

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 (P-CREATE)
- 研究開発課題名： (日本語) 新規遊走シグナル制御分子群を標的とした抗がん剤の開発
(英語) Development of anti-cancer drugs that target novel chemotaxis signaling regulators
- 研究開発担当者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人東京大学大学院医学系研究科分子予防医学 教授 松島綱治
(英語) Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Professor, Kouji Matsushima
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 開発課題名： (日本語) 腫瘍会合マクロファージを標的とした FROUNT 特異的阻害剤の最適化・導出および治験準備
(英語) Optimization and clinical trial preparation of FROUNT-specific inhibitors for macrophage-targeted anti-cancer therapy
- 研究開発分担者 所属 役職 氏名： (日本語) 国立大学法人東京大学大学院医学系研究科分子予防医学 教授 松島綱治
(英語) Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Professor, Kouji Matsushima
- 分担研究 開発課題名： (日本語) 腫瘍微小環境を構成するストローマ細胞の制御に関わるケモカイン受容体のシグナル制御分子 R1-15 およびがん治療標的となる新規遊走シグナル制御候補分子の標的 POC の検証と特異的阻害剤の開発
(英語) Proof-of-concept studies and development of specific inhibitors for the chemokine signal regulator R1-15 and other novel chemotaxis signaling regulators

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学大学院医学系研究科分子予防医学 助教 寺島裕也
所属 役職 氏名 : (英語) Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of
Medicine, The University of Tokyo, Assistant Professor, Yuya
Terashima

分担研究 (日本語) 構造学的解析に基づく論理的創薬開発研究
開発課題名 : (英語) Rational drug development based on structural analysis

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人熊本大学 大学院生命科学研究部 教授 寺沢宏明
所属 役職 氏名 : (英語) National University Corporation Kumamoto University, Faculty of
Life Sciences, Professor, Hiroaki Terasawa

II. 成果の概要（総括研究報告）

和文

がん細胞の増殖、転移、がん微小環境構成細胞の浸潤、増殖、血管新生など、がんの進展を助ける細胞応答においてケモカイン受容体ファミリーが重要な役割を担う。本研究では、松島綱治教授（東京大学大学院医学系研究科・研究代表者）および寺島裕也助教（東京大学大学院医学系研究科・研究分担者）らがこれまでに細胞遊走を指標とした独自の機能的探索技術を用いて同定した複数の候補分子群について、抗がん剤標的としての開発を進め、遊走シグナル制御分子ファミリーの顕在化とがん治療分野において遊走シグナル標的治療薬という新分野を開拓することを目指す。以下の項目について研究開発を進めた。

当グループが最初に同定した遊走シグナル制御分子である FROUNT に対する特異的阻害剤について開発を進めた。より活性の高い特異的阻害剤を得るため、新たに収集した類似化合物のケモカイン受容体との相互作用阻害活性の解析を進め、細胞遊走阻害活性試験、および細胞毒性試験により有望な類似化合物の絞り込みを開始した。寺沢宏明教授（熊本大学大学院生命科学研究部・研究分担者）グループでは FROUNT 特異的阻害化合物群について構造学的手法を用いて FROUNT タンパク質との結合様式を明らかにした。

また、新規遊走制御分子である R1-15 について生体における機能的解析を実施するために、遺伝子欠損マウスの作出を進めるとともに、R1-15 の立体構造解析に向けて、ケモカイン受容体結合領域の組換えタンパク質を調製した。

腫瘍微小環境における炎症応答に関与することが予想される alarmin の一種について抗腫瘍効果の解析に用いるために、組み換えタンパク質の発現・精製方法の検討を行った。収量効率の良い発現条件を見出したため、現在この条件で得られたタンパク質の精製を行っている。

以上のように、代表・分担機関ともに当初の計画通り順調に研究開発を進展させている。引き続き各シーズのフェーズを進めるために両機関が連携して取り組む。

英文

Chemokine receptors play pivotal roles in cellular responses to promote tumor progression, such as cancer cell growth and metastasis, infiltration and growth of various cell types composing the tumor-microenvironment, as

well as neovascularization. By a unique chemotaxis-based functional screening method, Matsushima (The University of Tokyo, Professor, Representative) and Terashima (The University of Tokyo, Assistant Professor, Co-investigator) et al. have identified several candidate molecules that regulate chemotaxis signaling. In this project, we aim to progress validation of these candidate molecules as anti-cancer drug targets and develop specific inhibitors that regulate harmful chemotaxis signaling. We propose a novel anti-cancer therapeutics which target chemotaxis signaling regulators.

In the development of specific inhibitors for FROUNT, the first chemotaxis signaling regulator identified by our chemotaxis-based functional screening, we obtained another set of analogues and undertook screening for their ability to inhibit chemokine receptor-FROUNT interaction and cellular chemotaxis without cytotoxicity. Through structural analysis, Terasawa's group (Kumamoto University, Professor, Co-investigator) characterized the binding modes of the FROUNT inhibitors to the FROUNT protein.

For functional analysis of the novel chemotaxis regulator R1-15, we generated R1-15 deficient mice and prepared a recombinant protein of the R1-15 receptor-binding region.

We are planning to evaluate the anti-cancer roles of a novel candidate molecule, a type of alarmin, which is expected to affect inflammatory responses in the tumor microenvironment. To generate recombinant protein for this purpose, we developed and optimized a protein expression and purification system. Protein production and purification is being conducted under these optimized conditions.

In conclusion, our research and development are progressing well and on schedule. We will continue to advance the developmental phase of each target molecule through efficient collaboration with each organization.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 1 件、国際誌 13 件)

1. Ueha R, Ueha S, Kondo K, Sakamoto T, Kikuta S, Kanaya K, Nishijima H, Matsushima K, Yamasoba T. Damage to Olfactory Progenitor Cells Is Involved in Cigarette Smoke-Induced Olfactory Dysfunction in Mice. *Am J Pathol.* 2016, 186(3):579-86.
2. Moro T, Nakao S, Sumiyoshi H, Ishii T, Miyazawa M, Ishii N, Sato T, Iida Y, Okada Y, Tanaka M, Hayashi H, Ueha S, Matsushima K, Inagaki Y. A Combination of Mitochondrial Oxidative

Stress and Excess Fat/Calorie Intake Accelerates Steatohepatitis by Enhancing Hepatic CC Chemokine Production in Mice. *PLoS One*. 2016, 11(1):e0146592.

3. Park AM, Kanai K, Itoh T, Sato T, Tsukui T, Inagaki Y, Selman M, Matsushima K, Yoshie O. Heat Shock Protein 27 Plays a Pivotal Role in Myofibroblast Differentiation and in the Development of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *PLoS One*. 2016, 11(2):e0148998.
4. Matsuo Y, Mizoguchi F, Saito T, Kawahata K, Ueha S, Matsushima K, Inagaki Y, Miyasaka N, Kohsaka H. Local fibroblast proliferation but not influx is responsible for synovial hyperplasia in a murine model of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016, 470(3):504-9.
5. Tan X, Fujiu K, Manabe I, Nishida J, Yamagishi R, Terashima Y, Matsushima K, Kaburaki T, Nagai R, Yanagi Y. Choroidal Neovascularization Is Inhibited in Splenic-Denervated or Splenectomized Mice with a Concomitant Decrease in Intraocular Macrophage. *PLoS One*. 2016, 11(8):e0160985.
6. Ueha R, Ueha S, Sakamoto T, Kanaya K, Suzukawa K, Nishijima H, Kikuta S, Kondo K, Matsushima K, Yamasoba T. Cigarette Smoke Delays Regeneration of the Olfactory Epithelium in Mice. *Neurotox Res*. 2016, 30(2):213-24.
7. Ueha R, Ueha S, Kondo K, Nito T, Fujimaki Y, Nishijima H, Tsunoda K, Shand FH, Matsushima K, Yamasoba T. Laryngeal mucus hypersecretion is exacerbated after smoking cessation and ameliorated by glucocorticoid administration. *Toxicol Lett*. 2017, 265:140-146.
8. Fujino M, Sato H, Okamura T, Uda A, Takeda S, Ahmed N, Shichino S, Shiino T, Saito Y, Watanabe S, Sugimoto C, Kuroda M, Ato M, Nagai Y, Izumo S, Matsushima K, Miyazawa M, Ansari AA, Villinger F, Mori K. Simian Immunodeficiency Virus Targeting of CXCR3⁺ CD4⁺ T Cells in Secondary Lymphoid Organs Is Associated with Robust CXCL10 Expression in Monocyte/Macrophage Subsets. *J Virol*. 2017, in press.
9. Sonoda, A., Yoshinaga, S., Yunoki, K., Ezaki, S., Yano, K., Takeda, M., Toda, E., Terashima, Y., Matsushima, K., and Terasawa, H. Identification and preparation of a novel chemokine receptor-binding domain in the cytoplasmic regulator FROUNT. 2017, *Mol. Biotech.* **59**, 141–150
10. Toyoda, H., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., Kusanagi, S., and Terasawa, H. An iterative reconstruction method for dual-band EPI in small-animal studies. 2016, *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **24**, 3242
11. Toyoda, H., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., and Terasawa, H. Image-based phase correction for dual-band EPI with slice-GRAPPA using point-by-point procedures in k-space. 2016, *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **24**, 4315
12. Yuzuriha, N., Yoshinaga, S., Sato, H., Honda, S., Tamaki, K., Sekizawa, T., Fujikawa, A., and Terasawa, H. Development of an evaluation system for analgesic drugs targeted to allodynia-specific pain using BOLD fMRI. 2016, *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **24**, 1722
13. Nakata, E., Kusanagi, S., Kimura, K., Araki, R., Takeda, M., Yoshinaga, S., and Terasawa, H. Development of an awake mouse MRI method using soft immobilization for a cryogenic probe system. 2016, *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **24**, 1757
14. 寺島裕也、遠田悦子「特集 複合がん免疫療法の時代来る・マクロファージ制御による新たながん治療薬の開発」ニューサイエンス社 細胞 2016年12月号48(13) p8-p12

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 細胞動態の分子メカニズムに着目した疾患の診断/治療/予防法の研究開発、創薬標的としての細胞動態の分子メカニズム（若手シンポジウム—企画および口頭発表）、寺島裕也、第 87 回日本衛生学会学術総会，2017/3/26-28, 国内.
2. Blocking chemokine receptors signaling by interrupting the interaction with a cytoplasmic regulatory protein FROUNT, ポスター, Yuya Terashima, Etsuko Toda and Kouji Matsushima, Keystone Symposia Conference; PI3K Pathways in Immunology, Growth Disorders and Cancer, , 2017/1/19-23, 国外.
3. シンポジウム—アカデミア発創薬探索研究、疾患に関わる細胞動態のメカニズムとその制御法, 口頭, 寺島裕也、第 89 回日本生化学会大会，2016/9/25-27, 国内.
4. ケモカイン受容体の遊走シグナルを標的とした新しい分子標的薬剤の開発（口頭発表）、寺島裕也、遠田悦子、板倉明司、松島綱治、第 25 回日本癌病態治療研究会，口頭，2016/6/8-9, 国内.
5. Intracellular blockade of macrophage chemotaxis via targeting a chemokine receptor-associating molecule FROUNT, ポスター, Yuya Terashima, Etsuko Toda and Kouji Matsushima, 24th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (MMCB2016), 2016/6/4-5, 国内.
6. A chemokine-signaling modulator FROUNT as a novel molecular target for cancer therapy, 口頭, Etsuko Toda, Yuya Terashima and Kouji Matsushima, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6-8, 国内.
7. ケモカイン受容体—細胞内会合分子相互作用を標的とする立体構造に基づく創薬研究, 口頭（招待講演）, 吉永壮佐, 第 87 回日本衛生学会学術集会，2017/3/26, 国内.
8. Structure-based analyses of the interaction between the chemokine receptor-regulator FROUNT and anti-inflammatory compounds., ポスター, Ezaki, S., Yoshinaga, S., Ishida, N., Takeda, M., Yunoki, K., Terashima, Y., Toda, E., Matsushima, K., and Terasawa, H., 日本生物物理学会第 54 回年会，2016/11/25-27, 国内.
9. ケモカイン受容体制御因子 FROUNT—新規制御化合物間の相互作用解析, ポスター, 江崎宗一郎、吉永壮佐、石田規人、武田光広、柚木芳、寺島裕也、遠田悦子、松島綱治、寺沢宏明, 第 55 回 NMR 討論会，2016/11/16-18, 国内.
10. Optimization of the awake mouse MRI method using mouse clothes for a cryogenic coil system., ポスター, Nakata, E., Kusanagi, S., Kimura, K., Araki, R., Takeda, M., Yoshinaga, S., and Terasawa, H., 第 44 回日本磁気共鳴医学会大会，2016/9/10, 国内.
11. Analyses of the Interaction Between the Regulating Factor of the Chemokine Receptor FROUNT and Anti-inflammatory Compounds., ポスター, Ezaki, S., Yoshinaga, S., Ishida, N., Yunoki, K., Terashima, Y., Toda, E., Matsushima, K., and Terasawa, H., The XXVIIth ICMRBS (International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems), 2016/8/22-25, 国内.
12. An iterative reconstruction method for dual-band EPI in small-animal studies., ポスター, Toyoda, H., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., Kusanagi, S., and Terasawa, H., 24th ISMRM (International Society for Magnetic Resonance in Medicine) annual meeting, 2016/5/9-12, 国外.

13. Image-based phase correction for dual-band EPI with slice-GRAPPA using point-by-point procedures in k-space., ポスター, Toyoda, H., Yoshinaga, S., Yuzuriha, N., and Terasawa, H., 24th ISMRM (International Society for Magnetic Resonance in Medicine) annual meeting, 2016/5/9-12, 国外.
14. Development of an awake mouse MRI method using soft immobilization for a cryogenic probe system., ポスター, Nakata, E., Kusanagi, S., Kimura, K., Araki, R., Takeda, M., Yoshinaga, S., and Terasawa, H., 24th ISMRM (International Society for Magnetic Resonance in Medicine) annual meeting, 2016/5/9-12, 国外.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
該当なし

(4) 特許出願
該当なし