

機関番号：32612

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20611016

研究課題名（和文） 固形癌悪性化におけるXBP1の機能解析

研究課題名（英文） Studies on the role of XBP1 in tumor malignancy

研究代表者

田代 悦（TASHIRO ETSU）

慶應義塾大学・理工学部・講師

研究者番号：00365446

研究成果の概要（和文）：

小胞体内に不良タンパク質が蓄積することで引き起こされる小胞体ストレスは、低酸素・低栄養環境下にある固形がん細胞で観察され、特にその生存のために転写因子 XBP1(X-box binding protein 1)を活性化させている。そこで XBP1 の活性化阻害物質は固形がん選択的な治療薬になり得ると考え、その阻害物質を微生物培養液から探索した。その結果、2つの新規物質を含む3つの化合物の取得に成功した。それぞれの XBP1 阻害メカニズムを解析したところ、そのうちのひとつトヨカマイシンが XBP1 を強く阻害し、小胞体ストレス状態のがん細胞にアポトーシスを誘導した。よって、トヨカマイシンが新しい固形がん選択的ながん分子標的治療薬になることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Poorly vascularized solid-tumor cells encounter a range of cytotoxic conditions such as hypoxia and nutrient deprivation, which cause ER stress. These cytotoxic conditions in solid tumors are considered to adapt to ER stress by activating X-box binding protein 1 (XBP1). Therefore, we have been screening for an inhibitor of XBP1 activation, and we succeeded to identify three small molecule inhibitors. As we investigated the molecular mechanism by which these small molecule inhibitors inhibited XBP1, we found that toyocamycin strongly inhibited XBP1 and induced apoptosis in cancer cells only under ER stressed condition. Therefore, toyocamycin would be an inhibitor as a new molecular target therapy of cancer.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：9033（ケミカルバイオロジー）

キーワード：小胞体ストレス，XBP1，固形がん悪性化

1. 研究開始当初の背景

小胞体内に不良タンパク質が蓄積するこ

とで引き起こされる小胞体ストレスは、がんや神経変性疾患など様々な疾患の発症と密

接に関わっているが、詳細な分子機構については不明な点が多い。したがって、小胞体ストレスを制御する小分子化合物はこれら疾患発症の分子機構を解明するための有用なバイオプローブになるばかりでなく、治療薬にもなることが期待出来る。我々は、低酸素・低栄養環境下にある固形がん内部の細胞が小胞体ストレス状態にあり、その生存のために転写因子 XBP1 (X-box binding protein 1) を活性化させることで小胞体ストレスを緩和していることに着目した。すなわち、XBP1 の活性化を阻害する小分子化合物は固形がん選択的な治療薬になり得ると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、小胞体ストレスが誘導する XBP1 の活性化を抑制する物質のスクリーニングを微生物培養液より行い、阻害物質を単離精製すること。さらに単離した物質を用いて固形がん悪性化における XBP1 の機能を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

XBP1 mRNA は小胞体ストレスによりスプライシングを受けて活性型となる。この性質に着目し、XBP1 cDNA の下流にルシフェラーゼ cDNA を連結させたプラスミド (pcDNA3/XBP1-luc) を作製し、このプラスミドをヒト子宮頸がん HeLa 細胞に安定的に導入した HeLa/XBP1-luc 細胞を構築した。この細胞は、通常培養条件下では XBP1 mRNA 配列内に存在する終始コドンによってルシフェラーゼ mRNA は翻訳されない。しかし、小胞体ストレス状態になると XBP1 mRNA がスプライシングされるためにフレームシフトが起き、ルシフェラーゼ mRNA が翻訳される。すなわち、HeLa/XBP1-luc 細胞を用いると XBP1 の活性化をルシフェラーゼ活性で測定することが可能になる。この細胞を用いて、ルシフェラーゼの発光を指標に XBP1 阻害物質をスクリーニングした。

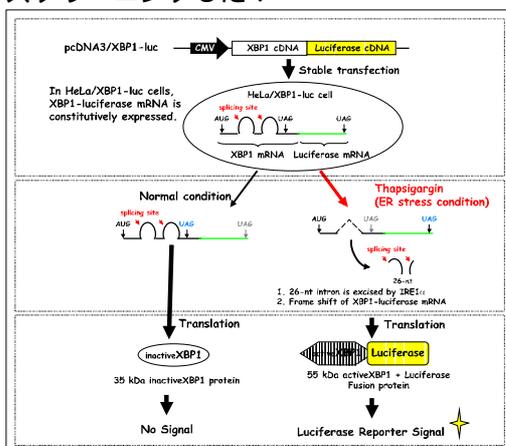


図 1. XBP1 阻害物質のスクリーニング方法

4. 研究成果

(1) XBP1 活性化阻害物質の単離

小胞体ストレスによる XBP1 活性化阻害物質を微生物培養液中からスクリーニングした結果、新規トリエン・アンサマイシン系化合物トリエリキシンとキノトリエリキシンの 2 化合物とトヨカマイシンの取得に成功した。次にそれぞれの化合物による XBP1 阻害メカニズムについて解析を行った。

(2) トリエリキシンとキノトリエリキシンによる XBP1 阻害機構の解析

トリエリキシンとキノトリエリキシンは XBP1 の活性化を nM オーダーで強く阻害し、またほぼ同濃度で様々ながん細胞の増殖を抑制したことから、トリエリキシンとキノトリエリキシンは XBP1 の活性化を阻害することが期待された。そこでキノトリエリキシンによる XBP1 阻害機構を解析したところ、キノトリエリキシンがタンパク質合成阻害活性を持っていることを見出した。さらにシクロヘキシミドやアノマイシンといった既存のタンパク質合成阻害剤も XBP1 活性化を阻害することがわかり、キノトリエリキシンはタンパク質合成阻害によって XBP1 活性化を阻害していることが強く示唆された。一方、同じくタンパク質合成阻害剤であるピューロマイシンは XBP1 活性化を阻害しなかったことから、キノトリエリキシンは小胞体内に流入する新生ポリペプチドの合成を阻害することで不良タンパク質の蓄積を抑制し、その結果として XBP1 活性化を阻害することが明らかになった。タンパク質合成阻害が XBP1 活性化を阻害することは初めての知見で、XBP1 を活性化するためには新生ポリペプチドが小胞体内に流入することが必須であることを明らかにした。

(3) トヨカマイシンによる XBP1 阻害機構の解析

単離したもう一つの化合物トヨカマイシンは RNA 合成阻害剤として知られているが、トヨカマイシンは RNA 合成を阻害する濃度よりも約 100 倍も低濃度で XBP1 を阻害したことから、RNA 合成阻害とは異なった機構で XBP1 を阻害することが強く示唆された。小胞体ストレスによる XBP1 活性化は、IRE1a の活性化と活性化 IRE1a による XBP1 スプライシングによって引き起こされる。そこでまず、IRE1a による XBP1 スプライシングにトヨカマイシンが与える影響を試験管内で評価した。しかしトヨカマイシンは試験管内での IRE1a による XBP1 スプライシングを阻害しなかった。よって小胞体ストレスによる IRE1a の活性化ステップを阻害していることが示唆された。さらに、小胞体ストレスによる IRE1a の活性化には、IRE1a の自己リン酸化とその後の ADP もしくは ATP の結合が必須で

あるが、トヨカマイシンは IRE1a の自己リン酸化は阻害しなかった。したがって、トヨカマイシンは IRE1a の自己リン酸化後におこるヌクレオチドの結合を阻害していることが示唆された。

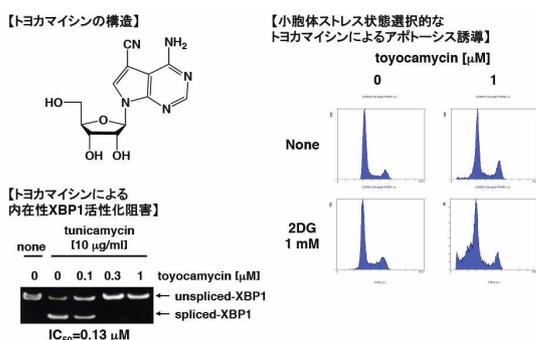


図2. トヨカマイシンによる細胞死誘導

最後に IRE1a-XBP1 経路を阻害したときの抗腫瘍効果について検討した。小胞体ストレス状態にしたがん細胞にトヨカマイシンを添加するとアポトーシスを誘導することを見出した。近年、恒常的な小胞体ストレス状態であることが知られている骨髄腫細胞に対して、IRE1a の阻害剤が抗腫瘍物質として有効であることが報告されている。したがって今後、トヨカマイシンが骨髄腫に対する新しい分子標的治療薬として期待できる。

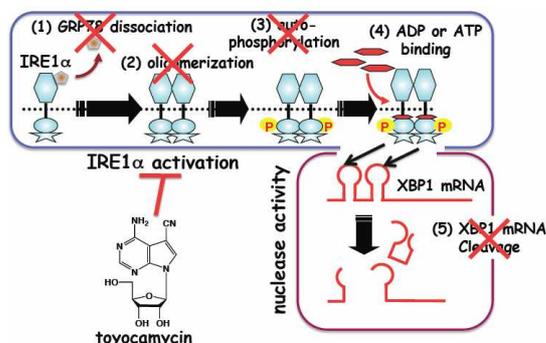


図3. トヨカマイシンによる IRE1a 活性化阻害メカニズム

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 12 件)

- 1) Quinotriexin inhibited ER stress-induced XBP1 mRNA splicing through inhibition of protein synthesis. K. Yamamoto, E. Tashiro and M. Imoto *Biosci Biotechnol Biochem*, 75, 284-288, 2011 査読あり
- 2) A new, convenient cell-based screening

method for small molecule glycolytic inhibitors

M. Kitagawa, M. Misawa, S. Ogawa, E. Tashiro and M. Imoto *Biosci Biotechnol Biochem*, 75, 367-369, 2011 査読あり

- 3) Synthesis and anti-migrative evaluation of moverastin derivatives. M. Sawada, S. Kubo, K. Matsumura, Y. Takemoto, H. Kobayashi, E. Tashiro, T. Kitahara, H. Watanabe and M. Imoto *Bioorg Med Chem Lett*, 21, 1385-1389, 2011 査読あり

- 4) Metabolomic identification of the target of the filopodia protrusion inhibitor glucopiericidin A. M. Kitagawa, S. Ikeda, E. Tashiro, T. Soga and M. Imoto *Chemistry and Biology*, 17, 989-998, 2010 査読あり

- 5) Isolation and structure elucidation of a novel androgen antagonist, arabilin, produced by *Streptomyces* sp. MK756- Δ F1. T. Kawamura, T. Fujimaki, N. Hamanaka, K. Torii, H. Kobayashi, Y. Takahashi, M. Igarashi, N. Kinoshita, Y. Nishimura, E. Tashiro and M. Imoto *J. Antibiot (Tokyo)*, 63, 601-605, 2010 査読あり

- 6) Oligomycin induced the proteasomal degradation of cyclin D1. M. Kanai, S. Iba, R. Okada, E. Tashiro and M. Imoto *J. Antibiot (Tokyo)*, 62, 425-429, 2009 査読あり

- 7) V-ATPase Inhibitors Overcome Bcl-xL-mediated Chemoresistance through Restoration of a Caspase-independent Apoptotic Pathway. Y. Sasazawa, Y. Futamura, E. Tashiro and M. Imoto *Cancer Science*, 100, 1460-1467, 2009 査読あり

- 8) Transcriptional regulation of human fibroblast growth factor receptor 1 by E2F-1.

M. Kanai, E. Tashiro, H. Maruki, Y. Minato and M. Imoto *Gene*, 438, 49-56, 2009 査読あり

- 9) SAR study of a Novel Triene ansamycin Group Compound, Quinotriexin, and Related Compounds, as Inhibitors of ER Stress-induced XBP1 Activation. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation, and Biological activities and SAR study. T. Kawamura, E. Tashiro, K. Yamamoto, K. Shindo and M. Imoto *J. Antibiot (Tokyo)*, 61, 303-311, 2008 査読あり
- 10) SAR study of a Novel Triene ansamycin Group Compound, Quinotriexin, and Related Compounds, as Inhibitors of ER Stress-induced XBP1 Activation. II.

Structure Elucidation

T. Kawamura, **E. Tashiro**, K. Shindo and M. Imoto *J. Antibiot (Tokyo)*, 61, 312-317, 2008 査読あり

- 11) Identification and characterization of mouse type II platelet derived growth factor receptor a transcript. Y. Minato*, Y. Nihei*, Y. Kodama, **E. Tashiro**, M. Kanai and M. Imoto *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72, 759-766, 2008 査読あり
- 12) Discovery of Incednine as a Potent Modulator of the Anti-apoptotic Function of Bcl-xL from Microbial Origin. Y. Futamura, R. Sawa, Y. Umezawa, M. Igarashi, H. Nakamura, K. Hasegawa, M. Yamasaki, **E. Tashiro**, Y. Takahashi, Y. Akamatsu, M. Imoto *The Journal of American Chemical Society*, 130, 1822-1823, 2008 査読あり

[学会発表](計 11件)

- 1) **Etsu Tashiro** and **Masaya Imoto** "Identification of Trierixin as a novel inhibitor for ER stress-induced XBP1 activation from *Streptomyces* sp." アジアコアプログラム第2回合同セミナー 2010年11月21日 タイ・コンケン
- 2) 小田一成、**田代悦**、本橋慶一郎、瀬戸治男、**井本正哉** 「放線菌由来新規テルペン化合物 NT17A による細胞死誘導機構の解析」日本農芸化学会 2010年3月29日 @東京
- 3) **Etsu Tashiro**, Yumi Yokouchi, Kohta Yamamoto, and **Masaya Imoto** "Toyocamycin inhibits ER stress-induced XBP1 mRNA splicing through IRE1a inhibition" AACR-NCI-EORTC 合同国際カンファレンス 2009年11月16日 @ボストン
- 4) 山本浩太、**田代悦**、**井本正哉** 「新規 XBP1 阻害剤キノトリエリキシンは不良タンパク質の蓄積を阻害することで小胞体ストレスを抑制する」ケミカルバイオロジー学会 2009年5月18日 @神戸
- 5) 新莊聡子、**田代悦**、**井本正哉** 「BrefeldinA が誘導する小胞体ストレス応答の制御機構解析」日本農芸化学会 2009年3月27日 @福岡
- 6) **田代悦**、二村友史、**井本正哉** 「新規 XBP1 活性化阻害剤トリエリキシンの発見」日本癌学会 2008年10月28日 @横浜
- 7) 河村達郎、**田代悦**、二村友史、新藤一敏、**井本正哉** 「小胞体ストレスが誘導する転写因子 XBP1 の活性化を抑制する新規化

合物トリエリキシンとキノトリエリキシンの発見・構造解析・生物活性・構造活性相関」天然有機化合物討論会 2008年9月30日 @福岡

- 8) 河村達郎、**田代悦**、**井本正哉** 「トリエリキシンおよびその類縁体の XBP1 阻害活性および抗腫瘍活性の評価」がん分子標的治療研究会 2008年6月26日 @東京
- 9) **田代悦**、**井本正哉** 「トヨカマイシンによる XBP1 活性化阻害機構の解析」がん分子標的治療研究会 2008年6月26日 @東京
- 10) 新莊聡子、**田代悦**、**井本正哉** 「小分子化合物と統計処理を用いた小胞体ストレス応答機構の解析」日本ケミカルバイオロジー研究会 2008年5月19日 @東京
- 11) **田代悦**、**井本正哉** 「トヨカマイシンによる XBP1 活性化阻害機構の解析」日本ケミカルバイオロジー研究会 2008年5月19日 @東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.keio.ac.jp/labs/imoto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代悦 (TASHIRO ETSU)
慶應義塾大学・理工学部・講師
研究者番号: 00365446

(2) 研究分担者

井本正哉 (IMOTO MASAYA)
慶應義塾大学・理工学部・教授
研究者番号: 60213253

(3) 連携研究者

該当なし