

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22240092

研究課題名（和文） Cancer Cell Informatics による革新的な分子標的薬の創薬研究

研究課題名（英文） Discovery of innovative molecular targeted drugs based on Cancer Cell Informatics

研究代表者

矢守 隆夫（YAMORI TAKAO）

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・客員研究員

研究者番号：60200854

研究成果の概要（和文）：新しい抗がん剤を見出すために独自に開発したがん細胞情報システムをさらに進化させ、これを用いて新規抗がん物質 AMF-26 を見出した。本剤は、がん細胞内の膜小胞輸送を司るゴルジ体を破壊し、がん細胞増殖を阻害した。さらに、ヌードマウスに移植したヒト乳がん BSY-1 株を経口投与で完全に退縮させることができ、かつ、低毒性であった。よって本剤は、ゴルジ体を分子標的とする全く新しい抗がん剤候補として有望である。

研究成果の概要（英文）：We improved Cancer Cell Informatics that we originally developed to discover new anticancer drugs, and found a novel anticancer compound AMF-26. It destroyed Golgi apparatus, which controls membrane traffic, and inhibit the growth of cancer cells. AMF-26 induced complete regression of BSY-1 human breast cancer xenograft in nude mice by oral administration. Its toxicity was weak and recoverable. Therefore, AMF-26 is a promising novel anticancer drug candidate targeting Golgi apparatus.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	16,600,000	4,980,000	21,580,000
2011年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2012年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
年度			
年度			
総計	38,800,000	11,640,000	50,440,000

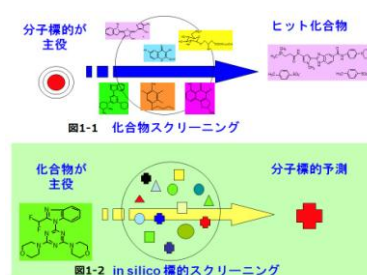
研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：がん治療、分子標的薬、分子薬理学、情報システム

1. 研究開始当初の背景

がん治療では、がん細胞に特異的に発現した機能分子（がんのアキレス腱）をねらい打つ分子標的薬が注目され、その開発では、まず有力な分子標的を選定し、ついで標的の阻害剤を膨大な化合物群から探索するのが主流であった（図 1-1）。すなわち「分子標的が主役」の開発であるのに対し、本研究では、「化合物が主役」という逆転の発想から分子標的薬を発見するアプローチを提案した。た



例えば、手もとに新規化合物があるが標的不明の時、標的をたちまち予測できる（図 2-2）、

あるいは、手もとにある既知阻害剤から同じ阻害作用を持つ新規物質を予測できる（図2-3）、という革新的方法を開発である。本研究開始までに研究代表者らは、39系のがん細胞株パネル（JFCR39）を研究基盤として樹立し、その薬剤感受性情報とオミクス情報（包括的生体分子情報）を集積・統合し、情報解析から化合物の標的を予測し、ついで実験的に検証する、独自のがん細胞情報システム（Cancer Cell Informatics: CCI）の構築を進めてきた。その途上で、PI3K など驚くべき分子を標的とする化合物の同定・開発に成功した（Yaguchi S, Yamori T et al. J Natl Cancer Inst 2006;98:545-56）。本研究を開始するのに十分な環境が整えられていた。

2. 研究の目的

独自に開発した化合物の分子標的予測システムである CCI の拡充を推進することによってその予測精度を高め、それを革新的な分子標的薬創薬に応用する。本研究では、特にチャレンジングな応用領域として、タンパク質間相互作用（Wells JA AND McClendon CL Nature 2007;450:1001-9）の新規阻害剤の探索・開発への応用を試みる。また、有望な分子標的薬の開発領域として PI3K キナーゼ（PI3K）阻害剤に注目し、CCI を PI3K 阻害剤の効果予測バイオマーカー探索へ応用することも試みる。

3. 研究の方法

(1) CCI の拡充

①フィンガープリントのデータベース化

CCI では、新規化合物の標的を予測するために標的既知の化合物（種々の抗がん剤および種々のバスキュラー阻害剤・酵素阻害剤）をレファレンスとして体系的に収集し、各々について JFCR39 における増殖阻害スペクトル（フィンガープリント）を測定し CCI のデータベースに登録する（図2-1）。本研究以前

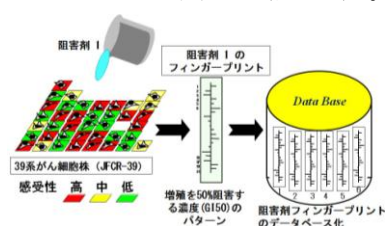


図2-1 阻害剤など化合物のフィンガープリントのデータベース化

に約700種類のレファレンス化合物のフィンガープリントを測定し、登録することで、レファレンス化合物のフィンガープリント数を一挙に1000種類以上にする。また、連携研究者の協力を得て、新規化合物を収集し、同じくデータベースに追加する。

②オミクス情報のデータベース化

JFCR39について、GeneChip Human Genome

U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) によってゲノムワイドな遺伝子発現情報を新たに取得し、データベースに加える。種々の機能タンパク質について、その発現あるいはリン酸化状態をウェスタンブロッティングにより測定し、データベース化する。

(2) 分子標的薬創薬への応用

①新規の分子標的薬候補物質の探索と開発

CCI では、化合物のフィンガープリントを手がかりに、(i) 標的不明の新規化合物の標的を予測する（図2-2）、あるいは、(ii) ある

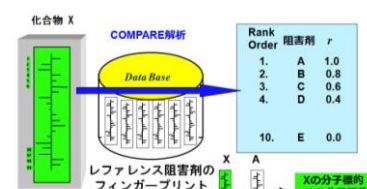


図2-2 インフォーマティクスで分子標的を予測

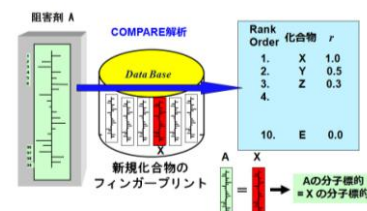


図2-3 インフォーマティクスで新規阻害物質を予測

標的を阻害する新規物質を in silico で予測する（図2-3）。本研究では、両方を行うが、(ii)に力点を置くこととした。具体的には以下の Step 1~5 の手順で行う（図2-3）。(Step 1) まず有望と考えられる分子標的（★）を設定し、その分子標的に対する既知阻害剤 A を選定する。(Step 2) JFCR39 に対する阻害剤 A の増殖阻害効果を測定し、阻害剤 A のフィンガープリントを得る。(Step 3) 阻害剤 A のフィンガープリントと相同性の高いフィンガープリントを持つ化合物 X を CCI のデータベースから探索・抽出する（X は、複数あり得る）。(Step 4) 化合物 X について、分子標的★を阻害するかどうか実験的に検証する。(Step 5) 分子標的★のタンパク質立体構造が既知であれば上記 Step 4 のヒット化合物について、連携研究者（広野修一博士）の協力を得て、ドッキングスタディによる結合の検証を行う。(Step 6) ヒット化合物の中から動物がんモデルで有効なものを見出す。この場合のがんモデルとしては、フィンガープリントを参考にヒット化合物に感受性の高いがん細胞株を JFCR39 の中から選ぶ。

本研究では、特にチャレンジングな標的として、タンパク質間相互作用の新規阻害剤（Wells JA AND McClendon CL Nature 2007;450:1001-9）の創薬を試みた。ことに、タンパク質間相互作用として低分子量 G タンパク質の活性化に必須な低分子量 G タンパク質と GEF（GDP /GTP 交換促進因子）との相互作用に注目する（図3）。その中でも、ARFfamily-GEF 相互作用（D' Souza-Schorey, C. et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7:

347-58) と Rac1-GEF 相互作用 (Heasman, S.J. et al. Nat Rev Mol Cell Biol 2008 9; 690-701) に注目する。前者は膜小胞輸送に、後者は細胞運動に



図3 低分子量 Gタンパク質の活性調節機構

関与する系として、いずれも有望な抗がん分子標的と見られてはいるが、これまでに臨床試験まで開発が進んだ化合物は皆無であった。そこで、CCI に立脚し、上記の Step 1~5 の手順で研究を進める。(Step 1) として、ARFfamily-GEF 相互作用の既知阻害剤として Brefeldin A (図 4, Renault, L. Nature 2003 ;426: 525-30)、また、Rac1-GEF 相互作用の阻害剤として NSC-23766 (図 5, Gao Y et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101: 7618-23) が知られているので、これらを既知阻害剤に選定し、以下、Step 2 以降の研究を進める。

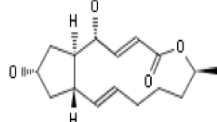


図4 Brefeldin A

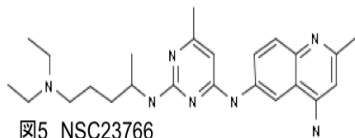


図5 NSC23766

②バイオマーカーの探索

PI3K阻害剤 (ZSTK474, BEZ-235, GDC-0941 など) に対する JFCR39 の感受性情報 (フィンガープリント) をデータベースより取り出す。一方、JFCR39 における PI3K 経路下流因子の発現およびリン酸化状態のデータセットを取り出し、PI3K 阻害剤感受性と相関する因子をピアソン相関分析によって同定する。

4. 研究成果

(1) CCI の拡充

①フィンガープリントのデータベース化

264 個のレファレンス化合物 (標的既知の化合物) の感受性情報を取得した。その結果、CCI には通算 1000 種類以上のレファレンス化合物データが登録された。新規化合物については、連携研究者椎名博士よりリダイフェン類 (論文#1)、小島博士よりアセトゲニン類 (論文#7) の提供を受け、これらのフィンガープリントを測定、登録し、共同研究を進めた。その結果、これらの化合物のデータ解析から、リダイフェン類、アセトゲニン類の両群よりおのおのユニークな作用機序を持つと期待される新規化合物が同定された。

②オミクス情報のデータベース化

JFCR39 オミクス情報として既に種々のタンパク質発現情報を取得していたが、本研究では、さらにゲノムワイドな遺伝子発現情報、PI3K 経路関連のゲノム DNA 変異、PI3K 経路

のタンパク質のリン酸化状態情報、エクソーム解析情報、加えて JFCR39 の一部についてはヌードマウス皮下腫瘍とした際の遺伝子発現情報を取得した。

(2) 分子標的薬創薬への応用

①新規の分子標的薬候補物質の探索と開発
既知の Arf1-GEF 阻害剤 Brefeldin A (BFA) をリファレンスとして、BFA とは化学構造が全く異なる新規 Arf1-GEF 阻害剤 AMF-26 を見出した (図 6)。本剤は CCI の予測どおり、がん細胞の Arf1 の活性化を阻害し、ゴルジ体を破壊し、小胞輸送および細胞増殖を阻害す

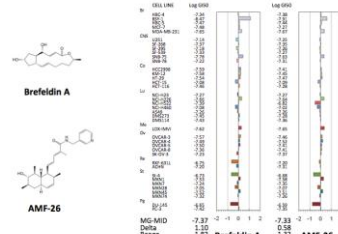


図 6 Brefeldin A と AMF-26 のフィンガープリント類似性

ることが明らかになった (図 7)。さらに注目すべき効果として、本剤はマウスゼノグラフトモデルにおいて、経口投与によりヒト乳がん (BSY-1) を完全に退縮させた (図 8, 論文#9)。さらに投薬による顕著なマウスの体重減少は認められな

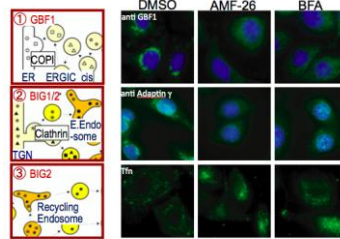


図 7 AMF-26 は BFA と同様のゴルジ破壊活性を示した

かった。本剤は Arf1 活性化を阻害する有望な抗がん剤リード化合物であると期待される。本剤は、天然物の誘導体であるため、開発に必要な供給量の確保が危ぶまれたが、連携研究者椎名博士が最近、本剤の全合成に成功したため今後順調に開発が進む見込みである。

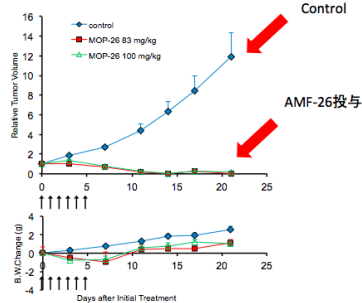


図 8 AMF-26 の抗がん効果

一方、Rac1-GEF 相互作用の阻害剤 NSC-23766 をリファレンスとして、新規の Rac1-GEF 相互作用阻害物質を見出

した (投稿準備中)。

②バイオマーカーの探索

新規 PI3K 阻害剤 ZSTK474 の薬効と関連する因子を探索し、リン酸化 Akt (高発現ほど効きやすい) および KRAS/BRAF 遺伝子変異 (変異細胞は効きにくい) を見出した。これらの治験が in vivo でも見られるかどうかを、JFCR39 中 24 系をヌードマウス皮下に移植し

たゼノグラフィモデルで検討した結果、同様の関連が確かめられた。よって、リン酸化Akt発現量は ZSTK474 の感受性予測マーカー、KRAS/BRAF 遺伝子変異は ZSTK474 の抵抗性予測マーカーとなる可能性が示された。

以上より、CCI の拡充とその活用による革新的分子標的薬の創成を達成した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文 (すべて査読あり)]

(計 42 件、うち 26 件のみ記載)

1. Guo WZ, Wang Y, Umeda E, Shiina I, Dan S, Yamori T. Search for Novel Anti-tumor Agents from Ridafens Using JFCR39, a Panel of Human Cancer Cell Lines. *Biol Pharm Bull.* 2013; 1;36(6):1008-16. DOI:10.1248/bpb.b13-00129
2. Katayama R, Aoyama A, Yamori T, Qi J, Oh-Hara T, Song Y, Engelman JA, Fujita N. Cytotoxic Activity of Tivantinib (ARQ 197) Is Not Due Solely to c-MET Inhibition. *Cancer Res.* 2013;73(10):3087-96. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-12-3256
3. 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 Ridafen-B induces Bcl-2 independent autophagy without estrogen receptor involvement. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 435(4):657-63. DOI:10.1016/j.bbrc.2013.05.040
4. 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. DOI:10.1021/jm301695c
5. Obuchi W, Ohtsuki S, Uchida Y, Ohmine K, Yamori T, Terasaki T. Identification of transporters associated with Etoposide sensitivity of stomach cancer cell lines and methotrexate sensitivity of breast cancer cell lines by quantitative targeted absolute proteomics. *Mol Pharmacol.* 2013;83(2):490-500. DOI: 10.1124/mol.112.081083
6. Komeda S, Takayama H, Suzuki T, Odani A, Yamori T, Chikuma M. Synthesis of antitumor azolato-bridged dinuclear platinum(ii) complexes with in vivo antitumor efficacy and unique in vitro cytotoxicity profiles. *Metallomics.* 2013;5(5):461-468. DOI:10.1039/c3mt00040k
7. 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. DOI:10.1016/j.ejmech.2013.03.009
8. Yao R, Natsume Y, Saiki Y, Shioya H, Takeuchi K, Yamori T, Toki H, Aoki I, Saga T, Noda T. Disruption of Tacc3 function leads to in vivo tumor regression. *Oncogene.* 2012;31(2):135-148. DOI:10.1038/onc.2011.235
9. 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. DOI:10.1074/jbc.M111.316125
10. Morita M, Ohno O, Teruya T, Yamori T, Inuzuka T, Suenaga K. Isolation and structures of biselyngbyasides B, C, and D from the marine cyanobacterium *Lyngbya* sp., and the biological activities of biselyngbyasides. *Tetrahedron.* 2012;68(29):5984-5990. DOI:10.1016/j.tet.2012.05.038
11. Kong D, Yamori T. JFCR39, a panel of 39 human cancer cell lines, and its application in the discovery and development of anticancer drugs. *Bioorg Med Chem.* 2012;20(6):1947-1951. DOI:10.1016/j.bmc.2012.01.017
12. Kimura KI, Sakamoto Y, Fujisawa N, Uesugi S, Aburai N, Kawada M, Ohba SI, Yamori T, Tsuchiya E, Koshino H. Cleavage mechanism and anti-tumor activity of 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene isolated from edible wild plants.

- Bioorg Med Chem. 2012;20(12):3887-3897. DOI:10.1016/j.bmc.2012.04.025
13. 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. DOI:10.1248/bp.b.12-00327
 14. 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. DOI:10.1111/cas.12004
 15. 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. DOI:10.1016/j.ejca.2011.10.006
 16. Murakami M, Cabral H, Matsumoto Y, Wu S, Kano MR, Yamori T, Nishiyama N, Kataoka K. Improving drug potency and efficacy by nanocarrier-mediated subcellular targeting. *Sci Transl Med*. 2011;3(64):64ra62. DOI:10.1126/scitranslmed.3001385
 17. Kojima N, Suga Y, Hayashi H, Yamori T, Yoshimitsu T, Tanaka T. Design and synthesis of C35-fluorinated solamins and their growth inhibitory activities against human cancer cell lines. *Bioorg Med Chem Lett*. 2011;21(19):5745-5749. DOI:10.1016/j.bmcl.2011.08.011
 18. Fuwa H, Suzuki T, Kubo H, Yamori T, Sasaki M. Total synthesis and biological assessment of (-)-exiguolide and analogues. *Chemistry*. 2011;17(9):2678-2688. DOI:10.1002/chem.201003135
 19. Anzai K, Sekine-Suzuki E, Ueno M, Okamura M, Yoshimi H, Dan S, Yaguchi S, Enami J, Yamori T, Okayasu R. Effectiveness of combined treatment using X-rays and a phosphoinositide 3-kinase inhibitor, ZSTK474, on proliferation of HeLa cells in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 2011;102(6):1176-1180. DOI:10.1111/j.1349-7006
 20. Laroche-Clary A, Le Morvan V, Yamori T, Robert J. Cytochrome P450 1B1 gene polymorphisms as predictors of anticancer drug activity: studies with in vitro models. *Mol Cancer Ther*. 2010;9(12):3315-3321. DOI:10.1158/1535-7163.MCT-10-0673
 21. Kong DX, Yamori T. ZSTK474, a novel phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor identified using the JFCR39 drug discovery system. *Acta Pharmacol Sin*. 2010;31(9):1189-1197. DOI:10.1038/aps.2010.150
 22. Kong D, Yamazaki K, Yamori T. Discovery of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitory compounds from the Screening Committee of Anticancer Drugs (SCADS) library. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(9):1600-1604. https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/33/9/33_9_1600/article
 23. Kong D, Dan S, Yamazaki K, Yamori T. Inhibition profiles of phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors against PI3K superfamily and human cancer cell line panel JFCR39. *Eur J Cancer*. 2010;46(6):1111-1121. DOI:10.1016/j.ejca.2010.01.005
 24. Kojima N, Morioka T, Urabe D, Yano M, Suga Y, Maezaki N, Ohashi-Kobayashi A, Fujimoto Y, Maeda M, Yamori T, Yoshimitsu T, Tanaka T. Convergent synthesis of fluorescence-labeled probes of Annonaceous acetogenins and visualization of their cell distribution. *Bioorg Med Chem*. 2010;18(24):8630-8641. DOI:10.1016/j.bmc.2010.10.004
 25. Dan S, Okamura M, Seki M, Yamazaki K, Sugita H, Okui M, Mukai Y, Nishimura H, Asaka R, Nomura K, Ishikawa Y, Yamori T. Correlating phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor efficacy with signaling pathway status: in silico and biological evaluations. *Cancer Res*. 2010;70(12):4982-4994. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-09-4172
 26. Chou LC, Chen CT, Lee JC, Way TD, Huang CH, Huang SM, Teng CM, Yamori T, Wu TS, Sun CM, Chien DS, Qian K,

Morris-Natschke SL, Lee KH, Huang LJ, Kuo SC. Synthesis and preclinical evaluations of 2-(2-fluorophenyl)-6,7-methylenedioxyquinolin-4-one monosodium phosphate (CHM-1-P-Na) as a potent antitumor agent. J Med Chem. 2010;53(4):1616-1626. DOI:10.1021/jm901292j.

[学会発表] (計 67 件、うち 3 件のみ記載)

1. 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. 2012/3/31-4/4 (Chicago, USA)
2. Yamori T. Discovery of Molecular-Targeted Drugs by an information-rich Cancer Cell Line Panel "JFCR39". 理研・マックスプランク研究所合同シンポジウム. 2012/3/5-7 (ドイツ)
3. Yamori T. Identification of a Novel Pi3k Inhibitor for Cancer Treatment. 世界薬学会議 2010 FIP PSWC/AAPS Annual Meeting. 2010/11/14-18 (New Orleans, USA)

[図書] (計 12 件、うち 1 件のみ記載)

1. 矢守隆夫, 大橋愛美. JFCR39 がん細胞パネルの活用による新たな抗がん剤創薬. 実験医学. 2012;30(7):1071-1077. (査読なし)

[産業財産権]

○出願状況 (計 6 件、うち 2 件のみ記載)

名称:『新規化合物及びその製造方法並びに抗がん剤』

発明者:(がん研) 矢守隆夫、(東京理科大) 椎名勇、中田健也、(東京電機大) 長原礼宗

権利者:学校法人 東京理科大学、学校法人 東京電機大学、公益財団法人がん研究会

種類:特許

番号:特願 2012-104763

出願年月日:2012 年 5 月 6 日

国内外の別:国内

名称:『新規化合物及びその製造方法並びに抗がん剤』

発明者:(がん研究会) 矢守隆夫、(東京理科大) 椎名勇

権利者:学校法人東京理科大学、公益財団法人がん研究会

種類:特許

番号:特願 2012-087973

出願年月日:2012 年 4 月 6 日

国内外の別:国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等:
<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/researcher/2387.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢守隆夫 (YAMORI TAKAO)

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・客員研究員

研究者番号:60200854

(2) 研究分担者

旦慎吾 (DAN SHINGO)

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

研究者番号:70332202

(3) 連携研究者

川田 学 (KAWADA MANABU)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究センター・沼津創薬医科学研究所・創薬基盤研究ユニット・ユニット長

研究者番号:20300808

中村 浩之 (NAKAMURA HIROYUKI)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号:30274434

椎名 勇 (SHIINA ISAMU)

東京理科大学・理学部・教授

研究者番号:40246690

小島 直人 (KOJIMA NAOTO)

京都薬科大学・創薬科学系・薬品製造学・講師

研究者番号:90420413

広野 修一 (HIRONO SYUICHI)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号:30146328