



岐阜薬科大学
Gifu Pharmaceutical University

がん幹細胞を標的とした抗がん剤創製

Development of anti-cancer drug targeting cancer stem cells

特願2022-45538号「抗がん剤」

檜井 栄一

岐阜薬科大学・薬学部・薬理学研究室

産学連携の経歴

＜産学連携による特許取得状況＞

- 特許第4430374号：檜井栄一「骨芽細胞の細胞死阻害剤」
- 特許第4773102号：檜井栄一「破骨細胞分化抑制剤、及びこれを含んでなる骨粗鬆症用薬剤」
- 特許第4923236号：檜井栄一「骨密度向上剤、抗骨粗鬆症薬および抗骨粗鬆症食品」
- 特許第5822189号：檜井栄一「幹細胞から褐色脂肪細胞への分化誘導促進剤」
- 特許第5866138号：檜井栄一「骨粗鬆症の予防及び/又は治療剤、骨吸収抑制剤、骨形成促進剤及びそれらのスクリーニング法」
- 特許第5979658号：檜井栄一「破骨細胞が関与する疾患の予防剤及び/又は治療剤」

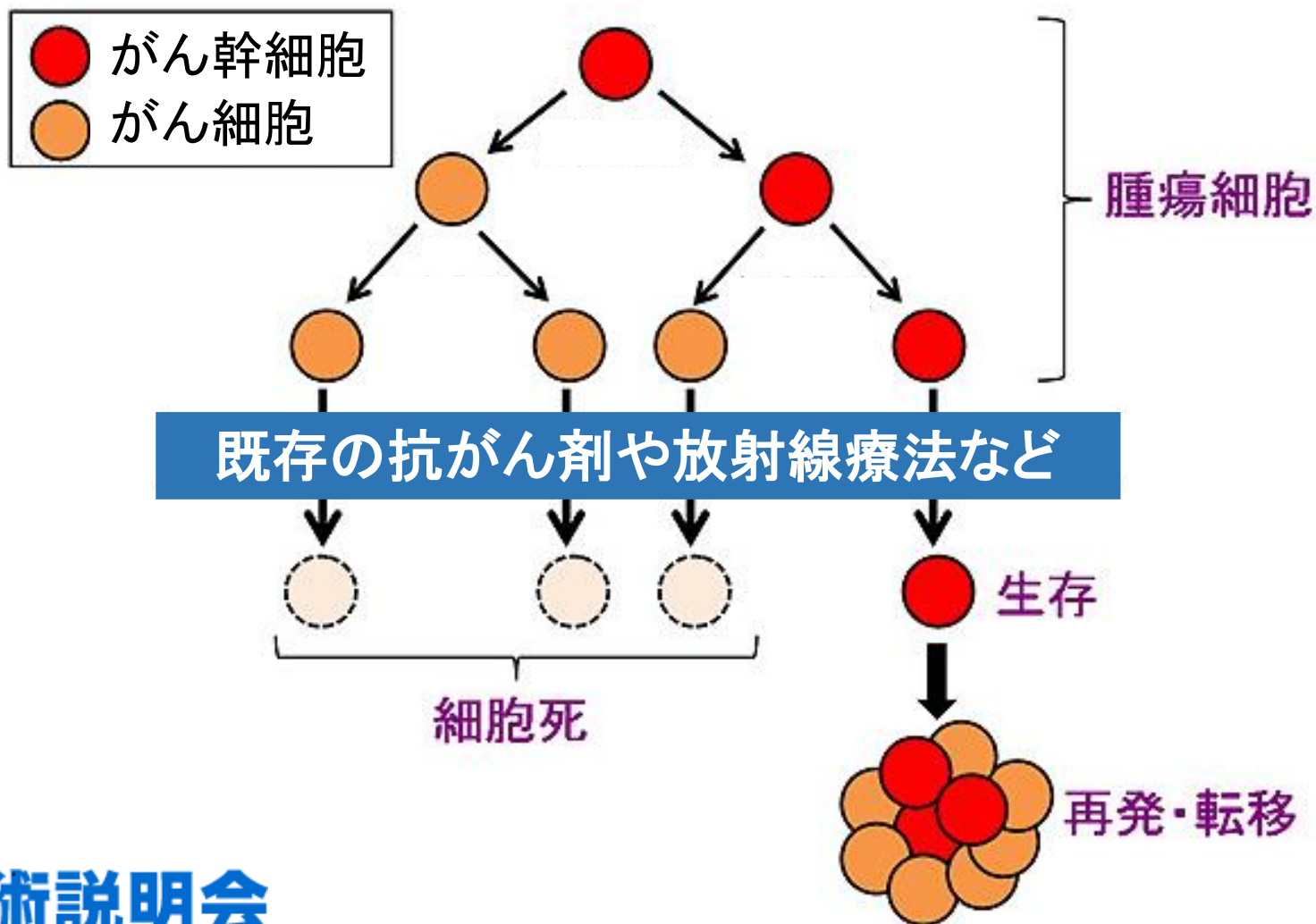
＜最近の産学連携＞

- 課題名：CDK8阻害剤の開発と抗がん剤治療 (*Oncogene* 2021)：毎日新聞、日経バイオテクなどで紹介
- 課題名：間葉系幹細胞を標的とした骨粗鬆症治療 (*Stem Cell Reports* 2022)：NHKニュース、朝日新聞、毎日新聞などで紹介

＜進行中の産学連携＞

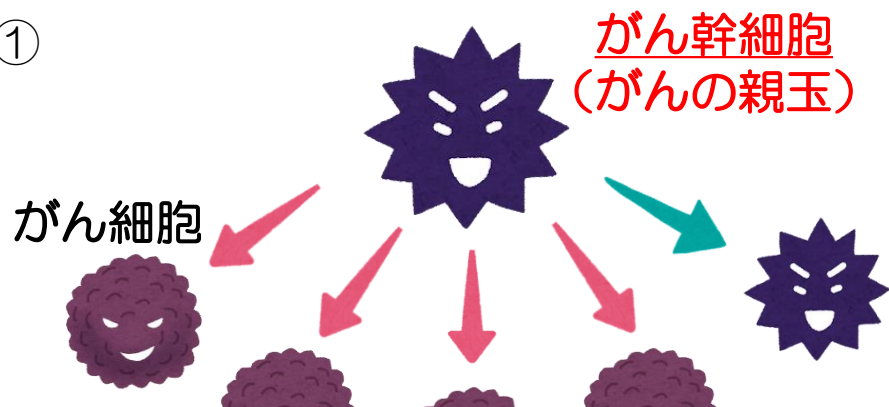
- 課題名：骨疾患領域における漢方製剤のエビデンス構築
- 課題名：ポリアミン含有食品素材の骨粗鬆症予防効果
- 課題名：キナーゼ阻害剤による骨系統疾患治療

がん幹細胞が生き残り、再発や転移が起こる

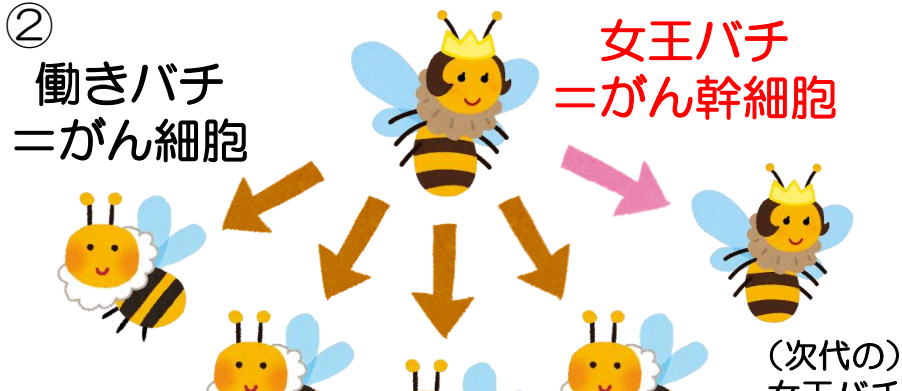


がん幹細胞を標的とした革新的創薬 (従来技術とその問題点・新技術の特徴・従来技術との比較)

①

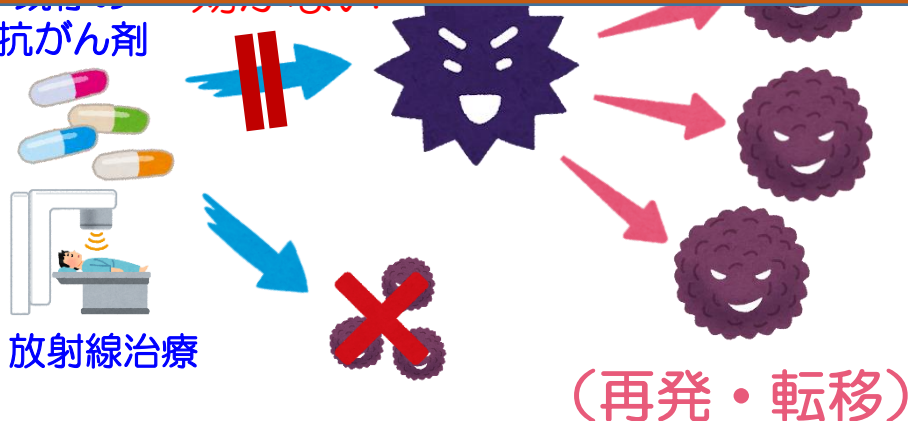


②



がん幹細胞に対する薬を開発し、
既存の抗がん剤と併用することで、がんの根治を目指す！

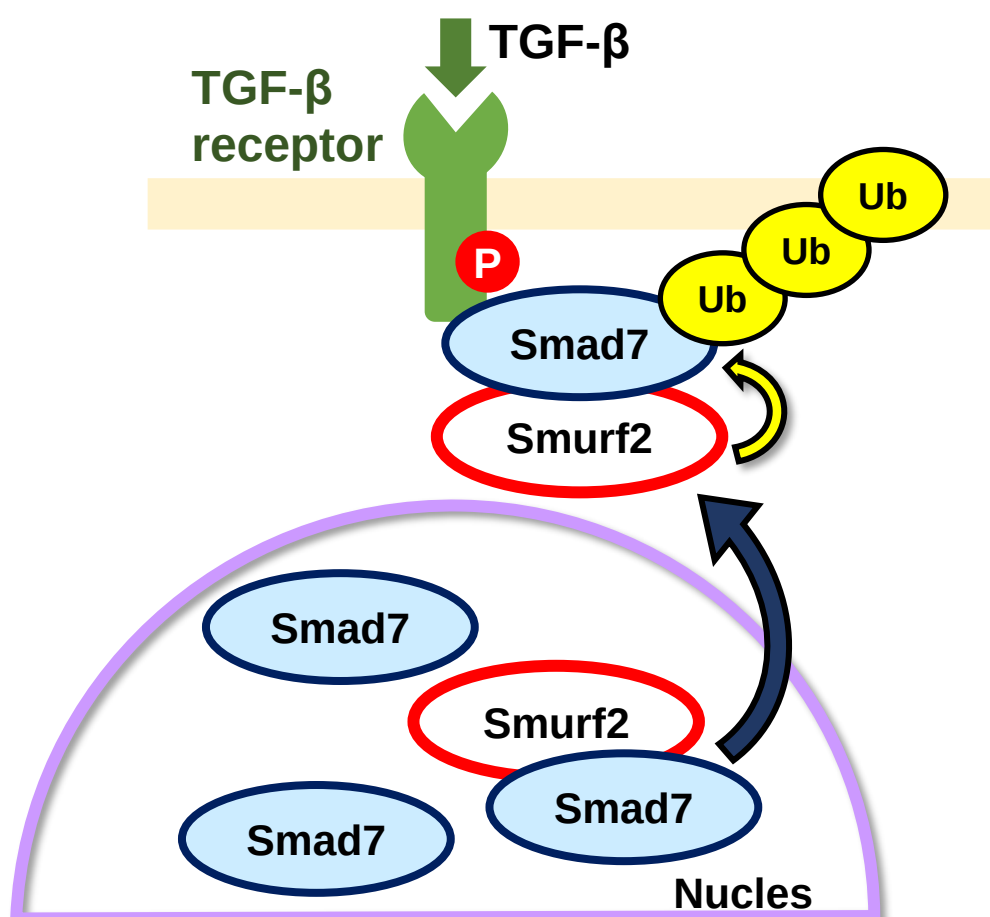
抗がん剤



新技術説明会
New Technology Presentation Meetings!

SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2 (Smurf2) について

- タンパク質分解系のE3 ubiquitin ligase
- TGF- β シグナルを抑制する因子 (Kavsak P et al., *Mol Cell*. 2000)
(Ikushima H et al., *Cell Stem Cell*. 2009)
- 腫瘍の発生を抑制する因子 (Blank M et al., *Nat Med*. 2012)



Smurf2欠損マウス



腫瘍の自然発生率が上昇

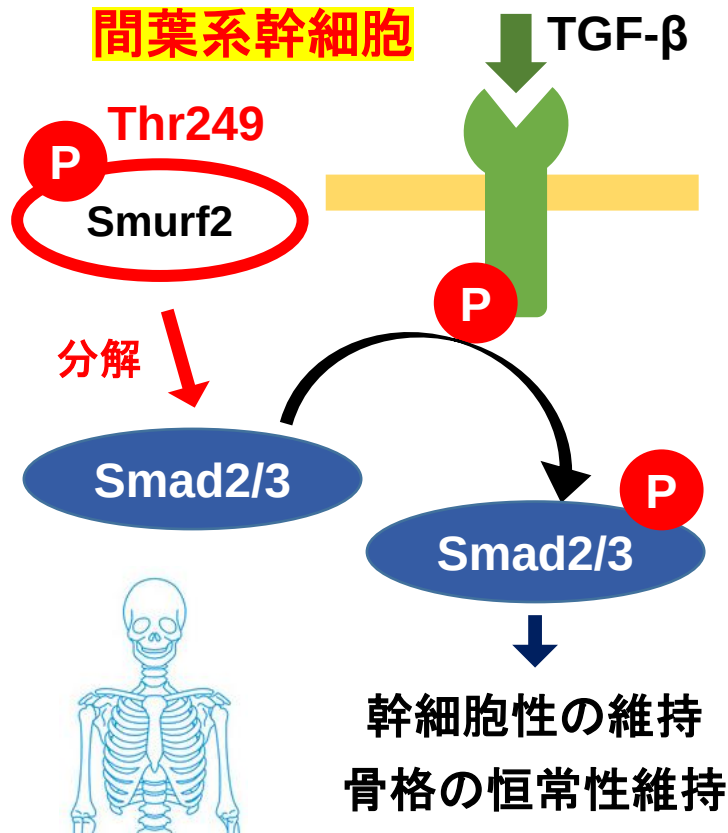
Smurf2欠損マウス由来
胚線維芽細胞 (MEF)



発がん性が上昇

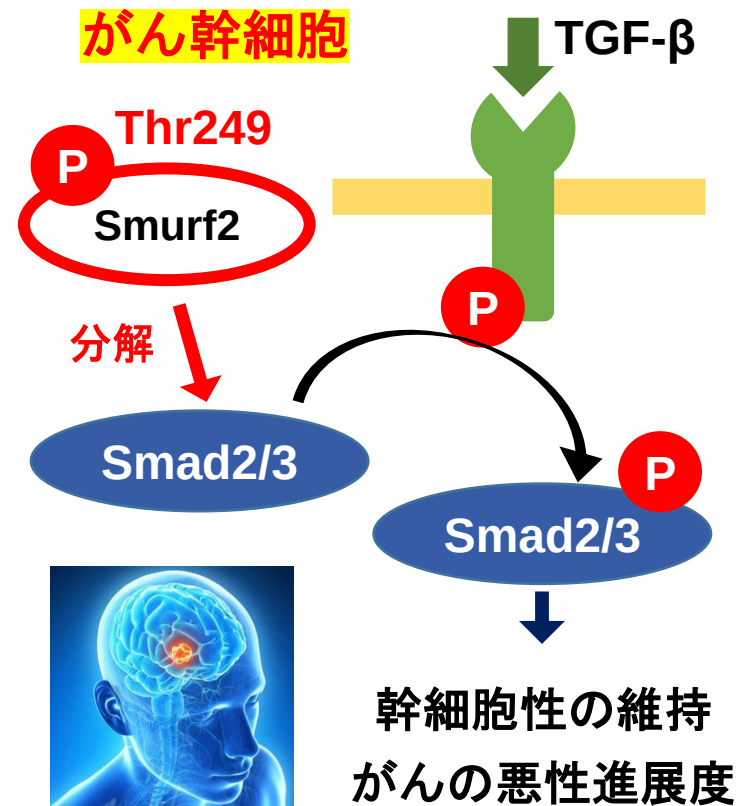
Smurf2(E3ユビキチンリガーゼ)の249番目のスレオニンのリン酸化は、幹細胞の幹細胞性維持に重要である

これまでの研究成果



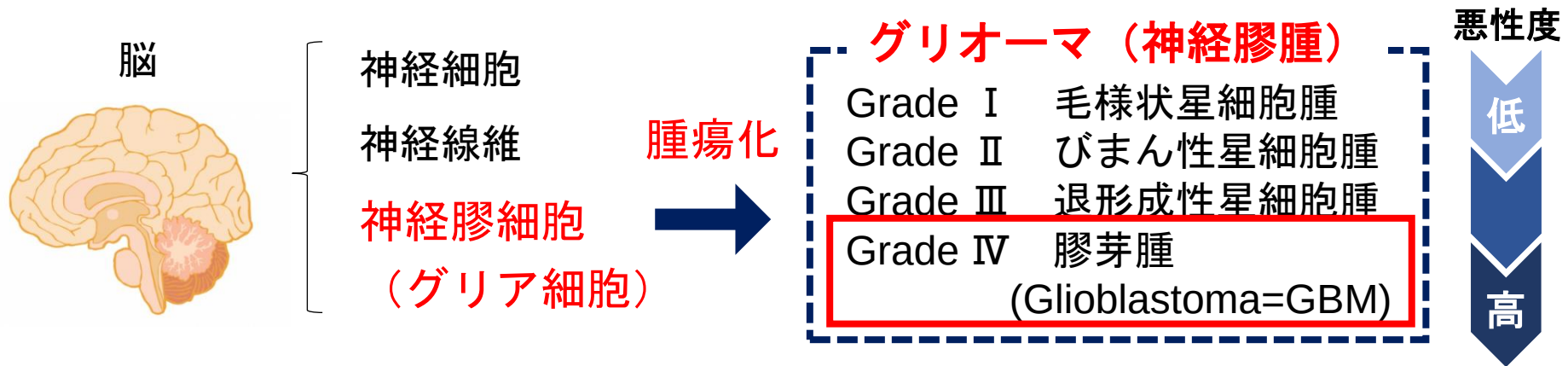
Iezaki, et al., *Development* 2018

本研究に関連する研究成果



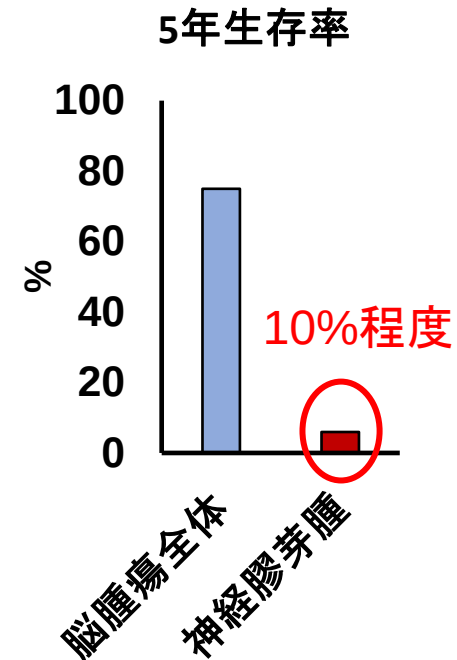
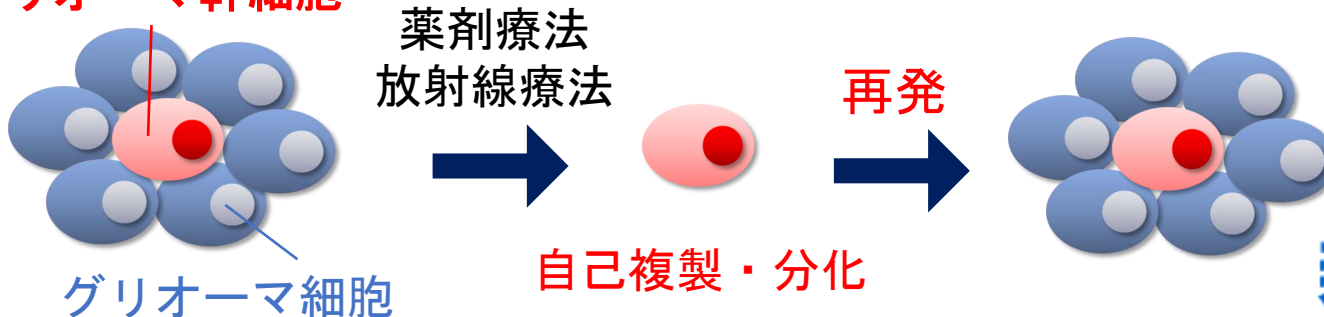
➤ Smurf2^{Thr249}のリン酸化状態が高い ⇒ Smurf2活性が亢進

グリオーマについて

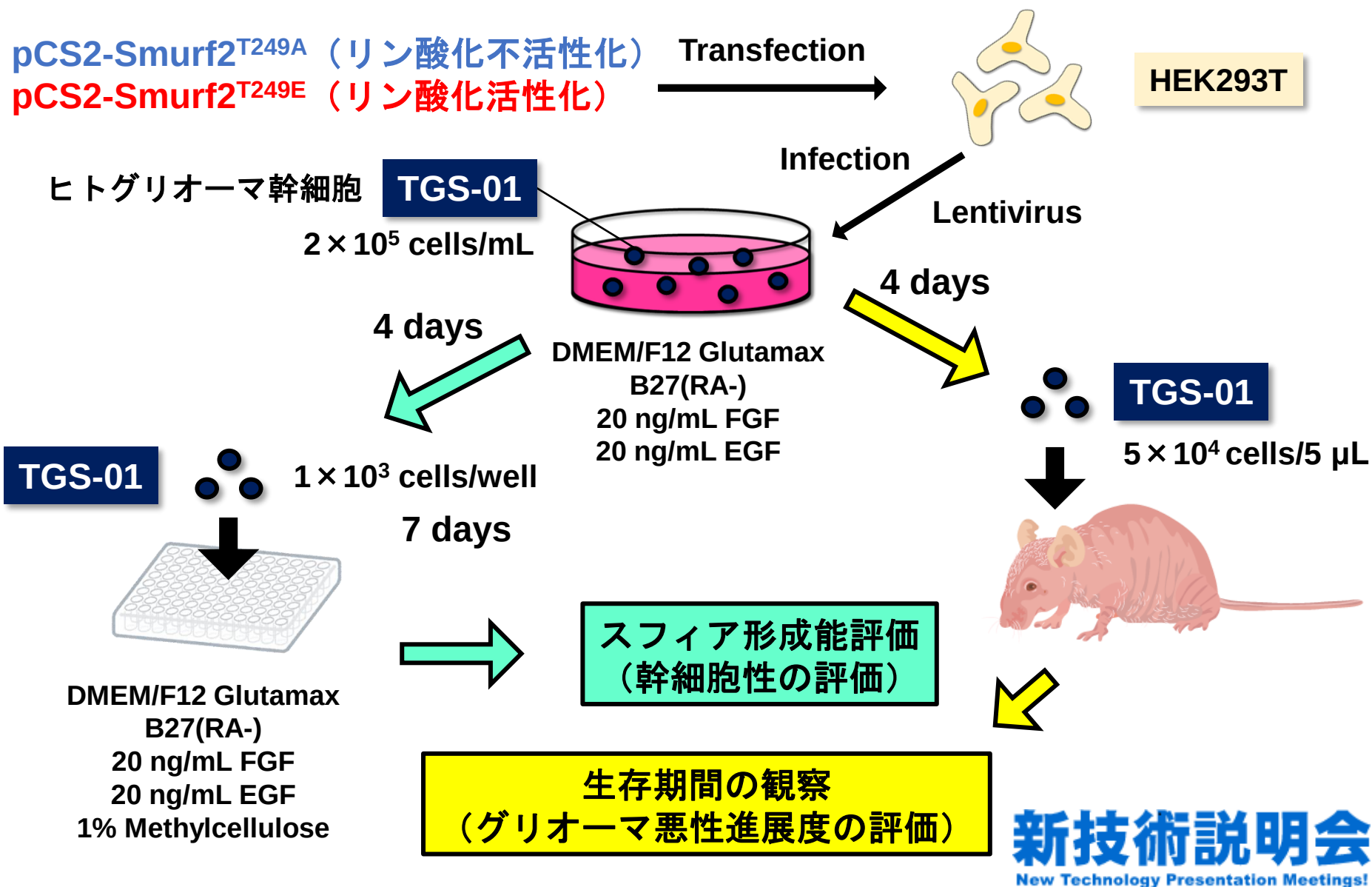


- ・ あらゆるがんの中で、最も予後不良の中枢神経系腫瘍
- ・ 「手術・放射線治療・化学療法」＝集学的治療
 - 約半世紀もの間、著明な予後の改善は認められていない
 - 根本的な治療法開発が望まれている
- ・ 「グリオーマ幹細胞 (glioma-initiating cell = GIC)」

グリオーマ幹細胞



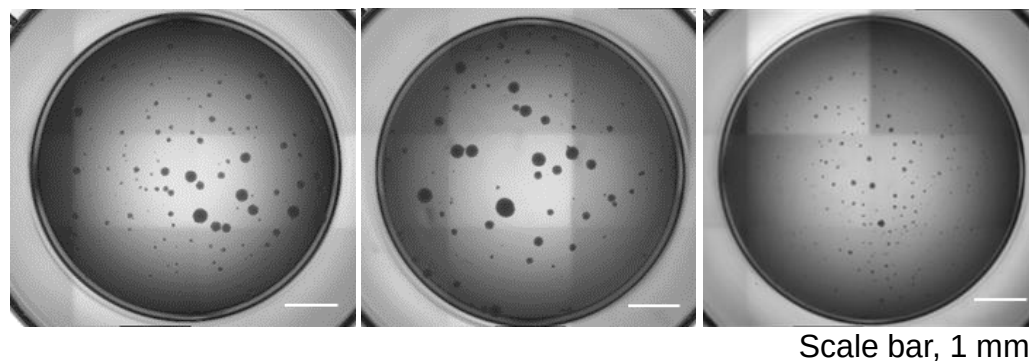
GICにおけるSmurf2^{Thr249}のリン酸化修飾が与える影響の検討について



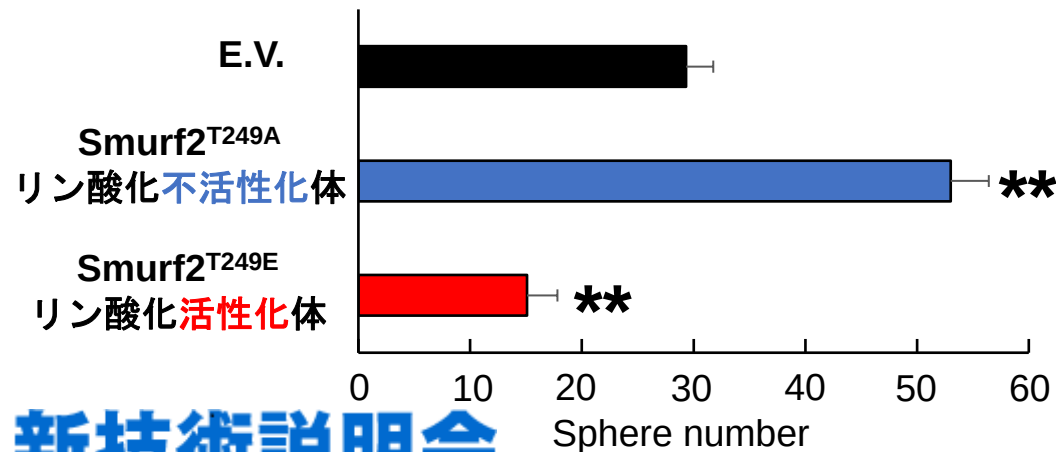
GICにおけるSmurf2^{Thr249}のリン酸化修飾は 幹細胞性・悪性進展度に関与

スフィア形成能（グリオーマ幹細胞性）評価

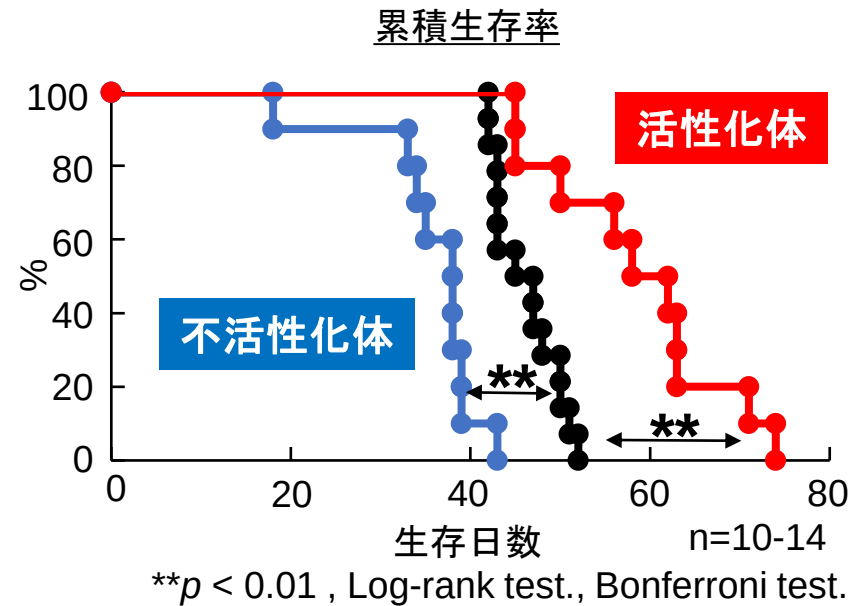
E.V. Smurf2^{T249A} Smurf2^{T249E}
リン酸化不活性化体 リン酸化活性化体



Sphere formation assay



Smurf2変異体導入GIC移植マウス
生存期間の観察
（グリオーマの悪性進展度評価）



グリオーマ患者の腫瘍組織を用いた解析

Glioma悪性度

Grade II

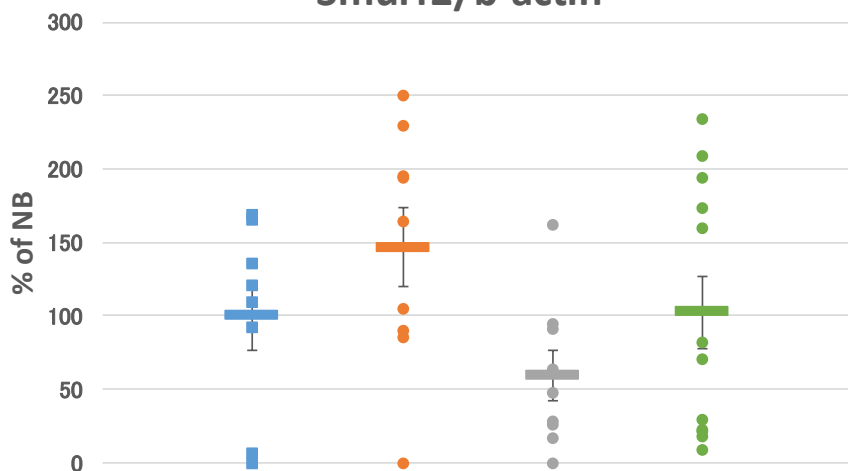
Grade III

Grade IV

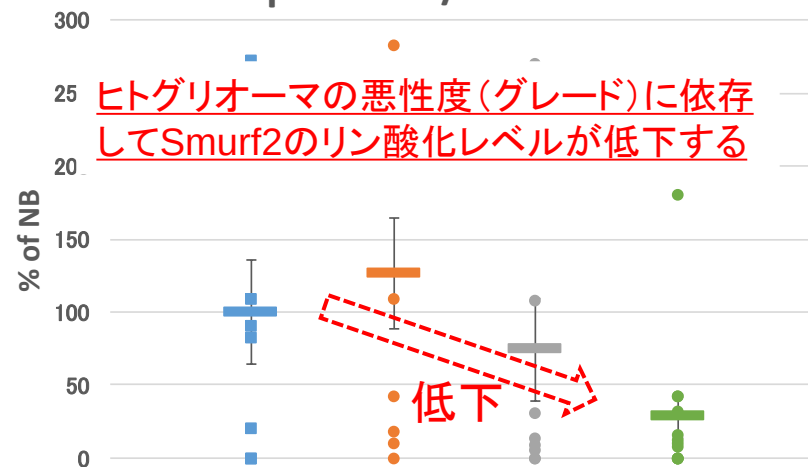
Glioma組織

分類	Normal Brain	OD (乏突起神経腫)	DA (びまん性星細胞腫)	AA (退形成性星細胞腫)	GBM (膠芽腫)
検体数	8	3	6	9	12

Smurf2/b-actin



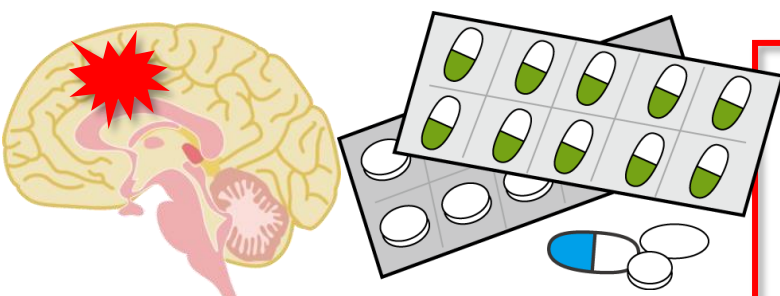
p-Smurf2/b-actin



Smurf2の249番目のスレオニンのリン酸化修飾は がんの悪性進展度に関与

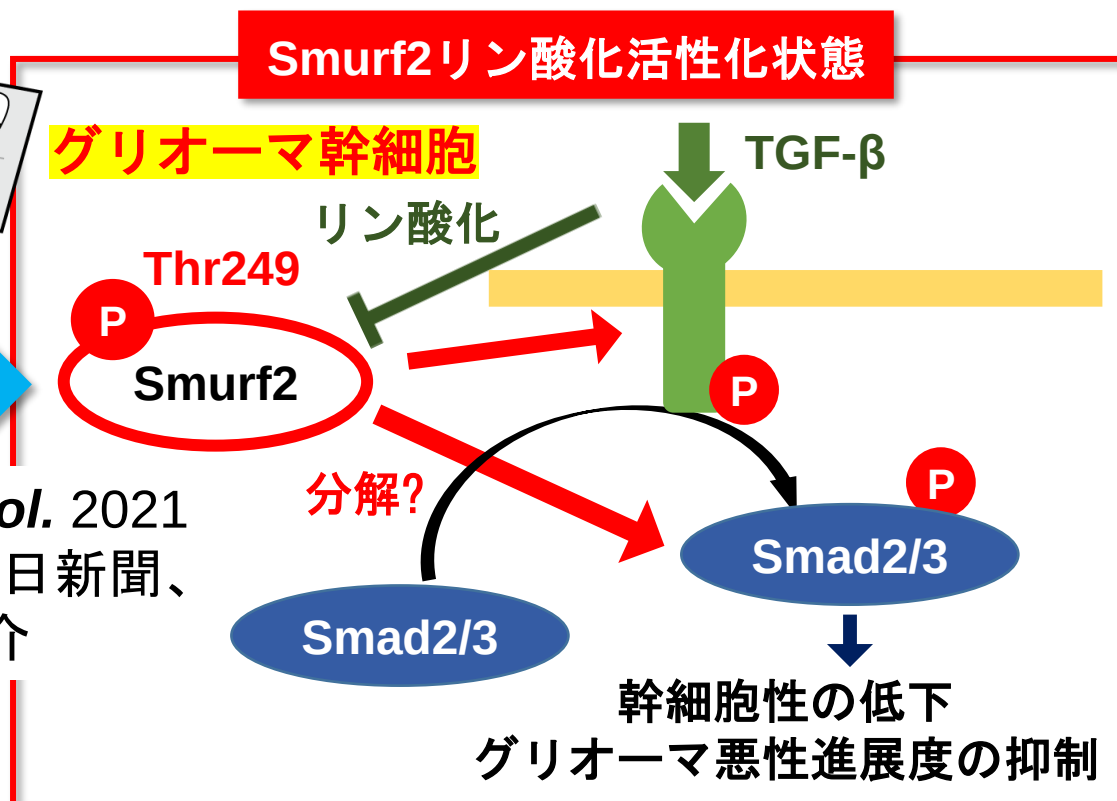
Smurf2^{Thr249}のリン酸化修飾 =

- ① **グリオーマ幹細胞の幹細胞性維持**に関与
- ② **グリオーマの悪性進展度**に関与
- ③ **ヒトグリオーマの悪性進展度と関連性**



創薬標的？

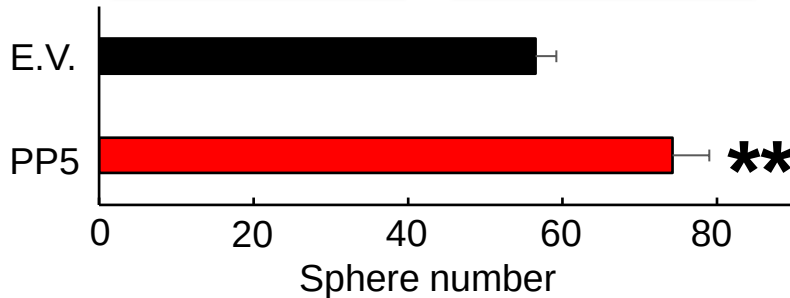
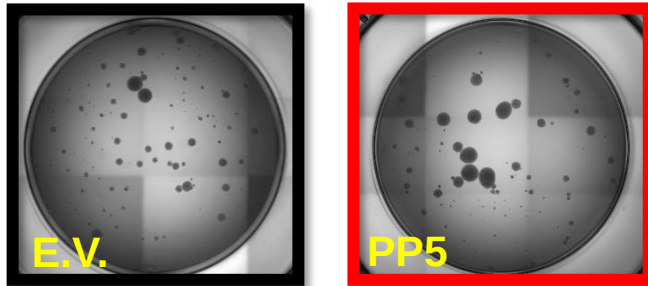
- Hiraiwa et al., *Commun. Biol.* 2021
- NHKニュース、朝日新聞、中日新聞、岐阜新聞などのメディアで紹介



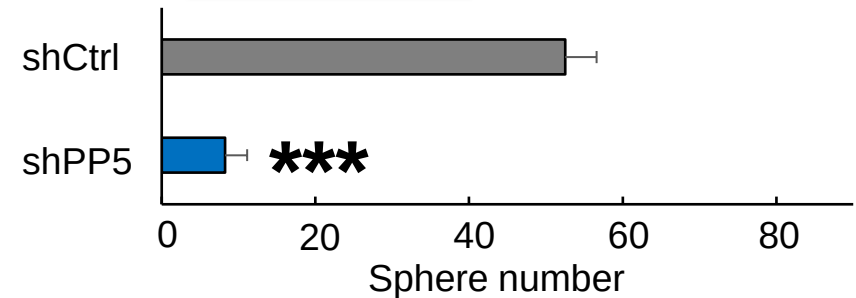
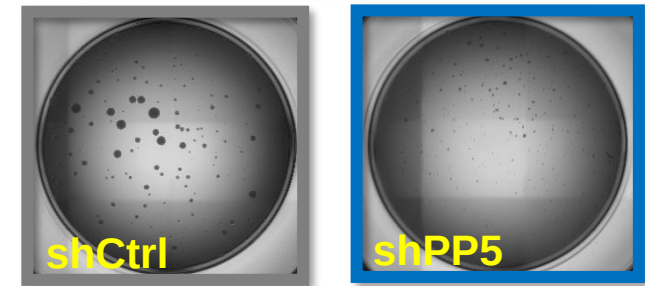
PP5はグリオーマの治療標的となり得る？

Sphere formation assay

PP5導入GIC

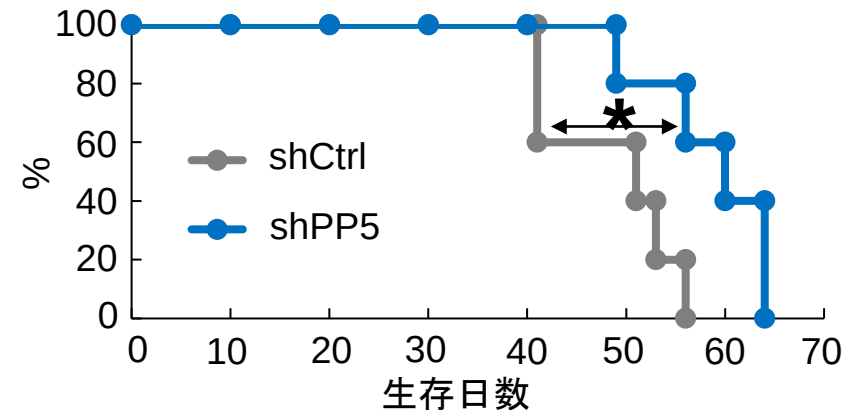
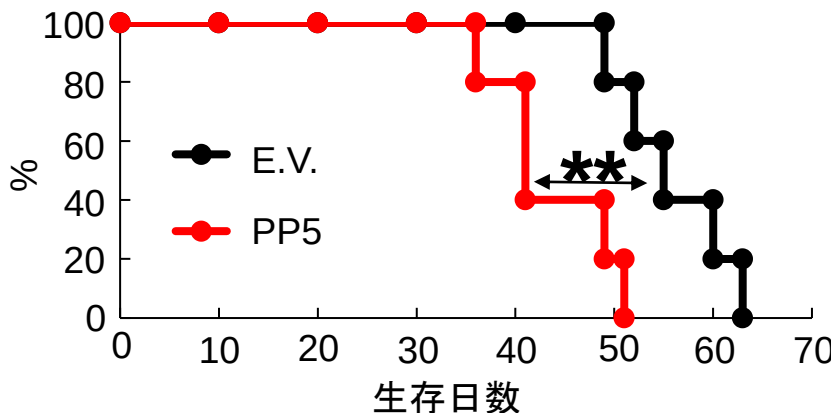


PP5ノックダウンGIC

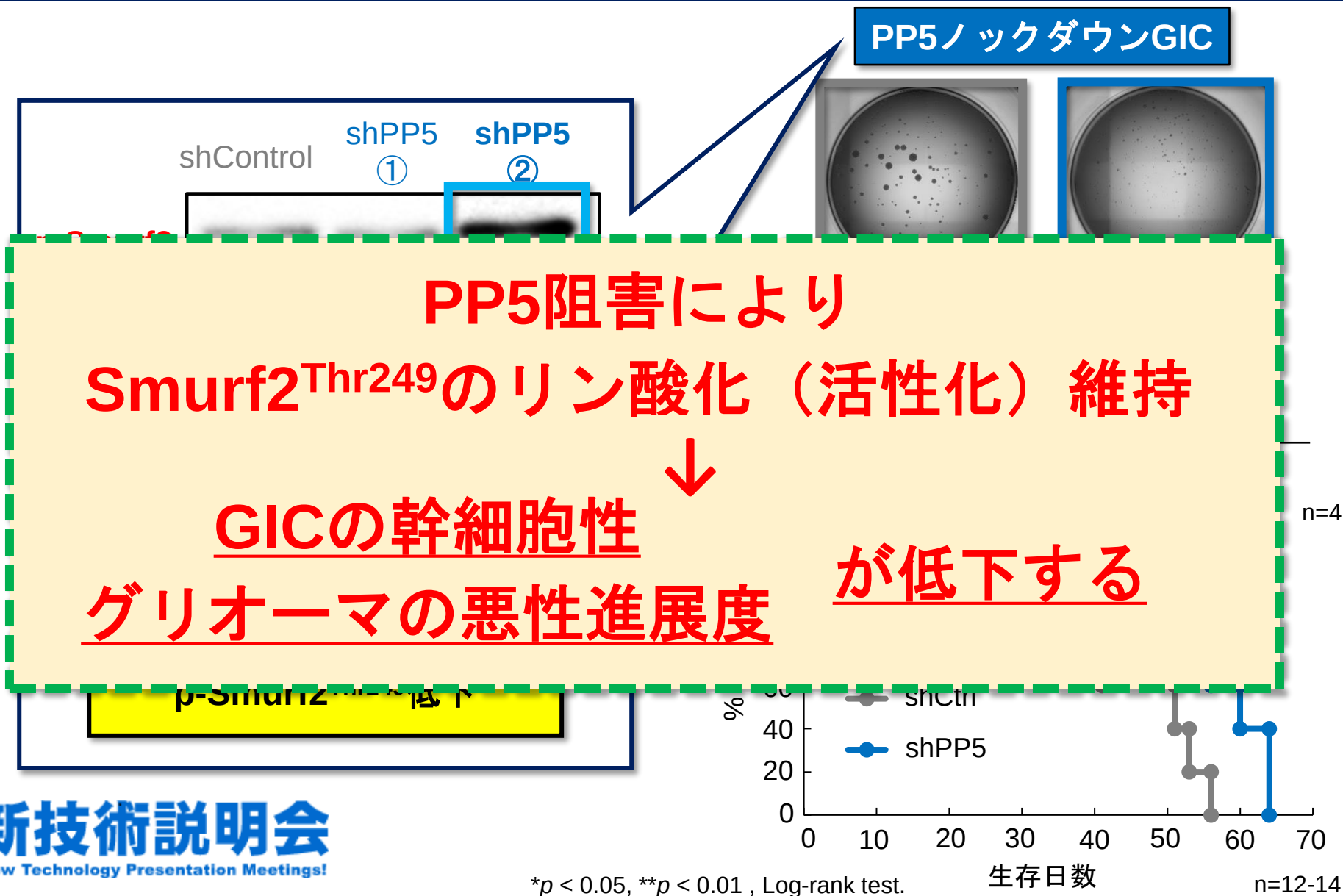


生存期間の観察

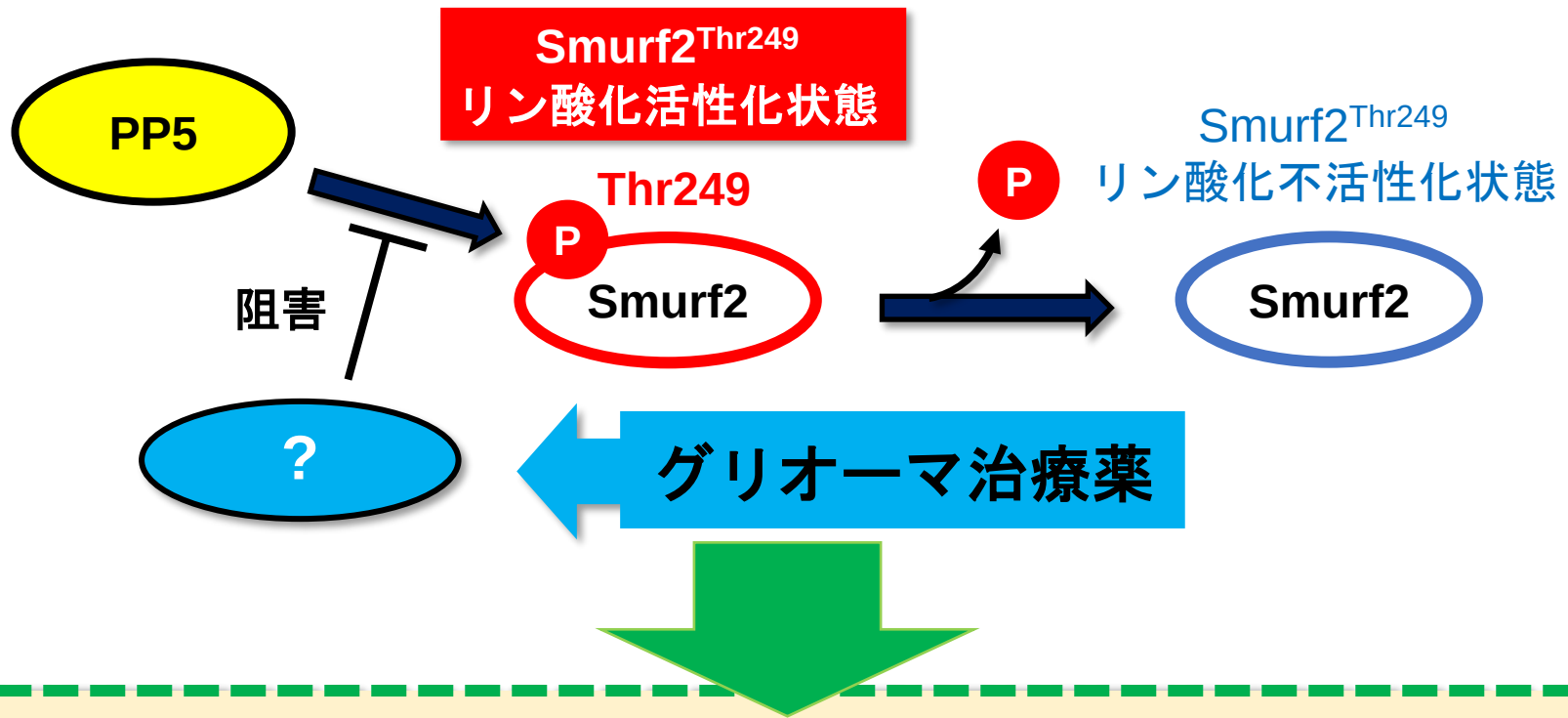
累積生存率



PP5はグリオーマの治療標的となり得る？



Smurf2活性化剤の探索



「Smurf2^{Thr249}の脱リン酸化を阻害する化合物
(=Smurf2活性化剤)」の探索

スクリーニングについて

1次

大規模スクリーニング

フォスファターゼ法による評価



2次

Smurf2^{Thr249}のリン酸化への影響

グリオーマ幹細胞での評価

Hit compound

(+)

(-)



3次

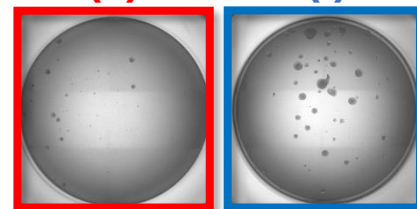
スフィア形成能への影響

グリオーマ幹細胞での評価

Hit compound

(+)

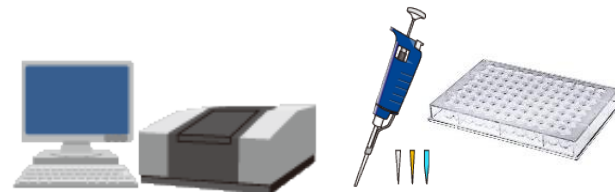
(-)



「Smurf2^{Thr249}の脱リン酸化を阻害する化合物の (=Smurf2活性化剤)」の探索

in vitroフォスファターゼアッセイ

- 基質としてp-Smurf2(Thr²⁴⁹) 周辺ペプチドを用いるので、**特異性が高い(+独自性)**
- 特別な試薬や抗体を必要としない(**安価な系**)
- 特別な機器も必要なし(**吸光度計があればOK**)
- 組換えPP5タンパク質の大量精製系を**確立済み**
- シンプルなアッセイ系
- 多検体を短時間(**1時間以内**)にスクリーニング可能



50 mM Tris-HCl (pH 7.4)
2 mM MgCl₂
50 µg/ml p-Smurf2(Thr²⁴⁹) ペプチド
(RTHLH{pTHR}PPDLPEGYC)
100~500 ng 組換えPP5

↓ 30分

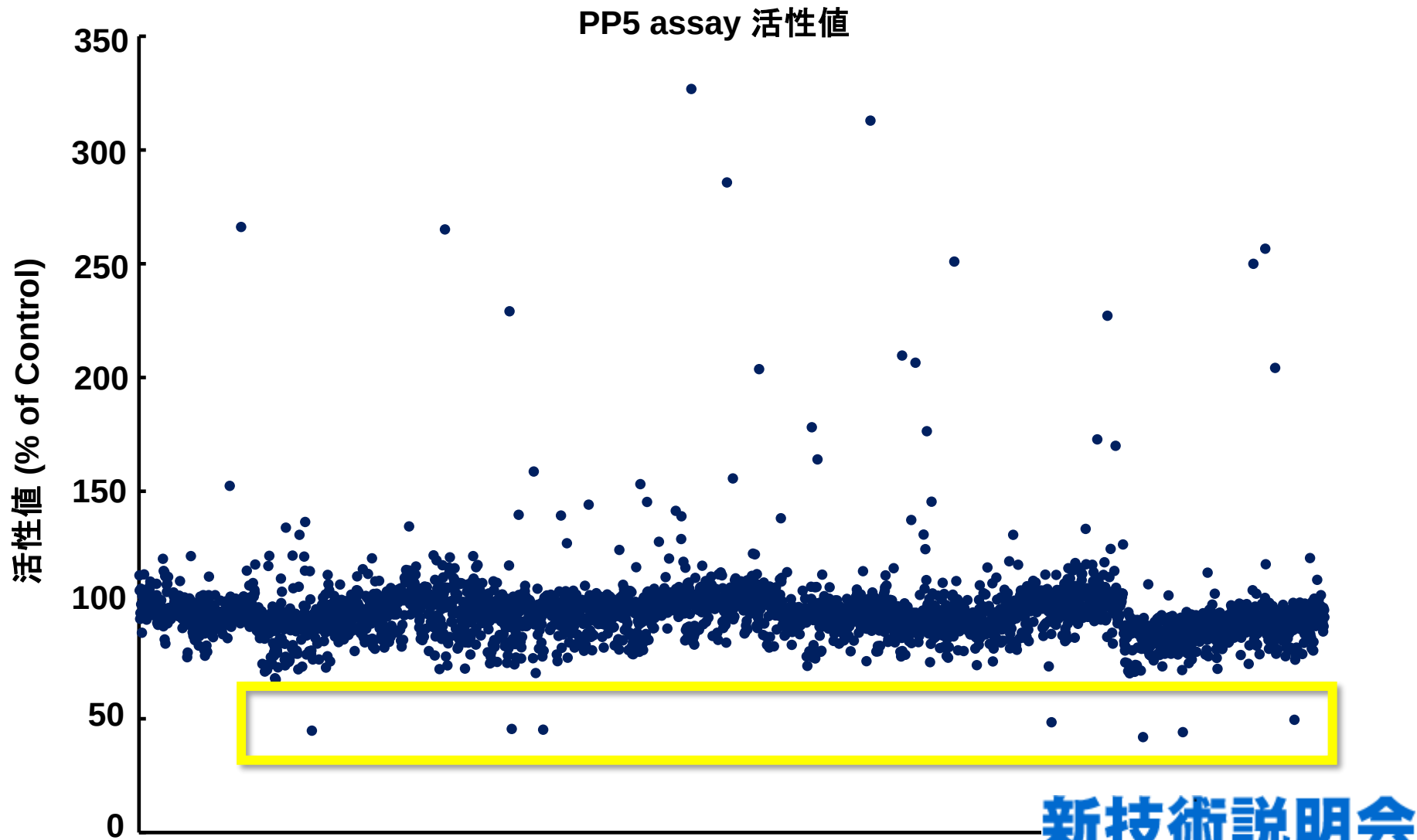
5% Na₂MoO₄
2mM Malachite green
2 M H₂SO₄
0.1 M L-Ascorbic acid

45分

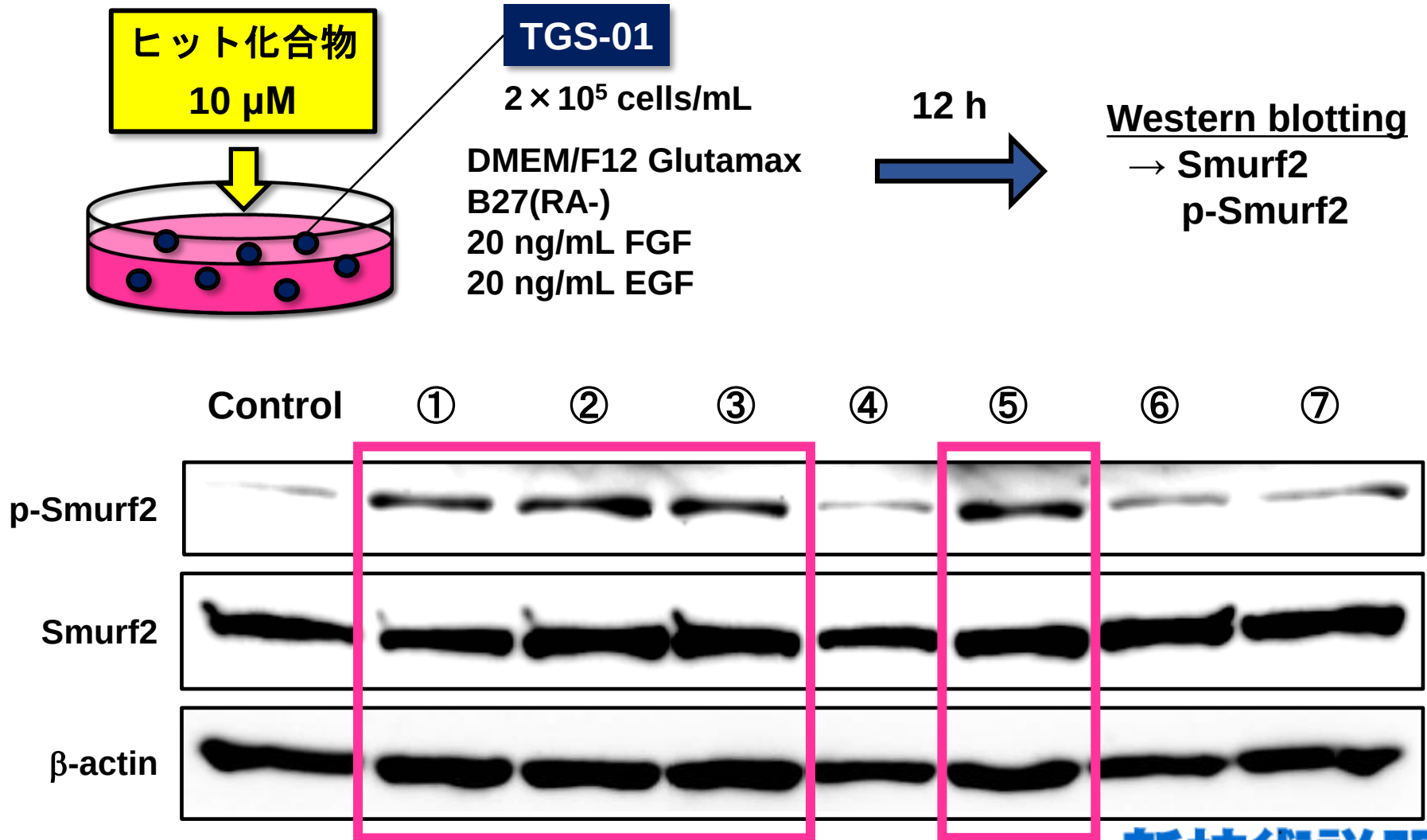
↓ 15分

吸光度測定 (O.D.600)

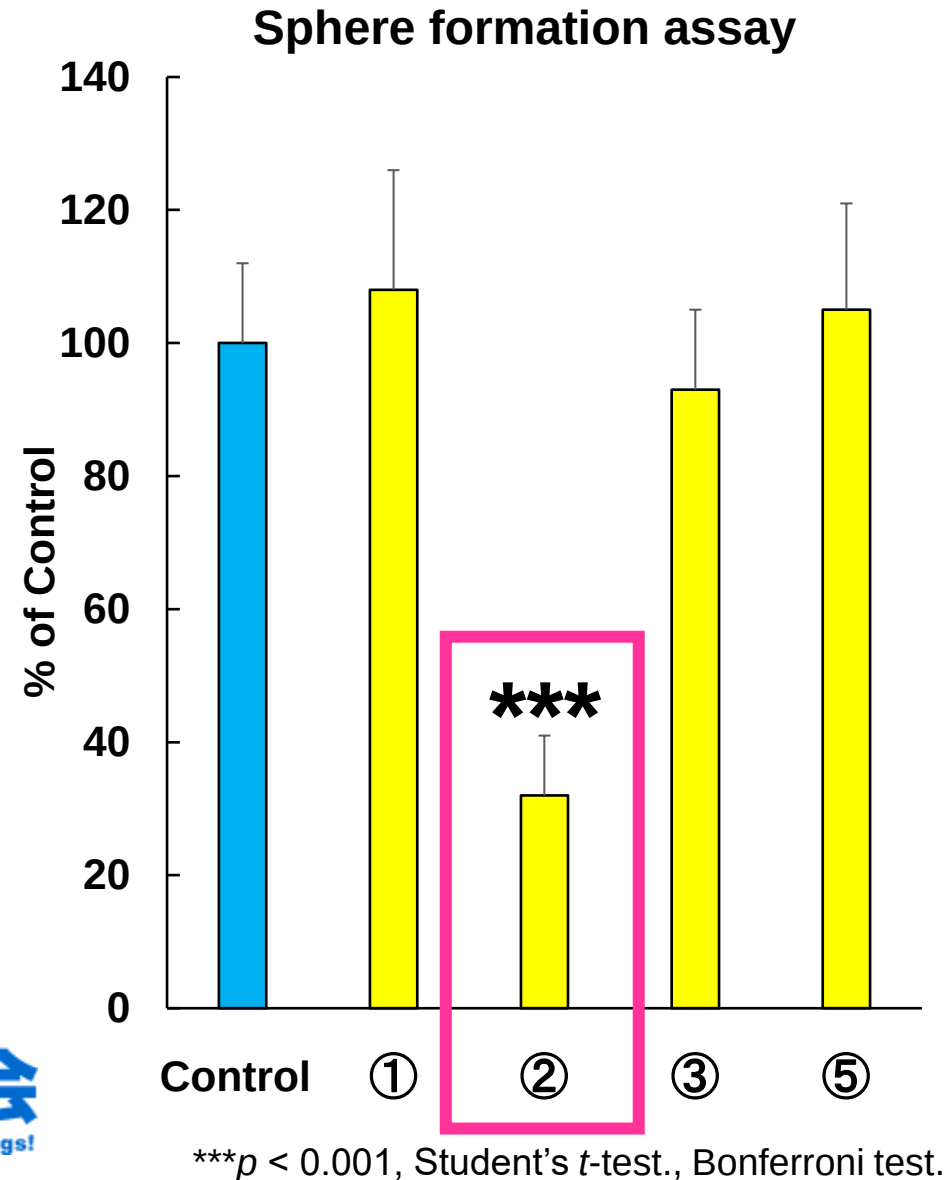
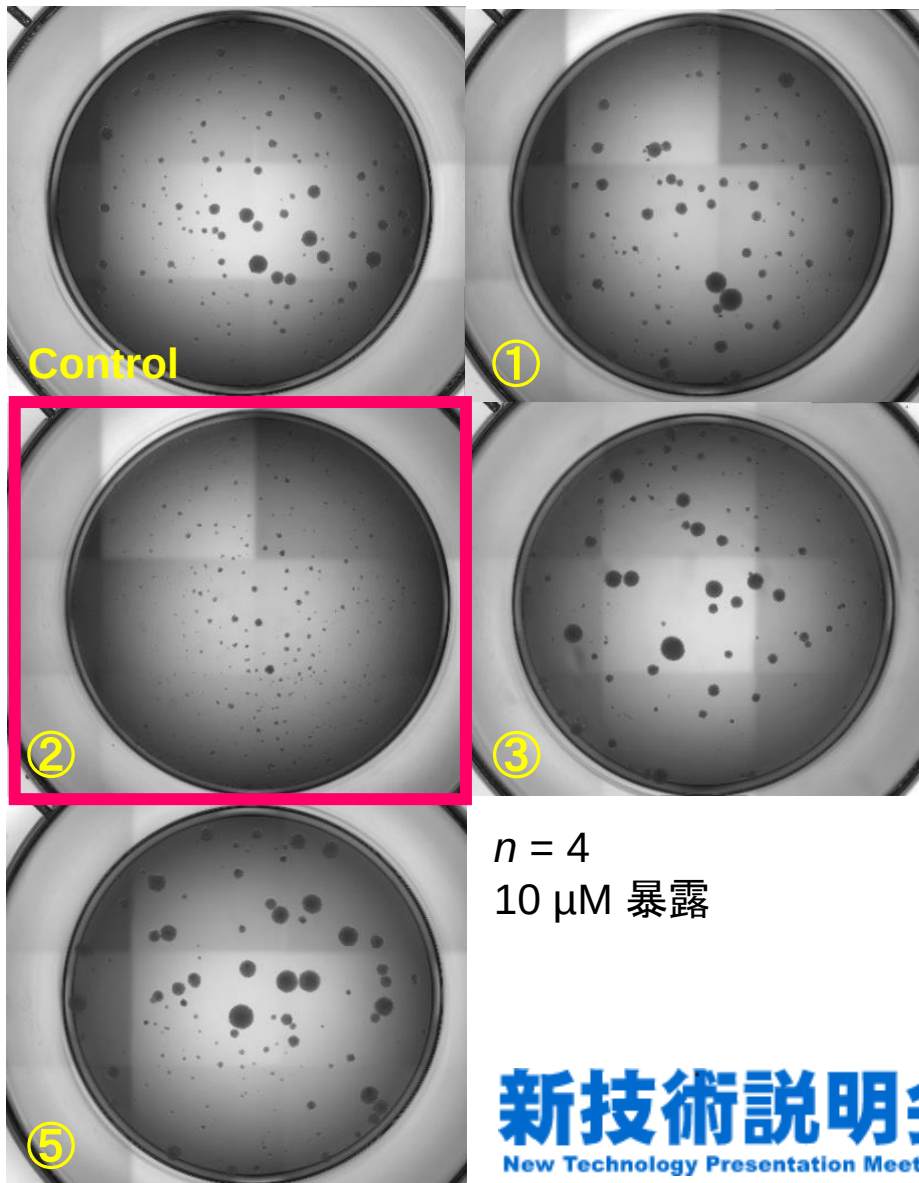
Validated Compound Library (3,300個) 1次スクリーニング結果



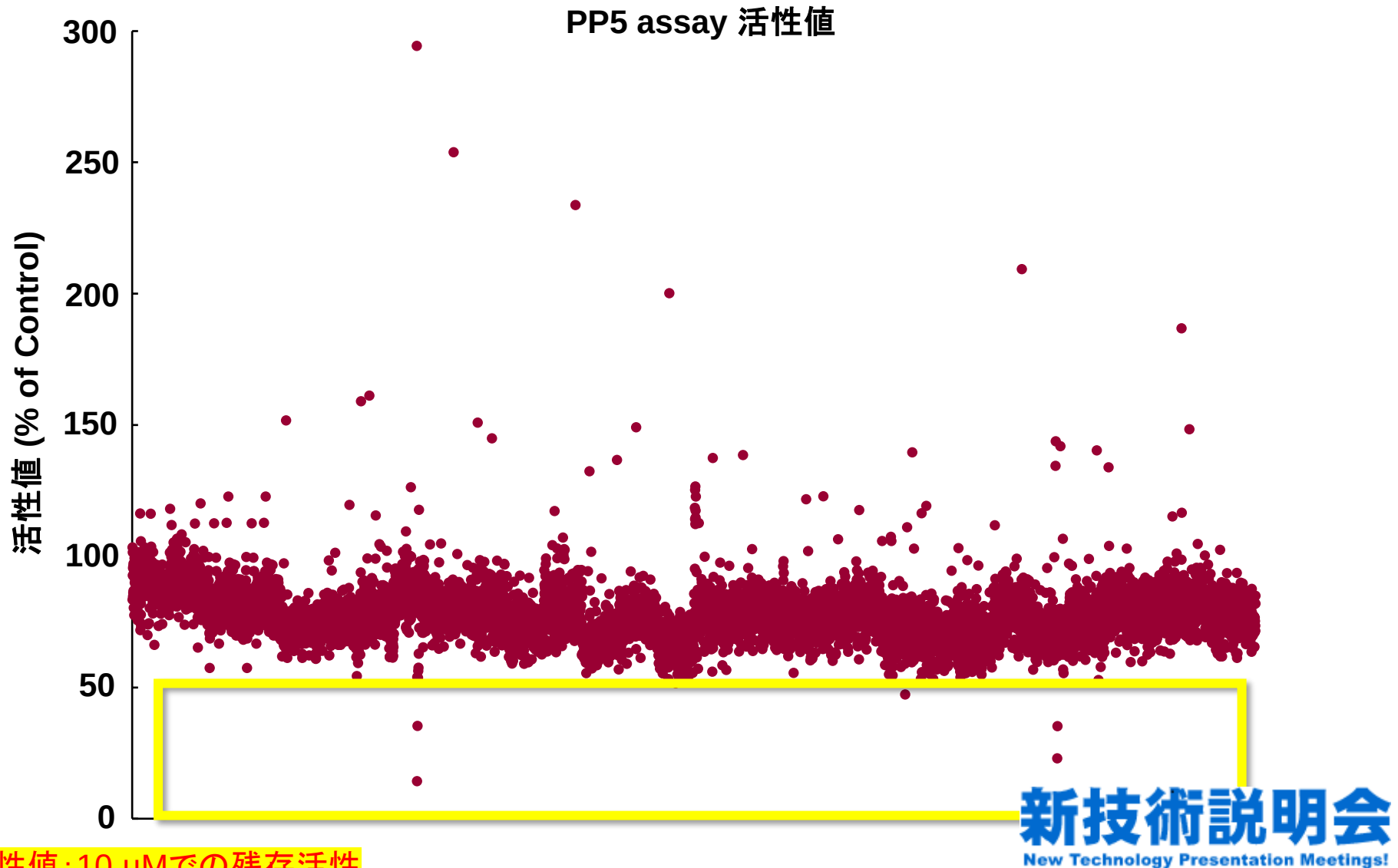
2次スクリーニング (Smurf2^{Thr249}リン酸化に対する効果)



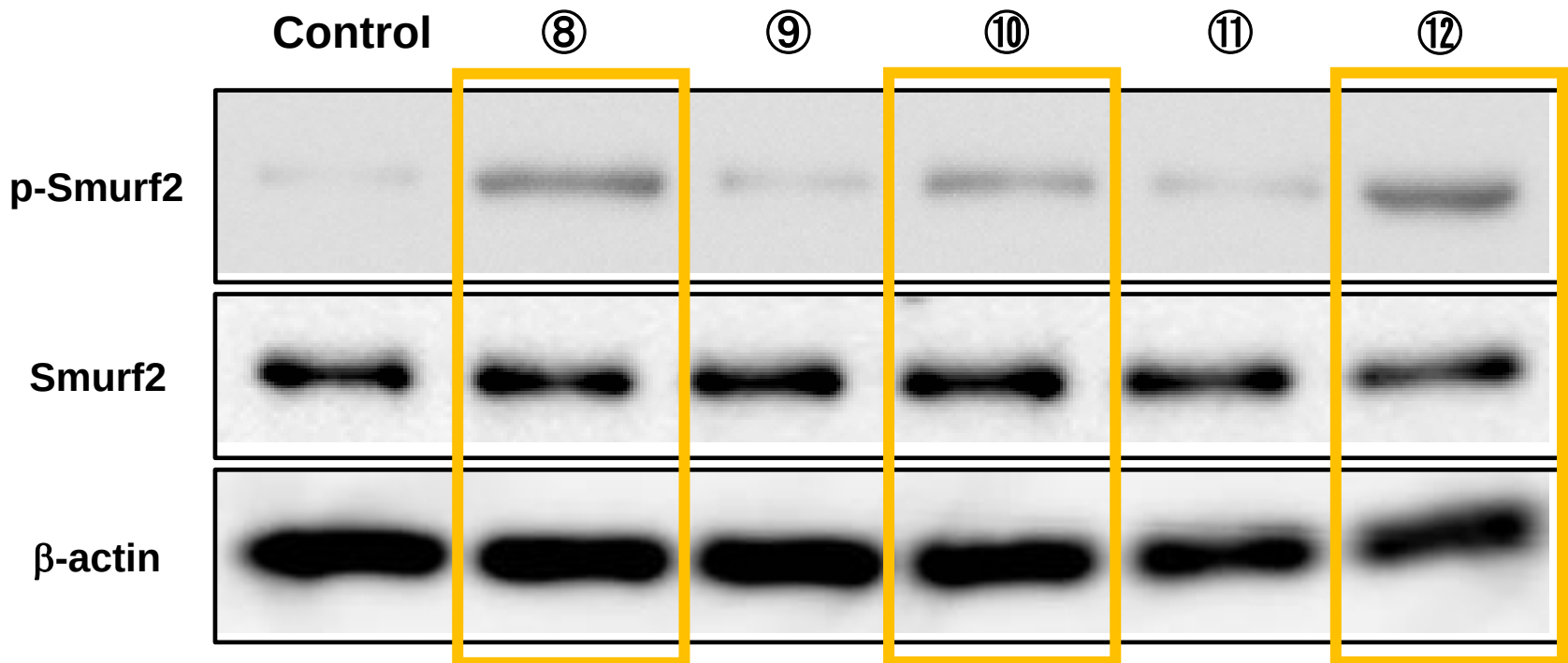
3次スクリーニング (スフィア形成能に対する効果)



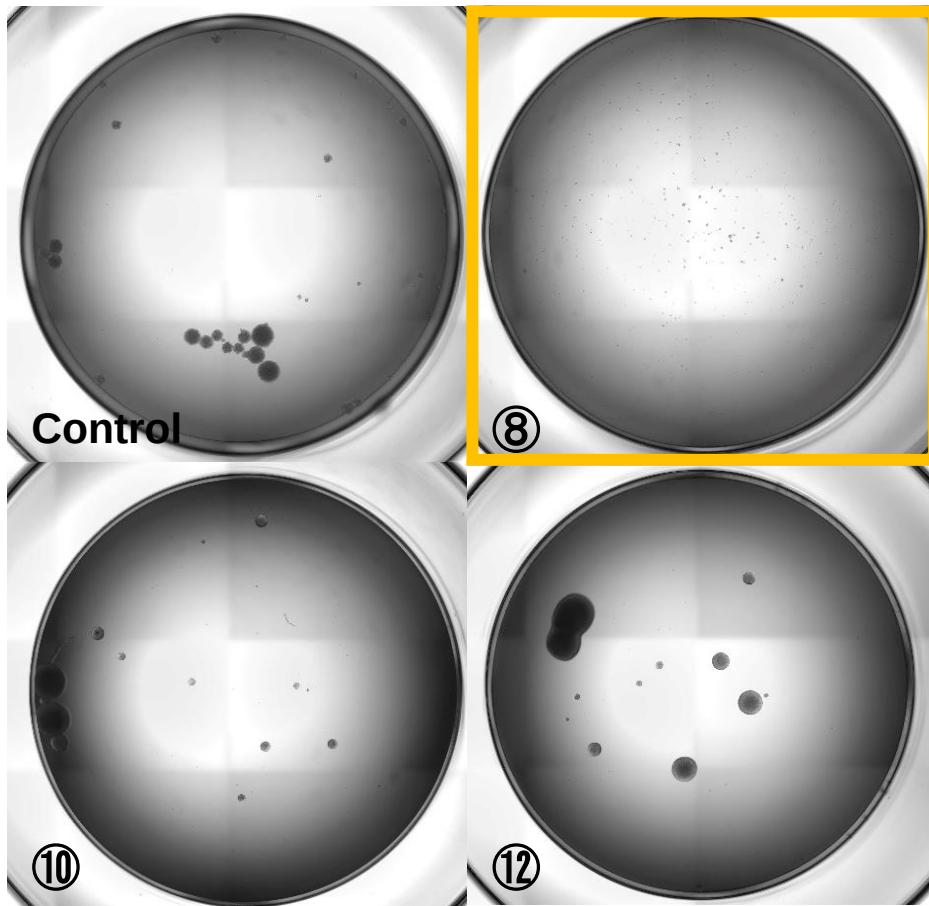
Core Library (9,600個) 1次スクリーニング結果



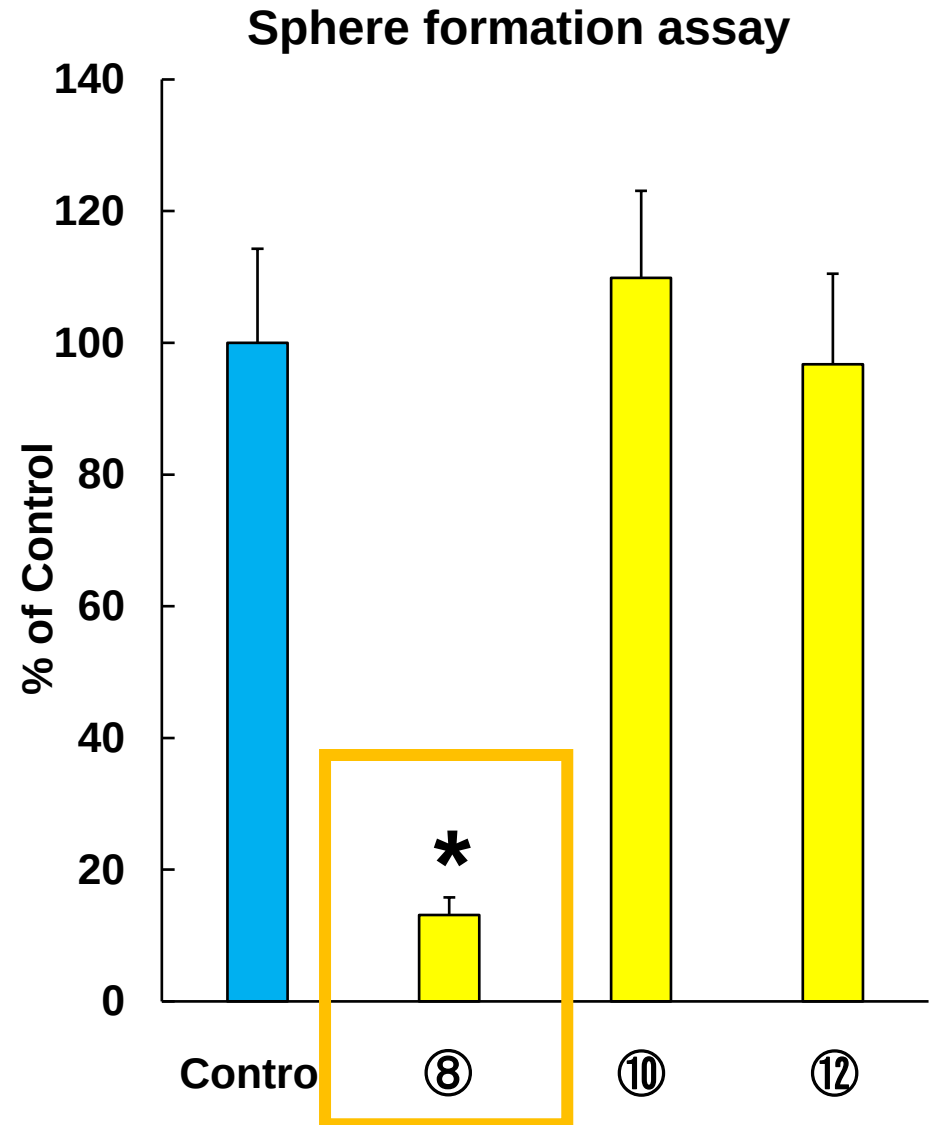
新技術説明会



3次スクリーニング (スフィア形成能に対する効果)



$n = 4$
10 μ M 暴露



* $p < 0.05$, Student's t -test., Bonferroni test.

現時点でのまとめ

Validated Compound Library

総数	1st screening (酵素評価) >50%阻害@10 μ M	2nd screening (リン酸化評価)	3rd screening (細胞評価)
3,300	> 7	> 4	> 1

Core Library

総数	1st screening (酵素評価) >50%阻害@10 μ M	2nd screening (リン酸化評価)	3rd screening (細胞評価)
9,600	> 5	> 3	> 1

新技術の科学的・技術的優位性

創薬標的及び作用機序の新規性、独創性

創薬標的は我々が世界に先駆けて見出した Smurf2 の新規リン酸化修飾 (Smurf2^{Thr249}) であり、新規性および独自性は極めて高い。

スクリーニングで見出されたヒット化合物群の新規性

複数のケモタイプがヒット化合物として見出されたが、これまでに PP5 阻害および Smurf2 脱リン酸化阻害としても知られていない。

アンメットニーズの充足度や既存薬に対する優位性

Smurf2^{Thr249} のリン酸化状態を高く維持することにより、著明なグリオーマ進展抑制が観察されたことから、GIC の Smurf2 の翻訳後修飾を標的とした薬剤はアンメットニーズの解消に貢献可能である。

化合物等の医薬品シーズとなる新物質

現在得られているヒット化合物群の Smurf2 リン酸化維持作用、GIC 阻害作用を把握することで 合成展開可能なシード・リード化合物を決定する。

新技術説明会

New Technology Presentation Meetings!

実用化に向けた検討項目・企業への期待

コンセプト

「**Smurf2^{Thr249}のリン酸化修飾**（研究標的）」がGBMの発症機序において中心的な役割を担い、そのリン酸化亢進がアンメットニーズを充足しうる治療効果をもたらすこと

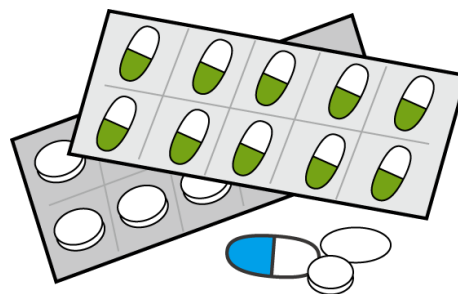
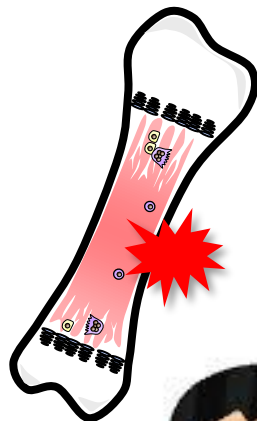
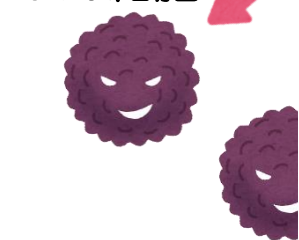
研究内容

- ① ヒット化合物群のGICに対する効果がPP5阻害およびSmurf2活性化の効果と一致するかを検討する（**=ヒット化合物群が真の阻害化合物であることを検証**）
- ② ヒット化合物群が合成展開（最適化、高活性化）できる骨格（ケモタイプ）であるかを検証する（**=構造活性相関の検証**）
- ③ ヒット化合物群に懸念点となる非特異的作用がないか（少ないか）を検証する（**=PP5特異性の検証**）
- ④ ヒット化合物群がin vivoモデル系で評価できる化合物であるかを検証する（**=ファーマコキネティクス解析**）

がん幹細胞を標的とした難治性がんに対する創薬 (想定される用途)

① 難治性がん（膠芽腫、白血病、骨肉腫など）
対象：ヒト・伴侶動物

がん細胞



(次代の)
女王バチ

③

既存の
抗がん剤

効か7



放射線治療



がん根治へ！

新技術説明会

New Technology Presentation Meetings!

問合せ先:

発表者:

岐阜薬科大学・薬学部・薬理学研究室 檜井栄一

TEL: 058-230-8123

E-mail: hinoi-e@gifu-pu.ac.jp

担当コーディネーター:

岐阜薬科大学・事務局庶務会計課 中尾真一郎

TEL: 058-230-8100

E-mail: syomuk@gifu-pu.ac.jp