

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「がん関連遺伝子産物の転写後発現調節を標的とした治療法の開発」
(MAP キナーゼ経路をターゲットとした新たな分子標的抗がん剤の開発)

2. 研究開発代表者： 武川睦寛 (国立大学法人東京大学)

3. 研究開発の成果

1) 化合物ライブラリーのスクリーニング

平成 27 年度初頭までに、我々が開発したハイスループット・スクリーニングシステム (HTS) を用いて、合成低分子化合物および天然物ライブラリー (計数十万種類) の HTS を実施し、MAP キナーゼ経路に対して阻害活性を示す低分子化合物の網羅的スクリーニングを完遂させた。さらに、HTS によって得られた各候補化合物に関して詳細な生化学的解析を行い、実際に MAP キナーゼ経路の構成分子に対して選択的な阻害活性を持つことを確認した。これら一連のスクリーニング実験を通して、少なくとも *in vitro* で薬効を示す約 200 化合物を選別した。さらに、稀釈系を作成して解析を行い、各候補化合物の 50% 活性阻害濃度 (IC₅₀) を算出した。これらの解析により、MAP キナーゼ経路に対する選択性が高く、阻害効果の強力な化合物として数十化合物を同定することに成功した。

2) 細胞レベル・動物レベルでの薬効確認およびトゥルーヒット・リード化合物の同定

次に、得られた候補化合物の抗腫瘍効果を細胞レベルで確認した。我々が確立したがん細胞株を利用したアッセイ系を用いて、得られた候補化合物の中から、異常な MAP キナーゼ活性を有するがん細胞に対して選択性が高く、増殖抑制効果も顕著なトゥルーヒット化合物を選別した。MAP キナーゼ経路の活性を *in vivo* でも阻害し、有意な増殖抑制作用を示した化合物に関しては、その類縁体も収集し、最も優れた薬効を持つものを選別した。これらの解析を通して、異常な MAP キナーゼ活性を有するがん細胞に対して選択的に増殖抑制作用を示すトゥルーヒット化合物を多数取得することに成功した。

さらに、これらトゥルーヒット化合物の抗腫瘍効果を動物レベルでも確認するため、担癌マウスを用いた実験を実施した。特定のがん細胞を皮下移植したマウスに各化合物を投与し、経時的に腫瘍容積および重量を測定した。その結果、複数の化合物が個体レベルでもがんの増殖を抑制する作用を持つこと、即ちリード化合物になり得ることを確認した。また、抗腫瘍効果が確認された化合物の一部に関してはその知財を確保すべく特許出願を行った。

3) MAP キナーゼ経路構成分子の構造解析と創薬への応用

MAP キナーゼ経路を構成する特定のシグナル伝達分子の 3 次元結晶構造を解明し、得られた構造情報を基に薬剤の最適化を図ることを目的として、当該シグナル伝達分子の大量精製と結晶化に取り組んだ。リコンビナント蛋白質の安定性を向上させて発現量を増加させるため、正常に folding し難く、結晶化の妨げとなる一部のアミノ酸配列を欠損させ、さらに、disorder 領域を除去してリンカー配列を挿入するなどの改変を行った。この改変型蛋白質の C 末端に His タグを付加して大腸菌に導入し、リコンビナント蛋白質の合成を試みたが、多くの蛋白質が不溶化してしまうこと、また、化学的に不均一な性質を持つ蛋白質が得られてしまうことなどの問題が生じ、様々な条件下で結晶化を試みたものの、いずれのコンディションでも結晶は得られなかった。そこでさらに、可溶性を高め、蛋白質を安定化させるため、タグの変更、バキュロウイルス発現系の利用、disorder 領域を異なるアミノ酸配列に置換するなど、さまざまな改変を追加して蛋白質の合成を試みた。これらの改良によって、目的蛋白質を大量精製することに成功しており、現在、結晶化を試みている。