

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560441

研究課題名(和文) 抗がん治療のための受容体取り込み作用薬の探索

研究課題名(英文) High throughput screening to identify small molecules inducing receptor internalization as potential anticancer agents

研究代表者

浅沼 大祐 (Asanuma, Daisuke)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10611204

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト上皮成長因子受容体2(HER2)は卵巣がんや乳がんなどの患者で過剰発現が認められ、病態の予後不良と強い相関がある。HER2の細胞内取り込みによる受容体シグナルの遮断は病態治療に有望であるが、所望の作用を有する化合物のハイスループット探索は従来技術的に困難であった。本研究では、研究代表者が近年開発した酸性環境検出蛍光プローブの応用を基に、HER2の細胞内取り込み作用を高効率に評価可能なスクリーニング手法を構築した。約155,000化合物のライブラリーから3種類のヒット化合物の取得に成功し、いずれの化合物もHER2の細胞内取り込みおよび分解作用を顕著に示すことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Enhanced expression of receptor tyrosine kinases in cancers, e.g., human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in ovarian and breast cancers, is associated with aggressiveness. Blockade of receptor signaling via induction of receptor internalization and degradation is a promising approach for cancer therapy. By employing a recently developed acidic-pH-activatable probe (Asanuma, D. et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 53, 6085-6089 (2014)), a cell-based high-throughput screening system was developed to identify molecules that induce HER2 internalization. From a ~155,000 small-molecule library, three hit compounds that induce internalization and degradation of HER2 were successfully identified.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：ハイスループットスクリーニングシステム 受容体 ダウンレギュレーション

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼ (receptor tyrosine kinases; RTKs) の亢進した発現は、幅広い種類のがんの進行・増悪の特徴となっている¹⁻³。例えば、卵巣がん^{4,5} や乳がん⁶ では、ヒト上皮性成長因子受容体 2 (human epidermal growth factor receptor 2; HER2) の過剰発現がよく認められ、患者の予後不良と強い相関を示す。RTK を過剰発現するがんの治療には、RTK の細胞外ドメインに結合するモノクローナル抗体が分子標的治療薬として広範に臨床で用いられている。これらの治療の作用機序の1つとして、受容体の細胞内取り込みを介した受容体シグナル伝達の遮断が効果的であると考えられている³。

一定の治療効果を上げている一方、治療抗体は高価である点が問題視されている。一日あたりの治療費の平均は、抗体等のバイオ医薬品では低分子量薬と比較して 20 倍以上に上ると概算されている⁷。これらの背景の下、低分子量化合物の探索による標的受容体の細胞内取り込み作用薬の同定は、高コスト医療を代替する安価な治療薬の開発の可能性を有する。また、作用点が細胞外に制限される抗体と異なり、低分子量化合物は細胞内のタンパク質等に作用することが可能であるため、網羅的な探索は新規の分子標的の発見につながることも期待される。しかしながら、従来利用されている酵素結合免疫測定法 (ELISA) や放射性同位体標識法などの受容体取り込み評価法は、手法の煩雑さから評価効率に限界があり、所望の探索を実現するハイスループットスクリーニング (high throughput screening; HTS) への応用は現実的に不可能であった。

2. 研究の目的

本研究では、蛍光プローブ技術を基にした独自の HTS 手法を提案・構築し、15 万種程度の低分子量化合物ライブラリーを対象として、技術的な障壁により従来実現が困難であった HER2 の細胞内取り込み作用薬を探索・取得することを目的とした。

3. 研究の方法

近年、研究代表者が開発した酸性環境検出蛍光プローブ⁸の応用を基に、所望の HTS を実現する評価法を構築した (図 1)。細胞膜上に発現する受容体は、細胞内に取り込まれると後期エンドソームやライソソーム等の酸性小胞 (pH ~5-6)⁹へと輸送され、細胞外環境 (pH ~7.4) とは異なった環境にさらされる。そのため、受容体に特異標識した酸性環境検出蛍光プローブは、受容体の細胞内取り込みに応じて特異的な蛍光シグナルを発する。従来の ELISA 等とは異なり、本法では細胞外液の余剰のプローブ分子が計測の問題となるバックグラウンドシグナルを持たず洗い流す操作が不要であるため、“mix and measure” が可能な均一アッセイ

(homogeneous assay) が実現し、検体処理能が大幅に向上した。プローブの濃度や細胞の培養時間等の最適化により、構築した評価法は Z'ファクターが 0.66 となり、HTS 手法として妥当な基準の > 0.5 を満たした。また、シグナル・ノイズ比は 40 を超える優れたものであった。

開発した HTS 手法を用いて、東京大学創薬オープンイノベーションセンター (現・創薬機構) の保有する約 155,000 種類の低分子量化合物をスクリーニングした。蛍光変化値上位 0.1% にあたる 150 種類の一次ヒット化合物は、再現性試験やカウンターアッセイによる二次評価を行い、HER2 の細胞内取り込み作用についてさらなる検証を行った。最終的に取得した 3 種類のヒット化合物 (図 2A) は、蛍光イメージング解析により、作用の経時変化や濃度依存性について検証した。ウェスタンブロット法により、ヒット化合物による HER2 の分解誘導作用についても検証した。また、HER2 のダウンレギュレーションの既存の作用経路である HSP90 阻害について、リガンド結合競合試験¹⁰によりヒット化合物の作用評価を行った。

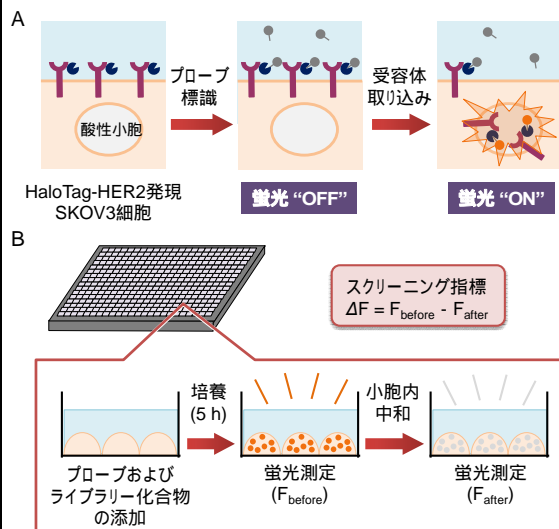


図 1. 受容体の細胞内取り込みを HTS 評価法。(A) 酸性環境検出蛍光プローブによる HER2 の細胞内取り込みの検出スキーム。HaloTag-HER2 融合タンパク質を発現する卵巣がん由来の SKOV3 細胞に、HaloTag リガンド化した蛍光プローブを加える。HaloTag を介して共有結合的に標識したプローブは、受容体の取り込みに伴って蛍光を発する。(B) アッセイプロトコル。384-ウェルプレート上の SKOV3/HaloTag-HER2 細胞に、蛍光プローブおよびライブラリー化合物を添加し、5 時間培養した後、蛍光強度を測定した (F_{before})。塩化アンモニウムを用いて酸性小胞内を中和した後、再度測定した (F_{after})。 $\Delta F = F_{\text{before}} - F_{\text{after}}$ を指標として、受容体取り込み作用の評価を行った。

4. 研究成果

構築した HTS 手法を用いてプローブの蛍光変化を指標として約 155,000 種の低分子量化合物のスクリーニングを基に、3 種類の HER2 取り込み作用化合物 **a-c** を取得することに成功した (図 2 A)。細胞膜上に存在する HER2 量を指標に作用評価を行った結果、取得化合物はいずれも細胞表面 HER2 のダウンレギュレーションを時間依存的に顕著に誘導することを明らかにした (図 2 B)。また、作用の濃度依存性についても確認した (図 2 C)。とりわけ、化合物 **b** は、5 μM 負荷の条件下約 1 時間で 50% の細胞表面 HER2 の減少を誘導する速いダウンレギュレーション動態を示し、15 μM 負荷および 5 時間培養の条件下では細胞形態に変化を起こさず 95% の細胞表面 HER2 を減少させた。また、細胞全体の HER2 量を評価したところ、化合物 **a-c** はいずれも HER2 の分解を誘導することを明らかにした。さらに、HER2 の細胞内取り込み / 分解のダウンレギュレーション作用について、既存の作用経路である HSP90 阻害について評価したところ、化合物 **a** は阻害活性を示したが、化合物 **b** および **c** は 50 μM の高濃度条件下でも阻害活性を示さなかった。後二者は、今後詳細な検討を行う予定であるが、従来とは異なる HER2 ダウンレギュレーションの作用経路が示唆された。本結果は、構築した cell-based スクリーニング手法が、分子標的に関わらず細胞表現型 (フェノタイプ) を指標に網羅的に作用分子を取得することが可能であることを示している。

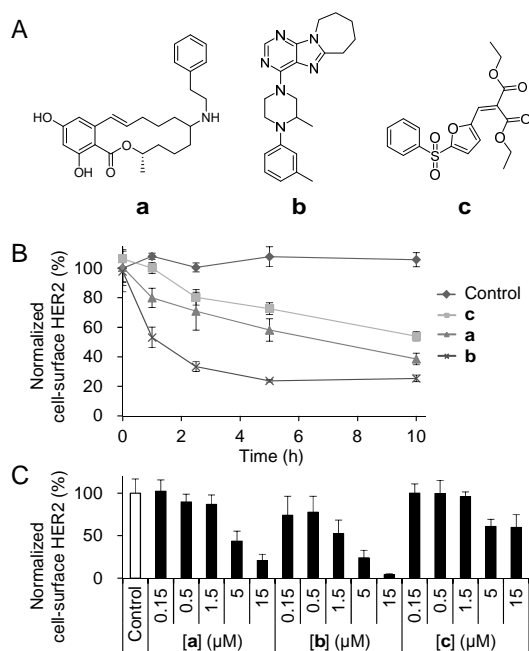


図 2. 化合物 **a-c** による HER2 の細胞内取り込み作用。(A) 化合物 **a-c** の分子構造。(B) 作用の経時変化。化合物は 5 μM で用い、細胞膜上の HER2 を定量した。(C) 作用の濃度依存性。評価は化合物添加の 5 時間後に行った。

本研究で HER2 を対象に原理実証したスクリーニング戦略は、その他の病態関連受容体の細胞内取り込み作用評価にも適用可能である。現在市販されている医薬品の半数近くは受容体を薬効作用点とし、特にがん疾患の領域では、上皮性成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor; EGFR)、血管内皮増殖因子受容体 (vascular endothelial growth factor receptor; VEGFR)、インスリン様増殖因子受容体 (insulin-like growth factor receptor; IGF1R) など過剰発現が報告され、創薬標的分子として極めて重要である。実証した HTS 手法の原理を同様に応用することにより有望なリード化合物の網羅的取得といった成果の創出が期待できる。

<引用文献>

- Gschwind, A., Fischer, O. M., and Ullrich, A. The discovery of receptor tyrosine kinases: targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Cancer* **4**, 361-370 (2004).
- Hynes, N. E., and Lane, H. A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors, *Nat. Rev. Cancer* **5**, 341-354 (2005).
- Imai, K., and Takaoka, A. Comparing antibody and small-molecule therapies for cancer, *Nat. Rev. Cancer* **6**, 714-727 (2006).
- Berchuck, A., Kamel, A., Whitaker, R., Kerns, B., Olt, G., Kinney, R., Soper, J. T., Dodge, R., Clarke-Pearson, D. L., and Marks, P. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced epithelial ovarian cancer, *Cancer Res.* **50**, 4087-4091 (1990).
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J., and Ullrich, A. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer, *Science* **244**, 707-712 (1989).
- Tandon, A. K., Clark, G. M., Chamness, G. C., Ullrich, A., and McGuire, W. L. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer, *J. Clin. Oncol.* **7**, 1120-1128 (1989).
- McCamish, M., and Woollett, G. Worldwide experience with biosimilar development, *MAbs.* **3**, 209-217 (2011).
- Asanuma, D., Takaoka, Y., Namiki, S., Takikawa, K., Kamiya, M., Nagano, T., Urano, Y., and Hirose, K. Acidic-pH-Activatable Fluorescence Probes for Visualizing Exocytosis Dynamics, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **53**, 6085-6089 (2014).
- Mukherjee, S., Ghosh, R. N., and Maxfield, F. R. Endocytosis, *Physiol. Rev.* **77**,

759-803 (1997).

Kim, J., Felts, S., Llauger, L., He, H., Huezo, H., Rosen, N., and Chiosis, G. Development of a fluorescence polarization assay for the molecular chaperone Hsp90, *J. Biomol. Screen.* **9**, 375-381 (2004).

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Isa M, Asanuma D[†], Namiki S, Kumagai K, Kojima H, Okabe T, Nagano T & Hirose K[†].

[†]Corresponding authors. High-throughput screening system to identify small molecules that induce internalization and degradation of HER2. *ACS Chem. Biol.* **9**, 2237-2241 (2014). DOI: 10.1021/cb500654q. 査読有.

〔学会発表〕(計 2 件)

浅沼大祐、伊佐真幸、並木繁行、熊谷和夫、小島宏建、岡部隆義、長野哲雄、廣瀬謙造 .HER2 の細胞内取り込み作用薬の探索を実現するハイスループットスクリーニング手法 .第 131 回日本薬理学会関東部会, 2014 年 10 月 11 日, 横浜市立大学福浦キャンパス (神奈川県横浜市).

浅沼大祐、伊佐真幸、並木繁行、熊谷和夫、小島宏建、岡部隆義、長野哲雄、廣瀬謙造 .HER2 の細胞内取り込み作用薬の探索を実現するハイスループットスクリーニング手法 .日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 28 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.neurobiol.m.u-tokyo.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

浅沼 大祐 (ASANUMA, Daisuke)

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 10611204