

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「がん微小環境を標的とした革新的治療法の実現」（がん微小環境を制御する Ras/Rap 標的蛋白質 PLC $\epsilon$ の選択的阻害剤の開発）
2. 研究開発代表者：片岡 徹（国立大学法人神戸大学 大学院医学研究科）
3. 研究開発の成果

ホスホイノシチド特異的ホスホリパーゼ C (PI-PLC) は、細胞内情報伝達に重要な役割を果たす酵素である。PLC には 6 クラス ( $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\eta$ 、 $\zeta$ ) に分類される 13 分子種があり、PLC $\epsilon$  はがん遺伝子産物 Ras とそのホモログ Rap により活性制御を受ける唯一の分子種である。研究開発代表者らは、PLC $\epsilon$ が非免疫細胞からの炎症性サイトカイン発現誘導を介してがん周辺微小環境における(慢性)炎症を促進し、発がん及びがん細胞の増殖と悪性化に重要かつ普遍的な働きを持つことを示してきた。また、ゲノムワイド関連解析により PLC $\epsilon$ 遺伝子の SNP がヒトのがん発生頻度と強い遺伝的連鎖を示すことが示された。これらのことから、PLC $\epsilon$ の選択的阻害剤ががんの発生と悪性進展及び増殖に対して抑制効果を示すことが予測され、本研究開発では、PLC $\epsilon$ 選択的阻害作用を持つ低分子化合物をハイスクリーンング (HTS) により獲得し、その活性を検証することを目的とした。

PLC による加水分解で蛍光を発生する合成基質を用いた完全水溶性の高感度 PLC 阻害剤 HTS 系を構築し、各クラス精製 PLC を用いて PLC $\epsilon$ 選択的阻害活性を検定する系を確立した。PLC $\epsilon$ の大量精製は従来不可能であったが、Expi293F 細胞の浮遊細胞培養系を用いて HTS に必要な量を確保した。この系を用いて、理研 HTS 支援基盤の支援を受け、3 種の低分子化合物ライブラリー（理研既存薬、理研 NPDepo 及び東京大学創薬イノベーションセンター・コア、計 32,914 化合物）の HTS を実施し、IC<sub>50</sub> 値が 10  $\mu$ M 以下のヒット化合物 105 個を得た。また、理研 FBDD ライブラリー（約 1.6 万化合物）及び産総研天然化合物ライブラリーの HTS も実施し、FBDD ライブラリーからは IC<sub>50</sub> 値 < 5  $\mu$ M のヒット化合物 1 個を得た。3 種のライブラリーの HTS でのヒットを別途購入して活性を調べ既存薬、NPDepo からの 41 化合物の PLC $\epsilon$  阻害活性 (IC<sub>50</sub> < 10  $\mu$ M) の再現性を確認し、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$  に対する阻害活性を調べて阻害の選択性を検定した。さらに、ヒト培養細胞株 HEK293 と Caco2 を用いて PLC $\epsilon$  の下流因子プロテインキナーゼ D (PKD) のリゾホスファチジン酸刺激による活性化 (リン酸化) を指標にして培養細胞レベルでの PLC $\epsilon$ 活性阻害を検定した。その結果、ヒット化合物のうち 3 個 (化合物 B、D、E) が PLC $\epsilon$ 依存的な PKD 活性化を阻害した。また、化合物 B は、腫瘍壊死因子 $\alpha$ による炎症性サイトカイン発現誘導も阻害した。化合物 B は、PLC $\epsilon$ のみに選択的に、化合物 D は PLC $\epsilon$ と PLC $\gamma$  に選択的に阻害活性を示すので true hit であると判断された。化合物 B、D は既存薬であり、ヒト又は実験動物モデルにおける抗炎症・抗腫瘍効果がすでに文献にて報告されているのでリード化合物とみなせると考えられるが、すでに確立したマウスモデルを用いた個体レベルでの発がん抑制効果と抗炎症効果の検定には研究期間内に到達できなかった。さらに、構造活性相関 (SAR) 研究の目的で、化合物 B と D について、理研の支援基盤の支援により類縁化合物を検索し、それぞれ 3 個と 17 個の類縁体を入手した。さらに、SAR 研究のための構造多様性の拡大を目的として、特許公開済み PLC 阻害物質 (化合物 F) も合成・入手し、分子種非選択的な PLC 阻害活性を示すことを確認した。

本研究開発では、研究期間内に PLC $\epsilon$ 選択的阻害作用をもつ複数の true hit を獲得できたが、がんの発生と悪性進展及び増殖に対する抑制効果を明白に証明するには至らなかった。しかし、本開発研究を通じて、PLC $\epsilon$ 選択的阻害剤の HTS 系の確立とその培養細胞及び個体レベルでの活性検証系の構築が完了し、リード化合物取得への道筋をつけることができた。