

## 総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 「転写機能をターゲットとした創薬」  
(がんの生存シグナルの維持を担う分子標的に対する革新的阻害剤の開発)
2. 研究開発代表者： 山口知也  
(国立大学法人 名古屋大学 大学院医学系研究科 分子腫瘍学分野 特任助教)
3. 研究開発の成果

本研究開発の創薬シーズであり我々の研究グループが同定したROR1は、肺腺がんのリネジ生存がん遺伝子TTF-1によって転写活性化を受けて、その生存シグナルを伝える肺腺がんにとってのアクレス腫である。ROR1はキナーゼ活性依存的及び非依存的機序を通じて、EGFRによって伝達される肺腺がんの生存シグナルの維持を司るとともに、最近新たに見出したキナーゼ活性非依存的なカベオラ構造の安定化を通じ、EGFR、MET、IGF-IRなどの様々な受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の活性化を維持する。

本事業の当初において、既に確立していた2つのアッセイ系 (ELISAベースのキナーゼアッセイ系と細胞ベースの蛋白質結合アッセイ系) に加えて、研究支援基盤の支援の下に高感度かつ低バックグラウンドを可能とするアルファスクリーン技術を用いた、キナーゼと2つの蛋白質結合のハイスループットスクリーニング (HTS) 系を構築した。アッセイ系の構築に必須なリコンビナント精製蛋白質の精製過程において直面した蛋白質の不安定さや収量の不足等の問題点を克服するとともに、精製後の蛋白質に十分な安定性が得られることを確認し十分量のリコンビナント精製蛋白質を得て、研究支援基盤の置かれている理化学研究所及び産業技術総合研究所において、最適な条件検討の後、HTSを実施した。また並行して、確立済であったROR1のキナーゼ活性非依存的機能を標的とした蛍光シグナルの検出による細胞ベースの蛋白質結合アッセイ系を用いて、産業技術総合研究所にてHTSを実施した。理化学研究所では、理研化合物NPDepoライブラリー (200,000種類)、東大創薬イノベーションコアライブラリー (10,000種類)、既存薬ライブラリー (4,000種類) の化合物ライブラリーを用い、産業技術総合研究所では、天然粗抽出物ライブラリー (254,080種類)、単離天然化合物ライブラリー (2,560種類)、合成化合物ライブラリー (11,840種類)、既存薬ライブラリー (4,160種類) の天然物ライブラリーを用いて、大規模なHTSによるヒット化合物の探索を行った。HTSによって得られた複数種の候補ヒット化合物に対して、再現性試験や濃度依存性試験、偽陽性試験、カウンターアッセイ (キナーゼアッセイの場合) を行うことでヒット化合物を同定した。その結果、ROR1のキナーゼ活性を標的としたヒット化合物については、5種類 (理研) 及び5種類 (産総研) をそれぞれ同定した。また、ROR1のキナーゼ活性非依存的な機能として、ROR1とROR1結合蛋白質との結合を標的としたヒット化合物については、29種類 (理研) 及び18種類 (産総研) を同定した。さらに、細胞ベースのROR1とROR1結合蛋白質との結合を標的としたヒット化合物については、3種類 (産総研) を同定した。また、これらのヒット化合物に対してPOCの取得のための解析を進めたところ (現段階でPOC取得進行中、或いは未検証のものは除く)、これまでにトゥルーヒットの可能性が示唆される化合物として、ROR1のキナーゼ活性を標的としたHTSから1種類の候補を、またROR1の非キナーゼ活性を標的としたHTSから2種類の候補を得た。