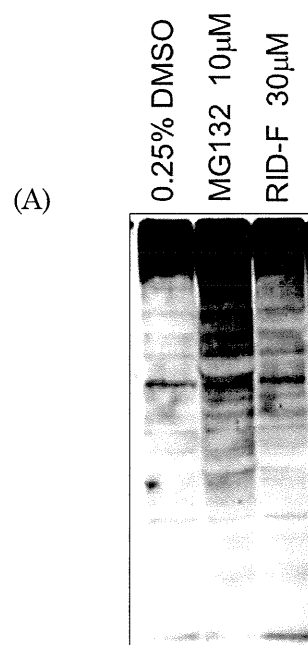


図1 (A) ユビキチン化タンパク質蓄積 (B) ポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (PARP)

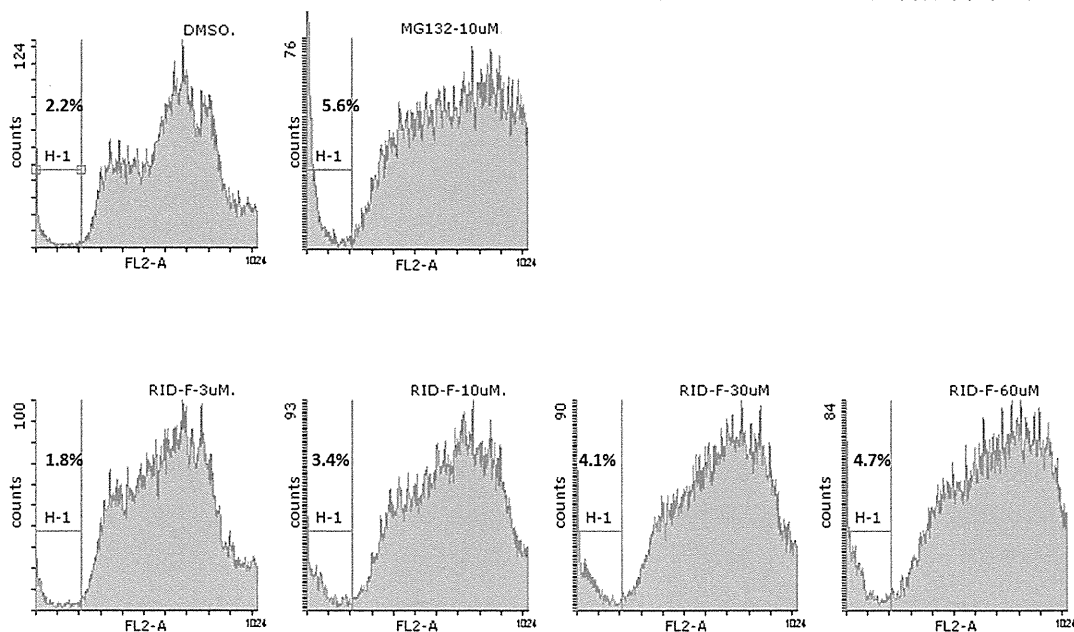


図2 フローサイトメトリによる Sub-G1 画分の計測