

# プロテアソーム機能代償機構を標的とした 新規がん治療戦略の開発

岐阜薬科大学 薬学部

生命薬学大講座 生化学研究室

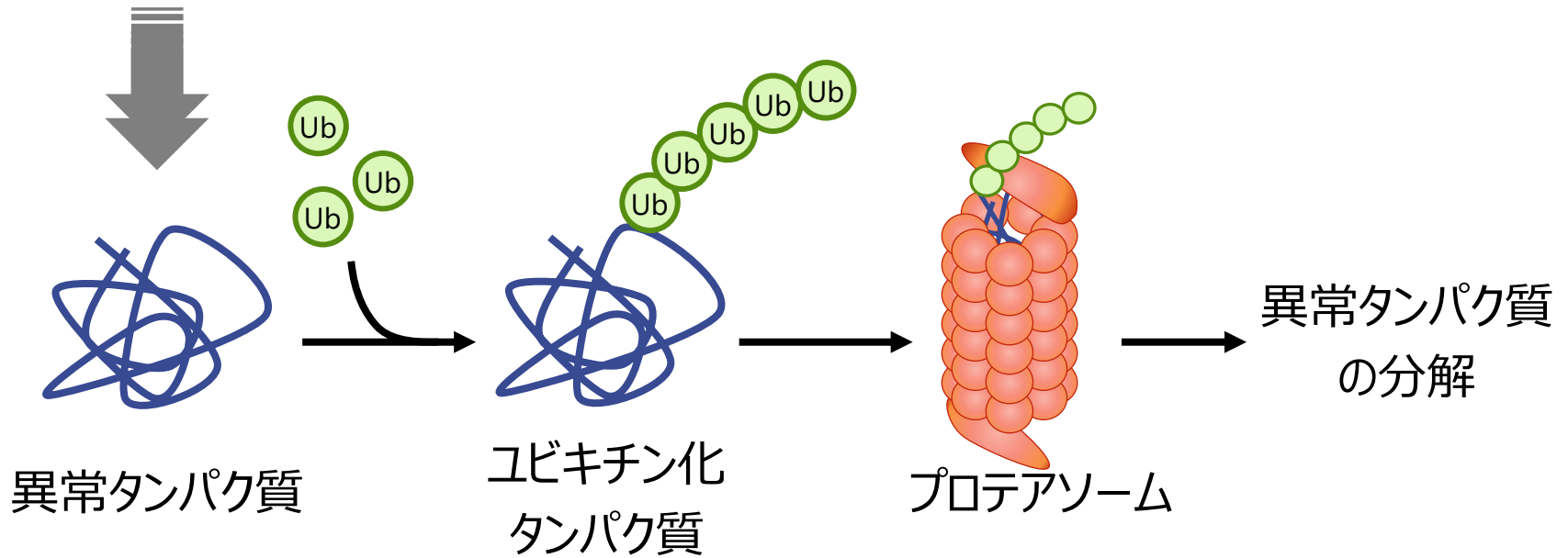
准教授 遠藤 智史

2023年10月24日

## がん細胞

- ◆ 過剰な細胞増殖
- ◆ 細胞死の抑制
- ◆ 栄養飢餓・低酸素

オートファジー/リソソーム系とならび  
タンパク質の恒常性維持に重要



細胞周期、DNA修復、細胞死制御、シグナル伝達、遺伝子発現、抗原提示、恒常性維持など多くの現象に関与する。

## 【特徴】

- プロテアソームのプロテアーゼ活性を阻害し、小胞体ストレス誘導や細胞周期停止によって抗腫瘍効果を発揮する。
- 固形がんでの臨床応用は進んでいない。
- 血液がんの治療において、耐性症例および不応例が顕在化しており、米国で行われた第II/III相試験 (SUM-MIT試験, VISTA試験など) において、無増悪生存期間は概ね半年から10ヶ月ほどであった。[Jagannath et al., Br J Haematol. 2004;127:165-72.]  
→このことは多くの症例が1年以内に耐性を獲得することを意味する。

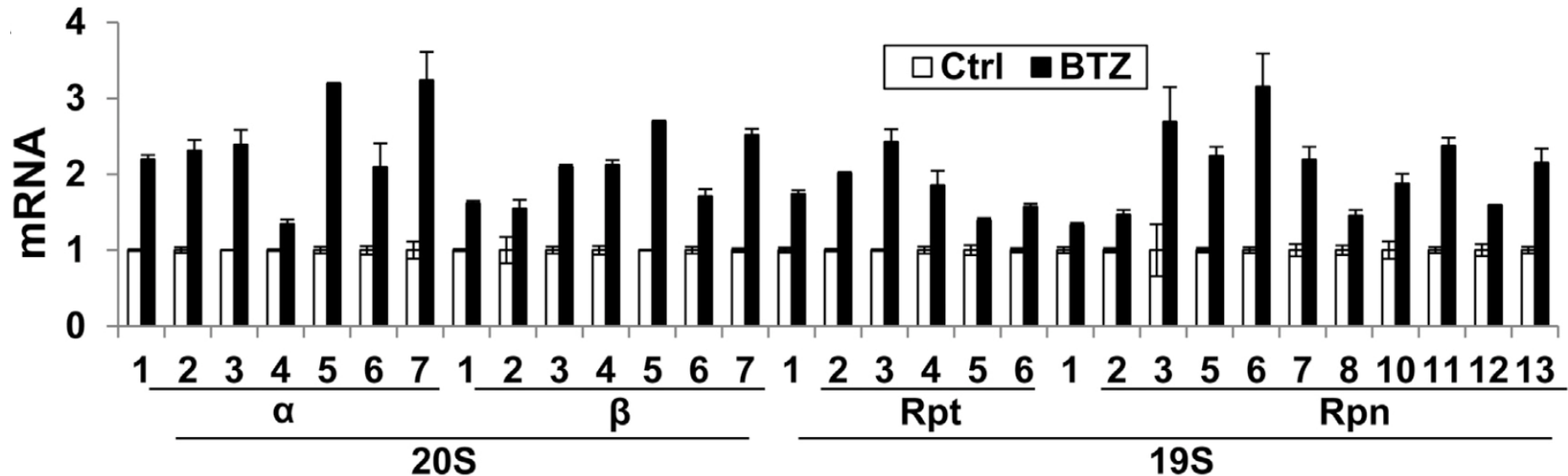
| 一般名              | 商品名    | 適用   | 販売年  | メーカー       | 売上                |
|------------------|--------|--|------|------------|-------------------|
| Bortezomib (BTZ) | ベルケイド  | 多発性骨髄腫<br>マンテル細胞リンパ腫<br>原発性マクログロブリン血症及び<br>リンパ形質細胞リンパ腫 | 2006 | ヤンセン/武田薬品  | 約500億円<br>(2020年) |
| Carfilzomib      | カイプロリス | 再発又は難治性の多発性骨髄腫   | 2016 | アムジェン/小野薬品 | 約300億円<br>(2020年) |
| Ixazomib         | ニンラーロ  | 再発又は難治性の多発性骨髄腫   | 2017 | 武田薬品       | 約900億円<br>(2020年) |

## 【プロテアソーム阻害剤の課題】

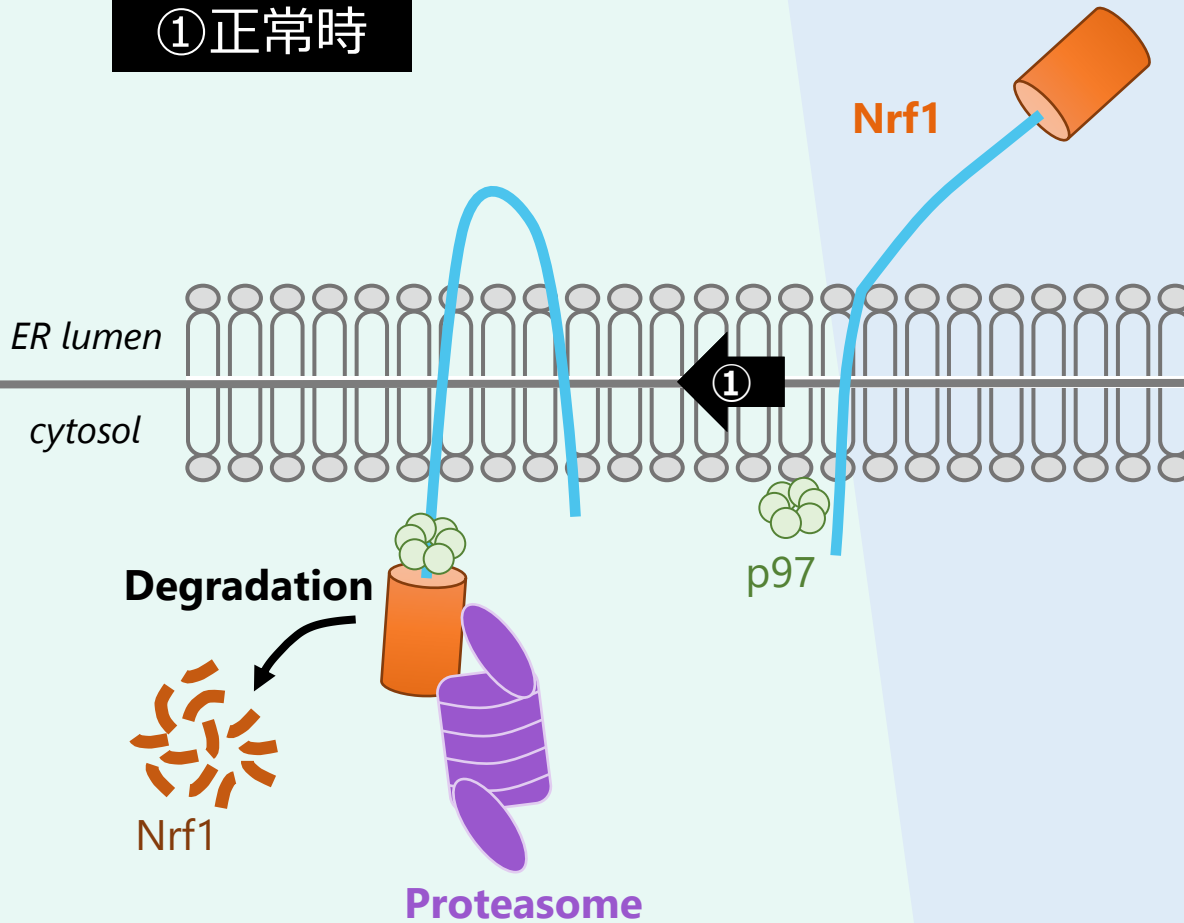
1. 固形がんへの適用拡大
2. 耐性化の抑制

➡ プロテアソーム構成因子の  
代償的合成促進 (Bounce back) の関与

[Induction of proteasome subunits by bortezomib (BTZ)]



## ① 正常時

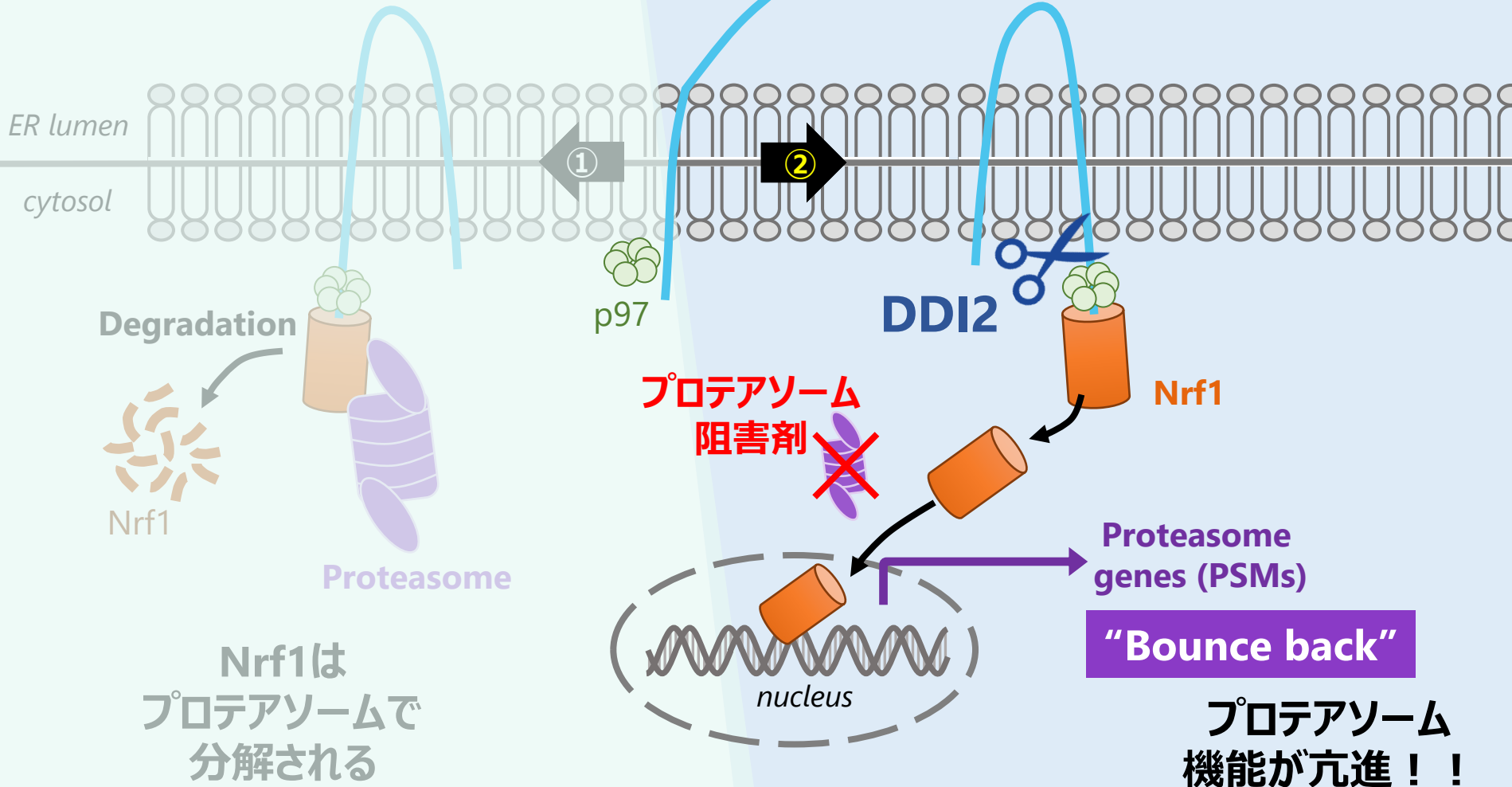


Nrf1は  
プロテアソームで  
分解される

# プロテアソーム阻害剤

① 正常時

② プロテアソーム  
活性低下時



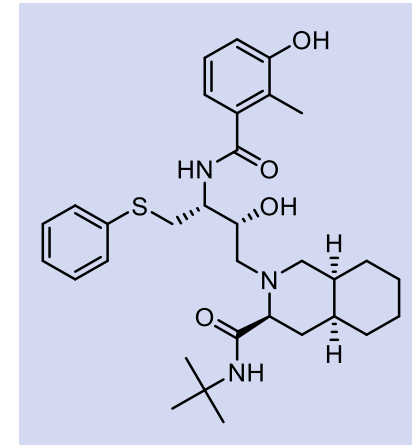
Nrf1は  
プロテアソームで  
分解される

**"Bounce back"**

**プロテアソーム  
機能が亢進！！**

## 【Nelfinavir (NFV)】

- ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の治療薬。
- 日本では1998-2017年に製造販売されていたが、現在では、HIV治療ガイドラインにおいて、積極的に変更を考慮すべき旧来の薬剤に位置付けられたことから、販売は中止されている。
- NFVとプロテアソーム阻害剤の併用の有効性が、多発性骨髄腫や、腎細胞がんにおいて細胞レベルで評価されてきた。



[Kraus et al., *Blood Cancer*, 2013, Kawabata et al., *Cell Death Dis*, 2012, Besse et al., *BJU Int*, 2018]

- **DDI2阻害活性**を有する。 [Gu et al., *Cell Signal*, 2020]

難治性固形がんの治療向上を目指し、  
プロテアソーム阻害剤とDDI2阻害剤併用  
の有効性を検証する



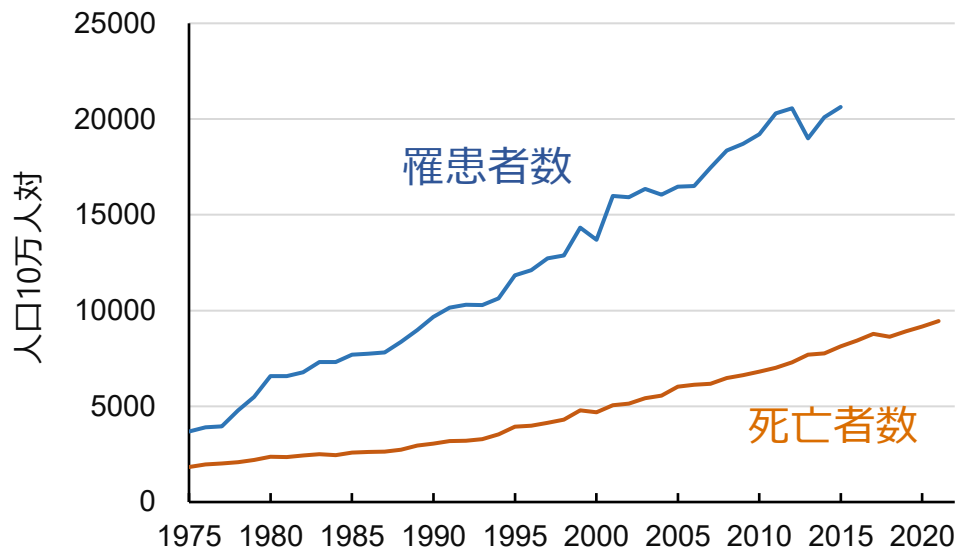
- 米国で5番目に患者数の多いがん。
- 日本でも患者数が増加。

## 化学療法は未だ選択肢が少ない

- ① 白金製剤療法  
(Gemcitabine/Cisplatin (GC))
- ② 免疫チェックポイント阻害薬療法  
(ペンブロリズマブ)



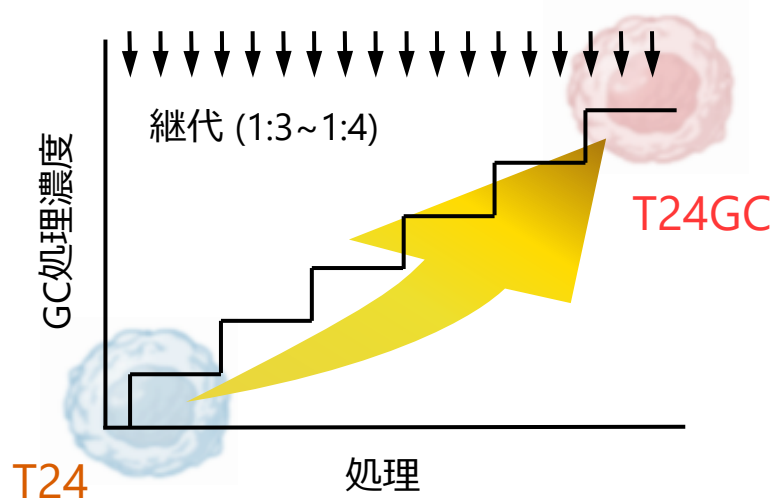
耐性化した場合の予後は  
極めて不良



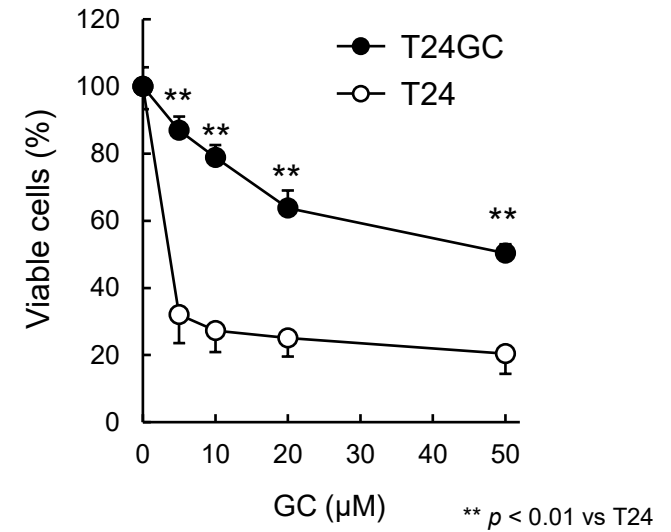
国立がん研究センターがん情報サービス「がん統計」  
(厚生労働省人口動態統計)

新規治療法の開発が  
求められている

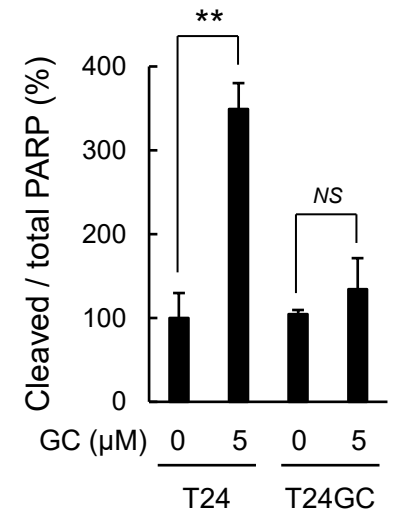
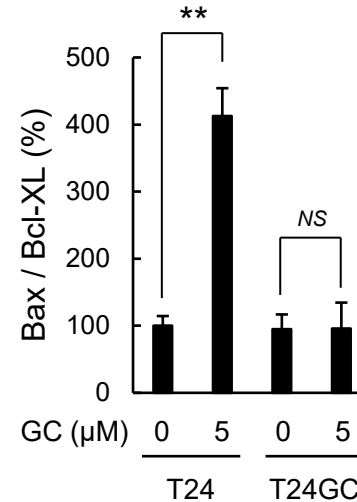
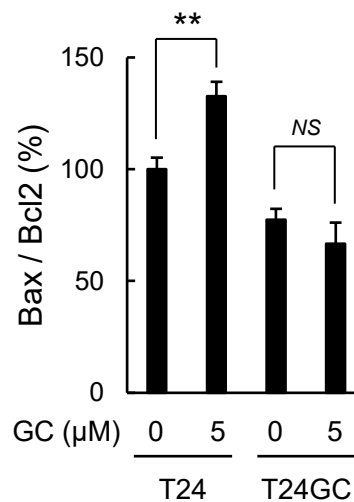
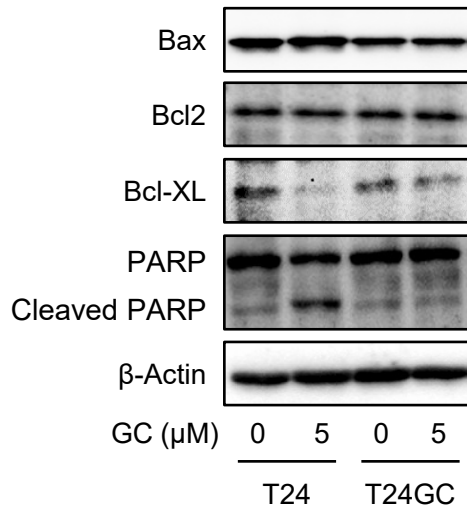
## 【耐性株の樹立】



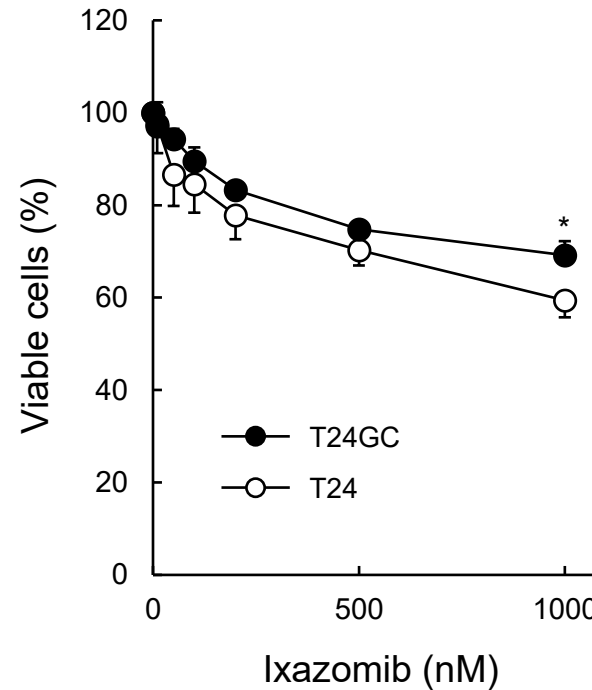
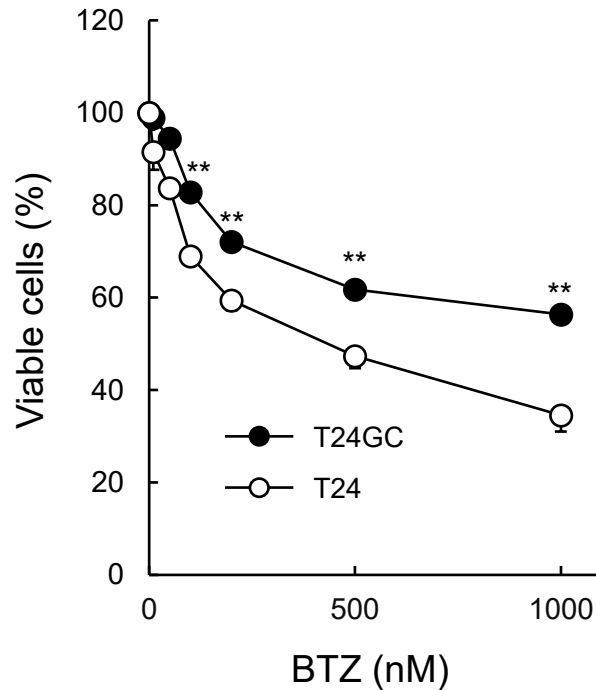
## 【GC感受性】



## 【アポトーシスシグナルへの影響】



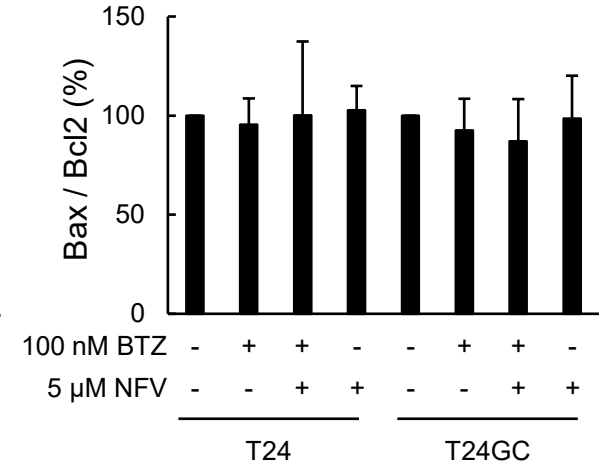
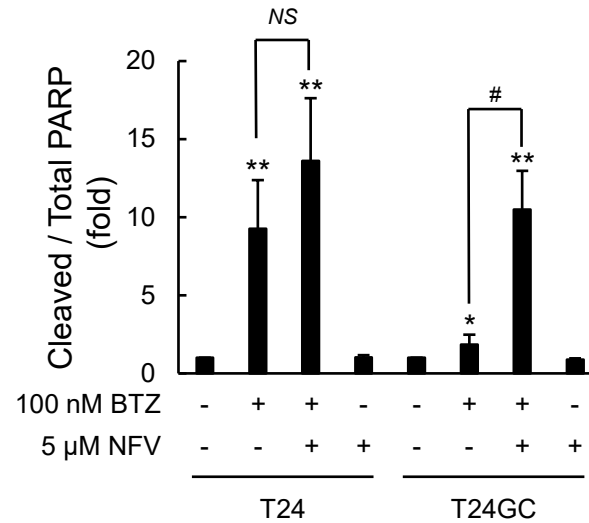
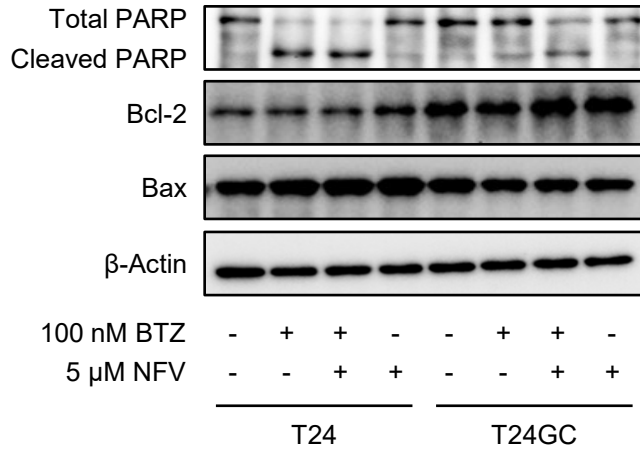
## 【プロテアソーム阻害剤感受性】



\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  vs T24

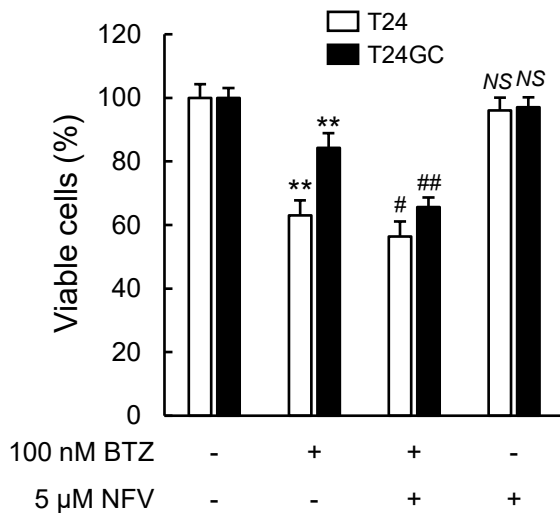
- T24GC細胞ではT24細胞と比べて、プロテアソーム阻害剤BTZとIxazomibに対する感受性が低下していた。  
⇒GC耐性化に伴い、プロテアソーム阻害剤に対する交叉耐性を獲得していることが示唆された。

## 【アポトーシスシグナルへの影響】



\*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$  vs Control, #  $p < 0.05$ , NS  $p > 0.05$  vs BTZ alone

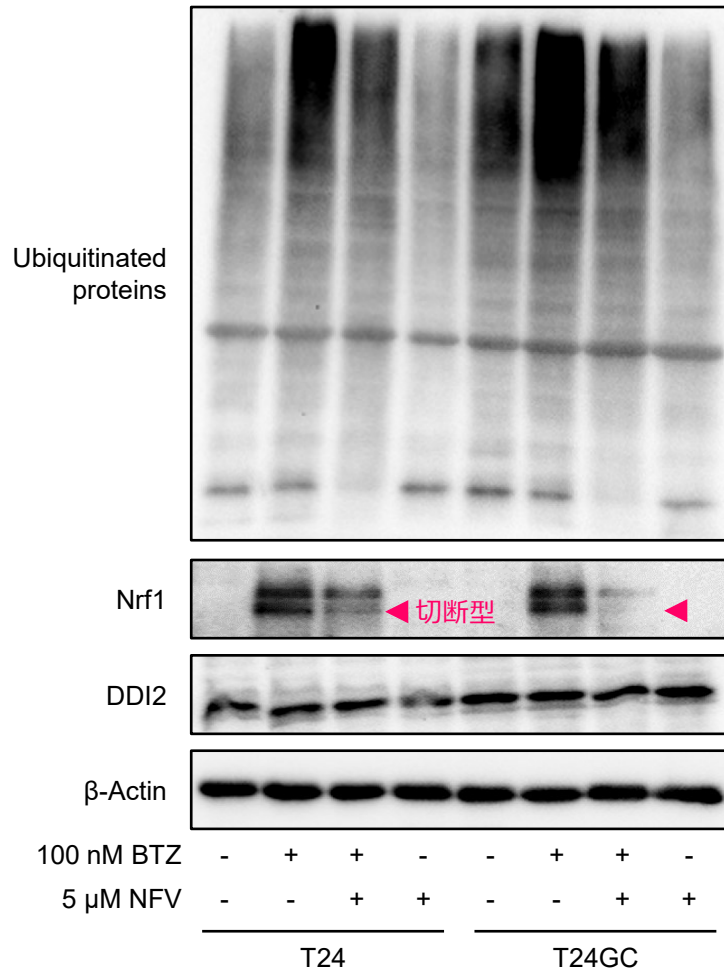
## 【BTZ感受性】



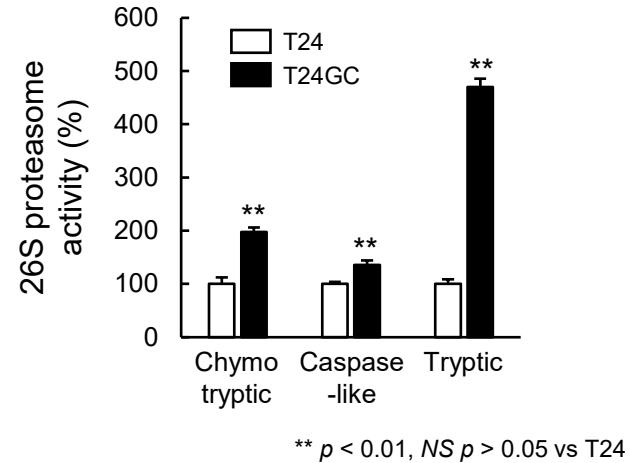
\*\*  $p < 0.01$ , NS  $p > 0.05$  vs Control, ##  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$  vs BTZ alone

- T24GC細胞で低下したBTZ感受性は、NFVの併用によって有意に回復した。  
⇒BTZ/NFV併用がGC耐性膀胱がんの治療に有効であることが示唆された。

## 【ユビキチン化タンパク質発現量】



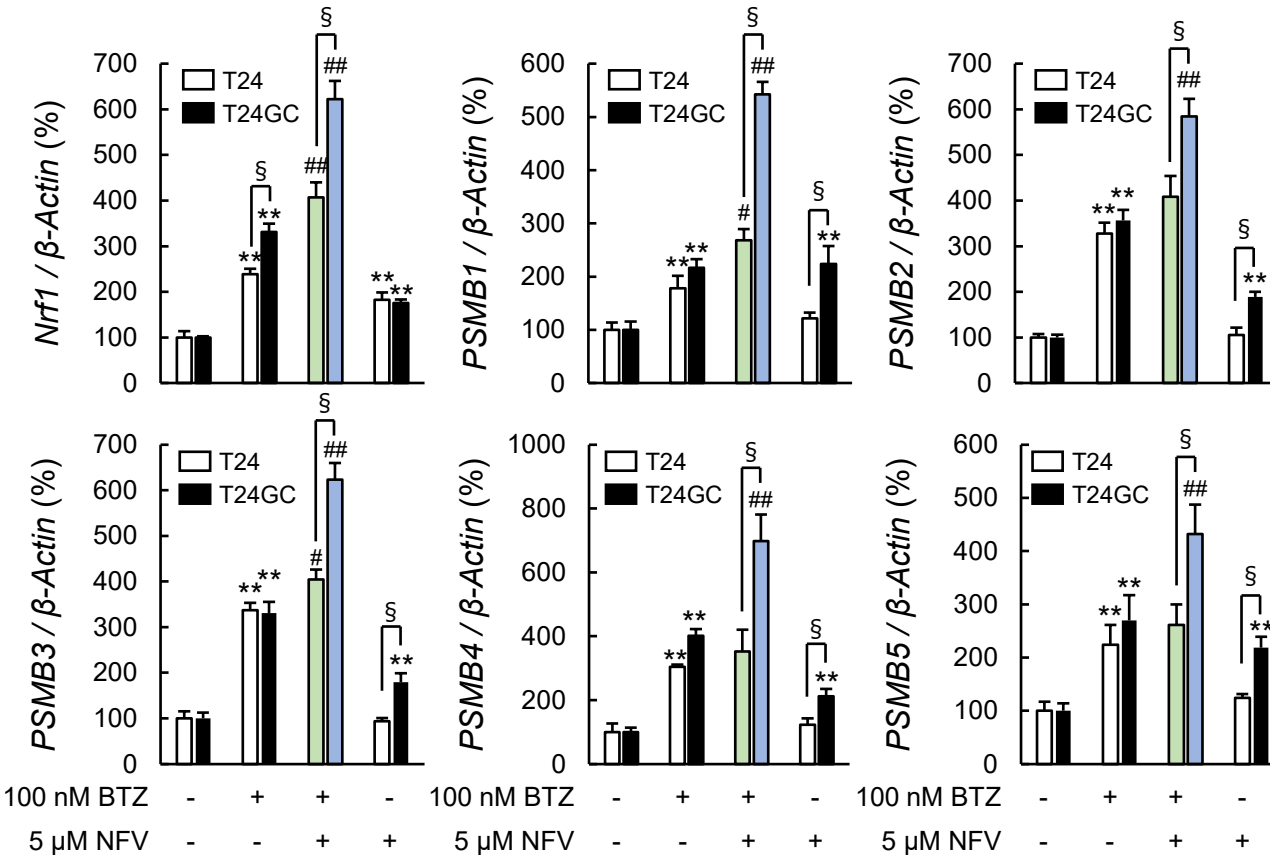
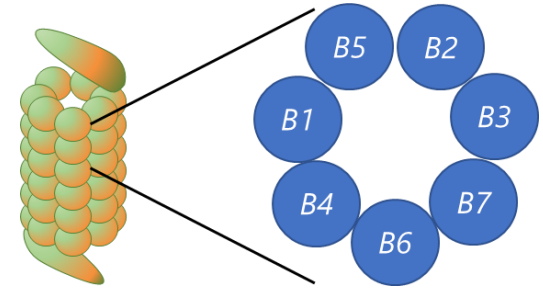
## 【プロテアソーム活性】



- Nrf1の切断型の量はNFVによって減少した。
- BTZによって増加したユビキチン化タンパク質量はNFV併用によって低下した。
- T24GC細胞ではT24細胞と比べて、プロテアソーム活性が上昇した。

⇒BTZ/NFV併用によってプロテアソーム活性の増強 (Bounce back) が誘導された可能性が考えられた。

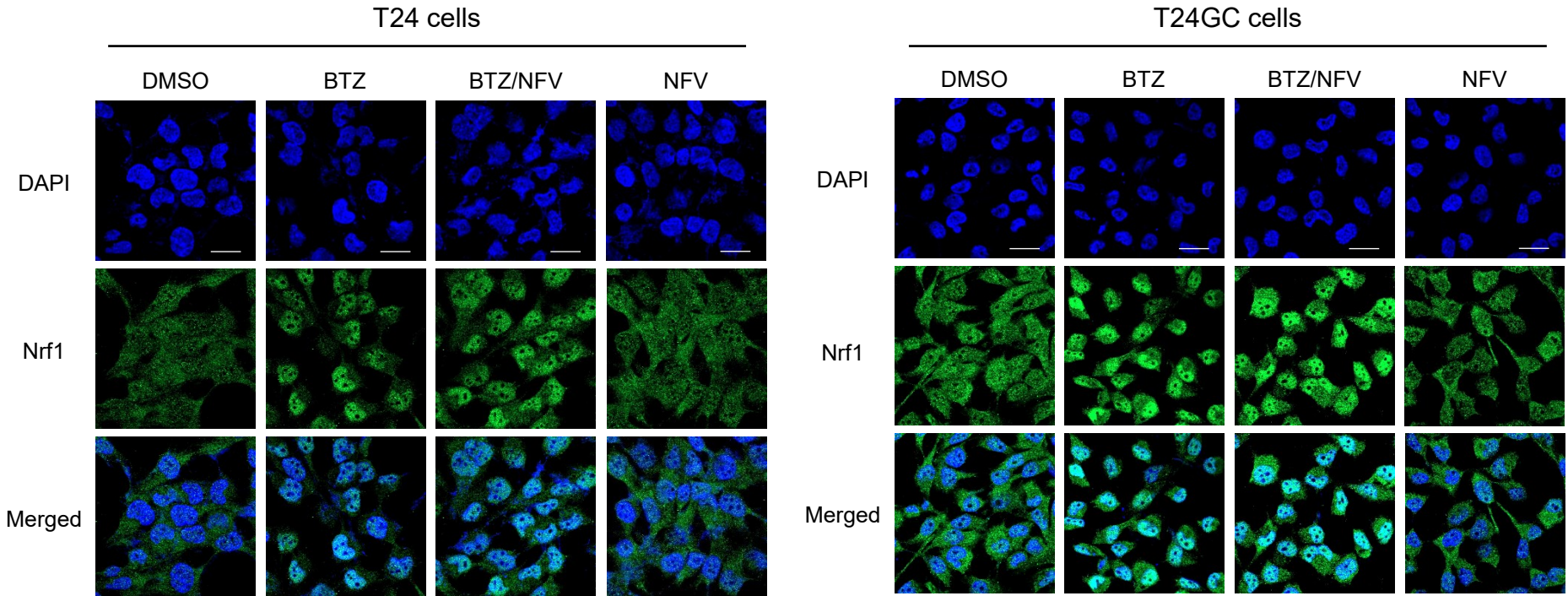
## 【BTZ/NFV併用時のプロテアソーム関連因子の発現変化】



- T24細胞、T24GC細胞ともにプロテアソーム構成因子 (PSMB1-5) とNrf1の発現はBTZ処理によって亢進した。
  - NFVの併用によって、T24GC細胞ではさらにPSMB1-5とNrf1の発現が誘導された。
- ⇒ T24GC細胞においてNFVがBTZによるBounce backを増強することが示唆された。

\*\* p < 0.01 vs Control # p < 0.05, ## p < 0.01 vs 100 nM BTZ § p < 0.05 vs T24

## 【Nrf1核内移行】



Scale bar : 20  $\mu$ m

- T24細胞において、BTZによって見られたNrf1の核内移行はNFV併用によって増強された。
- T24GC細胞では、T24細胞と比べて明らかにBTZ単独、BTZ/NFV併用時のNrf1の蛍光強度が高かった。

⇒BTZ/NFV併用時にT24GC細胞で見られた高いBounce back誘導は核内Nrf1量の増大に伴って起きると考えられた。



- 1 | GC耐性膀胱がん細胞の治療におけるプロテアソーム阻害剤とDDI2阻害剤NFVの併用の有効性が示唆された。
- 2 | DDI2阻害剤NFVはプロテアソーム阻害剤によるBounce backを亢進させた。

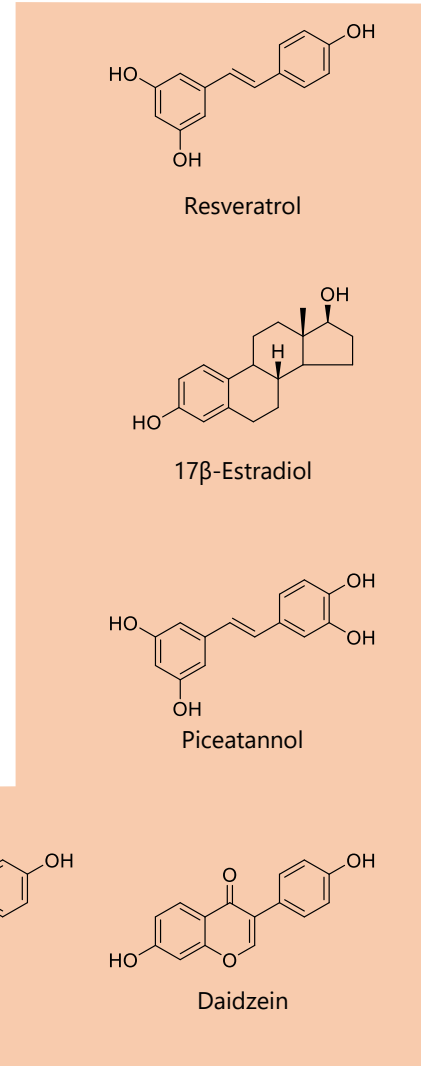
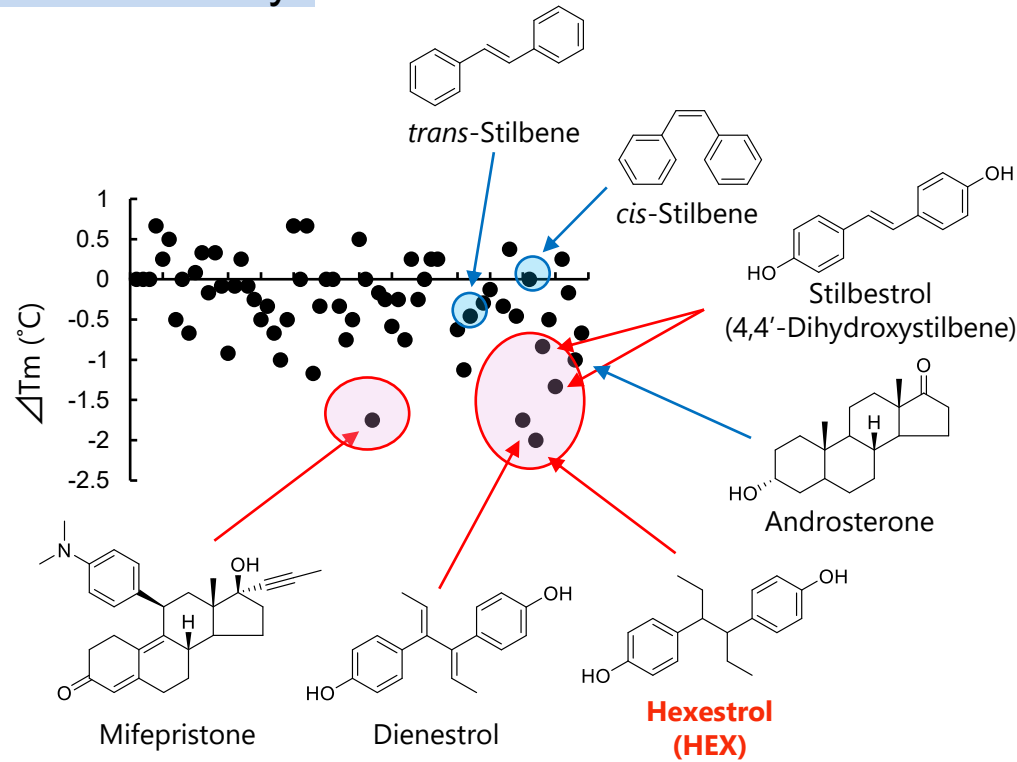


プロテアソーム阻害剤/DDI2阻害剤の併用療法の有効性が示唆された

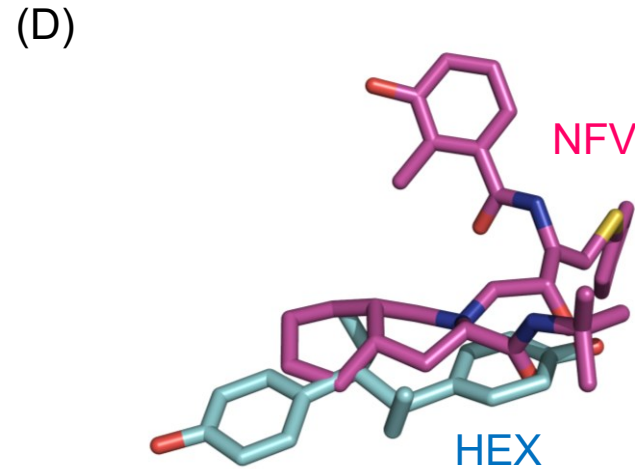
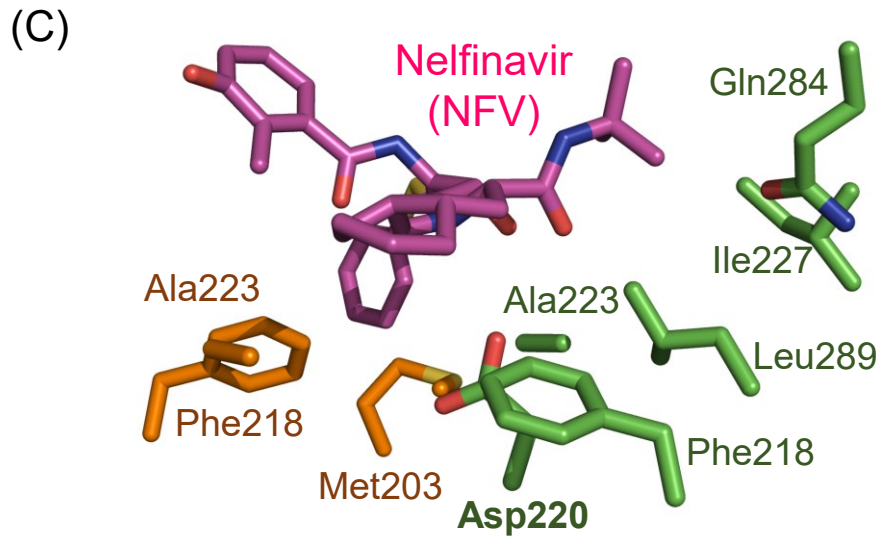
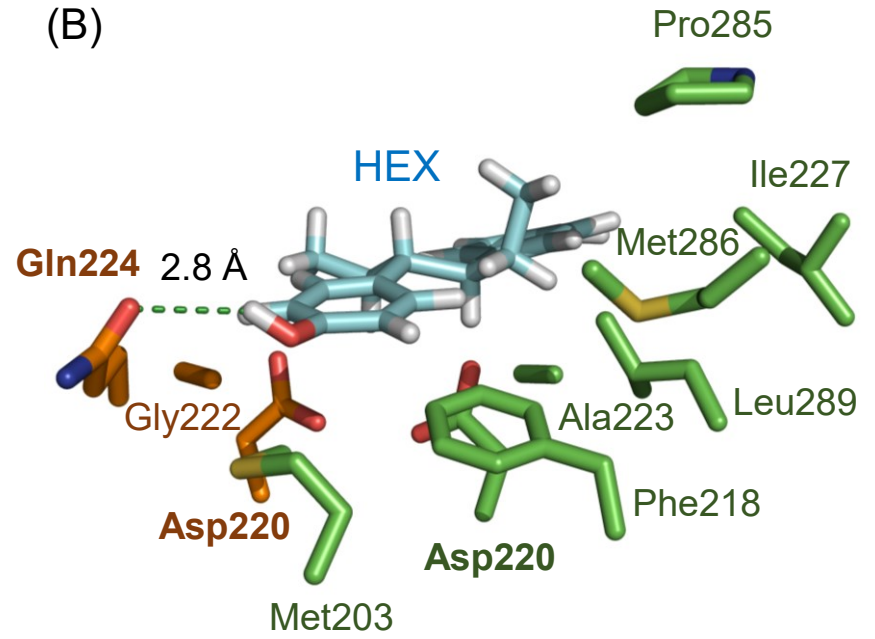
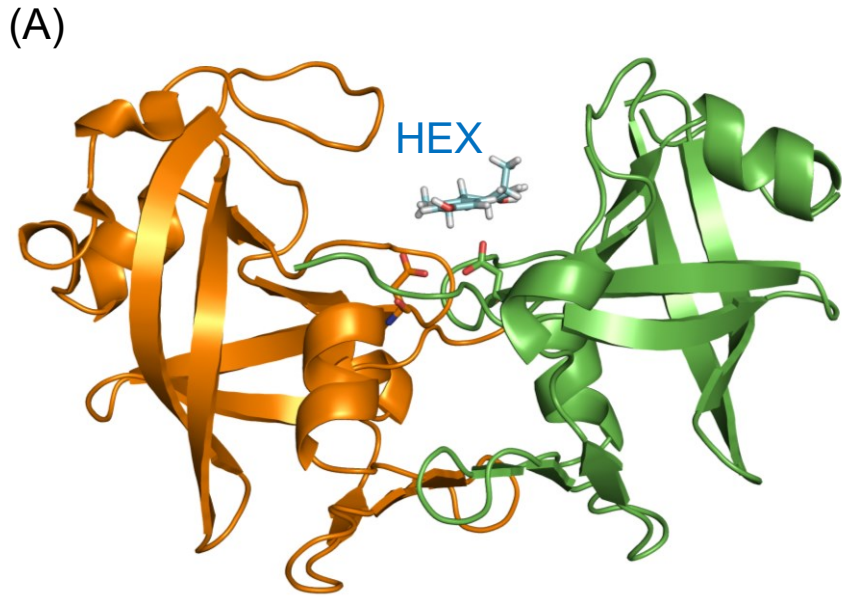
ただし、  
Bounce backを誘導しない新規DDI2阻害剤の開発が必要



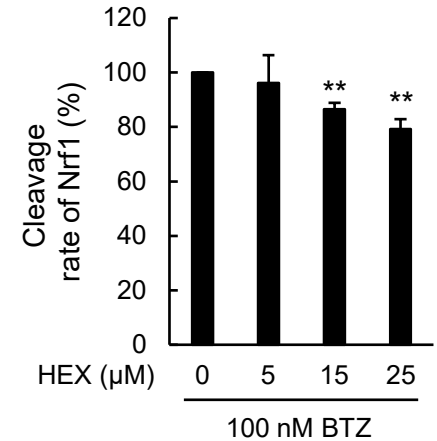
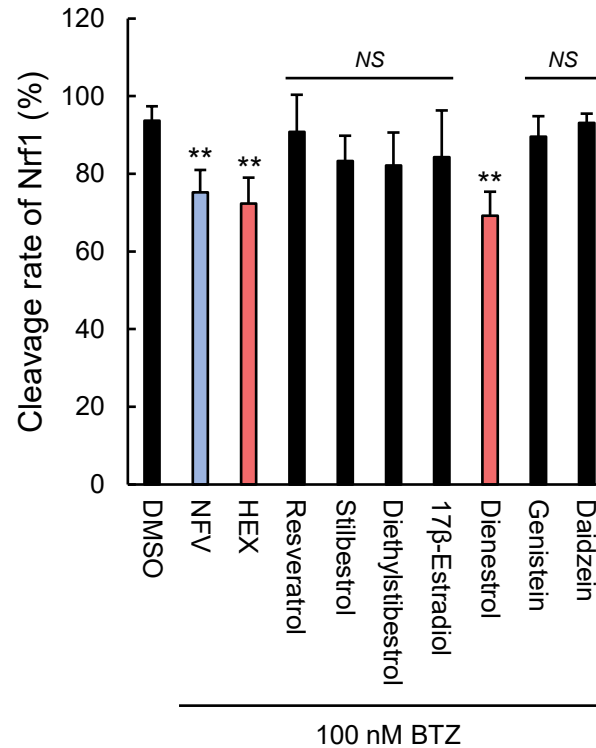
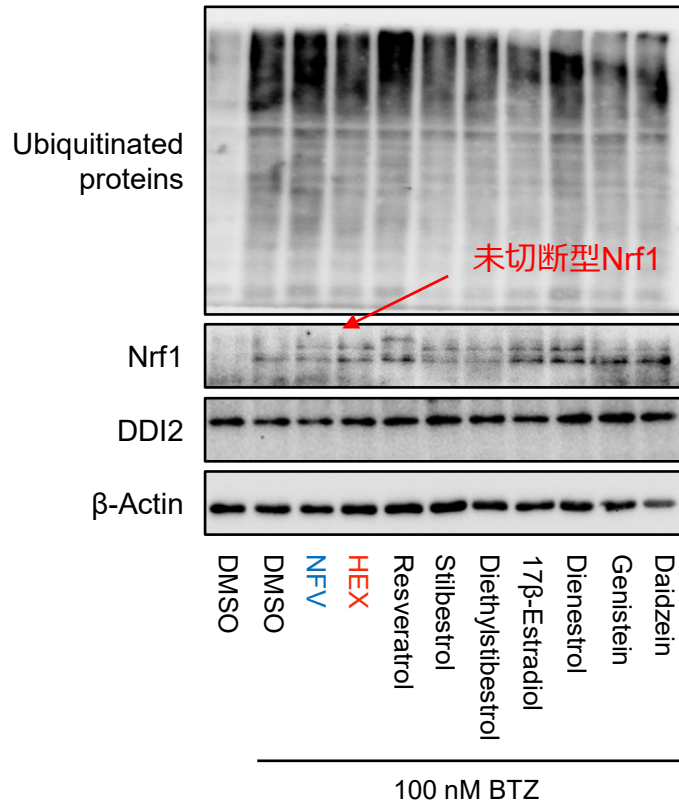
## 【Thermal shift assay】



# DDI2-hexestrol (HEX) ドッキングモデル

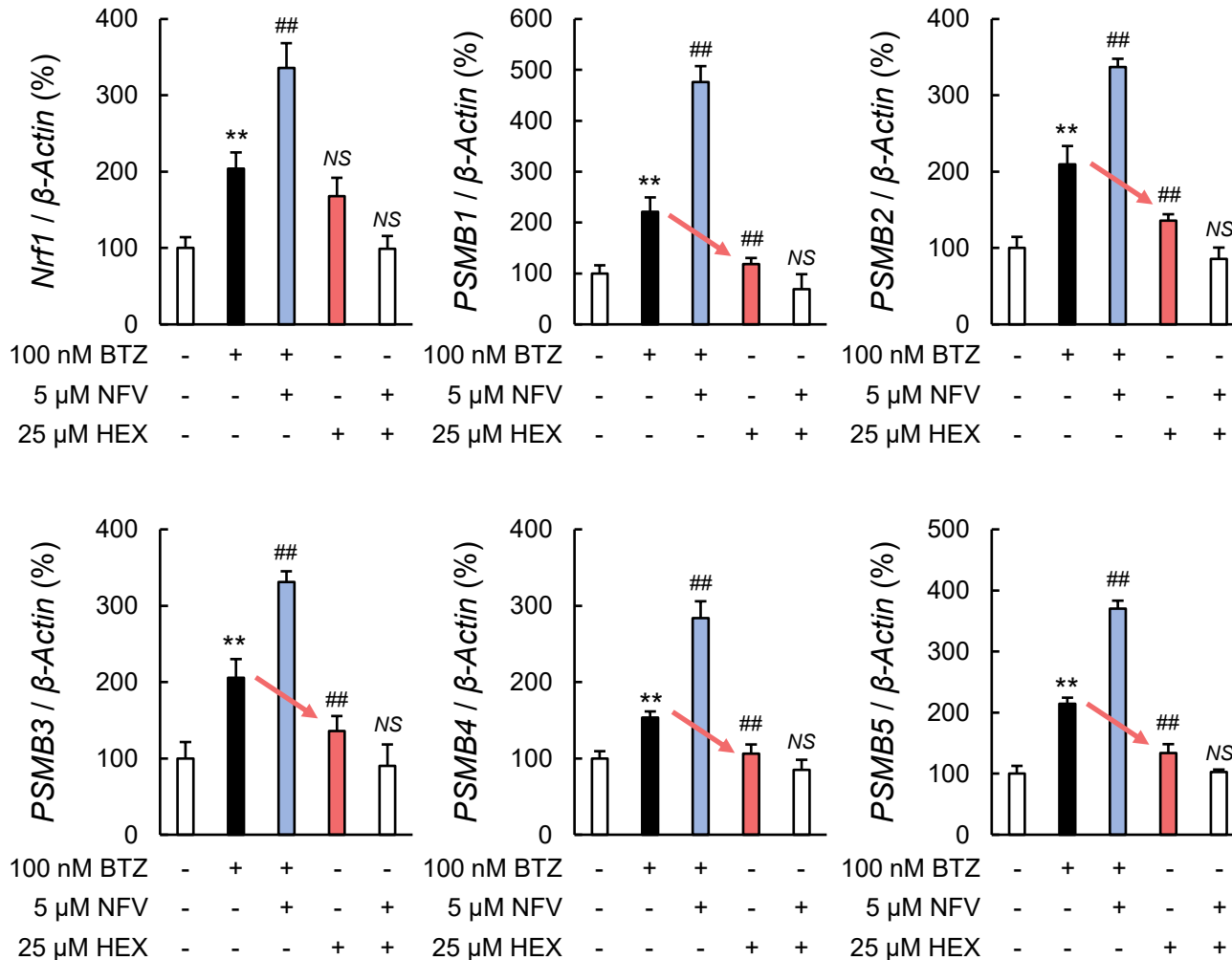


## 【候補化合物によるDDI2阻害活性評価】



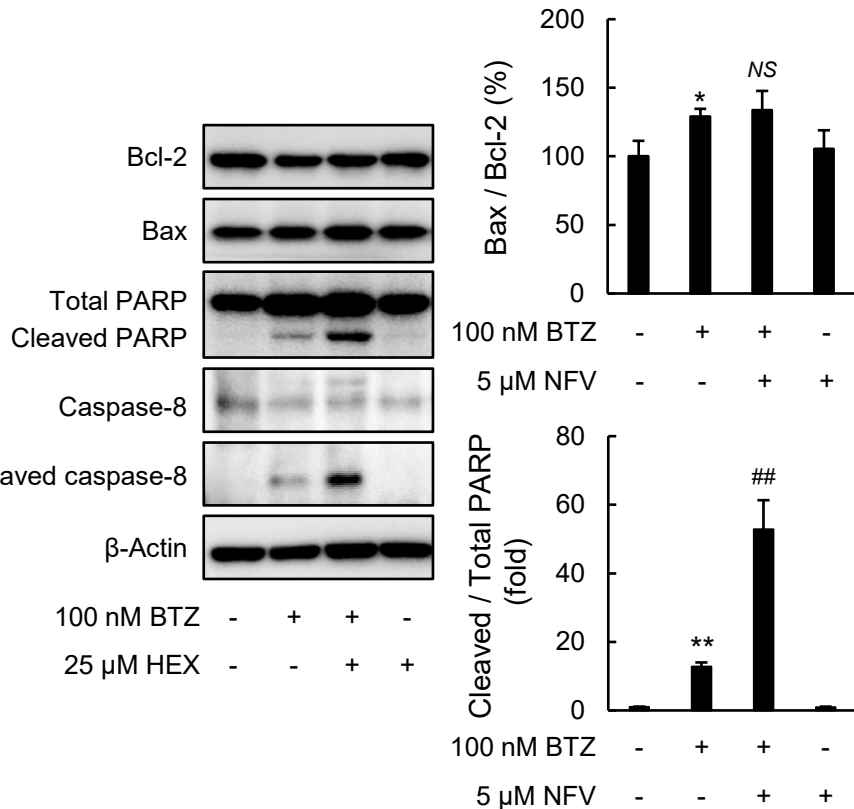
- HEXと構造類縁体 dienestrolは、有意なDDI2阻害活性を示した。
  - HEXは用量依存的にDDI2を阻害した。
- ⇒ HEXが新規DDI2阻害剤になることが明らかとなった。

## 【Nrf1とプロテアソーム構成因子のmRNA発現変動】

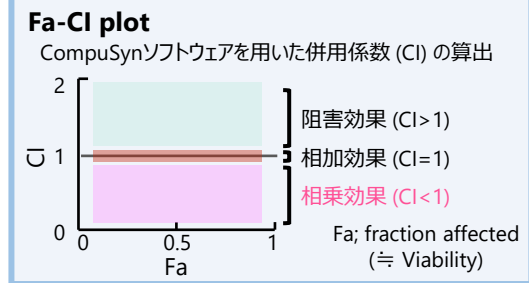
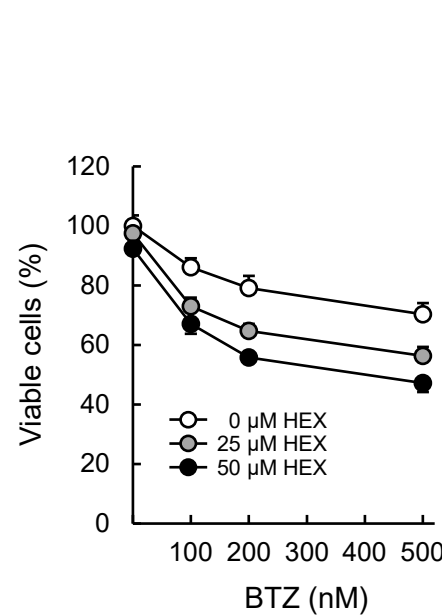


- HEXはBTZ誘導性 bounce backを有意に抑制した。  
⇒HEXがNFVの欠点を改善した、新規DDI2阻害剤になることが明らかとなった。

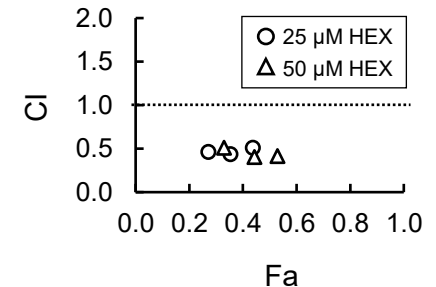
## 【アポトーシスシグナルへの影響】



## 【CompSynプログラムによる相乗性判定】



| HEX (μM) | BTZ (nM) |      |      |
|----------|----------|------|------|
|          | 100      | 200  | 500  |
| 25       | 0.46     | 0.43 | 0.51 |
| 50       | 0.51     | 0.40 | 0.41 |

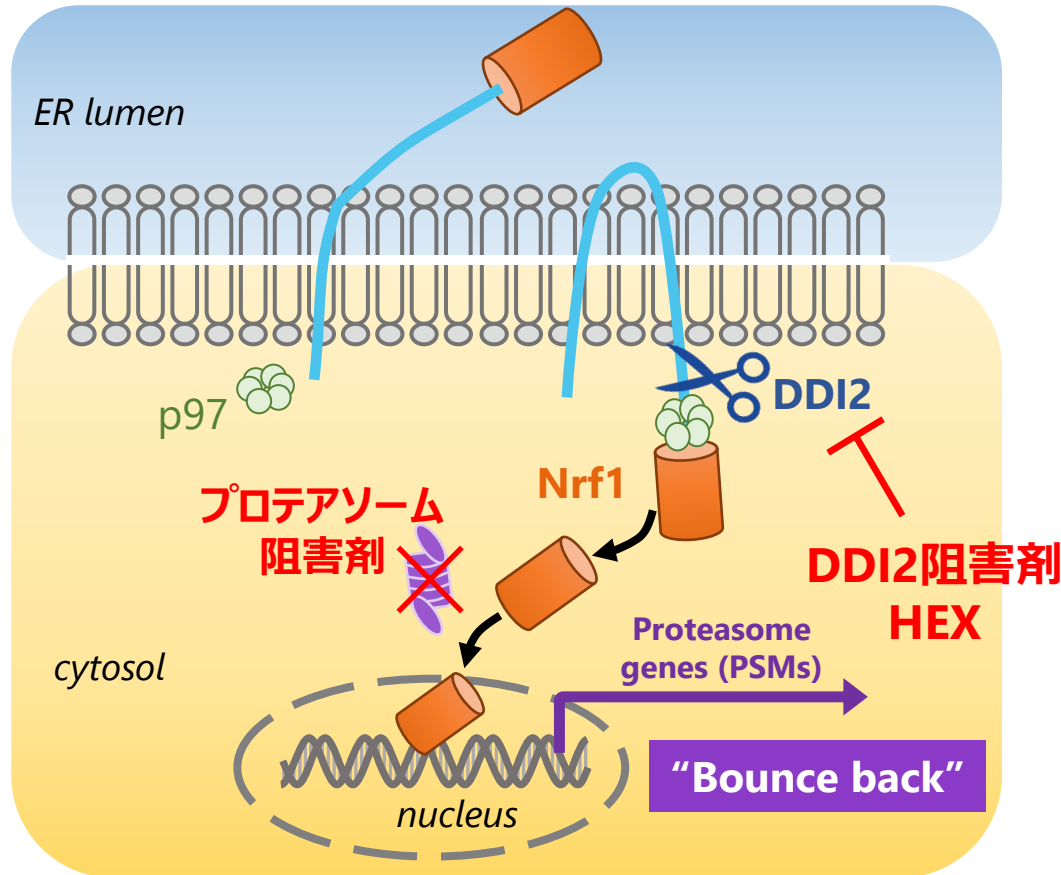


- HEXはBTZとの併用で有意にアポトーシスを誘導した。
  - HEXによるBTZとの併用効果が相乗的であることが明らかとなった。
- ⇒HEXがプロテアソーム阻害剤の有効性を高める新規アジュバント薬になることが期待される。

- 1 | スクリーニングから、Bounce backを抑制できるDDI2阻害剤 hexestrol (HEX) を見出した。
- 2 | HEXはプロテアソーム阻害剤の抗がん活性を有意に増強した。



プロテアソーム阻害薬の抗がん活性を増強する  
新規アジュバント薬の開発に成功



難治性固型がんのモデルとして樹立したGC耐性膀胱がん (T24GC) 細胞を用いて、プロテアソーム阻害剤と新規DDI2阻害剤HEXの併用の有効性を実証した。



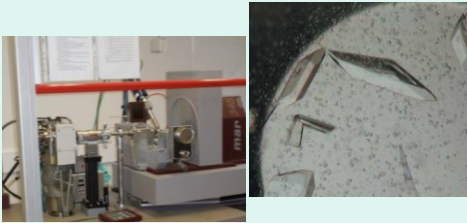
今後、さらに強力かつ特異的なDDI2阻害剤の開発研究を進め、臨床応用を目指したい。

|             | DDI2 inhibitors |              |
|-------------|-----------------|--------------|
|             | NFV (既存技術)      | HEX (新技術)    |
| その他の薬理作用    | HIVプロテアーゼ阻害薬    | エストロゲン受容体作動薬 |
| DDI2阻害      | ○               | ○            |
| BTZ抗がん活性の増強 | ○               | ○            |
| Bounce back | 増強              | 抑制           |



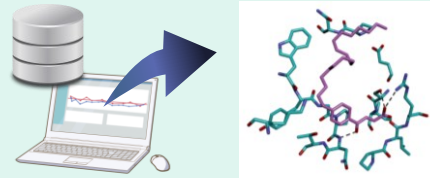
- 研究試薬としてのDDI2阻害剤
- 既存薬との併用によって、作用増強効果を示す  
がんアジュバンド薬
- 既存薬に対して抵抗性を獲得したがん細胞に  
対する抗がん剤耐性克服薬

## 構造解析



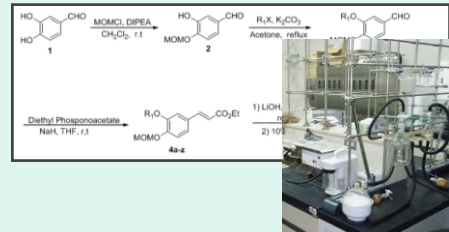
- X線結晶構造解析
- クライオ電顕

## 計算



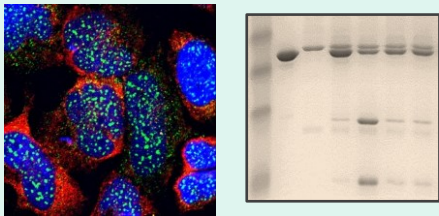
- *in silico*スクリーニング
- ドッキング解析

## 有機合成



- リードからの誘導体の合成
- 天然化合物の合成

## 生物活性評価



- 酵素活性評価、*in vitro*試験
- *in vivo*試験

HEX



ドッキング解析で得られたファーマコフォアに基づく誘導体の設計・合成・評価



より高活性な  
DDI2阻害剤の創製

- HEXは、Bounce backを阻害できる唯一のDDI2阻害剤であるが、その構造最適化が課題である。
- 活性の向上、物性や体内動態の改善、を加味した**構造最適化に向けたノウハウの提供や有機合成の支援**をいただける企業との共同研究を希望。
- NFVがDDI2阻害剤として同定されたのは2020年である。**プロテアソーム阻害剤の有効性の拡大に向けたDDI2阻害戦略の確立はまだ発展途上**であり、一緒に研究を推進していただける企業との共同研究を希望。

- 発明の名称 : アスパラギン酸プロテアーゼDDI2阻害剤  
およびその利用
- 出願番号 : 特願2023-027556
- 出願人 : 岐阜市
- 発明者 : 遠藤智史

## お問い合わせ先

---

### 岐阜薬科大学

◎ 生命薬学大講座 生化学研究室

遠藤 智史

TEL 058-230-8100 (内線3669)

FAX 058-230-8105

e-mail [sendo@gifu-pu.ac.jp](mailto:sendo@gifu-pu.ac.jp)

◎ 事務局 庶務会計課

中尾 真一郎

TEL 058-230-8100

FAX 058-230-8200

e-mail [syomuk@gifu-pu.ac.jp](mailto:syomuk@gifu-pu.ac.jp)