

ゴルジ体を標的とする新しいがん治療薬の開発

## 《研究の概要》

近年開発が進んでいる分子標的抗がん剤は、がんで特異的に活性化しているがん遺伝子産物を標的としており、高い治療効果かつ低毒性を実現している。しかしながら、分子標的薬の開発が進んでいないがんや分子標的薬に耐性を獲得したがんなど、有効な治療法が存在しないがんは多数残されており、このようなアンメットメディカルニーズに応える新たなコンセプトの抗がん剤が求められている。そこで我々は、タンパク質の成熟化や輸送を司るゴルジ体に着目した。これまでに、ゴルジ体の機能に必須な Arf1 と Arf1 の活性化因子 (GEF) との相互作用を阻害するブレフェルジン A (BFA) という薬剤が報告されている。BFA は試験管レベルおよび動物レベルで抗がん作用を示すが、類縁体も含めて抗がん剤として実用化されておらず、ゴルジ機能障害がどのようにして抗がん作用にいたるのか、その分子機序も明らかにされていない。我々はこれまでに、抗がん物質の分子メカニズムを予測することができる独自の JFCR39 パネルシステムを用いて、BFA と類似の作用メカニズムを持つ新規抗がん物質 M-COPA (別称 AMF-26) を同定し、本剤が BFA 同様ゴルジ体構造を破壊すること、特定のがん細胞に顕著な抗がん効果を示すことを明らかにしてきた。また、本剤は元来、希少な天然化合物を材料としているが、安価な試薬を原料とした大量人工合成法の開発に成功しており、本剤を起点としたゴルジ体を標的とした抗がん剤の創薬研究が可能となった。そこで、本研究事業では、M-COPA より活性が高く物性の優れた誘導体の検索をするとともに、M-COPA がどのようながんに対してどのような分子機構で奏功するのかを明らかにする目的で研究を進めた。誘導體展開については、M-COPA と同程度の活性を保持し、代謝安定性の優れた 5 種類の化合物を選抜し、動物実験のための大量合成を進めている。M-COPA が奏功するがんとその抗がんメカニズム研究については、小胞体ストレスシグナルの 1 つである PERK の活性化を介する抗がんメカニズムと、細胞表面に発現する受容体チロシンキナーゼ (RTK) が異常に活性化したがんに対する RTK の細胞表面への輸送を阻害することによる抗がんメカニズムの 2 つがあることを明らかにした。前者については、ヌードマウス皮下に移植したヒト乳がん由来 BSY-1 細胞や胃がん由来 MKN-1 細胞で、M-COPA 投与後に顕著な PERK シグナルの活性化がおこること、shRNA による PERK 遺伝子のノックダウンにより抗がん効果が減弱することを示した。後者については、有効な分子標的薬がまだ得られていない MET 増幅胃がんや、第一世代のチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) や第三世代の TKI に耐性を獲得した EGFR 変異肺がん M-COPA が奏功することを示した。以上のように、本研究事業の成果により、有効な分子標的薬が開発されていないがんや、分子標的薬に薬剤耐性を獲得したがんに対して、ゴルジ体を標的とした薬剤が有効である可能性が示され、M-COPA をリードとした今後の薬剤開発が期待された。

且 慎吾

公益財団法人がん研究会

研究全般

がん化学療法センター分子薬理部 副部長

椎名 勇

東京理科大学

化合物の調製・供給

理学部化学科 教授

## 研究報告

### I 研究目的

がんの薬物療法に用いられる化学療法剤は、その多くが DNA 複製や紡錘体形成を抑制することによりがん細胞の増殖を抑制するが、増殖が盛んな正常細胞にも毒性を示すため、時に深刻な副作用を伴う。20 世紀後半からの分子生物学の進歩により、がんの増殖メカニズムについて分子レベルでの理解が進み、その成果として 2000 年前後よりがん細胞において特異的に活性化された分子を標的とした抗がん剤が次々と開発された。これら分子標的抗がん剤の多くは、がん細胞の表面または細胞内で特異的に活性化しているチロシンキナーゼを標的としており、高い治療効果かつ低毒性を実現している。しかし、がんで活性化しているすべてのがん遺伝子についての有効な分子標的薬が見出されていないばかりか、そもそも有効な治療標的が見つかっていないがんも多数残されている。また、有効な分子標的抗がん剤であっても長期間投与することにより薬剤耐性を生じ、治療効果の減弱により再発することが報告されている。そこで、このような有効な治療法がないがんのアンメットメディカルニーズに応える新たなコンセプトの抗がん剤の開発が求められている。

代表研究者らはこれまでに、39 種類のがん細胞株を用いて独自に開発したスクリーニングシステムを活用し、多くのユニークな新規抗がん物質の同定とその作用機序の解析を行ってきた。その過程で見出した新規抗がん物質 AMF-26 (M-COPA) は、既存の抗がん剤とは異なるユニークな抗がんスペクトルを示すこと、ゴルジ体による小胞輸送を制御する低分子量 G タンパク質 Arf1 の阻害剤ブレフェルジン A (BFA) の抗がんスペクトルと類似することから、BFA と同様のゴルジ体機能阻害剤として働くことが示唆された。実際、本剤はがん細胞のゴルジ体構造を破壊し、*in vivo* で顕著な抗がん作用を示したことから (大橋ら、*J Biol Chem*, 2012)、がんの新たな分子標的としてゴルジ体に着目して研究を進めている。

ゴルジ体は、タンパク質の翻訳後修飾や輸送に重要な役割をする細胞内器官である。受容体チロシンキナーゼなどの細胞表面に発現する分子や細胞外に分泌される分子は、その分子の遺伝情報をコードする DNA から RNA を経て新生タンパク質に翻訳された後、小胞体～ゴルジ体を経て機能タンパク質として成熟し、ゴルジ体より出芽した輸送小胞により細胞膜へ輸送される。がんにおいては、ゴルジ体に局在するタンパク質糖転移酵素の活性化や、種々の受容体チロシンキナーゼの発現亢進が報告されており、ゴルジ体の機能を抑制することによりこれらのがんを抑制できると期待される。Arf1 は、小胞体～ゴルジ体～細胞膜間の小胞輸送(メンブレントラフィック)を調節する分子であり、BFA により Arf1 とその活性化因子である GEF (グアニンヌクレオチド交換因子) の相互作用が阻害されるとゴルジ体構造が破壊され、ゴルジ体機能障害をきたす。実際、BFA は試験管レベルおよび動

物実験レベルで抗がん作用を示すことが報告されているが(Sausvilleら、Cancer J Sci Am. 1996)、抗がん剤として実用化されていない。一方、BFAによりゴルジ体機能を阻害すると小胞体(ER)ストレスシグナルが強力に活性化されることが知られているが、ERストレスシグナルと抗がん効果の関連も解明されていない。

AMF-26は元来、子囊菌トリコデルマ由来の天然化合物を原料に合成された化合物であり大量調整が困難であったが、我々はこれまでに本化合物の人工合成に成功し、2-メチルコプロフィリンアミド(M-COPA)と命名した(椎名ら、J. Med. Chem. 2013)。本研究では、ゴルジ体を標的とした新たながん治療法実現に向けて、M-COPAおよびその類縁体を手掛かりに、Arf1阻害を介したゴルジ体の破壊と抗がん効果の因果関係を分子レベルで解明するとともに、ゴルジ標的薬が奏功するがんを同定することを目的とする。

## II 研究計画および材料と方法

本研究では、ゴルジ体を標的としたがん治療法実現に向けて、以下の①～④の研究項目に分けて研究を推進した。以下に、各項目の研究計画および方法を記す。

### ① M-COPA およびその誘導体の合成とその活性評価

我々はこれまでに、分子内に7か所の不斉炭素を持つM-COPAを、独自の合成技術である不斉アルドール反応、計算化学支援による立体選択的分子内ディールス・アルダー反応、高効率脱水縮合反応を駆使して人工合成する方法を開発した。本研究では以上の方法を利用して、M-COPAの新規誘導体を作成し、がん細胞株に対する試験管レベル(in vitro)の増殖抑制活性、および、ゴルジ体構造を破壊し細胞質に散在化させる(ゴルジ体散在化)活性を指標に活性評価を行うとともに、項目②以下のin vitroおよび動物レベル(in vivo)での研究の遂行に十分量のM-COPAの合成、供給を行う。BSY-1細胞株およびJFCR39パネルに対する増殖抑制活性は、スルホロダミンBを用いた方法を用いた。また、ゴルジ体散在化活性の評価は、ゴルジ体に局在するGBF1に対する蛍光免疫染色法を用いた。増殖抑制活性とゴルジ体散在化活性を用いて構造活性相関解析を行った。

### ② M-COPA が著効するがん細胞の検索と薬剤耐性細胞の樹立

M-COPAはマウスゼノグラフトモデルにおいてヒト乳がん細胞株BSY-1由来の腫瘍を完全に退縮させる一方、ヒト結腸がん細胞株HT-29にはほとんど抗がん効果を示さない。このように、M-COPAのようなゴルジ体を標的とした抗がん物質による抗がん分子機構を明らかにするためには、M-COPAがどのようながんに奏功するのか、どのようながんに奏功しないのかを明らかにする必要がある。また、奏功するがん細胞にM-COPAを長期投与して薬剤耐性を獲得する細胞株を取得することができれば、抗がんメカニズムの解析に有用であると考えられる。そこで、M-COPAが奏功するがん細胞株のスクリーニング、および、M-COPA耐性を示す細胞株の樹立を計画した。なお、種々のがん細胞株をヌードマウスの皮下に移植したゼノグラフトモデルを用いたM-COPA感受性試験結果は、それぞれのがん細胞株の試験管内での感受性を反映しないことから、感受性細胞のスクリーニングはヌードマウス皮

下移植モデルを用いて行った。一方、M-COPA 耐性株の樹立は、*in vitro* および *in vivo* 両方で検討を行った。また、得られた M-COPA 耐性株の耐性メカニズムを明らかにする目的で、次世代シーケンサーを用いたフルエクソンシーケンス解析を行い、耐性株で特異的に認められる遺伝子変異の中から耐性の原因となる遺伝子変異を同定し、実験的に耐性化に関わるかを CRISPR/Cas9 遺伝子編集技術を用いて検証した。

### ③ Arf 阻害・ゴルジ体の破壊が誘導する抗がん作用における ER ストレスシグナルの役割

既知の Arf1 阻害剤 BFA は、ER-ゴルジ間の小胞輸送を阻害し、強力に ER ストレスシグナルの活性化を惹起することが報告されている。我々はこれまでに、M-COPA が BFA と同様にがん細胞に ER ストレスシグナル活性化を起こすこと、顕著な抗がん効果を示す BSY-1 細胞では ER ストレスシグナルの 1 つである PERK の選択的阻害剤 GSK2656157 により M-COPA による抗がん効果・アポトーシス誘導が顕著に抑制されるとの予備検討結果を得ている。このことから、M-COPA による抗がん作用機序に、ER ストレス、特に PERK 経路が関与していると考えられた。本研究では、*in vitro* および *in vivo* において、M-COPA 投与後の細胞内 ER ストレスシグナル関連分子の変動について、ウェスタンブロット法で詳細に検討した。また、RNA 干渉を用いて ER ストレス関連分子をノックダウンした際、M-COPA の抗がん作用が減弱するかを *in vitro* および *in vivo* で調べた。

### ④ M-COPA によって発現減少するがん細胞表面分子の解析とその抗がん作用との関連

ゴルジ体は、細胞表面タンパク質や分泌タンパク質の輸送・翻訳後修飾を調節する。M-COPA は Arf1 の活性化を阻害してゴルジ体構造を破壊することから、これらのステップを阻害することが予測される。実際 M-COPA は細胞接着分子 ICAM-1 や血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR) の細胞表面発現を減少させることが報告されている (渡ら、Int J Cancer, 2012)。一部のがんにおいて、種々の受容体型チロシンキナーゼ (RTK) 遺伝子が遺伝子増幅や変異により活性化し、がん細胞の増殖・生存が活性化型 RTK に依存 (オンコジーンアディクション) していることが知られていることから、M-COPA はがん細胞の表面に発現する RTK の発現を抑制することにより RTK 依存がんの抗がん効果を発揮するものと予測した。

RTK に対する治療剤は、例えば上皮成長因子受容体 (EGFR) に活性化変異を持つ非小細胞肺癌に対する EGFR チロシンキナーゼ活性を ATP 競合的に抑制する阻害剤 (TKI) であるゲフィチニブが開発され、臨床で生存期間の有意な延長を示している。しかし、がんが活性化していることが知られているすべての受容体型チロシンキナーゼに対する阻害剤が開発済みというわけではなく、有効な治療薬の開発が進んでいないものも多い。また、有効な TKI が使用できても、多くの場合長期投与後に RTK 遺伝子に薬剤耐性変異を起こすことが知られており、TKI とは異なる作用機序の治療薬の開発が期待されている。そこで本研究項目では、有効な TKI の開発が遅れている MET や FGFR2 といった RTK を遺伝子増幅する胃がんや、TKI の獲得耐性が問題となっている EGFR 変異非小細胞肺癌に対する M-COPA の抗がん効果について検討をすることとした。具体的には、これらのがん細胞が細胞表面に発現する RTK に対する M-COPA の影響、RTK 下流の増殖シグナルや細胞増殖への影響を検討した。また、ヌードマウスに移植したこれらのがん細胞に対する M-COPA の抗がん効果を

検討した。

### III 研究成果

#### ① M-COPA およびその誘導体の合成とその活性評価

M-COPA の構造式を図 1 に示す。本化合物の活性および物性（溶解性・代謝安定性など）を改善するために、母核（オクタヒドロナフタレン環）およびその側鎖構造に様々な修飾を加えた 91 種類の新規 M-COPA 類縁化合物を人工合成した。誘導体のデザインは、共同研究先のエーザイ株式会社が行った Arf1-Sec7-M-COPA 複合体の共結晶についての X 線構造解析結果に基づいて北里大学がコンピューター援用薬品設計を利用して提案し、東京理科大学・椎名研究室にて合成した。これらの化合物についてヒト BSY-1 細胞に対する増殖抑制効果をスルホロダミン B アッセイで、ゴルジ体を散在化させる効果をゴルジ体に局在する GBF1 を用いた蛍光免疫染色法で検討した。その結果、M-COPA と比較して抗がん活性やゴルジ体散在化活性が 100 分の 1 以下に低減する類縁体がある一方、両活性が維持されかつ溶解性が増す誘導体や、活性が増強する誘導体が見出された。また、興味深いことに、91 剤の M-COPA 類縁体について、増殖抑制活性とゴルジ体散在化活性に強い正の相関があることが示され（図 2）、ゴルジ体散在化と抗がん効果の因果関係が予測された。これまでの構造活性相関解析の結果、M-COPA と遜色ない活性を示し、なおかつ別途調べた肝ミクロソームでの代謝安定性や水溶性が優れた誘導体の選定を進め、5 種を動物レベルでの活性評価に必要な大量合成に進めた

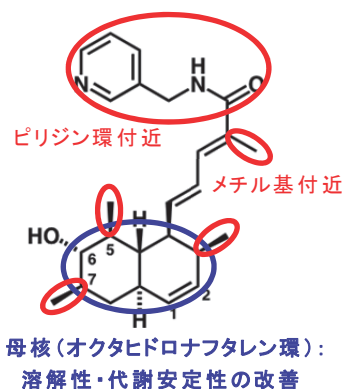


図 1 M-COPA の構造式と類縁化合物デザイン

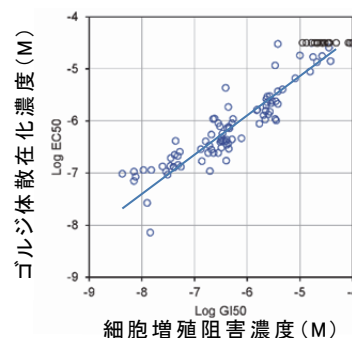


図 2 M-COPA 類縁体の細胞増殖阻害とゴルジ体散在化活性の相関

#### ② M-COPA が著効するがん細胞の検索と薬剤耐性細胞の樹立

M-COPA が奏功するがん細胞株の *in vivo* スクリーニングを 23 種類のヒトがん細胞株について実施した。3 匹のマウスを用いた一次スクリーニングの結果、M-COPA によって腫瘍増殖が完全に抑制されるか退縮傾向にある細胞株について、6 匹のマウスを用いた二次スクリーニングを実施し、新たに M-COPA 感受性が高い 2 種類の細胞株（胃がん細胞株 MKN-1、肺がん細胞株 NCI-H226）を同定した。

一方、試験管内で BSY-1 細胞に M-COPA を長期曝露して薬剤耐性を獲得した細胞を限界希釈法によりクローニングを行い、M-COPA に 100 倍以上耐性を示すクローンを得た。本クローンについて、次世代シーケンサーを用いたフルエクソンシーケンス解析を行い、耐性原因となりうる遺伝子の変異ステータスの変化を調査したところ、M-COPA の標的分子である Arf1 の活性化因子 (GEF) の 1 つである GBF1 にアミノ酸変異を伴う遺伝子変異が耐性ク

ローン特異的に認められた。このことから、この変異型 GBF1 が M-COPA に対する薬剤耐性の原因となっていることが期待された。その可能性を検証するために、CRISPR/Cas9 による遺伝子編集技術を用いてヒト 293T 細胞の GBF1 遺伝子に当該変異を導入したクローンを作製し、M-COPA に対する感受性を測定した。その結果、変異型 GBF1 を持つ 293T クローンは、親株に比べて M-COPA に対して 30 倍程度の薬剤耐性を示すことが明らかとなったことから、この変異型 GBF1 の出現が M-COPA 耐性の直接的な原因となっているものと結論された（赤塚ら、投稿準備中、研究成果 5）。

### ③ Arf 阻害・ゴルジ体の破壊が誘導する抗がん作用における ER ストレスシグナルの役割

*in vitro* で BSY-1 細胞および HT-29 細胞に対して M-COPA を添加した後の ER ストレス関連分子の変化をウェスタンブロット法により解析した。その結果、どちらの細胞でも ER ストレスセンサー分子である PERK や IRE1 $\alpha$  について、時間・濃度依存的にリン酸化が誘導され、M-COPA が ER ストレスを誘導することが示された。代表的な ER ストレス応答分子である BiP については、BSY-1 は 30 nM、HT-29 は 100 nM の M-COPA 添加で顕著な発現の上昇が生じ、この濃度は、細胞増殖が抑制される濃度と良く一致した。また、ER ストレス関連遺伝子に対する siRNA を用いた実験から、BSY-1 細胞において BiP と PERK の siRNA を用いることで、それぞれ M-COPA 感受性および耐性となった。これらの結果から、M-COPA の BSY-1 に対する *in vitro* 抗がん活性に対して、BiP は抑制的に、PERK は促進的に働くことが明らかとなった。

マウスゼノグラフトモデルを用いた *in vivo* 試験でも、M-COPA に高感受性を示す BSY-1 細胞で顕著な PERK のリン酸化、および、下流の eIF2 $\alpha$  のリン酸化が検出された。また、前項②で新たに見出した *in vivo* で M-COPA 感受性を示す MKN1 細胞でも同様な結果が認められた。そこで、M-COPA の *in vivo* 抗がん効果に対する PERK シグナル活性化の関与を検討するために、PERK に対する shRNA を導入した BSY-1 細胞をヌードマウス皮下に移植し、ゼノグラフト腫瘍を作製した。この腫瘍に対する M-COPA の効果を、親株 BSY-1 由来の腫瘍と比較した。その結果、親株は M-COPA を 50mg/kg で 5 日連続投与により腫瘍が完全に退縮したが、PERK shRNA 発現 BSY-1 細胞では腫瘍の完全退縮は起こらず、抗腫瘍効果は大きく減弱した。このことから、BSY-1 細胞ゼノグラフト腫瘍に対する M-COPA の *in vivo* 抗がん効果の少なくとも一部は、ER ストレスシグナルである PERK を介していることが証明された（赤塚ら、投稿準備中、研究成果 4）。

### ④ M-COPA によって発現減少するがん細胞表面分子の解析とその抗がん作用との関連

がんにおいて遺伝子増幅により異常な活性化が認められているものの、これまでに臨床試験で効果を示す TKI が得られていない MET 増幅胃がんに対する M-COPA の効果を解析した。その結果、複数の MET 増幅胃がん細胞に対し、M-COPA 添加により細胞表面の MET 発現量が低減する（図 3）と同時

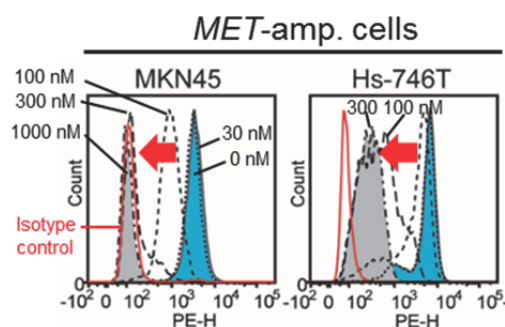


図 3 M-COPA による MET 増幅がんの MET 細胞表面発現の抑制



に、同じ濃度範囲で MET のプロセッシング・リン酸化の阻害、MET の下流シグナルの活性化阻害が起こることが確認された。また、これらの MET 増幅がんは、MET および他の RTK を発現亢進していない胃がん細胞株より M-COPA に対する感受性が有意に高いことが示された。さらに、MET 遺伝子増幅細胞株であるヒト胃がん MKN45 細胞株を用いたマウスゼノグラフトモデル試験において、M-COPA 投与により腫瘍増殖が顕著に抑制されることが示された。以上の結果から、MET 依存性の胃がんにおいて、M-COPA は MET の細胞表面発現阻害を介して抗腫瘍性を示すものと結論された。同様の傾向は、FGFR2 を増幅している胃がん細胞株でも認められたことから、これらの RTK を増幅する胃がんには M-COPA のようなゴルジ体機能阻害剤が有効であることが期待された（大橋ら、Cancer Res. 2016、研究成果 1）。

一方、有効な TKI が開発されているが、TKI の長期投与により薬剤耐性を獲得した肺がん細胞株に対する M-COPA の効果を解析した。M-COPA は、EGFR に活性化変異を持つ PC-9 細胞や NCH-H3255 に有意な抗がん効果を示すが、ゲフィチニブと比較すると効果は劣るものであった。一方、ゲフィチニブ長期投与により樹立した EGFR 遺伝子にゲフィチニブ耐性変異を有する PC-9R 細胞は、ゲフィチニブがまったく奏功しなかったが、M-COPA に対しては親株 PC-9 より良好な感受性を示すことがわかった。ゲフィチニブのような第一世代の EGFR-TKI に耐性を示す EGFR 遺伝子の二次変異には、第三世代の EGFR-TKI であるオシメルチニブが有効であることが示され、近年日米で承認された。しかし、本剤も長期投与後に EGFR 遺伝子に三次変異を来し、その結果薬剤耐性を獲得することが示されている。そこで本研究では、オシメルチニブ耐性を示す EGFR 三次変異を有する肺がん細胞株を入手し、これに対する M-COPA の効果を *in vitro* および *in vivo* ノードマウス同所移植モデルで検討したところ、オシメルチニブがまったく薬効を示さない細胞に M-COPA は顕著な抗がん効果を示した。以上のことから、M-COPA は、TKI 耐性を獲得した肺がん細胞の治療に有効である可能性が示された（大橋ら、投稿中、研究成果 3）。

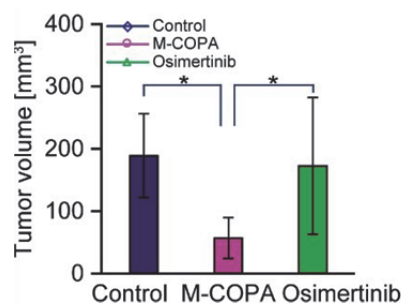


図 4 第三世代 EGFR-TKI に耐性を獲得した肺がんに対する M-COPA の *in vivo* 抗がん効果

#### IV 考察

項目①では、X線構造解析の結果に基づき設計した 91 種類の新規 M-COPA 類縁化合物を人工合成し、M-COPA より代謝安定性に優れ、*in vitro* で同程度の活性を持つ複数の化合物を同定することに成功した。M-COPA は動物レベルでいくつかのがん細胞株由来ゼノグラフトに顕著な抗がん効果を示すが、ヒトおよびマウス由来の肝ミクロソームによる代謝を受けやすく、代謝安定性がよくないが、今回見出した化合物は M-COPA と比較して代謝安定性が大幅に改善していることから、M-COPA より強い抗がん効果かつ低毒性であるものと期待される。これらの候補化合物はすでに大量合成を済ませ、今後 *in vivo* 抗がん試験を行う予定である。

項目②では、M-COPA が奏功するがん細胞株の *in vivo* スクリーニングを実施した。その



結果、*in vivo* で M-COPA に高感受性を示す細胞株として、新たに胃がん細胞株 MKN-1、肺がん細胞株 NCI-H226 を同定した。これらの細胞株は、以前 M-COPA 感受性株と同定した BSY-1 や RXF-631L と同じく、項目④で調べた RTK の活性化が起きている細胞株ではないが、PERK シグナルの活性化により下流の ATF4/CHOP の活性化を介した細胞死が起きているものと推察された。M-COPA の抗がん作用に PERK が重要な役割をなしていることは、*in vitro* だけではなく、PERK に対する shRNA を発現させた BSY-1 細胞を皮下に移植したマウスゼノグラフトモデルでも証明している。一方で、項目④で明らかにしたように、MET 増幅胃がん細胞 MKN-45 や、EGFR 活性化変異を有する非小細胞肺がん PC-9 は、主に細胞表面に発現している RTK の発現抑制を介した抗がん作用を示すものと考えられるが、PERK シグナル活性化の関与もあるものと推察される。現段階では M-COPA 処理により PERK シグナル活性化を介した抗がん効果を示す細胞とそうでない細胞にどのような違いがあるのかは明らかになっておらず、PERK 経路の活性化により M-COPA に高い感受性を示すがん細胞を見分けるためには、さらなる分子背景の解明が必要である。

最後に、項目④では、有効な TKI が得られていない MET・FGFR2 増幅胃がんや、TKI 耐性となった EGFR 変異非小細胞肺がんに対する M-COPA の有用性を明らかにした。胃がんではこれまでに、分子標的薬の開発が遅れており、進行・再発胃がんに対する薬物療法の成績はあまりよくない。MET 阻害剤の開発も進められているが、現在までに臨床試験で良好な治療効果を認めたものはなく、承認に至っていない。一方、第一世代の TKI であるゲフィチニブやエルロチニブに耐性になった EGFR 二次変異を有する肺がんに対する治療法としては、耐性変異型 EGFR にも奏功する第三世代の TKI であるオシメルチニブなどが開発され、昨年までに日米で承認されている。しかし、オシメルチニブに耐性を示す EGFR 遺伝子の三次変異の出現が報告されている。今後、EGFR 三次変異に対する TKI が開発されても、同じように薬剤耐性変異が生ずる可能性が高い。このことから、本剤のように、ゴルジ体機能を阻害することにより RTK の細胞膜上への輸送を抑制するという TKI とはまったく異なるメカニズムで RTK の活性化を抑え、抗がん効果を発揮する薬剤は、有効な TKI が得られていないがんや TKI 耐性がんなどアンメットニーズに対する治療オプションとして有用であると考えられる。また共同研究者の服部らは、本剤が病原性大腸菌が産生する毒素のエンドサイトーシスを抑制することで宿主細胞のアポトーシスを抑制することを報告した（服部ら、Genes Cells, 2016、研究成果 2）。以上のように、ゴルジ体機能を阻害する薬剤は、がんに限らずさまざまな疾患の治療薬として、今後の開発が期待される。

謝辞：本研究事業の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました、公益財団法人車両競技公益資金記念財団にこの場をお借りして深謝いたします。

## V 研究成果の発表（本研究事業に厳密に関連するもののみ）

1. Ohashi Y, Okamura M, Hirose A, Tamaki N, Akatsuka A, Wu KM, Choi HW, Yoshimatsu K, **Shiina I**, Yamori T, **Dan S**. M-COPA, a Golgi Disruptor, Inhibits Cell Surface Expression of MET Protein and Exhibits Antitumor Activity

- against MET-Addicted Gastric Cancers. **Cancer Res.** 76(13):3895-3903;2016.
2. Hattori T, Watanabe-Takahashi M, **Shiina I**, Ohashi Y, **Dan S**, Nishikawa K, Yamori T, Naito M. M-COPA, a novel Golgi system disruptor, suppresses apoptosis induced by Shiga toxin. **Genes Cells.** 21(8):901-906; 2016.
  3. Ohashi Y, Okamura M, Katayama R, Fang S, Tsutsui S, Akatsuka A, Shan M, Choi HW, Fujita N, Yoshimatsu K, **Shiina I**, Yamori T, **Dan S**. Targeting the Golgi apparatus to overcome acquired resistance of non-small cell lung cancer cells to EGFR tyrosine kinase inhibitors. 投稿中
  4. Akatsuka A, Okamura M, Hirose A, Ohashi Y, Choi HW, Yoshimatsu K, **Shiina I**, Yamori T, **Dan S**. M-COPA, a novel Golgi-Endoplasmic reticulum transport inhibitor exerts antitumor activity *via* activation of PERK-eIF2a pathway. 投稿準備中
  5. Akatsuka A, Moriya J, Fujimoto S, Kihara M, Ozawa K, Okamura M, Ohashi Y, Choi HW, Yoshimatsu K, **Shiina I**, Hirono S, Yamori T, **Dan S**. Point mutation of guanine nucleotide exchange factor GBF1 mediates acquired resistance to M-COPA *via* disabling M-COPA' s ability to interrupt Arf1-GEF activation. 投稿準備中