

平成 22 年 4 月 1 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17016085

研究課題名（和文） がん化シグナルと抗がん剤リードの探索

研究課題名（英文） Oncogenic signaling and screening of anticancer leads

研究代表者

上原 至雅 (UEHARA YOSHIMASA)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：50160213

研究成果の概要（和文）：足場非依存性増殖時においてのみアポトーシスを誘導する物質（anoikis 誘導物質）の探索を行った。その結果、hypothemycin などの MEK 阻害剤が、MEK-ERK 経路への依存度が高いヒトがん細胞に対して anoikis を誘導することを見出し、その分子機構を明らかにした。その他のがん化シグナル抑制物質として、anicequol、hsp90 阻害剤、セスキテルペンラクトンなどを見出し、これらの作用を解析した。

研究成果の概要（英文）：We searched for compounds that induce apoptosis in cancer cells only when cells are nonanchored (anoikis sensitizer). We found that MEK-inhibitors such as hypothemycin induce anoikis sensitivity in human cancer cells that rely heavily on the MEK-ERK pathway, and elucidated the molecular mechanism. We also discovered anicequol, HSP90 inhibitors, and sesquiterpene lactones as inhibitors of oncogenic signaling, and analyzed their mechanisms of action.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	10,000,000	0	10,000,000
2006 年度	10,400,000	0	10,400,000
2007 年度	10,400,000	0	10,400,000
2008 年度	9,400,000	0	9,400,000
2009 年度	9,400,000	0	9,400,000
総計	49,600,000	0	49,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：アポトーシス、anoikis、MEK 阻害剤、hypothemycin、BH3-only protein、Hsp90 阻害剤、anicequol、resorcylic acid lactones

1. 研究開始当初の背景

足場非依存性増殖はがん細胞の生化学的特性の中で造腫瘍性と最も相関性が高い事が知られている。この足場非依存性増殖を選択的に阻害する物質の探索を効率よく行うために、親水性ポリマーである

poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (polyHEMA) でコートした 96 穴プレートを用いる定量法を開発し探索を行った。

その結果、糸状菌由来の新規物質 anicequol や spicamycin 新規類縁体、

hypothemycin 等を単離し、構造を決定した。

一方、MEK 阻害剤 U0126 が ras でトランスフォームしたラット繊維芽細胞の足場非依存性増殖を選択的に抑制することを見出した。U0126 および別の MEK 阻害剤である PD98059、mTOR 阻害剤 rapamycin を用いた解析から、ras でトランスフォームした NRK 細胞の表現型の正常化には、ERK と p70S6K の両経路を同時に遮断することが必要であることを示唆した。さらに、ヒト培養がん細胞株に対する阻害剤の影響を調べた。大腸癌、乳癌の中に U0126 処理によって anoikis 感受性になる細胞があった。anoikis 感受性となる細胞では U0126 は MEK-ERK に加え、p70S6K の経路を阻害していた。anoikis が誘導されない細胞では、ERK の活性化は抑制されたが、p70S6K はほとんど影響を受けなかったことから、mTOR-p70S6K 経路は細胞によっては主に MEK-ERK によって制御されること、またそのようながん細胞に対して MEK 阻害剤は anoiki を誘導する有効な治療薬となりうることを示唆した。

このような背景から、申請者らが開発した polyHEMA 細胞培養法は、選択性の高いがん分子標的治療薬リードの作用機序解明と探索に有用と考えられた。

2. 研究の目的

上皮や内皮由来の細胞は、基質から遊離すると apoptosis を起こし死滅する。この機構は anoikis と呼ばれ、正常細胞が異所性に生存、増殖することを防いでいる。がん細胞は anoikis を回避し無秩序に増殖や転移を起こす。従って、足場非依存性増殖時においてのみ apoptosis を誘導する物質 (anoikis 感受性誘導物質) は副作用の少ない新しい抗がん剤になる可能性がある。本研究では、主に上皮系のヒト培養がん細胞

株を用い、各種阻害剤の anoikis 誘導能を調べ、生存に関与するシグナル伝達を解析するとともに、anoikis 誘導物質の探索を行う。そのために申請者らが開発した polyHEMA 細胞培養法を用い、がん細胞の足場非依存性の生存・増殖能を標的とした抗がん剤リードを見出し、分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1)モノレイヤーの細胞増殖よりも足場を除去した polyHEMA 上の細胞増殖をより強く阻害する物質の探索とその作用機構の解析を行う。がん細胞の特異な増殖機構を明らかにし、がん化シグナル抑制物質を探索し、その作用の解析を通じて新しい抗がん剤を探索する。
(2)上皮や内皮由来の細胞は、基質から遊離するとアポトーシスを起こし死滅する。この機構は anoikis と呼ばれ、生体内において、細胞が本来存在すべきでない場所で生存、増殖することを防いでいる。がん細胞では anoikis を回避する機構が働き、無秩序な増殖や転移が起きる。そこで、上皮系のヒト培養がん細胞株を用い、各種阻害剤の anoikis 誘導能を調べ、生存に関与するシグナル伝達を解析するとともに、anoikis 誘導物質の探索を行う。

探索に用いる化合物は、微生物およびその誘導体からなる化合物ライブラリーと構造未知の真菌由来の 2 次代謝産物を用いる。上記のアッセイ系を利用することで細胞がん化のシグナル伝達を解析し、そのがん化シグナルを標的とする新しいタイプの抗がん物質の創製を目指す。

4. 研究成果

(1) MEK 阻害剤による anoikis 誘導と機構解析

ヒト大腸がん細胞株の足場非依存性増殖を選択的に抑制する物質の探索から、MEK 阻害活性が報告されている hypothemycin を真菌二次代謝産物から同定したので詳細な解析を行った。

①K-ras でトランスフォームした NRK 細胞での解析

KRAS でトランスフォームした NRK 細胞を hypothemycin (HPM) 処理すると形態が正常様になり、足場非依存性増殖も阻害された。HPM は MEK、ERK を含む 46 種のプロテインキナーゼに保存されているシステインに共有結合し、プロテインキナーゼを不活性化することが報告されている。しかし KRAS でトランスフォームした繊維芽細胞の形態変化や、PKD など HPM の標的となりうるシステインを持つ他のキナーゼに対する影響の解析から、HPM は細胞内ではかなり選択的に MEK-ERK 経路を阻害すると予想された。

次に、NRK 細胞を PDGF 刺激し、活性化される PI3K 経路及び MEK-ERK 経路への影響を調べた。HPM は PDGFR 自己リン酸化を強く阻害したが、PI3K 経路の AKT、S6R に対する影響は PDGFR に比べはるかに弱かった。これに対し MAPK 経路の ERK、p90RSK の活性化は PDGFR と同程度に阻害された。以上から HPM は細胞内では選択的に MEK-ERK 経路を阻害していること、また、HPM は PDGFR に加え MEK、ERK、p90RSK も不活性化するため、同一経路上を複数箇所遮断することで有効性が発揮されていることが確認された。

②ヒトがん細胞での解析

約 50 種類のヒトがん細胞株について HPM に対する感受性を調べた。その中で、B-RAF が変異しているがん細胞は HPM に感受性が高かった。HPM は RAF は阻害しないが、下流の MEK、さらに ERK、p90RSK を阻害する。BRAF が変異しているがんは、MEK-ERK 経路への依存度が高いと考えられるが、BRAF に変異があるがん細胞と KRAS に変異があるがん細胞に対する HPM の影響を比較すると、BRAF 変異がん細胞の感受性が高い傾向が見られた。しかし BRAF 変異があっても HPM や他の MEK 阻害剤に対する感受性が低いがん細胞もあることから、MEK-ERK 経路阻害による影響には他の要因も関与していると考えられた。B-RAF が変異しているがんは、MEK-ERK 経路への依存度が高いと考えられるが、制御を逸脱した増殖を抑制するためには B-RAF よりも下流の MEK を阻害する方が効果的であり、さらに複数箇所シグナルを遮断するとより有効である可能性が考えられた。

HT29 など BRAF に活性化変異 (V600E) があるがん細胞が HPM に対して高感受性であり、足場非依存性増殖が強く抑制される分子機構を解析した。その結果、BH3-only protein の BimEL のレベルが上昇したことから、MEK-ERK 経路阻害に起因する BimEL 蛋白量の増加が原因であると考えられた。

(2) 足場非依存性増殖抑制物質の探索と機構解析

真菌から見出した足場非依存性増殖の選択的阻害剤である anicequol (ANC) はステロイド骨格類似構造をも

つので、他の生理活性物質のステロイド、ステロール類の DLD-1 がん細胞に対する足場非依存的増殖阻害活性を検索したところ、25-hydroxycholesterol が DLD-1 の足場非依存的増殖を選択性高く阻害し anoikis を誘導することを見いだした。いくつかの生理活性を比較した結果、25-hydroxycholesterol との分子薬理メカニズムの類似性が示唆された。

一方、ANC の DLD-1 に対する anoikis 誘導活性について、細胞死シグナルに関与する因子の同定を試みた。その結果、ANC 処理細胞において、p38MAPK の活性化がおきていること、さらに、p38MAPK の下流因子である ATF-2 および HSP27 についても同様の活性化が起きていることが分かった。また、他の大腸がん細胞 HT-29 及び WiDr についても ANC が同様の anoikis 誘導活性をもつことを見出した。この結果は、大腸がん細胞特異的な機構が ANC のがん細胞に対する anoikis 誘導活性に関与することを示唆している。

浮遊培養状態で RNAi ノックダウンにより p38MAPK α の発現量を特異的に減少させたところ、ANC による anoikis 誘導活性が抑制されることを見出した。さらに Rho-kinase 阻害剤 Y27632 が ANC による anoikis 誘導活性を減少させることも判明した。p38MAPK 経路との関係を調べるため、Y27632 存在下で ANC による p38MAPK 誘導活性を検討したところ、p38MAPK の活性化(リン酸化)が抑制された。従って、p38MAPK 経路と Rho 経路のクロストークが ANC のもつがん細胞に対する anoikis 誘導活性に関与することが示唆された。

(3) その他のがん化シグナル伝達抑制物質の探索

①Hsp90 阻害剤である geldanamycin の誘導体 17-AAG、17-DMAG が、大腸がん細胞株 DLD-1、HT29 に anoikis を誘導した。このとき BimEL の増加は観察されず、Hsp90 阻害剤は MEK 阻害剤とは異なる機序で anoikis 感受性を誘導することが示唆された。また Hsp90 阻害剤は細胞間で感受性の差が大きく、調べた 17 細胞株の中で最も高感受性であった HT29 は、DLD-1 とは IC₅₀ に約 100 倍、最も低感受性であった HCT15 とは約 1,000 倍の開きがあった。各株間で Hsp90 量に差はなく、Hsp90 阻害剤処理による変動もなかったが、Raf 等の Hsp90 client protein は高感受性細胞株ほど低濃度で減少していた。

②植物由来のある種の sesquiterpene lactone が rapamycin とは異なる機序で mTOR 経路を遮断することを見出した。mTOR の標的である p70S6K は複数の酵素により複数の残基がリン酸化される。rapamycin は調べたすべての部位のリン酸化を抑制したのに対し、sesquiterpene lactone は mTOR の直接のリン酸化部位であるとされる T389 を選択的に抑制した。解析の結果、mTOR の分解の促進が見出された。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕(計 9 件)

1. Fukazawa H, Ikeda Y, Fukuyama M, Suzuki T, Hori H, Okuda T, Uehara Y. The resorcylic acid lactone hypothemycin selectively inhibits

- the mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinase pathway in cells. *Biol Pharm Bull.* 33 (2): 168-73, 2010.
- Nomura T, Uehara Y et al. (6名中2番目) Alkyl isothiocyanates suppress epidermal growth factor receptor kinase activity but augment tyrosine kinase activity. *Cancer Epidemiology* 33: 288-292, 2009.
 - Teruya T, Sasaki H, Fukazawa H, Suenaga K. Bisebromoamide, a Potent Cytotoxic Peptide from the Marine Cyanobacterium *Lyngbya* sp.: Isolation, Stereostructure, and Biological Activity. *Org Lett* 11:5062-5065, 2009.
 - Uto Y, Uehara Y et al. (15名中12番目) Design of antiangiogenic hypoxic cell radiosensitizers: 2-Nitroimidazoles containing a 2-aminomethylene-4-cyclopentene-1,3-dione moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16: 6042-6053. 2008.
 - Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Takahashi N, Yamagoe S and Uehara Y. Gamma-herpesviruses and cellular signaling in AIDS-associated malignancies. *Cancer Sci* 98: 1288-1296, 2007.
 - Nakamura H, Sasaki Y, Uno M, Yoshikawa T, Asano T, Ban HS, Fukazawa H, Shibuya M and Uehara Y. Synthesis and biological evaluation of benzamides and benzamidines as selective inhibitors of VEGFR tyrosine kinases. *Bioorg Med Chem Lett* 16: 5127-5131, 2006.
 - Murakami Y, Yamagoe S, Noguchi K, Takebe Y, Takahashi N, Uehara Y and Fukazawa H. Ets-1 dependent expression of vascular endothelial growth factor receptors is activated by latency-associated nuclear antigen of Kaposi's sarcoma herpesvirus through interaction with Daxx. *J Biol Chem* 281: 28113-28121, 2006.
 - Hosoya T, Uehara Y et al. (6名中3番目) New cytotoxic bisindole alkaloids with protein tyrosine kinase inhibitory activity from a myxomycete *Lycogala epidendrum*. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 2776-2780, 2005.
 - Igarashi Y, Uehara Y et al. (6名中5番目) Anicemycin, a novel antitumor substance from *Streptomyces thermoviolaceus* TP-A0648. *J Antibiotics* 58: 322-326, 2005.
- [学会発表] (計9件)
- 西谷直之、津田香代子、上原至雅:ゼブラフィッシュ胚を用いたがん分子標的薬探索系の開発、第13回日本がん分子標的治療学会学術集会、平成21年6月26日、徳島
 - 深澤秀輔: cis-enone resorcylic acid lactonesによるチロシンキナーゼ阻害、第13回日本がん分子標的治療学会学術集会、平成21年6月24-26日、徳島
 - 池田好美、鈴木岳之、深澤秀輔: Hypothemycinは細胞内で選択的にMEK-ERK経路を阻害する、日本薬学会第129年会、平成21年3月26-28日、京都

4. 上原至雅: がん分子標的治療薬の開発現況と将来動向、第 67 回日本癌学会学術総会レクチャーシンポジウム: がん分子標的治療におけるがん専門薬剤師の役割、平成 20 年 10 月 30 日、名古屋
5. 上原至雅: 課題と展望-日本発の創薬をめざして、第 67 回日本癌学会学術総会シンポジウム 1: アカデミアから創薬パイプライン創設へ向けての新しい流れ、平成 20 年 10 月 28 日、名古屋
6. 池田好美、鈴木岳之、上原至雅、深澤秀輔: Hypothemycin による MEK-ERK 経路の選択的阻害。日本薬学会第 128 年会、平成 20 年 3 月 26-28 日、横浜
7. 深澤秀輔、上原至雅: Cell-based screening approaches for identification of signal transduction inhibitors. 第 66 回日本癌学会学術総会 シンポジウム 分子標的としてのシグナル伝達 平成 19 年 10 月 3-5 日、横浜
8. 野口耕司、深澤秀輔、上原至雅: がん関連ウイルス EBV や KSHV の持続感染維持機構を標的とした分子標的薬開発のための研究、第 11 回がん分子標的治療研究会総会、平成 19 年 7 月 6 日、大阪
9. 深澤秀輔、上原至雅: プロテインキナーゼ阻害物質の探索。長浜バイオ大学、文部科学省がん特定領域研究・化学療法基盤情報支援班共催シンポジウム 「ケミカルゲノミクスから抗癌剤創薬への展開」 平成 17 年 11 月 4 日、長浜

〔図書〕 (計 2 件)

1. 西谷直之、上原至雅: 足場非依存性細胞増殖測定法および併用効果評価法。「がん分子標的治療研究 実践マニュアル」、日本がん分子標的治療学会 編集、曾根三郎/鶴尾 隆 編集代表、p76-83、金芳堂、2009.
2. 上原至雅、深澤秀輔: 細胞がん化のシグナル伝達と新規リード探索。シリーズ「がん研究のいま」 3. がんの診断と治療 (中村祐輔/稲澤譲治編)、p199-208、東京大学出版会、2006.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗ガン作用を有する化合物、その製造方法及び抗ガン剤

発明者: 上原至雅、深澤秀輔、ほか 2 名

権利者: 倉田毅: 国立感染症研究所所長

種類: 技術分野

番号: 特願 2004-186572

出願年月日: 2004 年 6 月 24 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 至雅 (UEHARA YOSHIMASA)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号: 50160213

(2) 研究分担者

深澤 秀輔 (FUKAZAWA HIDESUKE)

国立感染症研究所・生物活性物質部・室長

研究者番号: 10218878

(3) 連携研究者

()

研究者番号: