

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「がん幹細胞を標的とした根治療法の開発」（がん幹細胞に発現する CDCP1 蛋白質を標的とした新規治療薬の開発）

2. 研究開発代表者： 塚隆一

(国立研究開発法人国立がん研究センター研究所・難治進行がん研究分野)

3. 研究開発の成果

固形腫瘍において膜蛋白質 CDCP1 は Ras-ERK 系の活性化によって発現誘導され、さらに腫瘍で活性化した Src ファミリーのキナーゼによってリン酸化されることにより、PKC δ と結合して腫瘍悪性化にかかわるシグナルを媒介することが示された。従って CDCP1-PKC δ 経路のシグナルを抑える分子を開発はこのような特性を阻害する有用な薬剤となることは確かである。本研究ではファージディスプレイライブラリーから得られた抗 CDCP1 ヒト型一本鎖抗体群や cell free の化合物スクリーニングシステムを用いて、臨床に应用可能な、CDCP1 シグナル経路を標的とした治療薬候補を得ることを目標に研究を進めてきた。

① ヒト型ファージディスプレイ抗体の評価・選択

これまでに選別した 19 種の CDCP1 を認識するとされるヒト型ファージディスプレイ抗体クローンを総て Fc 部分を付加した完全抗体に変換して、抗体価の測定、がん細胞の増殖能や足場非依存性に対する影響、ADCC 活性の測定を行った。その結果 2 クローン (No.7 と No.11) 浮遊状態での細胞死が誘導され、足場非依存性に対する抑制効果が認められた。また他の 2 クローン (No.1 と No.19) については ADCC 活性が誘導され、No.19 については膵臓がん細胞 CFPAC のヌードマウスにおける造腫瘍能を抑える効果も認められた。

② CDCP1 活性シグナルの可視化細胞を用いた化合物スクリーニング

CDCP1 がプロテインキナーゼ C δ (PKC δ)と結合した時にシグナルを発する FRET システムを 1 分子フレットと 2 分子フレットの原理で 2 種類作成し、幾つかの細胞で CDCP1 のシグナル経路をオン/オフする系を用い、評価を進めたが、強いシグナルが得られなかった。FRET を用いた他の検出系として新たにフランス cisbio 社が開発した時間分解蛍光(TRF)と FRET を組み合わせた HTRF 法の導入を試み、最終的に CDCP1 と PKC δ の蛋白質相互作用を高感度で効率よく検出することに成功した。

③ Cell Free の系による CDCP1-PKC δ 間の結合阻害化合物の探索

CDCP1 の PKC δ との結合部位のリン酸化チロシンを含むペプチドの合成と PKC δ の C2 ドメインの大腸菌からの精製を行い、これらを用いて CDCP1-PKC δ シグナルの Cell Free の系におけるスクリーニングの系を立ち上げた。ポジコン、ネガコンを用いたスクリーニングの系の検出精が確認できたため、まず文科省「がん研究分野の特性などを踏まえた支援活動」の寄託化合物ライブラリー 500 化合物のスクリーニングを行ったところ、似通った 2 つの金属錯体が特異的に極めて強い結合阻害効果を示すことがわかった。これらは CDCP1 のシグナル抑制、浮遊状態での増殖抑制効果も示し極めて有望である。in vivo での効果を確認めるとともに、これらの化合物の寄託元の研究者と共同でさらに低濃度で効果を示す化合物の合成展開を進めた。またその後、東大創薬機構から供与された 1 万化合物のライブラリーも同様にスクリーニングし、最初の 2 つの化合物より阻害活性は弱いながらも 4 つの化合物において CDCP1-PKC δ の結合阻害活性が見られた。これらについても先の 2 化合物と同様 CDCP1 シグナル抑制効果や in vitro/in vivo での腫瘍抑制効果を検討することが必要である。