

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の詳細を明らかにした。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、新しいクラスのがん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のプロテアソーム阻害作用について、他の既知のプロテアソーム阻害剤との比較を行った。

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。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、前年度までにRID化合物群

の中でも特にRID-Fに関して顕著なプロテアソーム阻害作用があることを見出し、その構造活性相関を明らかにした。今年度は、さらに既知のプロテアソーム阻害剤との比較を行い、今後のドラッグデザインに関する指針を得た。

## B. 研究方法

精製 20S および 26S プロテアソームを用いた阻害活性の比較：RID-F および新たに当研究室でプロテアソーム阻害作用が見出された AMD3100、既知のプロテアソーム阻害剤である Lactacystin、Epoxomicin、Belactosin A、Bortezomib、MG132 (図 1) に関してプロテアソームの IC<sub>50</sub> (50%阻害濃度) を比較した。酵素反応速度は、50 $\mu$ M の蛍光標識基質 (Suc-LLVY-AMC、Z-LLE-AMC および Boc-LRR-AMC) を用い、分解に伴う波長 460 nm (励起波長 380 nm) の蛍光量増加により評価した。

### (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

まず、リダイフェン F (RID-F) の阻害様式に関して検討した。20S プロテアソームに対して、CT-L および PGPH 活性を測定するために使用する蛍光標識基質の K<sub>m</sub> は 32.4  $\mu$ M および 32.7  $\mu$ M であった。K<sub>m</sub> 付近の基質濃度で、RID-F による阻害効果を定量し、阻害定数 K<sub>i</sub> を決定したところ、CT-L 活性に対し 0.53  $\mu$ M、PGPH 活性に

対し 0.30  $\mu$ M を示した。意外なことに、RID-F は CT-L 活性に対し非拮抗型、PGPH 活性に対し拮抗型と作用様式が異なることが速度論解析から判明した。この結果は、RID-F がまず PGPH 活性に対して作用し、次いで協奏的に CT-L 活性に作用する可能性を示唆する。

次に、種々のプロテアソーム阻害剤との比較を 20S および 26S の 2 種の形態のプロテアソームに関して検討した。20S プロテアソームのキモトリプシン様活性 (CT-L) に対する RID-F の IC<sub>50</sub> は 0.65  $\mu$ M であった。AMD3100、Belactosin A に関しては 2.56  $\mu$ M および 1.02  $\mu$ M、Lactacystin、Epoxomicin、Bortezomib、MG132 に関しては、すべて 0.5  $\mu$ M 未満の阻害効果を示した (表 1)。次に、これらの化合物の 26S プロテアソームにおける CT-L 活性に対する IC<sub>50</sub> を測定した。Belactosin A、Epoxomicin、Bortezomib、MG132 は、その IC<sub>50</sub> に変化なかった。一方、RID-F、AMD3100、Lactacystin は、かなり弱い阻害活性しか示さないことがわかった (表 2)。以上の結果は、20S と 26S というプロテアソームの存在状態が、阻害剤作用に大きく影響することを示唆する。

## D. 考察

今回検証したプロテアソーム阻害剤のうち RID-F、AMD3100、Lactacystin は、非ペプチドの有機化合物である。一方、Epoxomicin、Belactosin A、Bortezomib、MG132 はすべてペプチド骨格を持つ。これらは、いずれも 20S プロテアソームに対しては阻害効果を示すのに対して、26S プロ

テアソームにはペプチド骨格を持つ化合物のみしか十分な阻害作用を示さない。

細胞内で、20S と 26S プロテアソームは、制御を担う 19S 複合体の有無により相互変換の平衡状態にある。19S 複合体は、ユビキチン認識とタンパク質フォールディングをほどく役割を持っている。ペプチド骨格を有する阻害剤は、何らかの 19S 複合体との相互作用を介して、26S プロテアソームに作用する可能性がある。そのため、26S プロテアソームを効率よく阻害するのであろう。

細胞レベルで RID-F のプロテアソーム阻害効果をより高めるためには、20S のみならず 26S プロテアソームにも作用させることが必要である。今年度の結果から、RID-F のドラッグデザインにたいして重要な示唆が得られた。それは、19S 複合体と相互作用しうるペプチド様構造の導入である。次年度は、その観点から検証を進め、プロテアソームを標的とした新規抗がん剤リード化合物としての開発を進める。

## 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

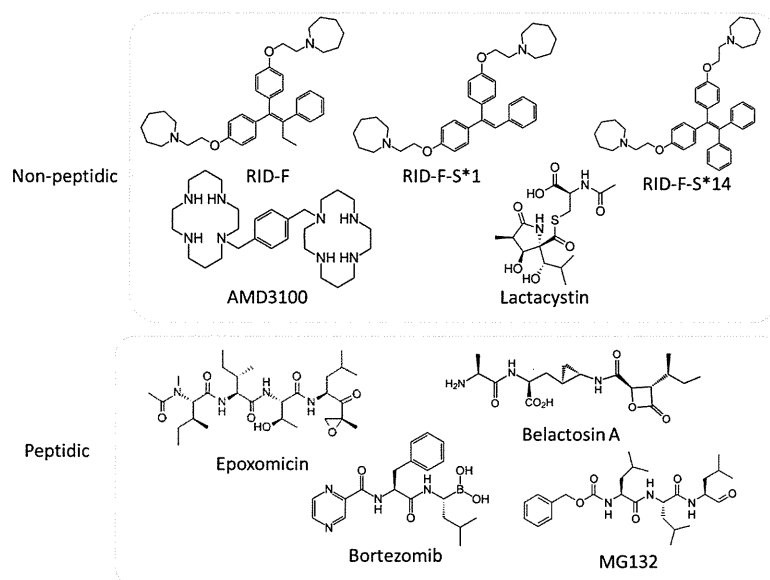


図1 検証に用いたプロテアソーム阻害剤

表1 20S プロテアソームに対する各種のプロテアソーム阻害剤作用

Inhibitors	IC50 (μM)			
	CT-L	PGPH	T-L	
RID-F	0.65	0.44	>8.0	Non-peptidic
AMD3100	2.56	2.70	>8.0	
Lactacystin	<0.5	>8.0	3.08	
MG132	<0.5	<0.5	6.58	Peptidic
Belactosin A	1.02	>8.0	>8.0	
Epoxomicin	<0.5	8.03	1.01	
Bortezomib	<0.5	<0.5	2.18	

表2 26S プロテアソームに対する各種のプロテアソーム阻害剤作用

Inhibitors	IC50 (μM)			
	CT-L	PGPH	T-L	
RID-F	>40.0	>40.0	>40.0	Non-peptidic
AMD3100	>40.0	>40.0	>40.0	
Lactacystin	11.5	>40.0	>40.0	
MG132	<0.1	0.39	>40.0	Peptidic
Belactosin A	1.26	7.21	>40.0	
Epoxomicin	<0.1	0.93	>40.0	
Bortezomib	<0.1	<0.1	>40.0	

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 真菌部 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、細胞増殖阻害の解除を指標にridaifensの抗HCV活性の評価を行った。調べた71 ridaifensのうち、24化合物がHCV感染により4%にまで低下したHuh7.5.1細胞の増殖を50%以上にまで回復させた。Ridaifensと構造が類似の選択的エストロゲン受容体モジュレーター(Selective estrogen receptor modulator; SERM)の多くはHCV複製を阻害するが、ridaifensの抗HCV活性とER結合能には相関は見られなかった。

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、得られた活性物質の作用を解析し、HCV生活環の理解、治療薬開発へと発展させる。

B. 研究方法

HCV JFH1株を高MOIでHuh7.5.1細胞に感染させると、増殖が強く阻害される。HCVの複製を阻害する物質は、HCVによる細胞変性効果(CPE)を抑制し、増殖を回復させる。細胞増殖阻害の解除を指標として、ridaifensの抗HCV作用を評価した。Huh7.5.1細胞を無血清培地に懸濁し、カラー

ゲンコートの96穴プレートにまき、HCV JFH1株をMOI=2で感染させた。4日間培養後、Cell Counting Kit-8により細胞増殖を測定した。核内受容体アッセイにはEnBio RCAS for ERを用いた。

(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

前年度までに19種のridaifensの抗HCV作用を測定していたが、今年度新たに52化合物の活性を調べた。HCV JFH1株をMOI=2でHuh7.5.1細胞に感染させると、細胞増殖はコントロールの5%以下にまで抑制される。ridaifensを10  $\mu$ M, 1  $\mu$ MでHCV JFH1感染前に添加し、HCVによる増殖阻害を解除する活性があるかどうかを調べた。対照として、HCVを感染させず化合物のみを添加したレプリカプレートを作り、化合物単

独の細胞増殖阻害活性を測定した。前年度までに測定した 19 化合物も改めて評価した。計 71 物質の抗 HCV 作用と Huh 7. 5. 1 細胞に対する増殖阻害活性を表 1 に示す。10  $\mu$ M で 14 化合物、1  $\mu$ M で 10 化合物が、4% にまで低下した細胞増殖を 50%以上に回復させた。

Ridaifens と構造が類似の、triphenylethylene を基本骨格に持つ tamoxifen、clomifene 等の選択的エストロゲン受容体モジュレーター (Selective estrogen receptor modulator; SERM) は HCV 複製を阻害する。RID-A~H、RID-PA~PG、RID-NA~NE のエストロゲン受容体 ( $ER\alpha$ ) 結合活性を調べたところ、 $ER\alpha$  結合能と抗 HCV 活性には相関は見られなかった。また、第 2 世代、第 3 世代の ridaifens には、ほとんど  $ER$  結合活性のない ( $IC_{50} > 10000$  nM) 化合物が存在する (Guo et al., Biol Pharmaceut Bull 36:1008-1016, 2013)。そのうち、RID-SB3, SB7, SG2, SG3, SG7 は HCV 感染による細胞増殖阻害を顕著に解除した。以上から ridaifens の抗 HCV 作用は  $ER$  を介したものではないと考えられた。

#### D. 考察

ridaifens と構造が類似の SERMs は HCV を阻害する。我々の今までの実験結果からは SERMs は、侵入過程を含む、HCV 生活環の複数の過程を阻害すると推定されるが、標的分子は明らかではなく、 $ER$  が関与しているかどうかはよくわかっていない。

ridaifens も SERMs 同様 HCV 生活環の複数の過程を阻害すると考えられる。ただ今

回、ほとんど  $ER$  結合活性のない化合物にも抗 HCV 活性が観察されたことから、 $ER$  は関与していないと推測される。また ridaifens は HCV 粒子そのものに作用することも考えられる。例えば 10  $\mu$ M の RID-SB15、および  $MOI=2$  の HCV 感染は、Huh 7. 5. 1 の増殖をそれぞれコントロールの 7%、4%にまで低下させた。しかし RID-SB15 と HCV の両者が存在すると増殖は 81%にまで回復した。このことから、RID-SB15 と HCV 粒子は相互作用し、互いの毒性を打ち消し合っている可能性が考えられる。

#### E. 結論

ridaifens は高い頻度で抗 HCV 活性を示した。その作用機序は未だ不明であり、標的分子の探索が今後の重要な課題である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Murakami, Y., Fukasawa, M., Kaneko, Y., Suzuki, T., Wakita, T., Fukazawa, H. Retinoids and rexinoids inhibit hepatitis C virus independently of retinoid receptor signaling. *Microbes and Infection* 16:114-122, 2014

Kaneko, Y., Fukazawa, H., Ohno, H., Miyazaki, Y. Combinatory effect of fluconazole and FDA-approved drugs against *Candida albicans*. *Journal of Infection and Chemotherapy* 19:1141-1145, 2013

#### G. 知的財産の出願・登録状況

なし

表 1

	10 $\mu$ M		1 $\mu$ M			10 $\mu$ M		1 $\mu$ M	
	+HCV	-HCV	+HCV	-HCV		+HCV	-HCV	+HCV	-HCV
none	4	100	4	100	RID-SB16	2	11	2	102
RID-A	80	74	6	98	RID-SB17	69	95	3	104
RID-B	96	96	4	98	RID-SB22	26	1	4	132
RID-C	28	102	3	97	RID-SB23	98	100	6	106
RID-D	5	95	3	96	RID-SB24	5	85	3	94
RID-E	0	0	103	96	RID-SD1	4	2	9	96
RID-F	25	104	4	109	RID-SD2	31	33	5	88
RID-G	0	0	44	104	RID-SD3	13	82	2	90
RID-H	0	0	86	109	RID-SD4	13	84	5	93
RID-PA	4	3	69	93	RID-SG1	0	0	40	97
RID-PB	1	1	52	91	RID-SG2	97	86	3	93
RID-PC	0	0	94	88	RID-SG3	81	87	9	91
RID-PD	55	49	5	98	RID-SG4	11	91	3	93
RID-PE	92	91	5	96	RID-SG7	85	86	3	103
RID-PF	0	0	36	96	RID-SG8	0	1	5	108
RID-PG	0	0	71	90	RID-SG9	1	2	21	117
RID-NA	0	0	81	97	RID-SG10	34	13	4	135
RID-NB	0	0	19	87	RID-SG11	0	0	4	102
RID-NC	0	0	98	113	RID-SG12	0	71	3	100
RID-ND	20	90	7	101	RID-SG13	0	45	3	92
RID-NE	0	0	78	108	RID-SG14	0	0	3	105
RID-NF	0	0	28	114	RID-SG15	0	0	6	110
RID-NG	0	0	102	108	RID-SG16	0	0	4	129
RID-SB1	0	0	12	109	RID-SG17	6	109	5	112
RID-SB2	8	6	18	89	RID-SG22	15	0	4	105
RID-SB3	82	91	2	90	RID-SG23	74	44	3	120
RID-SB4	28	87	5	94	RID-SG24	2	26	3	100
RID-SB7	58	60	11	87	RID-SF17	3	109	3	123
RID-SB8	0	0	12	102	RID-SF22	45	85	4	92
RID-SB9	37	45	9	105	RID-SF23	7	88	3	95
RID-SB10	103	95	3	121	RID-SF24	6	90	2	123
RID-SB11	0	0	8	116	RID-B-OH	0	0	22	87
RID-SB12	0	0	5	120	RID-SB1-OH	0	1	6	91
RID-SB13	0	0	19	116	RID-SG17-p-OH	0	0	21	84
RID-SB14	0	0	70	95	RID-S29-p-OH	0	0	6	90
RID-SB15	81	7	24	92	RID-S29-m-OH	0	1	3	89

Huh 7.5.1細胞を96-well plateに5000/wellで撒き、試験物質を最終濃度10  $\mu$ M, 1  $\mu$ Mになるように添加した。HCV JFH1株をMOI=2で感染(+HCV)、もしくは感染させず(-HCV)4日間培養した後、Cell Counting Kit-8を用いて細胞増殖を測定した。数字はコントロール(試験物質無添加、HCV非感染)に対する細胞増殖(%)を表す。

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：ファージディスプレイ法によるリダイフェンBに関する研究  
研究分担者：菅原 二三男(東京理科大学理工学部教授)

研究要旨

タモキシフェン(TAM)類縁体のリダイフェン(RID-B)は、TAMとは異なる作用機構を有することが示唆されている。RID-Bの結合タンパク質を解明することを目的とし、T7ファージディスプレイ法を用いて網羅的な標的分子の探索を行った。その結果、単一クローン結合試験、表面プラズモン共鳴(SPR)解析、及びプルダウンアッセイの三種類の結合試験から、RID-BとPERQ2のアミノ酸残基745-1030が結合することが示され、その解離定数は $1.86 \times 10^{-7}$  (M)であると算出された。PERQ2を過剰発現させた細胞に添加し、リン酸化されたAktを検出した結果、濃度依存的にAktのリン酸化が阻害されたことから、RID-BがPI3K/Akt経路に影響を与えることを見出した。

A. 研究目的

乳癌は乳房組織に発生する癌腫であり、世界中でよく見られる癌である。生涯に罹患する確率は、日本では約25~30人に1人、欧米では8~10に1人であり、近年さらに増加傾向にあるといわれている。そのため、有効な治療薬の開発が求められている。乳癌は、癌細胞の特徴により2種類に分類される。このうち全体の6~7割を占める乳癌は、女性ホルモンの一つエストロゲンによって癌細胞の増殖が促進される。このような乳癌の癌細胞には、女性ホルモンの働きを感知するエストロゲン受容体あるいはプロゲステロン受容体が発現しており、ホルモン受容体陽性乳癌に分類される。一方、癌細胞の増殖にエストロゲンを必要としない乳癌はホルモン受容体を発現しておらず、

ホルモン受容体陰性乳癌に分類される。ホルモン受容体陰性乳癌の治療には、他のがん治療と同様に化学療法が用いられる。一方、ホルモン受容体陽性乳癌では、化学療法以外にホルモン療法も有効な治療法として用いられている。ホルモン療法は、エストロゲンによって促進される癌細胞の分裂や増殖を、エストロゲンの産生あるいは、働きを阻害することにより抑制するものであり、これまでに多くのホルモン療法薬が開発されてきた。中でもタモキシフェンは、ホルモン療法薬の第一選択薬として長年汎用されてきた。

タモキシフェンは、組織特異的にエストロゲン受容体のアゴニストあるいはアンタゴニストとして作用する。乳房組織においては、アンタゴニストとして働き(抗エストロゲン作用)癌細胞の増殖を抑制するた



め、抗腫瘍効果を発揮する。一方、子宮においてはアゴニスト（エストロゲン様作用）として働くため、長期投与による子宮体癌などの発生率が高まることが指摘されており、改良が望まれている。このような背景から、タモキシフェンの改良を目的とし、本学においてタモキシフェンの化学構造類縁体であるリダイフェンが合成された。リダイフェン B (RID-B) は、エストロゲン受容体陽性細胞と陰性細胞に対し同程度の増殖阻害活性を有すると報告されている。また、COMPAR 解析を用いて RID-B の作用機構について予測した結果、RID-B は、タモキシフェンや既存の抗がん剤とは異なる作用機構を有する可能性が示された。これらのことから、RID-B はタモキシフェンとは異なり、エストロゲン受容体を介さない作用機構を有する可能性があり、タモキシフェンや既存の抗がん剤とは異なる新たな抗がん剤となり得ると期待されている。しかしながら、その詳細な作用機構についてはこれまでのところ明らかにされていない。

## B. 研究方法

本研究で用いたファージディスプレイ法は、結合タンパク質を探索する手法の一つで、外来のタンパク質やペプチドをバクテリオファージの外殻タンパク質上に提示する技術であり、モノクローナル抗体やペプチドなど、目的の分子に結合するペプチドの単離に用いられてきた（図1）。繊維状ファージである M13 ファージが主に用いられてきたが、その後、より大きな分子の提示が可能であり、提示分子のバイアスを抑えることのできる T7 ファージを用いた

系が確立された。近年は、この T7 ファージを用いたファージディスプレイ法により、ペプチドのみならず薬剤などの低分子化合物の結合タンパク質の同定に成功した報告も増えつつある。そこで本研究では、RID-B の作用機構の解明を目的とし、T7 ファージディスプレイ法を用いた結合タンパク質の探索に着手した。

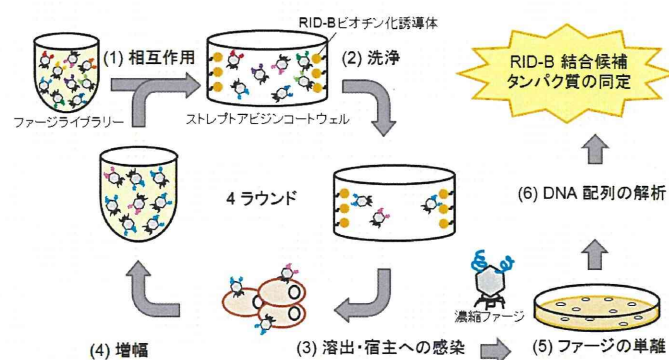


図1 ファージディスプレイ法の概念図

### (倫理面への配慮)

遺伝子組換え実験を実施するための、種々の申請、届出、報告については、本学規程等「東京理科大学遺伝子組換え実験実施規則」および「東京理科大学遺伝子組換え実験安全実施マニュアル」に従い、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」を順守した。

## C. 研究結果

これまでの研究から、RID-B はエストロゲン受容体を介さない作用機構を有することが予想された。そこで、エストロゲン受容体以外の結合分子を得るため、エストロゲン受容体を発現していないヒト急性リンパ性白血病細胞 Jurkat を用いて T7 ファージライブラリーを作製し、結合タンパク質の探索に用いた。ストレプトアビジン

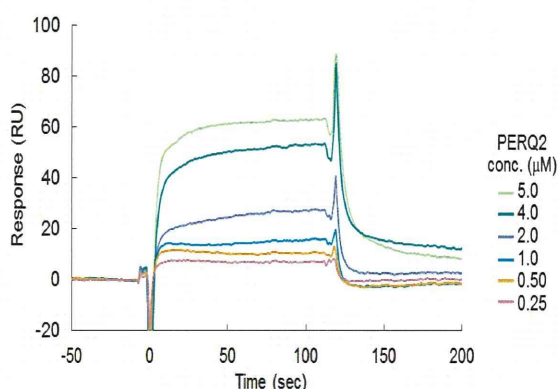
が塗布されたウェルに、アビジン-ビオチンの相互作用を利用し合成した RID-B ビオチン化誘導体を固定した。そこへ、作製したファージライブラリーを添加した。洗浄操作により非特異的に結合するファージを除いた後に結合するファージを溶出し、宿主大腸菌により感染増幅して次のラウンドに用いるファージ増幅液とした。これを 1 ラウンドとし、4 ラウンド繰り返し行い、RID-B に結合するファージを選抜した。選抜したファージを単離し、ファージに挿入された cDNA の配列を解析した。これに、ウェルやビオチンリンカーに結合するファージを除外するため、化合物を固定しないウェル及び、リダイフェン D (RID-D) のビオチン化誘導を固定したウェルを用いて同様に結合するファージを得た。これまでに側鎖の異なるさまざまなリダイフェンが合成されてきた。その中でも RID-B は強い増殖阻害活性を有するのに対し、RID-D は RID-B の 10 分の 1 程度その活性が劣る。このことから RID-D を比較対象として用いる事とした。その結果、RID-B 結合候補ファージとして 286 a.a. 提示ファージクローンを得、相同性を検索したところ、286 a.a. は PERQ amino acid-rich with GYF domain containing protein 2 (PERQ2) 745-1030 a.a. に一致していた。このことから、RID-B の結合タンパク質は PERQ2 であり、その結合部位は 745-1030 a.a. であることが示唆された。

そこで、RID-B と PERQ2 及びその 745-1030 a.a. 部位との結合をさらに評価した。始めに、大腸菌を用いて N 末端にヒスチジンタグを融合させた組み換えタンパ

ク質 PERQ2(745-1030) を作製し、表面プラズモン共鳴 (SPR) 装置を用いて相互作用を解析した。センサーチップ上に RID-B ビオチン化誘導体を固定し、そこへ様々な濃度の精製した PERQ2(745-1030) を添加し、結合量を観察した。その結果、RID-B と PERQ2(745-1030) の濃度依存的な結合が観察された。またその解離定数は 186 nM であり、これらが強く結合することが示された (図 2)。次に、ヒト胎児腎臓細胞 HEK293T を用いて発現させた PERQ2 の全長配列と RID-B の結合を pull-down assay により観察した。N 末端に FLAG タグを融合させた全長の PERQ2 を発現するベクターを作製し、これを HEK293T に遺伝子導入することにより一過的に PERQ2 を過剰発現させた。この細胞の抽出液と RID-B ビオチン化誘導体、あるいはコントロールとしてビオチンを固定した樹脂を混合し、PERQ2 の結合量をウェスタンブロットティングにより検出した。その結果、PERQ2 はビオチンには結合せず、RID-B に結合することが示された。

さらに、RID-B と PERQ2 が選択的に結合するかを確認するため、PERQ2 に対するリダイフェンの結合親和性を比較した。側鎖の異なる RID-D と PERQ2 の結合は弱いと考え、RID-D を比較対象として PERQ2 への結合を評価した。始めに、SPR 解析を用いて PERQ2(745-1030) との結合を解析した。その結果、RID-B では低濃度の PERQ2(745-1030) においても濃度依存的な結合が観察されたが、RID-D では低濃度における濃度依存的な結合は観察されなかった。また、全長の PERQ2 との結

合を pull-down assay を用いて観察した結果、SPR 解析と同様に RID-D と PERQ2 の結合も観察されたが、RID-B と PERQ2 の結合がより強いことが示された。以上の結果から、PERQ2 は RID-B の結合タンパク質であり、その 745-1030 a.a. において結合することが示された。

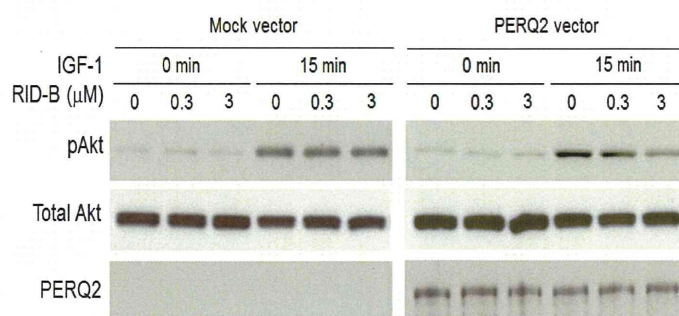


(図 2) RID-B と PERQ2(745-1030)の相互作用解析のヒストグラムの表面プラズモン共鳴

#### D. 考察

PERQ2 は、チロシンキナーゼ受容体下流のシグナル経路の調節に関わるタンパク質であり、この経路のうち、PI3K/Akt 経路への関与が報告されている。PERQ2 をノックダウンすると、PI3K/Akt 経路に含まれる分子である Akt のリン酸化が抑制されること、また乳癌細胞において PERQ2 の発現上昇と共に Akt のリン酸化レベルも上昇していることが示されている。そこで、RID-B が PI3K/Akt 経路に影響を与えるかを、Akt のリン酸化レベルを観察することで検証した。PERQ2 を過剰発現させた細胞において、無血清培地により培養することによってシグナルを抑制

した後、RID-B を添加した。その後、Insulin-like growth factor I (IGF-1) によって再度シグナルを誘導し、リン酸化された Akt を検出した。その結果 PERQ2 を過剰発現した細胞において RID-B は濃度依存的に IGF-1 により誘導された Akt のリン酸化を阻害することが示された (図 3)。



(図 3) RID-B は PERQ2 の発現依存的に Akt のリン酸化を減少させた

#### E. 結論

以上の結果から、RID-B の結合タンパク質として PERQ2 を同定し、また RID-B が Akt のリン酸化レベルを減少させることを示した。PERQ2 に結合する、あるいはその機能に影響を与える低分子化合物の報告は、本研究が初めてである。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Total synthesis and anti-hepatitis C virus activity of MA026. Shimura S, Ishima M, Nakajima S, Fujii T, Himeno N, Ikeda K, Izaguirre-Carbonell J, Murata H, Takeuchi T, Kamisuki S, Suzuki T, Kuramochi K, Watashi K, Kobayashi S, Sugawara F. J Am Chem Soc. 2013

- Dec 18;135(50):18949-56.
2. Specific inhibition of hepatitis C virus entry into host hepatocytes by fungi-derived sulochrin and its derivatives. Nakajima S, Watashi K, Kamisuki S, Tsukuda S, Takemoto K, Matsuda M, Suzuki R, Aizaki H, Sugawara F, Wakita T. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Nov 1;440(4):515-20.
  3. Synthesis, structure, and cytotoxicity studies of some fungal isochromanes. Kuramochi K, Tsubaki K, Kuriyama I, Mizushina Y, Yoshida H, Takeuchi T, Kamisuki S, Sugawara F, Kobayashi S. *J Nat Prod.* 2013 Sep 27;76(9):1737-45.
  4. A eukaryotic molecular target candidate of roxithromycin: fungal differentiation as a sensitive drug target analysis system. Ishii A, Kumasaka M, Nagashima Y, Nakajima Y, Kuramochi K, Sugawara F, Narukawa M, Kamakura T. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2013;77(7):1539-47.
  5. Inhibitory effects of low molecular weight polyphenolics from *Inonotus obliquus* on human DNA topoisomerase activity and cancer cell proliferation. Kuriyama I, Nakajima Y, Nishida H, Konishi T, Takeuchi T, Sugawara F, Yoshida H, Mizushina Y. *Mol Med Rep.* 2013 Jun 25. doi: 10.3892/mmr.2013.1547.
  6. Identification and Characterization of the Direct Interaction between Methotrexate (MTX) and High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) Protein. Kuroiwa Y, Takakusagi Y, Kusayanagi T, Kuramochi K, Imai T, Hirayama T, Ito I, Yoshida M, Sakaguchi K, Sugawara F. *PLoS One.* 2013 May 3;8(5):e63073. [Epub ahead of print]
  7. Mapping a Disordered Portion of the Brz2001-Binding Site on a Plant Monooxygenase, DWARF4, Using a Quartz-Crystal Microbalance Biosensor-Based T7 Phage Display. Takakusagi Y, Manita D, Kusayanagi T, Izaguirre-Carbonell J, Takakusagi K, Kuramochi K, Iwabata K, Kanai Y, Sakaguchi K, Sugawara F. *Assay Drug Dev Technol.* 2013 Apr;11(3):206-15.
  8. Ridaifen B, a tamoxifen derivative, directly binds to Grb10 interacting GYF protein 2. Tsukuda S, Kusayanagi T, Umeda E, Watanabe C, Tosaki Y, Kamisuki S, Takeuchi T, Takakusagi Y, Shiina I, Sugawara F. *Bioorg Med Chem.* 2013 Jan 1;21(1):311-20.
2. 学会発表
1. Identification of SQAP-binding proteins from a T7 phage display screen. Jesus Izaguirre Carbonell, Hiroshi Murata, Keisuke Ohta, Tomoe Kusayanagi, Senko Tsukuda, Kazuki Iwabata, Shinji

Kamisuki, Kengo Sakaguchgi, Fumio Sugawara. The Americal Society of Pharmacognosy 2013年7月14日～7月17日

2. T7 ファージディスプレイ法によるリダイフェン G 標的タンパク質の探索. 池田健太郎、紙透伸治、草柳友恵、九十田千子、椎名勇、菅原二三男. 日本ケミカルバイオロジー学会 第8回 2013年6月20日

3. Idetification of SQAP-binding proteins from a T7 phage display screen. Jesus Izaguirre Carbonell, Hiroshi Murata, Keisuke Ohta, Tomoe Kusayanagi, Senko Tsukuda, Shinji Kamisuki, Fumio Sugawara. 日本農芸化学会 2013年度(平成25年度)大会 2013年3月26日

#### H. 知的財産の出願・登録状況

(予定も含む。)

##### 1. 特許取得

特になし

##### 2. 実用新案登録

特になし

##### 3. その他

特になし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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-	化学療法基盤情報支援班	癌と化学療法	癌と化学療法社	東京	2013	40:116-146
水上民夫	抗がん薬のスクリーニング	相羽恵介	抗がん薬の臨床薬理	南山堂	東京	2013	2-13
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	最新がん薬物療法学-がんの薬物療法の最新知見-	日本臨牀	東京	2014	72(2):102-108

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yukitoshi Nagahara, 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	435(4)	657-663	2013
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(6)	1008-1016	2013
Wen-zhi Guo, Isamu Shiina, Yanwen Wang, Eri Umeda, Chihiro Watanabe, Shoko Uetake, Yoshimi Ohashi, Takao Yamori, Shingo Dan	Ridaifen-SB8, a Novel Tamoxifen Derivative, Induces Apoptosis via Reactive Oxygen Species-Dependent Signaling Pathway	Biochemical Pharmacology	86(9)	1272-1284	2013

Makoto Hasegawa, Yukari Yasuda, Tanaka, Kenya Nakata, Eri Umeda, Yanwen Wang, Chihiro Watanabe, Shoko Uetake, Tatsuki Kunoh, Masafumi Shionyu, Ryuzo Sasaki, Isamu Shiina, Tamio Mizukami	A Novel Tamoxifen Derivative, Ridaifen-F, Is a Nonpeptidic Small-molecule Proteasome Inhibitor,	European Journal of Medicinal Chemistry	71(1)	290-305	2014
Isamu Shiina	Asymmetric Mukaiyama Aldol Reactions Using Chiral Diamine-Coordinated Sn(II) Triflate: Development and Application to Natural Product Synthesis	The Chemical Record	14(1)	1272-1284	2014
Isamu Shiina	An Adventurous Synthetic Journey with MNBA from Its Reaction Chemistry to the Total Synthesis of Natural Products	Bulletin of the Chemical Society of Japan	87(2)	290-305	2014

(作成上の留意事項)

1. 省略
2. 「5. 研究成果の刊行に関する一覧表」に記入した書籍又は雑誌は、その刊行物又は別刷り一部を添付すること。
3. 「1. 厚生労働科学研究費補助金研究報告書表紙」から「5. 研究成果の刊行に関する一覧表」までの報告書等、及び「5. 研究成果の刊行に関する一覧表」に記入した書籍又は雑誌の刊行物又は別刷りは、一括して製本すること。ただし、一冊に製本することが困難な場合は複数の分冊ごとに製本することとし、各々の分冊に表紙を付けるとともに分冊の番号（1/n冊、2/n冊、一等）を表示すること。
4. 研究報告書（当該報告書に含まれる文献等を含む。以下本留意事項において同じ。）は、国立国会図書館及び厚生労働省図書館並びに国立保健医療科学院ホームページにおいて公表されるものであること。
5. 研究者等は当該報告書を提出した時点で、公表について承諾したものとすること。
6. その他  
日本工業規格A列4番の用紙を用いること。各項目の記入量に応じて、適宜、欄を引き伸ばして差し支えない。



# 1

## 抗がん薬のスクリーニング

抗がん薬のスクリーニング・開発法は、1990年代後半の分子標的薬の登場以降、劇的に変化した。従来の化学療法薬における方法論の大部分は、分子標的薬にはあてはまらなくなっている。現在世界で30を優に超えるがん分子標的薬が認可されており、いまや分子標的薬のファミリーは、抗がん薬の世界において、DNA作用薬、微小管作用薬などのクラシカルな化学療法薬ファミリーを凌ぐまでに成長した。本稿では抗がん薬開発の歴史の変遷について述べた後、世界で認可されている分子標的薬と臨床試験中の分子標的薬の開発状況を紹介します。その後、分子標的薬の基本的な開発戦略を含め、スクリーニングや開発プロセスにおける最新の研究手法を詳しく解説する。

### 1 抗がん薬のスクリーニングの開発の変遷

抗がん薬のスクリーニングは、可移植性実験腫瘍モデルの樹立とともに、1940年代に本格的に始まった<sup>1)</sup>。その最初の成果がアルキル化薬のナイトロジェンマスタード(mechlorethamine)であり<sup>2,3)</sup>、続く成果が葉酸拮抗薬のaminopterinである<sup>4)</sup>。これらの成功により、米国では抗がん薬開発の機運が高まり、1955年には議会の承認を得て、米国国立がん研究所(NCI)にCancer Chemotherapy National Service Center (CCNSC)が設置された。このセンターで、マウス同系腫瘍L1210白血病モデル(1975年からはP388白血病モデル)やSarcoma 180などを一次スクリーニング系として、大規模なランダムスクリーニングが実施された<sup>5,6)</sup>。

わが国においては、1940年代から吉田富三らが自ら樹立したラットの吉田肉腫や腹水肝がんを用いた抗がん薬のスクリーニングを開始し、1952年には石館守三らとともに国産第1号の抗がん薬となるナイトロジェンマスタードのN-オキシド(ナイトロミン)の開発に成功している<sup>7)</sup>。またその後わが国では、抗がん性抗生物質のスクリーニングが活発に行われ、現在も臨床の場で用いられる2種の重要な抗がん薬が発見された。すなわち、1955年に秦藤樹らにより*Streptomyces caespitosus*の培養液から発見されたmitomycinである<sup>8)</sup>。Mitomycin類のなかで安定性が高く、最も強い抗腫瘍活性を有するmitomycin Cが協和発酵工業の若木重敏らによって分離され<sup>9)</sup>、1963年に認可された。また1966年には、梅沢浜夫らにより*Streptomyces verticillus*の培養液からbleomycinが発見され、1968

年に認可された<sup>10)</sup>。これらの実績により、わが国が抗がん薬開発へ果たした貢献は非常に大きいといえよう。

NCIのCCNSCにおける抗がん薬スクリーニングは、1976年にNCIの新組織であるDevelopmental Therapeutics Program (DTP)に引き継がれ、現在に至っている。途中、プログラムの見直しが適宜行われ、1975年にはヒト腫瘍移植マウスモデルが導入された。1990年には60種類のヒトがん細胞株(肺、大腸、脳、前立腺、卵巣、乳、腎臓の各がん、メラノーマ、白血病由来)のパネルを用いたdisease-oriented screening (DOS)と呼ばれるスクリーニング法が開発され、細胞増殖抑制活性の一次スクリーニングが行われることになった<sup>11)</sup>。年間約2,500化合物が一次スクリーニングに供され、増殖阻害の選択性、強さ、作用メカニズムのユニークさなどの基準により選択される150~200化合物が、セミ*in vivo*ともいえる12種のヒトがん細胞が充填されたストロー状の限外濾過膜(hollow fiber)を腹腔内移植したマウスモデルで評価される。最終的に一次スクリーニングした化合物の2%に相当する約50化合物が、ヒト腫瘍移植マウスモデルを用いる抗がん評価に進むという。このモデル系で低毒性かつ抗腫瘍効果を示すと、薬物動態、製剤化試験が行われる。さらに本試験もパスすると、臨床試験を見越して、試験サンプルの製造と同サンプルを用いて2種の動物を用いた毒性評価が行われ、臨床試験の実施の可否が最終判断される<sup>11)</sup>。

これまでにNCIがスポンサーとして支援した抗がん薬で米国FDAが認可したがん化学療法薬およびホルモン療法薬の代表的な事例としては、アルキル化薬のcarmustine, dacarbazine, 白金製剤のcisplatin, carbo-



platin, 代謝拮抗薬の cytarabine, fludarabine, pentostatin, hydroxyurea, トポイソメラーゼ阻害薬の topotecan, mitoxantrone, 微小管阻害薬の paclitaxel, eribulin, ホルモン療法薬での tamoxifen があげられる<sup>11)</sup>. これらの実績により, 1955 年以降の抗がん薬開発の歴史における NCI の貢献は極めて大きいといえる.

このように, がん化学療法薬は, 当初は可移植性実験腫瘍モデルを用いて, また途中からはがん細胞株も加えて, 殺細胞活性をもつ化合物のスクリーニングにより見出され開発された. 開発段階では薬剤の標的分子は不明であったが, 後に行われた作用メカニズムの解析から, 薬効標的分子が DNA そのものや DNA や RNA の生合成酵素, またトポイソメラーゼ, 微小管であることが判明した. これらの標的は正常細胞においても必須の役割を果たすことから, このようなスクリーニング戦略によって開発される抗がん薬に対して, がん細胞に対する選択的な増殖阻害や殺細胞活性を期待することは本質的に限界があるといえる.

## 2 化学療法薬から分子標的薬へ： 抗がん薬スクリーニングの パラダイムシフト

1980 年代のヒトがん遺伝子やがん抑制遺伝子の発見により, がんが遺伝子疾患であることが証明され, それ以来がん細胞選択的な増殖阻害や殺細胞効果を期待して, これらのがんの原因遺伝子の産物を標的とした抗がん薬の開発が活発に進められてきた. その結果, とくに 1997 年以降, がん遺伝子産物などをターゲットとする分子標的薬の開発は大きな成功を収め, 現在世界で 30 を優に超える分子標的薬が認可されている. 今や分子標的薬のファミリーは抗がん薬の世界において, DNA 作用薬, 代謝拮抗薬, トポイソメラーゼ阻害薬, 微小管作用薬などのクラシカルな化学療法薬ファミリーを凌ぐまでに成長している<sup>12)</sup>.

### ● 認可されている分子標的薬

これまでに認可された分子標的薬の標的分子の大部分は, 1980 年代のがん遺伝子研究を中心とするがんの分子生物学の基礎研究から生まれたが, その後もがんに関わる生命現象の解明は大きく進展し続け, 得られた知見に基づいた創薬研究が現在も活発に展開され

ている.

図 I-1-1 には, Hanahan と Weinberg により, 2000 年から 10 年間のがんの基礎研究の知見を加えてバージョンアップされたがん固有の生物学的性質がまとめられている. これらは今後の分子標的薬の創薬標的として重要である<sup>13)</sup>. その性質として, ①増殖シグナルの自己完結性, ②増殖抑制シグナルへの不応, ③アポトーシスへの抵抗, ④血管新生の誘導, ⑤浸潤・転移の活性化, ⑥複製を可能にする不死能力, ⑦ゲノムの不安定性, 変異, ⑧エネルギーメタボリズムの亢進, ⑨炎症によるがん化促進, ⑩免疫排除からの回避の合計 10 項目があげられている. これらのがんの特徴を標的として, その働きを抑制できる活性をもつ物質には, がん特異的な抗がん作用が期待できる. とくに①の「増殖シグナルの自己完結性」については, がん遺伝子の実験的同定の原理ともなっており, がん遺伝子は, 抗がん薬創薬にとって, いわば機能検証がすんだ重要標的である, と言っても過言ではない. 事実, 次に述べるように, これまでに認可にまで至った分子標的薬の多くはがん遺伝子産物を標的として開発された薬剤となっている.

表 I-1-1 には, これまでに世界で認可された分子標的薬をまとめた. 表にある 38 剤の内訳は, 27 剤が低分子医薬品, 10 剤がモノクローナル抗体医薬品, 1 剤が受容体 /IgG 抗体 Fc 融合蛋白質医薬品である. なおこの表には, 毒素や放射性物質で標識した抗体医薬品, 抗体以外の蛋白質医薬品, 全トランス型レチノイン酸 (ATRA) などの分化誘導薬剤, サリドマイド系薬剤は含めていない.

表に示す抗がん薬の標的分子では, trastuzumab, pertuzumab と lapatinib の標的である HER2, また gefitinib, erlotinib, cetuximab, panitumumab および lapatinib の標的である epidermal growth factor receptor (EGFR), imatinib の標的である BCR-ABL, さらに最近認可された crizotinib の標的である ALK といったチロシンキナーゼ活性を有するがん遺伝子産物が多くを占めている.

最近では, 単一標的に対して作用する, いわゆる“ピュアー”な作用をもつ薬剤に続いて, 複数のプロテインキナーゼに対して阻害作用をもつ sorafenib や sunitinib, pazopanib, vandetanib, axitinib, rego-

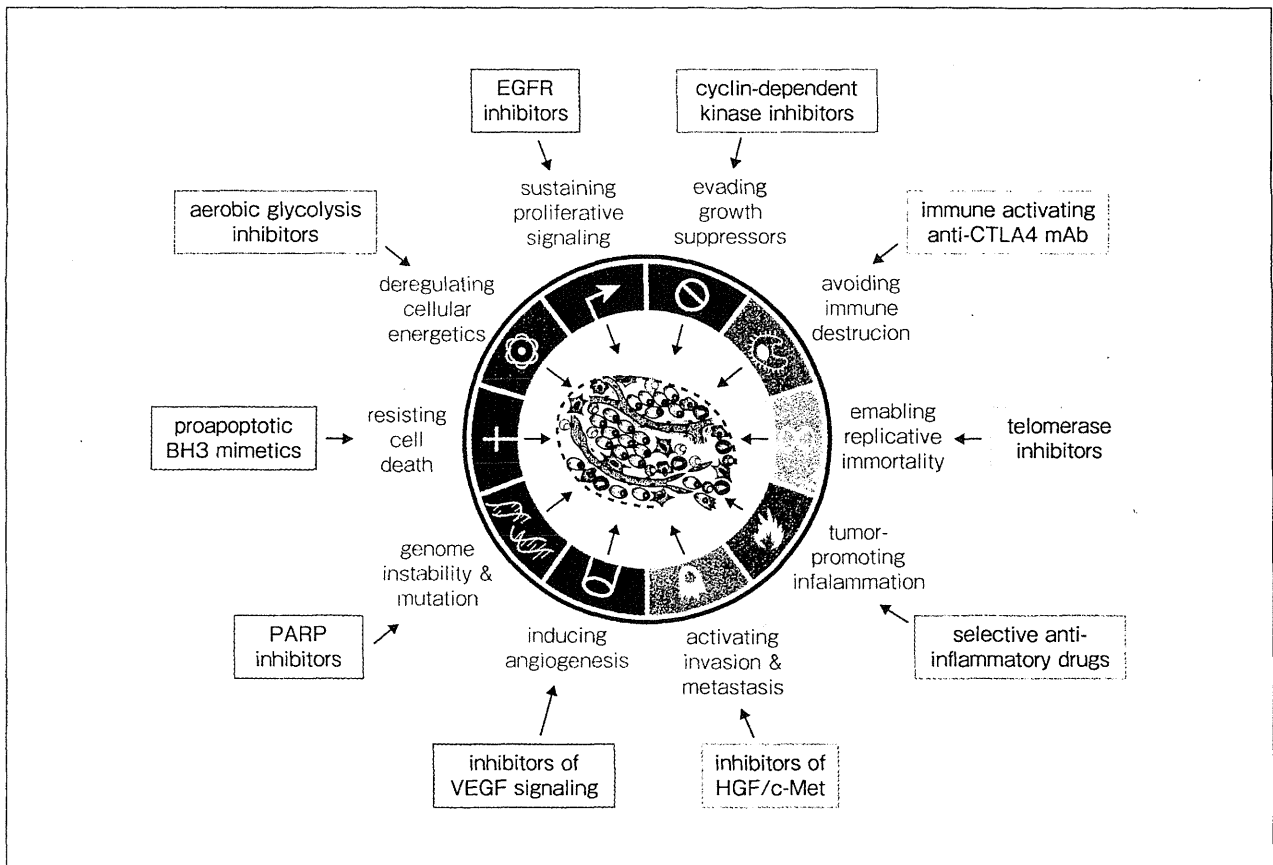


図 I-1-1 がんの特性：分子標的薬の創薬標的

(文献 13 より)

rafenib, cabozantinib といった“マルチターゲット”作用薬が登場している。その開発コンセプトは、多くの固形がんでがん化のプロセスに複数の因子が関与することから、マルチターゲットに作用する薬剤のほうが、単剤で高い効果が期待できるとの考えに基づいている。

一方、Weinstein は、がん細胞の増殖と生存の維持が特定のがん遺伝子の活性化に強く依存している状態を“oncogene addiction：がん遺伝子中毒”と呼び、がん細胞のアキレス腱として、これらのがん遺伝子は格好の治療標的となるとしたが、前述の“ピュア”な作用をもつ薬剤はまさにこのコンセプトに適合する<sup>14)</sup>。

最近、前述のチロシンキナーゼ阻害活性をもつ分子標的薬に対する薬剤耐性ががんの出現が問題となり始めているが、imatinib 耐性の慢性骨髄性白血病については、第 2、第 3 世代の BCR-ABL キナーゼ阻害薬が開発され、dasatinib と nilotinib, bosutinib, ponatinib が認可されている。

一方、セリン・スレオニンキナーゼ阻害活性をもつ分子標的薬に関しては、セリン・スレオニンキナーゼ活性をもつ mTOR に対する阻害薬である temsirolimus, everolimus が腎細胞がんを適応として、また最近では、同じくセリン・スレオニンキナーゼ活性をもつ BRAF (V600E 変異) の阻害薬である vemurafenib がメラノーマを適応として認可されている。

なお前述の 24 種のキナーゼ阻害薬カテゴリー以外の薬剤としては、エピジェネティクス作用薬のカテゴリーに属する DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) 阻害薬の azacitidine, decitabine, またヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害薬の vorinostat, romidepsin の合計 4 種の薬剤が認可されている<sup>15)</sup>。その他のカテゴリーとして、プロテアソーム阻害薬である bortezomib と carfilzomib, hedgehog シグナル伝達経路の阻害薬である vismodegib が認可されている。

またモノクローナル抗体医薬品としては、前述の trastuzumab, pertuzumab, cetuximab, panitumumab

表 I-1-1 世界で認可された主要な分子標的薬

一般名	標的分子	適応がん種	承認年
rituximab * <sup>1</sup>	CD20	B 細胞性腫瘍	1997
trastuzumab * <sup>1</sup>	Her2 * <sup>2</sup>	乳がん	1998
alemtuzumab * <sup>1</sup>	CD52	慢性リンパ性白血病	2001
imatinib	BCR-ABL/Kit * <sup>2</sup>	CML, GIST, Ph 陽性 ALL	2001
gefitinib	EGFR * <sup>2</sup>	非小細胞肺癌	2002
bortezomib	proteasome	多発性骨髄腫, MCL	2003
bevacizumab * <sup>1</sup>	VEGF	大腸がん, 非小細胞肺癌, 乳がん, グリオブラストーマ, 腎細胞がん, 卵巣がん	2004
cetuximab * <sup>1</sup>	EGFR * <sup>2</sup>	大腸がん, 頭頸部がん	2004
erlotinib	EGFR * <sup>2</sup>	非小細胞肺癌, 膵がん	2004
azacitidine	DNMT	骨髄異形成症候群	2004
sorafenib	multi-kinases * <sup>2</sup>	腎細胞がん, 肝細胞がん	2005
sunitinib	multi-kinases * <sup>2</sup>	GIST, 腎細胞がん, NET	2006
dasatinib	BCR-ABL/Src * <sup>2</sup>	CML, Ph 陽性 ALL	2006
panitumumab * <sup>1</sup>	EGFR * <sup>2</sup>	大腸がん	2006
vorinostat	HDAC	皮膚 T 細胞性リンパ腫	2006
decitabine	DNMT	骨髄異形成症候群	2006
lapatinib	EGFR/Her2 * <sup>2</sup>	乳がん	2007
temsirolimus	mTOR * <sup>2</sup>	腎細胞がん	2007
nilotinib	BCR-ABL * <sup>2</sup>	CML	2007
everolimus	mTOR * <sup>2</sup>	腎細胞がん, SEGA, NET, 乳がん	2009
pazopanib	multi-kinases * <sup>2</sup>	腎細胞がん, 軟部腫瘍	2009
romidepsin	HDAC	皮膚 T 細胞性リンパ腫	2009
denosumab * <sup>1</sup>	RANKL	多発性骨髄腫による骨病変および固形がん骨転移による骨病変	2010
ipilimumab * <sup>1</sup>	CTLA-4	メラノーマ	2011
vandetanib	multi-kinases * <sup>2</sup>	甲状腺髄様がん	2011
vemurafenib	BRAF (V600E) * <sup>2</sup>	メラノーマ	2011
crizotinib	ALK * <sup>2</sup>	非小細胞肺癌	2011
ruxolitinib	JAK * <sup>2</sup>	骨髄線維症	2011
axitinib	Multi-kinases * <sup>2</sup>	腎細胞がん	2012
vismodegib	Hh signaling	基底細胞がん	2012
mogamulizumab * <sup>1</sup>	CCR4	成人 T 細胞白血病リンパ腫	2012
pertuzumab * <sup>1</sup>	Her2 * <sup>2</sup>	乳がん	2012
carfilzomib	Proteasome	多発性骨髄腫	2012
ziv-aflibercept * <sup>1</sup> *	VEGF	大腸がん	2012
bosutinib	Bcr-Abl/Src * <sup>2</sup>	CML	2012
regorafenib	Multi-kinases * <sup>2</sup>	大腸がん	2012
cabozantinib	Multi-kinases * <sup>2</sup>	甲状腺髄様がん	2012
ponatinib	Bcr-Abl (T315I) * <sup>2</sup>	CML, Ph + ALL	2012

(2013年1月時点)

\* 1: 抗体医薬 (\*: VEGF 受容体 /IgG 抗体 Fc 融合蛋白質医薬品), \* 2: キナーゼ標的.

(文献 16 を改変)

以外では, CD20 を抗原とする rituximab, CD52 を抗原とする alemtuzumab, 血管内皮細胞成長因子 (VEGF) を抗原とする bevacizumab, RANKL を抗原とする denosumab, CTLA-4 を抗原とする ipilimumab, CCR4 を抗原とする mogamulizumab が認可さ

れている。また最近 VEGF 受容体 /IgG 抗体 Fc 融合タンパク質医薬品である ziv-aflibercept が認可されている。

表 I-1-2 国内外で臨床試験中の低分子化合物の標的分子

① マルチキナーゼ標的 (化合物総数: 26)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• VEGF expression [1]</li> <li>• HIF-1 alfa expression [1]</li> <li>• integrin alfa2 expression [1]</li> <li>• ICAM-1 expression [1]</li> <li>• STAT3 phosphorylation [2]</li> <li>• SH2 domain-containing tyrosine phosphatases-1 and-2 (SHP-1 and SHP-2) [1]</li> </ul>
② チロシンキナーゼ標的 (受容体型) [標的総数: 13] [化合物総数: 84]	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• EGFR/Her2 [21]</li> <li>• IGF1R [6]</li> <li>• VEGFR [12]</li> <li>• PDGFR [3]</li> <li>• FGFR [5]</li> <li>• CSF1R [2]</li> <li>• c-Kit [4]</li> <li>• c-Met [17]</li> <li>• FLT3 [6]</li> <li>• Trk [1]</li> <li>• Tie2 [1]</li> <li>• Alk [5]</li> <li>• Ret [1]</li> </ul>	
③ チロシンキナーゼ標的 (非受容体型) [標的総数: 7] [化合物総数: 29]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) [12]</li> <li>• farnesyltransferase (FTPase) /Ras signaling [8]</li> <li>• proteasome [4]</li> <li>• Nedd 8 Activating Enzyme [1]</li> <li>• Hsp90 [18]</li> <li>• GRP78 [1]</li> <li>• ER stress induction [1]</li> <li>• mitotic kinesin [9]</li> <li>• CRM1/XPO1 [2]</li> </ul>
④ セリン・スレオニンキナーゼ標的 (MAPK 経路) [標的総数: 3] [化合物総数: 28]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Src [4]</li> <li>• Lyn [2]</li> <li>• Bcr-Abl [5]</li> <li>• Btk [3]</li> <li>• Syk [2]</li> <li>• FAK [4]</li> <li>• JAK [9]</li> </ul>
⑤ セリン・スレオニンキナーゼ標的 (PI3K/Akt/mTOR 経路) [標的総数: 3] [化合物総数: 58]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MAPK/ERK kinase (MEK) [17]</li> <li>• Raf [8]</li> <li>• p38 MAPK [3]</li> <li>• p53 activation [5]</li> <li>• Bcl-2 (BH3 mimetic) [4]</li> <li>• inhibitor of apoptosis protein (IAP) [6]</li> <li>• survivin expression [1]</li> <li>• mitochondrial function [1]</li> <li>• autophagy [1]</li> </ul>
⑥ セリン・スレオニンキナーゼ標的 (細胞周期関連) [標的総数: 6] [化合物総数: 49]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• phosphoinositide 3-kinase (PI3K) [28]</li> <li>• Akt [12]</li> <li>• mTOR [18]</li> <li>• cyclin dependent kinase (CDK) [16]</li> <li>• Wee1 kinase [1]</li> <li>• CDC7 [2]</li> <li>• checkpoint kinase (Chk) 1/2 [9]</li> <li>• aurora kinase [13]</li> <li>• polo-like kinase (PLK) [8]</li> </ul>
⑦ セリン・スレオニンキナーゼ標的 (その他) [標的総数: 10] [化合物総数: 14]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• protein kinase C [4]</li> <li>• casein kinase II (CK2) [1]</li> <li>• PDK1 [1]</li> <li>• DNA-PK [1]</li> <li>• PIM [2]</li> <li>• TGF β R1 kinase [1]</li> <li>• p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4 (PAK4) [1]</li> <li>• glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3) [1]</li> <li>• sphingosine kinase-2 [1]</li> <li>• choline kinase alpha [1]</li> </ul>
⑧ キナーゼ以外の標的 (エピジェネティクス, テロメア制御, 遺伝子発現) [標的総数: 12] [化合物総数: 36]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• histone deacetylases (HDAC) [23]</li> <li>• BET (Bromodomain and Extra Terminal) family [1]</li> <li>• telomerase [2]</li> <li>• splicing factor (SF) 3b [1]</li> <li>• nuclear factor kappa B (NF-κB) [1]</li> <li>• human metal-regulatory transcription factor 1 (MTF-1) [1]</li> </ul>
⑨ キナーゼ以外の標的 (蛋白質翻訳後修飾・分解・フォールディング, 分子モーター, 核外輸送) [標的総数: 9] [化合物総数: 56]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hedgehog signaling pathway [7]</li> <li>• Notch signaling pathway [4]</li> <li>• Wnt signaling pathway [2]</li> <li>• cancer stem cell pathway [2]</li> </ul>
⑩ キナーゼ以外の標的 (アポトーシス, オートファジー) [標的総数: 16] [化合物総数: 18]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• p53 activation [5]</li> <li>• Bcl-2 (BH3 mimetic) [4]</li> <li>• inhibitor of apoptosis protein (IAP) [6]</li> <li>• survivin expression [1]</li> <li>• mitochondrial function [1]</li> <li>• autophagy [1]</li> </ul>
⑪ キナーゼ以外の標的 (Hedgehog/Notch/Wnt 経路, がん幹細胞経路) [標的総数: 4] [化合物総数: 15]	<ul style="list-style-type: none"> <li>• NADH-Ubiquinone Oxidoreductase [1]</li> <li>• tumor-specific NADH oxidase [1]</li> <li>• nicotinamide phosphoribosyltransferase [2]</li> <li>• gamma-glutamylcysteine synthetase [1]</li> <li>• S-adenosyl-L-methionine decarboxylase (SAMD) [1]</li> <li>• cyclooxygenase-2 (COX-2) [3]</li> <li>• cyclic guanosine monophosphate-phosphodiesterase (cGMP-PDE) [1]</li> <li>• cathepsin K [1]</li> <li>• endothelin A receptor antagonist [1]</li> <li>• integrin receptor antagonist [1]</li> <li>• chemokine receptor 2 (CCR2) antagonist [1]</li> <li>• CXCR4 antagonist [2]</li> <li>• PPAR gamma agonist [1]</li> <li>• toll-like receptor (TLR) agonist [2]</li> <li>• angiopoietin [1]</li> <li>• Sam68 [1]</li> <li>• TRPV6 calcium channel [1]</li> </ul>
⑫ キナーゼ以外の標的 (その他) [標的総数: 17] [化合物総数: 22]	<p>(2013年1月時点) 〔 〕内の数値: 当該標的に対する臨床試験進行中の化合物数。 (文献 16 を改変)</p>

## ● 開発中の分子標的薬

表 I-1-2 には、国内外で臨床試験が進行中の低分子性の分子標的薬 435 化合物 (延べ数) の創薬標的分子をリストアップした<sup>16)</sup>。この表にはトータル 90 種

の標的分子が示されている。なお本表には、抗体・蛋白質医薬品、核酸医薬品、内分泌療法剤、全トランス型レチノイン酸 (ATRA) などのビタミン A 誘導体、サリドマイド系薬剤は含まれていない。