

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) がん細胞特異的に作用するオートファジー細胞死誘導化合物を用いた創薬開発
(英語) Development of molecularly targeted anticancer agents based on the regulation of autophagic cell death
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学難治疾患研究所 病態細胞生物学分野 教授 清水重臣
- 所属 役職 氏名： (英語) Medical Research Institute, Pathological Cell Biology,
Tokyo Medical and Dental University, Professor, Shigeomi Shimizu
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) オートファジー細胞死誘導性抗がん剤の開発
開発課題名： (英語) Development of anticancer agents based on the activation of autophagic cell death
- 研究開発代表者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学難治疾患研究所 病態細胞生物学分野 教授 清水重臣
- 所属 役職 氏名： (英語) Medical Research Institute, Pathological Cell Biology,
Tokyo Medical and Dental University, Professor, Shigeomi Shimizu
- 分担研究 (日本語) オートファジー細胞死誘導化合物の合成
開発課題名： (英語) Synthesis of bioactive compounds inducing autophagic cell death
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 生体材料工学研究所 教授 細谷孝充
- 所属 役職 氏名： (英語) Institute of Biomaterials and Bioengineering
Tokyo Medical and Dental University, Professor, Takamitsu Hosoya

分担研究 (日本語) オートファジー細胞死誘導化合物の PET イメージング研究
開発課題名: (英語) PET imaging analysis of bioactive compounds inducing autophagic cell death

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター
所属 役職 氏名: 分子動態イメージング研究ユニット ユニットリーダー 崔 翼龍
(英語) RIKEN Center for Life Science Technologies, Molecular Dynamics
Imaging Unit, Unit Leader Yi-Long Cui Ph.D.

II. 成果の概要 (総括研究報告)

本研究では、がん細胞特異的にオートファジー細胞死を誘導できる低分子化合物を基盤に、新規抗がん剤を開発する。現在臨床で用いられている抗がん剤の多くは、がん細胞にアポトーシスを誘導する事でその効果を発揮している。特に、トポイソメラーゼ II 阻害剤などの DNA 傷害を誘導する薬剤は、がん細胞に p53 依存的なアポトーシスを実行することで、その抗がん剤としての役割を果たしている。ところが、多くのがんでは点突然変異などにより p53 分子が不活化されている。これらのがんでは、アポトーシスに対する感受性が低下しているため、臨床の場では、副作用のリスクを伴いながら大量の抗がん剤を投与しなければならない。そこで、アポトーシスとは異なる細胞死経路を介した抗がん剤の開発が期待される。

非アポトーシス細胞死として、オートファジー細胞死、ネクロプトーシス、パイロトーシスなどが、生体における重要な細胞死として位置づけられている (by Nomenclature Committee on Cell Death, Cell Death Differ, 2012)。この中で、オートファジー細胞死は、オートファジーの活性化によって誘導される細胞死である。オートファジーとは、自己構成成分を分解する細胞機能であり、通常は細胞を生かす為に機能しているが、この機構が無制限に働くと細胞内成分が過剰に分解されて細胞が死にいたるのである。

本研究では、オートファジー細胞死を誘導できる 4 種類のヒット化合物を基盤に、新たな抗がん剤の開発を行なう。具体的には、(1)開発が進んでいる TMD-511 化合物に関して、ヒトがん細胞への最適化作業を行う。(2)ex vivo がんモデルマウスで抗がん効果を発揮した 3 種類のヒット化合物に関して、化合物を改良するとともに、標的分子の解明、薬物動態解析、安全性試験などを行い、抗がん剤候補化合物としての見極めを行う。有望なものに関しては、ヒトがん細胞に対する最適化作業を行なう。さらに、(3)化合物ライブラリーの種類を変えることなどにより、新たなスクリーニングを行ない、新たな抗がん剤の開発を行なう。

平成 28 年度は、以下の開発研究を行った。

① TMD-511 の開発

TMD-511 化合物は、構造活性相関をもとに開発し、マウスに最適化した化合物である。本年度は、これまでの知見を参考に TMD-511 をさらに構造展開して、ヒトがんの ex vivo モデルに対して高活性を発揮する新規化合物 TMD-593 の合成に成功した。また、TMD-511 の有効性を把握する方法として、リソソーム動態を測定できる抗体を開発し、その有用性を確認した。さらに、TMD-593 化合物の適応対象となるがんの種類を探索し、皮膚がん、血液がん、胃がん、肝臓がん、膵臓がんなどで有効性

を示すことを見出した。一方で、神経由来のがん、肺がんなどでは、有効性を示すがん細胞は少なかった。また、PET イメージングに関しては、 ^{11}C TMD-511 の合成法の最適化を再度行い、PET 撮像に問題のない純度と放射能を有する PET プローブを与える条件を確立した。さらに、 ^{11}C TMD-511 を用いて、p53 欠損がんモデルマウスでの PET イメージング研究を実施し、がん組織への有意な集積すること、構造展開した TMD-511 の類縁体の前投与によってその集積が有意に低下することを明らかにした。

② TMD-#13、TMD-#16、TMD-#4 の開発

まず、3 種類のヒット化合物 TMD-#4、TMD-#13、TMD-#16 そのものの合成研究に取り組んだ結果、TMD-#4 及び TMD-#16 の提示構造化合物の合成に成功し、実際の殺細胞効果も確認された。即ち、確定ヒットとして確認された。さらに、次年度計画を前倒しして構造展開にも取り組んだ結果、TMD-#4 の類縁体を 1 種類合成できた。また、これら 3 種類の化合物を、30 種を超えるヒトがん細胞株に投与し、有効に作用するがんの種類を明らかにした。

③ 新たな低分子化合物ライブラリー由来の化合物開発

p53 欠損がん細胞、変異型 Ras 発現がん細胞に有効な化合物を、各々 3 種類、2 種類同定した。

Results

Many molecularly targeted anticancer agents have been developed on the basis of apoptosis. However, autophagic cell death is also involved in the mechanisms of carcinogenesis. Therefore, we speculate that cancer may be cured by inducing autophagic death in cancer cells. This type of treatment would be effective for cancers that do not respond to existing anticancer agents (i.e., agents with apoptosis-based mechanisms of action). In addition, synergistic effects with existing anticancer agents are expected. Thus, we are now trying to develop molecularly targeted anticancer agents based on the induction of autophagic cell death. To meet this objective, we have established a high-throughput assay system that can monitor excessive autophagy and cell death-inducing activity. Using this assay, we screened a low-molecular weight compound library to identify chemicals with autophagic cell death-inducing activities and successfully identified 24 candidate compounds. In particular, four of these compounds exhibited strong anticancer activities. At present, we are optimizing these compounds for development as drugs based on pharmacokinetic investigations and structure-activity relationships. We are also performing high-throughput screening using different chemical library.

Specifically, this year, we obtained following results.

(1) Improvement of TMD-511

TMD-511 is an anti-cancer compound with autophagic cell death-inducing activity. Recently, we developed relative compound TMD-593, which has a strong anticancer activity against *ex vivo* human cancer mouse model. We also developed specific antibody that can monitor the effectiveness of TMD-593 through measuring lysosomal function. We also examined the type of cancer that can be treated by TMD-593. This compound is useful for skin tumor, leukemia, gastric cancer, liver cancer, and pancreatic cancer, but not for neurological cancer and lung cancer.

We established a synthetic method of ^{11}C TMD-511 with high purity and radioactivity that is suitable for a PET imaging study by re-optimization of the reaction conditions. PET imaging with ^{11}C TMD-511 in

p53-null tumor cell xenograft model mouse showed that the radioactivity was obviously accumulated in the tumor tissue and clearly blocked by pre-treatment of unlabeled TMD-511 derivative.

(2) Improvement of TMD-#13, #16, #4

We tried to synthesize the TMD-#4, #13, #16 according to their structures, and successfully synthesized TMD-#4 and TMD-#16. We also confirmed their anticancer activities. We further succeeded to synthesize one relative compound of TMD-#4. We administrated these three compounds to 30 human cancer cells, and revealed the type of human cancer that can be treated by these compounds.

(3) Development of novel anticancer compounds from other compound libraries

We identified three compounds that specifically kill p53-deficient cancer cells, and two compounds that specifically kill mutant Ras expressing cancer cells.

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 8 件、国際誌 9 件)

1. Nasu Y, Benke A, Arakawa S, Yoshida G, Kawamura G, Manley S, Shimizu S, Ozawa T. In situ characterization of Bak clusters responsible for cell death using single molecule localization microscopy. *Scientific Reports*. 2016, 6, Article number: 27505.
2. Yamaguchi H, Arakawa S, Kanaseki T, Miyatsuka T, Fujitani Y, Watada H, Tsujimoto Y, Shimizu S. Golgi membrane-associated degradation pathway in yeast and mammals. *EMBO J*. 2016, 35, 1991-2007.
3. Konishi A, Izumi T, Shimizu S. TRF2 interacts with core histones to stabilize chromosome ends. *J. Biol. Chem*. 2016, 291, 20798-810.
4. Torii S, Yoshida T, Arakawa S, Honda S, Nakanishi A, Shimizu S. Identification of PPM1D as an essential Ulk1 phosphatase for genotoxic stress-induced autophagy. *EMBO R*. 2016, 11, 1552-1564.
5. Watanabe Y, Honda S, Konishi A, Arakawa S, Murohashi M, Yamaguchi H, Torii S, Tanabe M, Tanaka S, Warabi E, Shimizu S. Autophagy controls centrosome number by degrading Cep63. *Nature Commun*. 2016, 7, Article number: 13508.
6. Arakawa S, Honda S, Torii S, Tsujioka M, Shimizu S. Monitoring of Atg5-independent Mitophagy. "Mitophagy" Volume in 'Methods in Molecular Biology Springer Press, 2016, *in press*.
7. Kozaki T, Komano J, Kanbayashi D, Takahama M, Misawa T, Satoh T, Takeuchi O, Kawai T, Shimizu S, Matsuura Y, Akira S, Saitoh T. Mitochondrial damage elicits a TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase-mediated antiviral response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017, 114, 2681-2686.
8. Arakawa S, Tsujioka M, Yoshida T, Tajima-Sakurai H, Nishida Y, Matsuoka Y, Yoshino I, Tsujimoto Y, Shimizu S. Role of Atg5-dependent cell death in the embryonic development of Bax/Bak double-knockout mice. *Cell Death and Differ*. 2017, *in press*

9. Arakawa S, Honda S, Yamaguchi H, Shimizu S. Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-independent alternative autophagy Proceedings of the Japan Academy, Series B. 2017, *in press*

1. 清水重臣. オートファジーと細胞死. 実験医学増刊号「細胞死」2016, 55-61.
2. 清水重臣. 細胞を浄化する新たなメカニズムの発見. 「御茶の水医学雑誌」2016, 64: 91-103.
3. 清水重臣. Autophagy、細胞死と疾患. 「日本外科学会雑誌」2016, 117: 622-624.
4. 清水重臣. オートファジーと細胞死. 「肝胆膵」2016, 73: 157-162.
5. 清水重臣. ミトコンドリア変調を病因とする脳神経疾患. 「脳21」2016, 19: 38-43.
6. 清水重臣. ミトコンドリア消失機構の分子基盤. 「医学のあゆみ」2017, 260: 31-36.
7. 清水重臣. 新たなオートファジー機構の発見. 「DOJIN news」2017, 160: 1-7.
8. 清水重臣. オートファジー欠損マウスの解析から見出した新規オートファジー機構. 「LABIO」2017, 印刷中.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. “Identification of natural product against fatty liver disease based on the induction of alternative autophagy” 口頭、清水重臣、ICNIM2016, 2016/7/15 国内.
2. 「オートファジーと細胞死の接点」口頭、清水重臣、日本 Cell Death 学会主催セミナー, 2016/8/25、国内.
3. “Alternative Autophagy is Essential for Neuronal Cell Maintenance” 口頭、清水重臣、Brain Protein Aging and Dementia Control International Workshop, 2016/9/9 国内.
4. 「ミトコンドリアの品質管理とその破綻による疾患」口頭、清水重臣、同仁化学研究所セミナー, 2016/9/29、国内.
5. “Macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes” 口頭、清水重臣、第78回日本血液学会, 2016/10/13、国内.
6. “Mitophagy and alternative autophagy” 口頭、清水重臣、The 13th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine, 2016/10/31、国内.
7. 「DNA 傷害誘導性オートファジーを制御する PPM1D 分子の役割」口頭、鳥居暁, 吉田達士, 荒川聡子, 本田真也, 清水重臣、第10回オートファジー研究会, 2016/11/14、国内.
8. 「DNA 傷害誘導性オートファジーを制御する PPM1D 分子の役割」ポスター、鳥居暁, 吉田達士, 荒川聡子, 清水重臣、第39回分子生物学会, 2016/11/30-12/02、国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 高校生への生物学紹介, 清水重臣, 海城高校, 2016/7/22, 国内.
2. 「細胞内のタンパク質を分解する新しい仕組み GOMED を発見—糖尿病罹患者の血糖調節への関与の可能性」, 清水重臣, プレスリリース(EMBO J), 2016/8/16, 国内.

3. 「放射線による細胞死を抑制するメカニズムを解明-オートファジーの新たな細胞保護機構-」, 清水重臣, プレスリリース(EMBO R), 2016/9/12, 国内.
4. 「体の中のゴミ処理機構とその異常による病気」, 清水重臣, 文京区市民公開講座, 2016/10/21, 国内.
5. 「染色体の均等分配に必須の中心体数を正確に制御する新たなメカニズムを解明」, 清水重臣, プレスリリース(Nature Commun), 2016/11/21, 国内.
6. 「オートファジーと疾患」, 清水重臣, 東京医科歯科大学平成 28 年度第 5 回記者懇談会, 2016/12/15, 国内.

(4) 特許出願

なし