

が得られるため、サンプルの保存・移送の問題も克服する必要がある。これらの課題をクリアし、できるだけ早い時点で診断技術として確立されることを目指している。

おわりに

蛍光タンパク質はこれまで生物学研究に文字通り多くの光を照らしてきた。とりわけ蛍光タンパク質を用いたFRETは、生きた細胞内で起こる現象を色の変化として捉えられる画期的なイメージング技術で、世界的にも頻用されている。しかしこれまで、これらの技術が利用されるのは純粋な基礎研究分野に限られていた。今回の我々の研究は、GFPに臨床現場での活躍の場を与える最初の一步と位置づけられ、Clinical Cancer Research誌の論説においても、本成果はテーラーメイド医療に向けた「pioneer study (先駆的研究)」として紹介されている¹³⁾。しかし、実際に医療現場に普及してこそ真に評価されるものであり、その点に鋭意努力する所存である。本技術の利点としては治療効果の向上のみならず、最大治療効果が得られる時間を短縮できることがあげられる。また、分子標的治療薬は大変高価であるため、本技術の臨床現場への普及は経済的かつ効率的な医療の実践にも繋がると思われる。さらに本手法には生きた細胞を解析するという他の検査には類を見ない特徴があり、単なる臨床的効果だけでなく薬剤耐性機構解明への発展も期待できる。

- 1) Morise, H., Shimomura, O., Johnson, F.H., & Winant, J. (1974) *Biochemistry*, 13, 2656-2662.
- 2) Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F. G., & Cormier, M.J. (1992) *Gene*, 111, 229-233.
- 3) Tomosugi, W., Matsuda, T., Tani, T., Nemoto, T., Kotera, I., Saito, K., Horikawa, K., & Nagai, T. (2009) *Nat. Methods*, 6, 351-353.
- 4) Shcherbo, D., Shemiakina, I.I., Ryabova, A.V., Luker, K.E., Schmidt, B.T., Souslova, E.A., Gorodnicheva, T.V., Strukova, L., Shidlovskiy, K.M., Britanova, O.V., Zaraisky, A.G., Lukyanov, K.A., Loschenov, V.B., Luker, G.D., & Chudakov, D.M. (2010) *Nat. Methods*, 7, 827-829.
- 5) Miyawaki, A. (2003) *Dev. Cell*, 4, 295-305.
- 6) Miyawaki, A. (2011) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 12, 656-668.
- 7) Truong, K., Sawano, A., Mizuno, H., Hama, H., Tong, K.I., Mal, T.K., Miyawaki, A., Ikura, M. (2001) *Nat. Struct. Biol.*, 8, 1069-1073.
- 8) Kurzrock, R., Gutterman, J.U., & Talpaz, M. (1998) *N. Engl. J. Med.*, 319, 990-998.
- 9) Mizutani, T., Kondo, T., Darmanin, S., Tsuda, M., Tanaka, S., Tobiume, M., Asaka, M., & Ohba, Y. (2010) *Clin. Cancer Res.*, 16, 3964-3975.
- 10) O'Hare, T., Walters, D.K., Stoffregen, E.P., Jia, T., Manley, P.

W., Mestan, J., Cowan-Jacob, S.W., Lee, F.Y., Heinrich, M.C., Deininger, M.W., & Druker, B.J. (2005) *Cancer Res.*, 65, 4500-4505.

- 11) Redaelli, S., Piazza, R., Rostagno, R., Magistrini, V., Perini, P., Marega, M., Gambacorti-Passerini, C., & Boschelli, F. (2009) *J. Clin. Oncol.*, 27, 469-471.
- 12) Gorre, M.E., Mohammed, M., Ellwood, K., Hsu, N., Paquette, R., Rao, P.N., & Sawyers, C.L. (2001) *Science*, 293, 876-880.
- 13) Lu, S. & Wang, Y. (2010) *Clin. Cancer Res.*, 16, 3822-3824.

大場 雄介, 津田 真寿美
(北海道大学大学院医学研究科)

Visualization of intracellular signaling and its application to assessment of response to molecular target drugs
Yusuke Ohba and Masumi Tsuda (Laboratory of Pathophysiology and Signal Transduction, Hokkaido University Graduate School of Medicine, N15W7, Kita-ku, Sapporo 060-8638, Japan)

非ステロイド系抗炎症薬の新しい薬理効果とその分子機構

1. はじめに

ケミカルバイオロジーとは、有機化合物を用いて生命科学を行うことであり、近年世界的に注目されている分野である。本稿のキーワードであるドラッグリプロファイリング研究 (Drug re-profiling research, DR 研究) とは、現在臨床で使われている医薬品 (既存薬) を用いたケミカルバイオロジー研究と位置づけることができる。

既存薬の中には、その作用機構がよく分かっていないものが多い。特に古くから使われてきた薬 (いわゆる“いい”薬) にこのケースが多い。これは病気に効くことが伝承されてきた天然物などからその医薬品が開発されたため、「なぜ効くか?」という研究がなされて来なかったためである。またそのような医薬品が開発された頃は、現在のように分析手法が確立されておらず、分子レベルでの作用機構の検討が難しかったのも原因である。さらに新薬の開発に比べ、副作用研究があまり注目されてこなかったこともあり、副作用に関しては、その発症機構が解明されていないものがほとんどである (後述する非ステロイド系抗炎症薬 (NSAID) による胃潰瘍など)。一方疫学調査により、既存薬の新しい薬理作用 (後述する NSAID の抗が

ん、抗アルツハイマー病作用など)が相次いで発見されている。しかしながら、これらに与る分子メカニズムはほとんど分かっていない。またこれまでに発見されていない既存薬の新しい薬理作用もたくさん存在すると思われる。そもそも、生体内には何万、何十万という種類の分子があり、医薬品がその一つだけに作用する、つまり一つの薬理作用のみを持つと考えることの方が無理であると思う。

このような事実を基盤に私が提唱している DR 研究では、既存薬の作用機構を DNA チップなどの最新の研究手法を用いて分子レベルで網羅的に徹底的に調べ、その既存薬が作用・副作用を発揮するメカニズムや、既存薬の新しい作用メカニズムを解明する。DR 研究は人類の長年の努力の結晶である既存薬から教を請うて、それを新薬開発へ応用するというアイデアである。そこで私は DR 研究を“温故知新創薬研究”とも呼んでいる。

最初に述べたように、DR 研究は既存薬を用いたケミカルバイオロジー研究である。既存薬が作用・副作用を発揮するメカニズムが未解明であるということは、それが未知の生体内反応に作用している可能性を示しており、その作用・副作用機構を解明することが、新しい生体内反応の発見に繋がるのが期待される。

一方 DR 研究は新しい医薬品開発に繋がる可能性の高い基礎研究である。例えば、既存薬の新たな薬理作用を発見し、その既存薬を別の疾患治療薬として開発する(適応拡大する)研究や、既存薬の作用・副作用の発症メカニズムを解明し、より作用の強い薬や副作用の少ない薬を開発する研究が考えられる(図1)。DR 研究(特に、既存薬の新たな薬理作用を発見し適応拡大する研究)の利点は、既に臨床で使われている医薬品なので、ヒトでの安全性や体内動態などがよく分かっており、臨床試験で予想外の副作用や体内動態の問題が発生し開発が失敗する可能性が少ない、即ち医薬品開発の成功確率が高いことである。もう一つの利点は、既にあるデータ(動物での安全性試験や第一相臨床試験など)を利用出来るので、開発にかかる時間とコストを削減できることである。言い換えれば、早く安く安全な医薬品を患者さんに届けられるのが、DR 研究の利点である。

以下に我々がこれまでに行ってきた DR 研究を、NSAID を例に紹介する。

2. NSAID に関する DR 研究 —胃潰瘍副作用に関して—

アスピリン、インドメタシンを代表とする NSAID は世

界でもっともよく使用されている医薬品である。NSAID はシクロオキシゲナーゼ(COX)の阻害剤であり COX 依存に産生されるプロスタグランジン E₂(PGE₂, 炎症増悪因子)を減少させることにより抗炎症作用を発揮する。一方、その副作用である胃潰瘍が臨床現場で大きな問題になっている(米国ではエイズを上回る、年間 16,500 人が NSAID 潰瘍で亡くなっている)。従来は COX 阻害による PGE₂ 低下が胃潰瘍副作用の原因と考えられてきたが(PGE₂ が胃粘膜保護作用を持つため)、最近ではこれ以外の未解明の作用も関与していると考えられるようになってきた。

そこで我々は DNA チップを用いて NSAID により誘導される遺伝子を解析するなど、NSAID の作用を最新の分析手法を用いて分子レベルで網羅的に解析した。その結果、NSAID が抗炎症タンパク質であるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)を誘導することが NSAID の主作用(抗炎症作用)に関与することだけでなく、NSAID が細胞膜を傷害し、細胞の外から内へのカルシウム流入を促進すること、これにより小胞体ストレス応答を誘導し、CHOP(アポトーシス誘導性の転写因子)を増やし胃粘膜細胞にアポトーシスを誘導すること、そしてこのアポトーシスが NSAID の副作用(胃潰瘍)に関与することを見出した²⁻⁴⁾。具体的には、①10 種類の NSAIDs において、膜傷害性とアポトーシス誘導性の強さに強い相関性が見られたこと、②カルシウムキレーターや CHOP 遺伝子のノックアウトにより NSAIDs 依存のアポトーシスが抑制されたこと、③ NSAIDs によるアポトーシスが起らない条件では、NSAID 潰瘍も起らないことを発見した。

我々が膜傷害性の少ない NSAIDs を発見できれば、胃潰瘍副作用の少ない NSAIDs の開発に繋がると考えた。そこで、既存の NSAID の中で最も膜傷害性の少なかったロキ

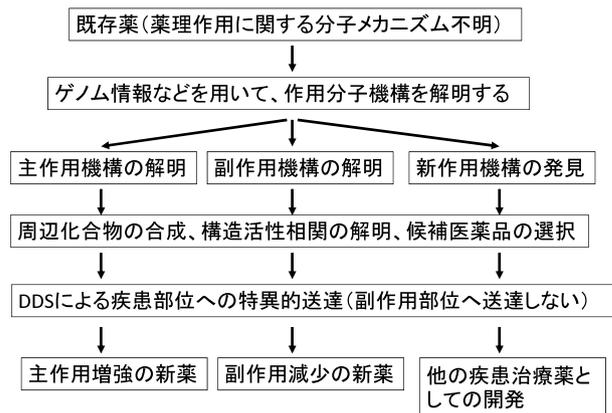


図1 DR 研究戦略

ソプロフェンに対して様々な誘導体を合成し、膜傷害性をほとんど持たない誘導体、フルオロ-ロキソプロフェンを発見した。そして、それがロキソプロフェンと同等の抗炎症作用を持つにも関わらず、胃潰瘍をほとんど起こさないことを示した（胃潰瘍を起こす強さはロキソプロフェンの20分の1以下）⁵⁻⁷⁾。この成果は、DR研究が既存薬の副作用発症機構の解明と、副作用の少ない新薬の開発につながることを示している。

3. NSAIDに関するDR研究

—抗がん、抗アルツハイマー病作用に関して—

一方、疫学調査からNSAIDの長期服用により、がん、及びアルツハイマー病の発症リスクが大きく低下することが明らかになった。しかしNSAIDががん、及びアルツハイマー病の発症を抑える分子機構はほとんど分かっていなかった。

我々はPGE₂ががん細胞の増殖を促進しアポトーシスを抑制することを示すと共に、上述のDNAチップを用いた解析から、NSAIDがタイトジャンクション（TJ）関連遺伝子の発現を誘導することを見出した。そしてこの作用がNSAIDの抗がん作用に関与することを示唆した。具体的には、NSAIDがカルシウム流入を増加させることによりTJを構成するクロージンの発現を変化させ、これによりがん細胞の運動性や浸潤性（がんの転移に関係する）が低下することを見出した⁸⁻¹¹⁾。さらに、NSAIDがPGE₂を低下させること、及び小胞体シャペロンを誘導することにより、βアミロイド（アルツハイマー病の原因タンパク質）の産生を抑制することがNSAIDの抗アルツハイマー病作用に関与することを見いだした（図2）¹²⁻¹⁵⁾。

我々は、TJ関連遺伝子を強く誘導するNSAIDsを抗がん剤として、小胞体シャペロンを強く誘導するNSAIDsを抗アルツハイマー病薬とし開発する研究を進めている。このようにDR研究は、疫学等から示唆された既存薬の新しい薬理作用に関する分子機構の解明と、その作用の強い医薬品の開発に繋がる研究でもある。

さらに我々はこのDR研究から見出された、PGE₂がβアミロイドの産生を抑制するメカニズムを詳細に解析した。その結果、EP4受容体（PGE₂の受容体の一つ）がβアミロイドの前駆体タンパク質（APP）、及びβアミロイドを産生するプロテアーゼ（γセクレターゼ）と細胞膜上で結合しており、PGE₂がEP4受容体と結合すると、その受容体と共にAPPとβアミロイドも内在化し、結果としてβアミロイドの産生が促進されるというメカニズムを

明らかにした^{13,14)}。また我々は、EP4受容体のノックアウトマウスを用いた研究などから、EP4受容体の阻害はアルツハイマー病モデルマウスの記憶学習能力を改善させることを見出した¹⁵⁾。この結果は、EP4受容体特異的アンタゴニストが、アルツハイマー病治療薬として有望であることを示している。実際我々は製薬企業と共同で、EP4受容体特異的アンタゴニストがアルツハイマー病モデルマウスの記憶学習能力を改善させることを示し、現在その開発を行っている。このようにDR研究は、新しい生命現象の発見（EP4受容体が記憶学習能力を負に制御していること）、及び新しい創薬ターゲットの発見（アルツハイマー病治療薬のターゲットとしてのEP4受容体）にも繋がる。

4. まとめと今後の展望

これまで我々は、特定の既存薬（NSAIDなど）に着目してその新しい作用を網羅的に検索する研究手法をとってきた。しかしこのような方法では発見出来ない既存薬の新しい薬理作用も多いと思われる。そこで、特定の薬理作用を持つ既存薬を網羅的に検索することが重要である。この目的のために我々は、独自に既存薬ライブラリー（我が国で市販されている医薬品約800種の内、700種を網羅）を構築し、それを用いて特定の薬理作用を持つ既存薬を検索する研究を開始している。既に、アセトアミノフェン（解熱薬）ががん幹細胞の分化を誘導し、抗がん剤に感受性化することなどを発見している¹⁶⁾。

DR研究を効率的に行うためには、大学・企業のネットワークが必要である。大学には独自の医薬品スクリーニング系を有している研究者が多い。そこで各企業から既存薬を集め、それを各大学研究者が自らの医薬品スクリーニング系で解析し創薬研究に繋がる成果を得て、それを基に企

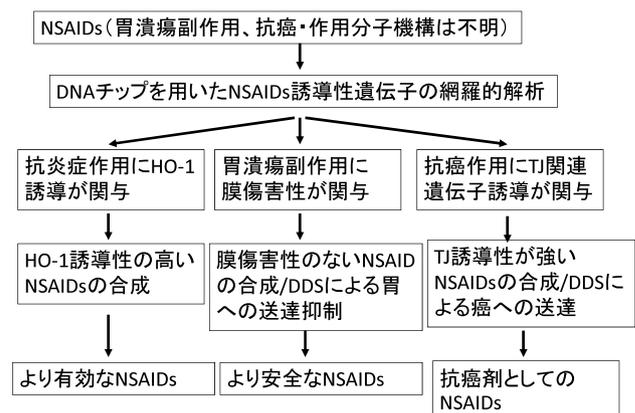


図2 NSAIDsに関するこれまでの研究

業が医薬品開発を行う、このようなシステムを構築できれば停滞している我が国の創薬研究を活性化できると考えている。また各大学研究者が有する医薬品スクリーニング系は自身の基礎研究と直結しているので、その系に作用する医薬品を発見することは、大学研究者の基礎研究の発展にも貢献する。このように大学・企業のネットワークを用いてDR研究を行うことは様々な面で有用である。

- 1) Aburaya, M., Tanaka, K., Hoshino, T., Tsutsumi, S., Suzuki, K., Makise, M., Akagi, R., & Mizushima, T. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 33422–33432.
- 2) Tanaka, K., Tomisato, W., Hoshino, T., Ishihara, T., Namba, T., Aburaya, M., Katsu, T., Suzuki, K., Tsutsumi, S., & Mizushima, T. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 31059–31067.
- 3) Tsutsumi, S., Gotoh, T., Tomisato, W., Mima, S., Hoshino, T., Hwang, H.J., Takenaka, H., Tsuchiya, T., Mori, M., & Mizushima, T. (2004) *Cell Death Differ.*, **11**, 1009–1016.
- 4) Tomisato, W., Tsutsumi, S., Hoshino, T., Hwang, H.J., Mio, M., Tsuchiya, T., & Mizushima, T. (2004) *Biochem. Pharmacol.*, **67**, 575–585.
- 5) Yamakawa, N., Suemasu, S., Kimoto, A., Arai, Y., Ishihara, T., Yokomizo, K., Okamoto, Y., Otsuka, M., Tanaka, K., & Mizushima, T. (2010) *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 398–403.
- 6) Yamakawa, N., Suemasu, S., Matoyama, M., Kimoto, A., Takeda, M., Tanaka, K., Ishihara, T., Katsu, T., Okamoto, Y., Otsuka, M., & Mizushima, T. (2010) *J. Med. Chem.*, **53**, 7879–7882.
- 7) Yamakawa, N., Suemasu, S., Matoyama, M., Tanaka, K.-i., Katsu, T., Miyata, K., Okamoto, Y., Otsuka, M., & Mizushima, T. (2011) *Bioorg. Med. Chem.*, **19**, 3299–3311.
- 8) Mima, S., Tsutsumi, S., Ushijima, H., Takeda, M., Fukuda, I., Yokomizo, K., Suzuki, K., Sano, K., Nakanishi, T., Tomisato, W., Tsuchiya, T., & Mizushima, T. (2005) *Cancer Res.*, **65**, 1868–1876.
- 9) Hoshino, T., Tsutsumi, S., Tomisato, W., Hwang, H.J., Tsuchiya, T., & Mizushima, T. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 12752–12758.
- 10) Namba, T., Homan, T., Nishimura, T., Mima, S., Hoshino, T., & Mizushima, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 4158–4167.
- 11) Mima, S., Takehara, M., Takada, H., Nishimura, T., Hoshino, T., & Mizushima, T. (2008) *Carcinogenesis*, **29**, 1994–2000.
- 12) Hoshino, T., Nakaya, T., Araki, W., Suzuki, K., Suzuki, T., & Mizushima, T. (2007) *Biochem. J.*, **402**, 581–589.
- 13) Hoshino, T., Nakaya, T., Homan, T., Tanaka, K., Sugimoto, Y., Araki, W., Narita, M., Narumiya, S., Suzuki, T., & Mizushima, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 32676–32688.
- 14) Hoshino, T., Namba, T., Takehara, M., Nakaya, T., Sugimoto, Y., Araki, W., Narumiya, S., Suzuki, T., & Mizushima, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 18493–18502.
- 15) Hoshino, T., Namba, T., Takehara, M., Murao, N., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Matsushima, T., Suzuki, T., & Mizushima, T. (2012) *J. Neurochem.*, **120**, 795–805.
- 16) Takehara, M., Hoshino, T., Namba, T., Yamakawa, N., & Mizushima, T. (2011) *Biochem. Pharmacol.*, **81**, 1124–1135.

水島 徹

(慶應義塾大学薬学部)

Novel pharmacological effects of NSAIDs and their molecular mechanism

Tohru Mizushima (Faculty of Pharmacy, Keio University, 1-5-30 Shibakoen, Minato-ku, Tokyo 105-8512, Japan)

神経軸索の再生における Dock3 の機能

1. はじめに

細胞骨格制御とそれによって引き起こされる細胞の運動は、基本的な生命現象の一つとして様々な細胞の機能に関わっている。たとえば免疫細胞の遊走、神経細胞の形態形成、さらにはがん細胞の浸潤・転移などにおいても、多くの役割をはたすことが明らかとなっている。なかでも細胞骨格のひとつであるアクチン骨格は、細胞の動的な形態変化を引き起こす中心的な役割を担っている。運動している細胞の先端では急速なアクチンの重合が起こり、運動の駆動力を生み出す細胞の突起が形成される。このようなアクチン骨格の再編成は、主に Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 (Rac1, Cdc42, RhoA など) によって制御されている。たとえば Rac1 が細胞の先端部で活性化すると平板な葉状仮足 (ラメリポディア) が形成されて駆動力が生まれ、Cdc42 が活性化すると糸状仮足 (フィロポディア) が形成されて細胞の進行方向を探る。こうした機能は神経細胞でも重要であり、外界からの刺激に応じて形態を変化させることにより、細胞極性や軸索伸長にも関与すると考えられている。

一方、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の活性を制御する分子としてグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor, GEF) が知られている。つまり細胞は GEF の活性を調節することによってアクチン骨格の動態を制御することになる。GEF はこれまでに約 80 種類が知られているが、近年新しいタイプの GEF として Dock ファミリー分子が発見された (図 1)¹⁾。現在では Dock ファミリー分子の解析が進み、様々な疾患への関与も指摘されつつある。興味深いことに Dock ファミリー分子の中で中枢神経に特異的に発現するのは Dock3 のみであることから、著者らのグループを含め、いくつかの研究