

平成 20 年度

金沢大学がん研究所
共同研究成果報告書

2009.4

金沢大学がん研究所

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成21年4月20日提出

対象研究テーマ：幹細胞あるいはがん幹細胞の特定・可視化に関する研究

研究期間： 2008年11月1日～2009年3月31日

研究題目 分子イメージングによる幹細胞可視化法の開発

研究代表者 原 英二

研究成果の概要：

マウスの生体内において Bmi-1 遺伝子と p16^{INK4a} 遺伝子の発現をリアルタイムに可視化・計測出来るイメージングシステムの開発に成功した。このイメージングシステムを用いて Bmi-1 遺伝子の発現が皮膚化学発癌の初期（良性腫瘍）において著しく低下する一方で癌抑制遺伝子である p16^{INK4a} 遺伝子の発現が顕著に上昇することを見出した。この結果は少なくとも皮膚化学発癌の過程において Bmi-1 遺伝子の発現低下が良性腫瘍から悪性腫瘍への形質転換を防ぐ働きに関与している可能性を強く示唆している。

研究分野：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

p16^{INK4a} 遺伝子は重要な癌抑制遺伝子として知られているがその生体内での発現調節機構は未だ不明なままである。これまで主に培養細胞を用いた研究からポリコム・グループ転写因子の一つであり幹細胞性の維持に関与している Bmi-1 が p16^{INK4a} 遺伝子の発現調節に重要な働きをしていることが示唆されてきた。しかし、Bmi-1 ノックアウトマウスは生後まもなく死亡するため、発癌や個体老化の過程で Bmi-1 がどのように p16^{INK4a} 遺伝子の発現を制御しているのかについては殆ど明らかにされていない。

2. 研究の目的

分子イメージングの技術を使い Bmi-1 遺伝子と p16^{INK4a} 遺伝子発現の体内動態を解析することで Bmi-1 による p16^{INK4a} 遺伝子発現調節機構及びその生体内での役割を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

完全長の Bmi-1 遺伝子及び周辺の転写調節領域を十分な長さ持つマウスの染色体断片が組み込まれた Bacterial Artificial Chromosome (BAC) クローンを利用し、Bmi-1 とルシフェラーゼとの融合蛋白を発現する組み換え染色体断片を作製する。この染色体断片を組み込んだトランスジェニックマウスを作成し、内在性の Bmi-1 遺伝子の発現をルシフェラーゼ活性として可視化できることを確認する。この Bmi-1 発現可視化マウスと既に作成済みである p16^{INK4a} 発現可視化マウスとを用いて発癌や個体老化の過程で Bmi-1 及び p16^{INK4a} の発現をイメージングし、それら遺伝子の発現動態を比較検討する。

4. 研究成果

(1) 様々な解析から作成したトランスジェニックマウス (Bmi-1 レポーターマウス) が発する発光シグナルが内在性 Bmi-1 遺伝子の発現をうまく反映していることが確認された。このため、このシステムを用いることで、これまで困難であった Bmi-1 の生体内での機能明らかに出来る可能性が示唆された。

(2) DMBA/TPA を用いた化学皮膚発癌の過程でパピローマの発生とともに、Bmi-1 遺伝子の発現が低下する一方で、p16^{INK4a} 遺伝子の発現が上昇した。この結果からパピローマの発生過程で Bmi-1 の発現低下が p16^{INK4a} 遺伝子の発現誘導に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1) Ohtani, N., Mann, D.J. & Hara E.

Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. **Cancer Sci.** 100: 792-797 (2009)

2) Inomata, K., Aoto, T., Masunaga, T., Tanimura, S., Binh, N.T., Wakayama, T., Hara, E., Iseki, S., Shimizu, H. & Nishimura, E.K.

Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation. **Cell in press** (2009)

[学会発表] (計 2 件)

1) Ohtani, N., Yamakoshi, K., Takahashi, A. & Hara, E. Visualizing the dynamics of oncogenic stress response in living mice.

AACR Conference on Mouse model of Cancer (San Francisco, U.S.A.) January 12-15, 2009

2) Yamakoshi, K., Takahashi, A., Ohtani, N. & Hara, E. Real-time imaging of p16^{INK4a}

expression visualizes the dynamics of senescence signalling in living animals.

日本分子生物学会 (神戸) 2008 年 12 月 9 日～12 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原 英二 (財団法人癌研究会癌研究所・部長)

(2) 研究分担者

大谷直子 (財団法人癌研究会癌研究所・主任研究員)

高橋暁子 (財団法人癌研究会癌研究所・研究員)

山越貴水 (財団法人癌研究会癌研究所・嘱託研究員)

(3) 本研究所担当者

平尾 敦 教授

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成 21 年 4 月 1 日提出

対象研究テーマ：幹細胞あるいはがん幹細胞の特定・可視化に関する研究

研究期間： 2008 年 11 月 1 日～2009 年 3 月 31 日

研究題目 がん幹細胞の機能および抗がん剤耐性に関する ABC 輸送体に関する研究

研究代表者 慶應義塾大学薬学部 杉本芳一

研究成果の概要：

ヒト ABCB5 の全長である ABCB5-1257 の発現ベクターおよび遺伝子導入細胞の作成を行った。ABCB5-1257 は、160 kDa、>300 kDa のタンパク質として細胞に発現した。また、ABCB5-EGFP は細胞膜上に局在した。組織由来 cDNA library を用いた PCR により、prostate、testis で、ABCB5-1257 cDNA の 5' 側 (-117-457) の発現が確認された。また、heart、placenta、lung、liver、pancreas、spleen、thymus、prostate、testis、ovary、small intestine、colon で、ABCB5 の 3' 側 (2543-3026) の発現が確認された。よって、ABCB5-1257 は、特に prostate と testis に高発現する ABC 輸送体と考えられる。

研究分野：がん分子標的治療、がん幹細胞

キーワード：がん幹細胞、抗がん剤耐性、ABC 輸送体、ABCB1、ABCB5、ABCG2

1. 研究開始当初の背景

近年、がん幹細胞が存在することが知られ、この分野の研究が活性化している。また、幹細胞における ABC 輸送体 (ATP-binding cassette transporter) の発現について、興味ある知見が得られている。

P-糖タンパク質 (P-gp、ABCB1) は、細胞膜を 6 回貫通する膜貫通領域と細胞内の ATP 結合領域をそれぞれ 2 個ずつ持つ、ABC 輸送体である。P-gp は、ATP の加水分解のエネルギーを利用して種々の抗がん剤を細胞外に排出するポンプとして働く。また、BCRP (breast cancer resistance protein、ABCG2) は、細胞膜を 6 回貫通する膜貫通領域と細胞内の ATP 結合領域をそれぞれ 1 個ずつ、すなわち P-gp の半分の構造を持つ ABC 輸送体であり、2 量体として機能する。BCRP は、irinotecan、gefitinib などの抗がん剤を細胞外に排出するポンプであるが、Hoechst 33342 を細胞外に排出する能力も持つ。

造血幹細胞は Hoechst 33342 で染色されない side population cell 中にある。この Hoechst 33342 排出活性が BCRP そのものであることが明らかになったことより、BCRP は造血幹細胞のマーカーそのものと位置づけられている。また、造血幹細胞以外の種々の幹細胞においても、Hoechst 33342 で染色されない性質、すなわち BCRP 発現が、幹細胞の

重要なマーカーとなっていることが多い。

また、造血幹細胞より少し分化の進んだ造血前駆細胞は、Rhodamine 123 で染色されない細胞であるが、この Rhodamine 123 排出活性は、P-gp が担う。

こうした研究結果より、ABC 輸送体の発現は、幹細胞機能維持と密接に関わっていると考えられている。

2003 年に Harvard 大のグループによりクローニングされたヒトの ABCB5 cDNA は、2906 nucleotides よりなり、812 アミノ酸のタンパク質をコードしていた。この ABCB5 を、ABCB5-812 と呼ぶ。ヒト乳がん細胞 MCF-7 に ABCB5-812 cDNA を導入したところ、Rhodamine 123 の細胞内蓄積が低下した。また、同じグループは、ABCB5-812 発現細胞を抗 ABCB5 抗体で処理すると doxorubicin の排出が低下することから、ABCB5 は doxorubicin の排出に関与していると報告した。

一方、2008 年になって、ABCB5 が melanoma stem cell に発現しているという論文が出された。これにより、ABCB5 は、幹細胞研究と抗がん剤耐性の研究の両方において、非常に注目される遺伝子となった。

しかし、この ABCB5-812 の N 末付近には、P-gp の N 末側の ATP 結合部位にある Walker B motif と相同性のある配列が認められた。これは、この ABCB5-812 が partial peptide であることを示唆する。我々は、こうした背景

のもとに、ヒト精巢の cDNA ライブラリーより、ABCB5 の cDNA をクローニングした。得られたヒトの ABCB5 cDNA は、5184 nucleotides からなり、1257 アミノ酸のタンパク質をコードしていると推定された (GenBank 登録番号 AB353947)。

2. 研究の目的

本研究では、ABCB5 の遺伝子導入細胞を作成し、その生理機能を明らかにすることを目的とする。また、ABCB5 のレトロウイルス発現系を構築し、幹細胞研究に応用する。

3. 研究の方法

(1) HEK293/Myc-ABCB5 細胞の作成

ABCB5-1257 の N 末側に c-Myc-tag を付けた Myc-ABCB5-1257 cDNA を作成した。この cDNA を発現ベクターである pCAL-IRES-ZEO に組み込んだ。pCAL-Myc-ABCB5-IRES-ZEO をヒト胎児腎由来 HEK293 細胞に遺伝子導入した。Zeocin で選択して得られた細胞を HEK293/Myc-ABCB5-mix とした。さらに、限界希釈法により ABCB5-1257 高発現クローンを得た。

(2) HEK293/ABCB5-EGFP 細胞の作成

ABCB5-1257 cDNA の 3' 側の終止コドンを除いた cDNA を pEGFP-N2 に組み込むことにより、ABCB5-EGFP cDNA を作成した。pEGFP-N2-ABCB5 を HEK293 細胞に遺伝子導入した。

(3) 細胞における ABCB5-1257 タンパク質の発現確認

Myc-ABCB5-1257 の発現は、抗 c-Myc 抗体を用いた Western blot により確認した。ABCB5-EGFP の発現は、FACS 及び抗 EGFP 抗体を用いた Western blot により確認した。

(4) ABCB5-EGFP タンパク質の局在

チャンバースライドに HEK293 細胞を巻き、翌日 pEGFP-N2-ABCB5 あるいは pEGFP-N2 を遺伝子導入した。48 時間後に、EGFP による蛍光を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(5) ABCB5 cDNA の組織発現

MTC Multiple Tissue cDNA Panels を用いて、ABCB5-1257 cDNA の 5' 側 (-117-457) および 3' 側 (2543-3026) を PCR で増幅させた。得られた PCR 産物で 2nd PCR を行い、各組織における発現を確認した。

4. 研究成果

ABCB5-1257 遺伝子導入細胞の Western blot の結果、Myc-ABCB5-1257 は 160 kDa、>300 kDa のタンパク質として検出された。また、ABCB5-EGFP は、200 kDa、>300 kDa のタンパク質として検出された。

pEGFP-N2-ABCB5 を導入した細胞では、細胞膜上に蛍光が観察された。よって、ABCB5-EGFP は細胞膜タンパク質と結論された。一方、pEGFP-N2 を導入して EGFP 単独を発現させた細胞では、細胞全体に蛍光がみられた。

ABCB5-1257 cDNA の 5' 側 (-117-457) の発現は prostate、testis で確認された。3' 側 (2543-3026) の発現は heart、placenta、lung、liver、pancreas、spleen、thymus、prostate、testis、ovary、small intestine、colon で確認された。よって、ABCB5-1257 は、特に prostate と testis に高発現する ABC 輸送体と考えられる。また、ABCB5-812 は、種々の組織で広く発現していると考えられる。

今回の研究で作成した ABCB5-1257 発現ベクターおよび ABCB5-1257 発現細胞を用いて、今後、ABCB5-1257 による抗がん剤耐性の検討や輸送基質の探索などを行う予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

・Mashima T, Sato S, Sugimoto Y, Tsuruo T, Seimiya, H. Promotion of glioma cell survival by acyl-CoA synthetase 5 under extracellular acidosis conditions. *Oncogene*, 28: 9-19, 2009.

・Noguchi K, Katayama K, Mitsuhashi J, Sugimoto Y. Functions of BCRP in cancer chemotherapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61: 26-33, 2009.

・Katayama K, Shibata K, Mitsuhashi J, Noguchi K, Sugimoto Y. Pharmacological Interplay between breast cancer resistance protein and gefitinib in epidermal growth factor receptor signaling. *Anticancer Res*, 2009, in press.

・Kato, N, Suzuki H, Takagi H, Asami Y, Kakeya H, Uramoto M, Usui T, Takahashi S, Sugimoto Y, Osada H. Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem*, 2009, Feb 18. [Epub ahead to print]

・Takeshita A, Shinjo K, Yamakage N, Ono T, Hirano I, Nakamura S, Shigeno K, Tobita T, Maekawa M, Ohnishi K, Sugimoto Y, Ohno R. Cell cycle features and quantitative alteration of target molecules of malignant B cells treated with inotuzumab ozogamicin (CMC544) alone or in combination with rituximab. *Leukemia*, 2009, in press.

〔学会発表〕（計 3 件）

・河原はる香，野口耕司，片山和浩，三橋純子，杉本芳一．Sunitinib が薬剤排出トランスポーターの活性に及ぼす影響．日本薬学会第 129 年会（京都），要旨集 4，p173，2009/03.

・俵夕奈，河村容子，片山和浩，三橋純子，野口耕司，杉本芳一．P-糖タンパク質の発現を制御する遺伝子の探索．日本薬学会第 129 年会（京都），要旨集 4，p173，2009/03.

・初谷香織，大石智一，杉本芳一，鶴尾隆，清宮啓之．ポリ (ADP-リボシル) 化酵素タンキラーゼ 1 の自己多量体化によるテロメア機能の調節．日本薬学会第 129 年会 (京都)，要旨集 3，p123，2009/03.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

- ・ABCトランスポーター蛋白質発現抑制剤
（国際出願中）
- ・癌の予防及び治療剤
（国際出願中）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

慶應義塾大学薬学部 教授 杉本芳一

(2) 研究分担者

(3) 本研究所担当者

金沢大学がん研究所 教授 矢野聖二

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成 21年 4月 30日提出

対象研究テーマ：胃がんマウスモデルを用いた新規薬物の薬効評価に関する研究

研究期間： 2008年11月1日～2009年3月31日

研究題目 胃がんマウスモデルを用いた新規クルクミン誘導体の抗腫瘍活性の評価

研究代表者 柴田浩行

研究成果の概要：

1. 胃がん発がんモデルマウス *K19-Wnt1/C2mE* マウスの作成、受け入れ。
2. 家族性大腸腺腫症モデルマウスを *Apc580D* を用いたクルクミンの安全性、腺腫形成抑制効果の検討

研究分野：新規抗腫瘍性薬剤の開発

キーワード：クルクミン、Wnt パスウェイ

1. 研究開始当初の背景

クルクミンはウコン（ターメリック）に含まれる黄色のスパイスである。クルクミンの作用メカニズムは非常に多岐にわたり、Wnt パスウェイを含む多くのがん関連分子を標的とする。しかし、クルクミンは血中への吸収性が悪いことや速やかに分解され、生体内での有用性が乏しい。申請者らはクルクミンの低毒性を維持したまま、抗腫瘍活性を増強させることを目指し、今日までに約 90 種類の抗腫瘍活性の増強した類縁体（スーパークルクミン）を系統的に合成した。スーパークルクミンは *in vitro* において β -catenin、K-ras、cyclinD1、c-Myc、ErbB2 などのがん遺伝子産物分解に関してクルクミンの 8 倍以上の活性を有することが確認されている。

2. 研究の目的

クルクミンは β -catenin の分解など Wnt シグナル系の抑制作用と抗炎症作用を持つことが知られている。新規に合成したクルクミン類縁体の中で *in vitro* で強い抗腫瘍活性を示した誘導体 GO-Y030 などは *in vivo* でも β -catenin の分解活性を確認し、また、元化合物であるクルクミンで確認されている抗炎症作用も併せ持つ可能性が高く、胃がんのモデルマウスである *K19-Wnt1/C2mE* マウスにおいて胃がんの発生を強力に抑えることを確認する。

3. 研究の方法

金沢大学がん研究所にて大島教授と打ち合わせを行った。その結果、胃がんの発がん

モデルマウスである *K19-Wnt1/C2mE* マウスは熊本大学の Center for Animal Resources and Development Database (CARD R-BASE) に登録されており、このルートから供給を受けることになった。しかし、マウスを東北大学の動物実験施設に移管するには凍結胚からのマウス作成、一定期間の隔離、検疫などのクリーンアップなど、その受け入れには 3 ヶ月以上の時間を要し、2009 年 3 月現在、胃がん発がんモデルマウスの受け入れがようやく可能になったところである。

そこで、この間を利用して *Apc580D* を用いたクルクミン誘導体 GO-Y030 の安全性と小腸の腺腫形成抑制効果の検討を行った。

4. 研究成果

0.5% (weight/weight) の GO-Y030 を餌に混入させ、1 日当たり、個体当たり 25mg の誘導体を 10 日間経口摂取させた。小腸腺腫は個数や大きさの半減、 β -catenin の染色性の改善などが認められ、*in vivo* における抗腫瘍活性を示した。

また、体重の他、肝機能や腎機能に与える影響も軽微である事が確認され、比較的安全に投与可能であることが示された。

以上の結果から、消化管腫瘍に対する治療効果を見る上で 1 日当たり、個体当たり 25mg の誘導体を 10 日間経口摂取させることになった。

今後、胃がんモデルマウス *K19-Wnt1/C2mE* マウスに対して同様の実験を行い、胃癌抑制効果について検討す

る予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Shibata H, Yamakoshi H, Sato A, Ohori H, Kakudo Y, Kudo C, Takahashi Y, Watanabe M, Takano H, Ishioka C, Noda T, Iwabuchi Y. : Newly synthesized curcumin analog has improved potential to prevent colorectal carcinogenesis in vivo. (*Cancer Science*, 100, pp956-960, 2009.)

[学会発表] (計 1 件)

2009 AACR 100th Annual Meeting, Denver, CO, U.S.A., 2009 April 18-22
“Therapeutic potential of newly synthesized curcumin analogs”
.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田浩行

(2) 研究分担者

岩渕好治

山越博幸

工藤千枝子

(3) 本研究所担当者

大島正伸

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成 21 年 5 月 12 日提出

対象研究テーマ: 胃がんマウスモデルを用いたがん幹細胞の探索および維持機構に関する研究

研究期間: 2008 年 11 月 1 日~2009 年 3 月 31 日

研究題目 胃癌幹細胞における CD44 の発現意義とその機能解析

研究代表者 佐谷秀行 (慶應義塾大学・医学部)

研究成果の概要:

我々は胃癌自然発生モデル K19-Wnt1/C2mE トランスジェニックマウスを用いて幹細胞様胃癌細胞の候補となる細胞の探索を行った。その結果、マウス胃癌組織における CD44 の発現パターンには階層性が存在することが分かった。さらに遺伝子発現解析から CD44 陽性(CD44+)細胞は陰性細胞(CD44-)と比較して、上皮の分化シグナル関連遺伝子群の発現が低く、反対に癌幹細胞マーカーCD133 の発現が高いことなどから CD44+細胞は特に未分化な癌細胞集団であると考えられた。次に CD44-/- Wnt1/C2mE マウスを作成したところ、生後 20 週から 30 週にかけて認められる腫瘍径の著明な増大が CD44-/-では全く生じないことが分かった。また CD44-/-腫瘍では癌抑制シグナル伝達に關与する p38MAPK の明らかな活性化が生じることが分かった。以上の結果から CD44 の発現は p38MAPK の活性化を抑制し、癌幹細胞様細胞の拡大および腫瘍の増大を促進すると考えられた。

研究分野:

キーワード: 胃がん、癌幹細胞、CD44

1. 研究開始当初の背景

CD44 は、乳癌や大腸癌などの固形癌における癌幹細胞の表面マーカーであり CD44+細胞の解析は癌幹細胞をターゲットとした治療を考案する上で重要である。また、一方では胃癌においては癌幹細胞の有用な表面マーカーに関しては知られていない。これまでに我々は Wnt1/C2mE 胃癌マウスを用いた検討で、CD44+胃癌細胞は、癌幹細胞の特徴をもつ未分化な細胞であることを見出している。

2. 研究の目的

CD44+胃癌細胞に着目してその癌幹細胞としての性質の解明および癌幹細胞における CD44 の機能について解析を行う。

3. 研究の方法

Wnt1/C2mE 胃癌マウスを用いて CD44+胃癌細胞の拡大に關わる因子を同定する。また CD44+胃癌細胞の放射線および抗がん剤への感受性を個体を用いて解析する。Wnt1/C2mE 胃癌マウスから CD44+胃癌細胞を単離した後、遺伝子発現プロファイルの解析および癌幹細胞としての性質を維持するシグナルについて生化学的手法を用いて解析する。

4. 研究成果

胃癌細胞における CD44 の発現は p38MAPK の活性化を抑制することで、癌幹細胞様細胞の拡大を引き起こすことが明らかとなり、p38MAPK の活性化を抑制する CD44 およびその下流シグナルをターゲットとすることが癌幹細胞の拡大を抑制し、癌治療に有効であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Oguma K, Oshima H, Aoki M, Uchio R, Naka K, Nakamura S, Hirao A, Saya H, Taketo MM and Oshima M: Activated macrophages promote Wnt signaling through tumor necrosis factor- α in gastric tumor cells. *EMBO J* 27: 1671-1681, 2008

[学会発表] (計 1 件)

第 98 回日本病理学会総会・ワークショップ「胃癌幹細胞様細胞の拡大および腫瘍進展

における CD44 の役割」
永野修、石本崇胤、甲斐千晴、佐谷秀行

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐谷秀行（慶應義塾大学・医学部・教授）

(2) 研究分担者

永野 修（慶應義塾大学・医学部・助教）

石本崇胤（熊本大学・医学部・共同研究員）

(3) 本研究所担当者

大島 正伸（腫瘍遺伝学研究分野・教授）

金沢大学がん研究所共同研究成果報告書

平成21年 5月12日提出

対象研究テーマ：NK4 や HGF-Met 系阻害分子による制がん研究

研究期間： 2008年11月1日～2009年3月31日

研究題目 構造生物学を基盤とする HGF-Met 系阻害の分子創薬

研究代表者 大阪府立大学理学系研究科 准教授 木下誉富

研究成果の概要：HGF 全体について生物活性を保持している糖鎖欠損／除去 HGF を用いることで結晶化されたが、結晶構造解析に可能な大きさ・形状には至っていない。一方、これまでの研究で選択された化合物が結合すると考えられるポケットをもつ HGF の分子内領域の発現・精製、結晶化に成功した。これにより、より低濃度で HGF-Met 系を阻害する化合物を分子設計するため、選択された化合物との共結晶構造に基づく Structure-Based Drug Design による化合物最適化を実施する基盤ができた。

研究分野：構造生物学、創薬化学

キーワード：X線結晶構造解析、Structure-Based Drug Design

1. 研究開始当初の背景

インシリコスクリーニングにより、HGF-Met 系シグナル伝達を遮断するシード化合物を得ていた。この段階では、抗がん作用を検討する動物モデル実験を行うには至らない。

2. 研究の目的

この化合物の活性向上を目的として、HGF 分子内ドメインとの X線結晶構造解析を目指した。ここで得られる結合様式に基づいて Structure-Based Drug Design を進める。

3. 研究の方法

HGF 分子内ドメインサンプルを結晶化用に高純度精製した。シード化合物との複合体の結晶化スクリーニングを行う。得られた結晶を用いて、X線回折データ測定を行い、構造解析を行う。

4. 研究成果

構造解析レベルの結晶調製まで、あと一歩のところまで来ている。再度、HGF 分子内ドメインサンプルを調製して、結晶化条件の最適化を行っている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Conformational change of adenosine deaminase during ligand-exchange in a crystal, T. Kinoshita, T. Tada, I. Nakanishi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **373**, 53-57 (2008).

[学会発表] (計 23 件)

1. 先端科学セミナー京都ケミカルバイオロジーシンポジウム、木下誉富 (招待講演)

[図書] (計 1 件)

1. 「X線結晶構造解析を利用した医薬品創出」木下誉富 (著者分担)、タンパク質結晶の新展開－新しい育成技術から構造解析・応用研究へ、シーエムシー出版 (2008) 205-214

[産業財産権]

○出願状況（計 1 件）

出願番号：特願 2009－39997

○取得状況（計 0 件）

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大阪府立大学 理学系研究科
准教授 木下誉富

(2) 研究分担者

大阪府立大学 理学系研究科
研究員 仲庭哲津子

(3) 本研究所担当者

松本邦夫