

免疫グロブリン・スーパーファミリー細胞接着分子群を標的とした癌の浸潤・転移抑制医薬品の開発研究

研究期間 平成17年度～平成21年度(予定)

研究体制



※平成21年度における研究体制

癌の浸潤、転移抑制薬の開発へ大きく前進

Project KeyWord
キーワード

細胞接着分子 TSLC1

免疫グロブリン様細胞接着分子の一つ。成人T細胞性白血病では疾患特異的な発現、特定の高転移性腫瘍では特異なスプライズバリエーションの発現が見られ、癌の浸潤、転移を促進する。癌浸潤、転移抑制の薬剤標的候補と考えられる。

CD44と ADAMプロテアーゼ

膜蛋白質CD44は細胞外基質ヒアルロン酸と結合し、この結合はADAMプロテアーゼにより切断される。この一連の動的過程が細胞のマトリクス内運動に必須であることから、癌細胞の浸潤抑制の薬剤標的になると考えられる。

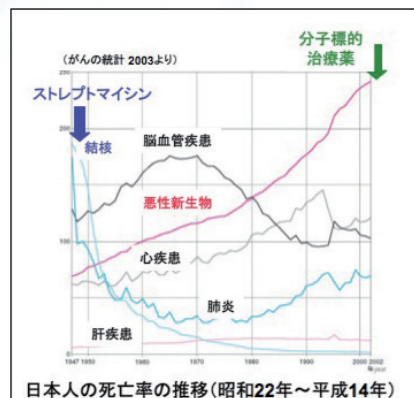
癌選択的糖鎖修飾とその検出

癌細胞ではしばしば正常では認められない膜蛋白質や修飾糖鎖が発現する。従って、癌細胞の特定蛋白質上の特定糖鎖が検出できれば、癌特異的な診断が可能となる。特に患者血清を用いた検出は有用性が高いと考えられる。

1 研究の背景・意義

浸潤、転移の制御は癌克服の最重要課題

現在までの癌治療薬の大部分は原発巣での癌細胞の増殖の抑制を期待するものであり、癌の浸潤、転移を直接標的とした医薬品はほとんどない。しかし、言うまでもなく浸潤・転移は癌死の最大の要因であり、その抑制は、癌を制御可能な疾患とするために必須である。癌の浸潤・転移は細胞間や細胞・基質間接着の異常により生じ、細胞間、並びに細胞・基質間の接着分子群が重要な役割を果たす。本プロジェクトの参加研究者らは、免疫グロブリン・スーパーファミリー細胞接着分子群(IgCAM)に属するTSLC1やヒアルロン酸結合分子CD44、並びにその糖鎖修飾が、癌の浸潤・転移に関わることを世界に先駆けて明らかにしてきた。特に、医薬品開発の直接標的となる限定された分子断片や、活性を制御する酵素反応、特定の糖鎖など、学術的に得られた基礎的知見と技術は独創性に富み、標的を絞りこんだ医薬品の開発が期待される。また、浸潤・転移はすべての進行癌に共通の終末像であることから、本研究の結果得られるCD44、TSLC1を対象とした診断薬、治療薬の対象は、肺癌、胃癌、大腸癌などほぼすべての癌腫(死亡数年間30万人以上)に及び、また、成人T細胞性白血病(ATL)におけるHTLV-1ウイルス抗体陽性者120万人を含めると、その保健医療への貢献は計り知れない。



▲癌は日本人の死因の第一位で、なお増加傾向にある。その大部分が浸潤、転移による死亡であり、その制御は最重要課題である。

2 研究プロジェクトの目標

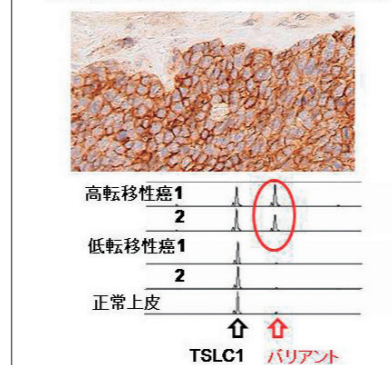
癌の浸潤、転移の診断医薬、抑制医薬の開発

本研究では、TSLC1、CD44分子を対象を絞り、その発現異常、スプライズ異常、分子切断、糖鎖修飾、下流シグナルの実態と意義を明らかにし、その分子経路を標的として癌の浸潤・転移を抑制する医薬品(ヒト化抗体、低分子化合物)の開発を目指す。また、数年の観察を要する浸潤、転移抑制医薬品の評価を可能とする血清中サロゲート・マーカー(抗癌性糖鎖抗体)とその検出法の開発を目指す。

TSLC1については、ATLや高転移性腫瘍における異常発現と浸潤、転移促進機能の実態を解明し、その機能を阻害するヒト化抗体を作製する。また、独自の低分子化合物検索系を構築し、TSLC1機能を阻害するリード化合物の同定を目指す。

CD44については、大腸癌や肺癌で見られるスプライズバリエーションの機能を解明し、癌の診断、治療の標的としての確立を目指す。特にCD44を切断するADAMプロテアーゼの癌細胞浸潤への関与を明らかにし、その活性を阻害する低分子化合物の検索系を構築し、浸潤・転移・増殖を抑制するリード化合物の同定を目指す。

高転移性癌における TSLC1 バリエーションの発現



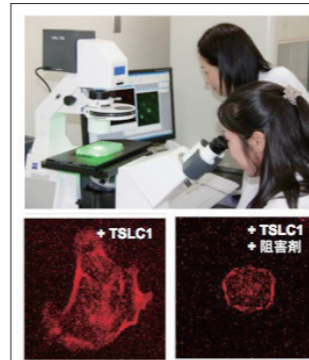
▲高転移癌に特異的に見られるTSLC1バリエーション。CD44バリエーションとともに浸潤・転移抑制の薬剤標的となる。

さらに、CD44、TSLC1分子の結合糖鎖を解析し、癌選択的糖鎖に対する特異的診断抗体を作製し、浸潤・転移の診断マーカーの確立を目指す。さらに、質量分析法を用いた患者検体中の糖鎖の検出法を開発して、抗体による検出の補強を目指す。

3 研究プロジェクトの成果

癌浸潤を抑制する TSLC1 阻害分子を同定

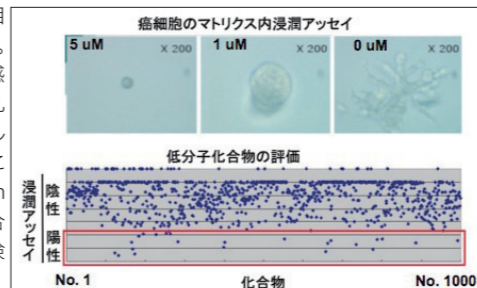
特定の難治癌の浸潤、転移にTSLC1が重要で、薬剤標的となることを示し、特許を出願した。そして、TSLC1機能を阻害する低分子化合物の、培養細胞を用いた検索系を構築し、既知化合物の検索により μ Mの濃度でTSLC1の浸潤能を強く抑制するリード化合物を得た。また、企業と連携してTSLC1の機能を阻害するヒト化抗体を得た。ともに癌の浸潤、転移抑制医薬品開発の有望な候補分子であり、抗体についてはマウスを用いた有効性試験、安全性試験を進めている。さらに特異性の高い抗 TSLC1モノクローナル抗体を作成し、診断医薬品としての評価を進めた。



▲TSLC1阻害剤による癌細胞の浸潤抑制。細胞形態変化に基づく低分子化合物の検索によりリード化合物を同定した。

癌浸潤を抑制するプロテアーゼ阻害剤を同定

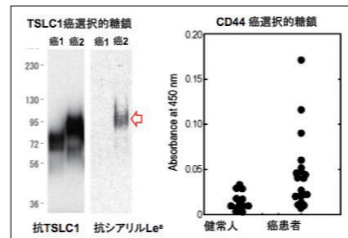
癌細胞の浸潤にはCD44のADAM10,17による切断が重要で、薬剤標的になることを示した。そこで、ADAM17の活性化によるCD44切断を評価する細胞を用いた高感度検索系を確立し、特許を出願し、低分子化合物を検索した。この結果、 μ MオーダーでADAM17活性を特異的に阻害し、CD44切断を抑制し、腫瘍のマトリクス内への浸潤を抑制する化合物を得た。そこで、この化合物の合成展開を行い、より低濃度で有効な化合物の取得を目指している。さらに、高感度のマウス乳癌転移モデルを構築し、これを用いてin vivoでの化合物の効果を検定した。



▲ADAM17阻害剤による癌細胞の3次元マトリクス内浸潤の抑制。1000種以上の化合物の検索によりリード化合物を同定した。

癌と非癌を識別できる血清糖鎖検出系を確立

癌の浸潤、転移抑制医薬品の効果を長期にわたり評価可能とするために、癌選択的糖鎖を標的とする血中マーカーの確立、並びに新規検出法の開発を試みた。まずサンドイッチ法により、特定蛋白質上の特定糖鎖の血清中での測定法を確立した。つぎにCD44、TSLC1の癌性スプライズバリエーションが、癌特有の糖鎖修飾を受けることを明らかにした。そこで、CD44バリエーションの癌選択的、及び正常細胞特有糖鎖を、患者血清を用いて測定できる抗体システムを二組開発し、大腸癌の評価に有効であることを示した。さらに、質量分析による血中糖鎖の化学的検出系を確立し特許を出願した。

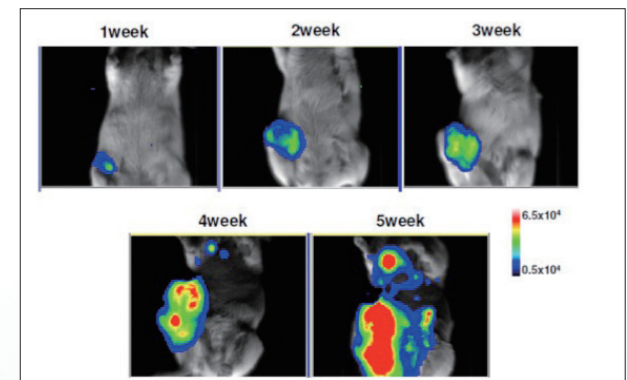


▲患者血清から、癌選択的糖鎖を鋭敏に検出可能となった。癌患者では、健康人よりも血清中の癌選択的糖鎖が高値を示す。

4 実用化にあたっての今後の課題及び研究方針

既存薬の検索による臨床応用にも道を拓く

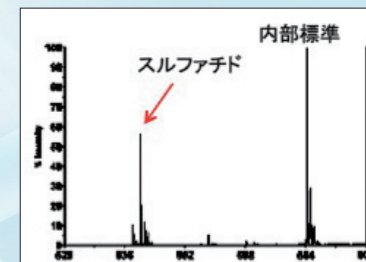
本研究で同定された、CD44、TSLC1の機能を阻害するリード化合物については、その実用化を目指して企業と共同で合成展開を進め、より高い活性と安全性をもつ化合物の同定に努める。また、本研究で確立された CD44、TSLC1の機能阻害剤に対する細胞を用いた検索系は、新規化合物のみならず、安全性試験が終了している既存の薬剤にも応用可能である。そこで、今後これらの検索を進め、有効な薬剤が得られた場合には、医師主導試験などにより速やかな臨床応用を目指す。すでに本研究により、ADAM17の阻害によるCD44切断抑制を介して癌細胞の浸潤を抑制する既存薬剤と、TSLC1機能を阻害する既存治療薬剤を複数個見出していることから、今後の展開が期待される。さらに癌細胞の浸潤を抑制する抗TSLC1ヒト化抗体を複数得、また癌特異的CD44スプライズバリエーションに対する抗体もヒト化を進めており、抗体医薬の実用化も視野に入ってきた。これらの有効性の評価に当たっては、本研究で別途構築されたマウスの浸潤、転移モデルが有用となる。このように、癌の浸潤、転移抑制を目指した本研究は、医薬品候補の同定のみならず、一連の新規製薬過程に必要なツールの構築についても大きく貢献しており、今後の発展が期待される。



▲乳腺に正所移植し100%肺、脳に転移するマウス乳癌転移モデルを構築した。in vivoでの化合物の効果検定に有用である。

糖鎖を標的とする癌の新規血清診断を実用化

癌選択的糖鎖を検出する抗CD44、抗TSLC1抗体の診断医薬品としての実用化を目指して本研究を行い、CD44については癌特有糖鎖、非癌特有糖鎖各々のサンドイッチ法に基づく測定系が完成し、患者検体の測定による評価を開始している。TSLC1についても結合糖鎖が判明し、測定系の構築が進んだ。これらの抗体を用いた患者血清による癌の診断は、癌の浸潤、転移抑制医薬品の効果を長期間観察する上で必須のツールとなると期待される。今後は、臨床検体での測定成績の解析を重ね、並行してこれらの糖鎖の出現が癌の浸潤・転移とどのように関連するか、その診断的意義についての研究を進ませ、有用な診断医薬品としての確立を目指す。また、血清中の糖鎖を、サンドイッチ法ではなく、直接質量分析法によって検出するという画期的な方法の開発については成功したが、複雑な構造の糖鎖については困難があり、今後も方法の変更・改良を加えながら、進めていく予定である。



▲MALDI-TOF型質量分析器による血中スルファチドの直接検出。画期的な手法であり、より複雑な糖鎖の検出が期待される。

参考文献

Yamada D, Yoshida M, Williams YN, Fukami T, Kikuchi S, Masuda M, Maruyama M, Ohta T, Nakae D, Maekawa A, Kitamura T, Murakami Y. Disruption of spermatogenic cell adhesion and male infertility in mice lacking TSLC1/IGSF4, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *Mol Cell Biol*, 26: 3610-3624, 2006

Inumaru J, Nagano O, Takahashi E, Ishimoto T, Nakamura S, Suzuki Y, Niwa SI, Umezawa K, Tanihara H, Saha H. Molecular mechanisms regulating dissociation of cell-cell junction of epithelial cells by oxidative stress. *Genes Cells* 14: 703-716, 2009

Lim K, Miyazaki K, Kimura N, Izaw M, Kannagi R. Clinical application of functional glycoproteomics - dissection of glycotopes carried by soluble CD44 variants in sera of patients with cancers. *Proteomics*, 8: 3263-3273, 2008