

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」（がん再発や治療抵抗性を制御する p53 経路を標的とする新規治療法開発に資する研究）
2. 研究開発代表者：江成 政人（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

Mdmx は p53 に結合し p53 機能を不活化するタンパク質で網膜芽腫等の多くのがん種で活性化している。この p53 と Mdmx との相互作用を抑制できれば、細胞内で p53 を再活性化できがんの抑制が見込まれる。平成 26 年度の研究成果より私達は p53-Mdmx 相互作用を阻害する低分子化合物 K-178 を見出し、その低分子化合物が Mdmx の活性が認められるがん細胞の p53 経路を再活性化し造腫瘍性を抑制すること等を発見した。しかしながら、p53-Mdmx 相互作用を阻害する活性がまだ弱かったことから K-178 の構造を基に 16 種類の誘導体低分子化合物を合成展開し、更に阻害活性の高い化合物の探索を行った。p53 と Mdmx との相互作用をモニタリングする実験系を用いた解析より、16 種類の誘導体低分子化合物のうち 4 つの低分子化合物が p53-Mdmx 相互作用を特異的に阻害する活性を有していた。そして、そのうちの 2 つは合成展開によって阻害活性が向上した。また、得られた Mdmx と p53 との相互作用を特異的に阻害する化合物によって Mdmx の活性が認められるがん細胞の造腫瘍性を抑制するか検討したところ、合成展開する前の化合物に比べ、より高い造腫瘍抑制活性を示すことがわかった。また、同定された化合物群から構造式、ファルマコフォア、表面形状類似性に着目した検索式を開発し、ライブラリーからのインシリコスクリーニング系を構築した。

また TSPAN2 タンパク質と CD44 タンパク質に黄蛍光タンパク質（YFP）あるいはシアン蛍光タンパク質（CFP）を融合させたプラスミドを構築し、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を利用して TSPAN2-CD44 相互作用モニタリング系の構築に成功した。また一本鎖抗体ライブラリーを作製するにあたり、培養細胞を用いて TSPAN2 の細胞外領域を調製し、それを抗原としてウサギへ免疫した。そして、免疫したウサギの脾臓より RNA を調製した後、一本鎖抗体ライブラリーを作製した。一方、次世代がん HTS 支援班の低分子化合物のライブラリーを用いたハイスループットスクリーニング（既存薬：約 3,800、理研所有の天然物関連化合物：約 20,000）を行ったところ、その相互作用を阻害する物質として 138 個（既存薬として 37 個、天然物関連化合物として 101 個）ヒットした。また、ヘリックスペプチドライブラリーを用いたスクリーニングより、TSPAN2-CD44 相互作用を阻害するものが一つ得られた。上記 TSPAN2-CD44 相互作用の阻害活性を持つヘリックスペプチド XL102 が実際がん細胞の運動能や浸潤能を抑制するかどうか検討したところ、予想した通り XL102 ががん細胞の運動能や浸潤能を用量依存的に抑制した。

p53 標的遺伝子である PHLDA3 は Akt を抑制することでアポトーシスを促進することを発見している。また、PHLDA3 欠損マウスでは β 細胞の増殖亢進とアポトーシス抵抗性が認められることがわかった。この結果から PHLDA3 機能を抑制することで膵島移植後の膵島定着率が向上し、膵島移植の成功率が上がると思われる。本件に関わる国内・国際特許を申請した（特願 2014-107529、PCT/JP2015/64792）。また、立体構造未知の PHLDA3 の立体構造を分子モデリングで予測し、PHLDA3 表面でのタンパク質相互作用部位の推定から制御化合物設計のための性質を予測した。

p53 活性を変化させる低分子化合物の研究項目において、スクリーニングの結果同定された p53 活性を変化させる化合物が、複数の培養細胞において p53 活性化を引き起こすかについて、検討を行った。また、p53 活性を変化させる化合物の最適化を進め、より低濃度で効果が高い化合物を取得することができた。