

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：23803
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22590067
 研究課題名（和文） キネシン機能阻害による異常な細胞周期進行の分子細胞生物学研究

研究課題名（英文） Molecular cellular biology of the cell cycle progression under inhibition of Kinesin Spindle Protein

研究代表者

澤田 潤一（SAWADA JUNICHI）

静岡県立大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号：70381738

研究成果の概要（和文）：新たな抗がん剤を創製するために、阻害標的分子を定めた分子標的薬の開発が進んでいる。その標的分子の一つであるキネシタンパク質を低分子化合物で阻害した時に起こる異常な微小管の伸長を特定し、その分子メカニズムを明らかにした。この結果に対応する形で、キネシン阻害剤が既存抗がん剤と強い併用効果を表すことを示した。これらの成果により、キネシン阻害剤から生じる抗がん効果の理解が深まり、薬による次世代抗がん戦略の作製に貢献できると期待できる。

研究成果の概要（英文）：Many targeted drugs with anti-cancer activity are being developed in academic institutes and pharmaceutical companies. Compounds with specific inhibition activity against a mitotic kinesin KSP are categorized in important candidates of such drugs. In this study, we have found a mitotic molecular event of microtubules whose dynamics were disorganized under treatment of the kinesin inhibitor, and shed light on the molecular mechanisms. From the results of these molecular cellular biological studies, we also demonstrated that the kinesin inhibitor prevent tissue culture cells from proliferating synergistically with anti-cancer drug Paclitaxel. Taken together, our results can facilitate understanding how inhibitors against the kinesin work on cancer cell proliferation, and contribute to planning new anti-cancer strategies using drugs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子細胞生物学、ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞生物学、薬理学、ケミカルバイオロジー、細胞周期、がん

1. 研究開始当初の背景

(1) 抗がん剤の開発においては従来か

らの細胞傷害性薬剤(cytotoxic drug)に加え、分子標的薬(targeted drug)の開発が積極的

に進められていた。臨床使用されている主な細胞傷害性薬剤にはTaxolやBica Alkanoidがあり、これらは微小管を標的として細胞周期M期の進行を妨げる阻害化合物である。微小管の多岐にわたる細胞内機能のため、神経などへの副作用が問題視されてきたことから、微小管以外のM期進行に重要なタンパク質を標的とした分子標的阻害化合物が新たな抗がん剤候補になると期待された。そこで、世界中の製薬会社および大学がキネシンKSPやリン酸化酵素Plk1、Aurora-A、Aurora-Bなどを標的分子とした阻害化合物の探索・開発で競い合っていた。

(2) M期分子標的阻害化合物の中でも、キネシンKSP阻害化合物の開発が先行して行われ、研究開始当初、少なくとも7化合物が臨床試験に入っていた。KSP阻害化合物が抗癌剤として患者に提供されるまでには、臨床試験での人体での有効性を提示するだけでなく、その作用機序の解明も必要である。製薬会社など民間の研究ではKSP阻害化合物がどのような癌細胞に効果的に細胞死誘導を引き起こすかという興味から、細胞死に注目して研究を進めていた。一方、化合物がKSPに結合した後、細胞が異常なM期進行を経てM期停止に至るまでの過程についての研究は詳細な報告がほとんどなかった。

(3) 申請者はM期の進行を妨げる化合物からの創薬研究に力を注いでいた。研究開始までに、低分子化合物ライブラリーを探索し、有機合成化学者と協力して、より選択性・効果が高く、これまでにないユニークなM期阻害化合物を見出してきていた。なかでも、KSP阻害化合物の開発では、異なる作用機序を持つ2化合物を見出すことに成功していた。

2. 研究の目的

(1) 低分子化合物によるKSP阻害から波及する細胞内生体分子群の異常挙動を明らか

にし、KSP阻害化合物の作用メカニズムにおける生体分子の情報を提供することで、癌治療薬の研究開発における生物学的基盤を確立することを目的としている。

(2) キネシンKSP阻害化合物を活用することで、KSPが関与するM期分子イベントを明らかにし、そこにおける生体分子相互作用ネットワークを抽出することを通じて、細胞分裂の分子細胞生物学に貢献することを目指す。

3. 研究の方法

(1) KSP阻害化合物と機能的相互作用するM期阻害化合物の探索(培養細胞での増殖試験) : ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞の細胞増殖を抑制する活性を指標として、KSP阻害化合物と併用することにより相乗効果を示すM期阻害化合物を既存化合物から探索する。ここで得られる化合物の相互作用関係から標的分子KSPの細胞内機能を予想する。

(2) M期におけるKSP分子と物理的相互作用するタンパク質の同定(培養細胞からの共精製) : KSP阻害化合物も含めた様々なM期阻害化合物で細胞周期をM期に留めたHeLa細胞からKSP分子を精製することにより、共に精製されるタンパク質を同定する。このことから、KSP分子の紡錘体構造形成時における新たな機能を予想する。

(3) KSP分子および相互作用因子のM期における細胞内局在位置の特定(培養細胞での観察) : M期紡錘体形成時におけるKSP分子および(2)で同定した相互作用因子の細胞内局在位置を特定することで、(2)の結果を検証するとともに、KSPが関与するM期分子イベントを予想する。

(4) KSP阻害化合物が及ぼす紡錘体の微小管形成への影響(培養細胞での機能試験) : KSP阻害化合物が紡錘体構造形成時の微小管ダイナミクスに与える影響を培養細胞にて検討する。

4. 研究成果

(1) KSP阻害化合物と機能的相互作用するM期阻害化合物の探索： アロステリック型およびATP拮抗型と作用機序が異なる2種類のKSP阻害化合物を用いて、既存のM期阻害化合物との薬物相互作用を検討した結果、両化合物共にM期リン酸化酵素Aurora-Aを標的分子とする化合物MLN8237と強い相乗効果を示した。また、ATP拮抗型阻害化合物のみが微小管安定化活性を有する既存抗がん剤Paclitaxelと強い相乗効果を示した。

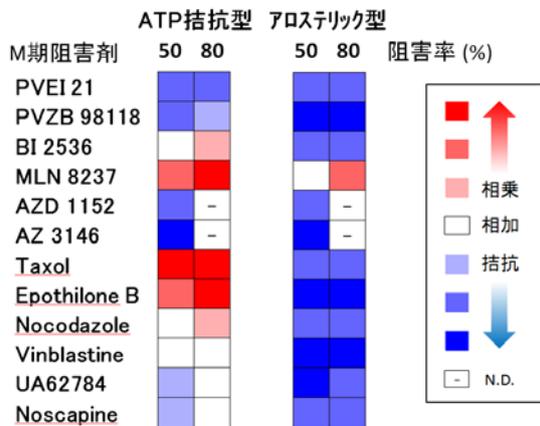


図1 KSP阻害化合物とM期阻害化合物の相互作用

(2) M期におけるKSP分子と物理的相互作用するタンパク質の同定： アフィニティータグを連結したKSP組換えタンパク質を発現するHeLa細胞から、KSP分子をアフィニティー精製し共精製されるタンパク質を同定した。

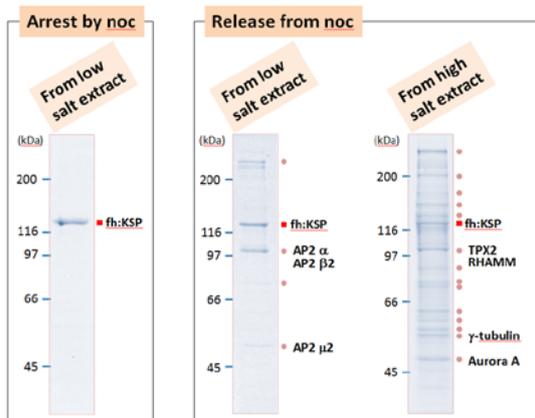


図2 M期HeLa細胞からのKSPアフィニティー精製

微小管重合阻害剤であるnocodazoleやアロステリック型KSP阻害化合物で処理したM期細胞

からはKSP分子とともに共精製されるタンパク質は見いだされなかったが、化合物で処理していないM期細胞から精製した場合にはAurora-A分子やTPX2分子など多数のタンパク質が共精製された。一方、微小管を主に構成する α -tubulin分子と β -tubulin分子は見られなかった。

(3) KSP分子および相互作用因子のM期における細胞内局在位置の特定： (1) および(2)の結果より、M期におけるKSP分子の機能はAurora-A分子と密接な関係にあることが示唆された。Aurora-A分子はTPX2分子と複合体を形成し、M期姉妹染色分体キネトコアで機能すると報告されている。KSP分子の中心体での機能は広く認知されているが、キネトコアでの機能は知られていない。そこで、KSP分子がキネトコア周辺に存在し、これら分子と共局在するかを検討した。Nocodazole処理によりM期で留まっている細胞は、核膜が崩壊し姉妹染色分体は凝縮しているものの、チューブリン分子が重合できず微小管繊維が存在しない。ここからnocodazoleを除去しM期を再開させることで紡錘体構造の形成過程を観察できる。この場合、中心体からではなく姉妹染色分体キネトコアからの微小管伸長過程がより詳しく観察できる。この条件でKSP分子を観察したところ、nocodazole処理下では細胞全体にほぼ均一に存在したKSP分子は、

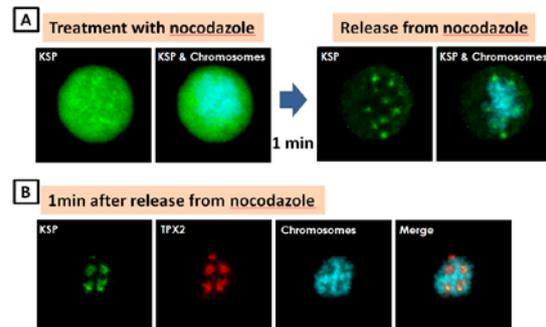


図3 姉妹染色分体キネトコアにおけるKSPとTPX2の共局在
A: nocodazole処理中および除去1分後のKSPの細胞内局在
B: nocodazole除去1分後のKSPとTPX2の共局在

nocodazole除去直後にキネトコア近傍に移

動・集積する。そこでKSP分子はTPX2と非常に良い共局在を示した。

(4) KSP阻害化合物が及ぼす紡錘体の微小管形成への影響： (3) に記したnocodazole除去からの紡錘体構造形成過程解析手法を用いて、姉妹染色分体キネトコアから伸長する微小管に対するKSP阻害化合物の影響を検討した。化合物無処理で伸長した微小管とATP拮抗型KSP阻害化合物処理下での微小管を比較したところ、化合物処理での微小管がより太く伸長速度も速いように観察できた。そこで、これら微小管の安定性を比べてみたところ、微小管自体の重合安定性は低温に対して変わらなかったものの、化合物処理においてのみ微小管の重合を促すと報告されているTPX2が繊維状態で低温耐性を持ち合わせていた。この結果は、(1) で得られたATP拮抗型KSP阻害化合物が微小管重合安定化剤であるPaclitaxcelと強い相乗効果を示した結果と矛盾しない。

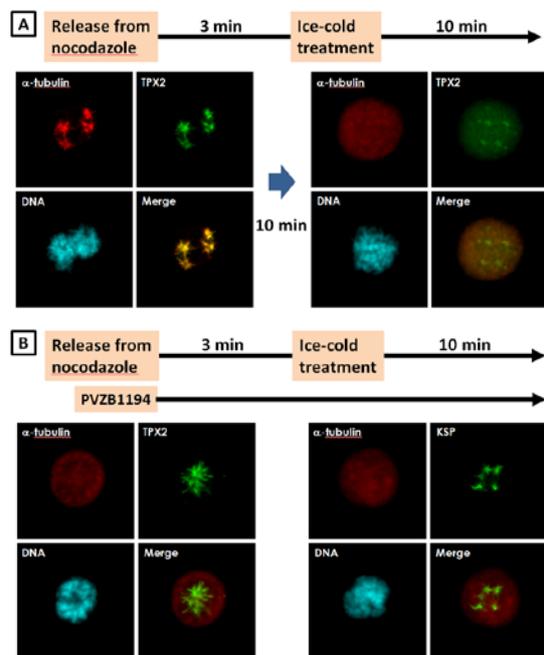


図4 姉妹染色分体キネトコアから伸長した微小管の低温耐性
A: 化合物処理なし、B: ATP拮抗型KSP阻害化合物処理

(5) 成果の位置づけと今後の展望： 近年開発が進む分子標的薬において、抗がん剤

創薬でのM期阻害化合物はいまだ臨床試験を通過したものはなく、細胞周期の分子細胞生物学やケミカルバイオロジー、癌科学における人類の知識および理解が未だ不十分である。そうした中、細胞周期分子標的薬を単剤でなく既存抗がん剤との併用薬として使用する可能性を探る動きもある。今回の研究成果の一つに、ATP拮抗型KSP阻害化合物が既存抗がん剤paxlitaxcelとの強い併用効果を見出した点は、現在の創薬時流からしても意味があるものと考えられる。また、分子細胞生物学の基礎研究として、KSP分子の新たな機能としてAurora-AやTPX2分子とともに姉妹染色分体キネトコアから伸長する微小管のダイナミクスに関わることを示し、細胞周期研究の進展に貢献している。この研究では、阻害化合物間の相互作用関係と、それら阻害化合物の標的分子間との相互作用関係を対比させて示しており、KSP阻害化合物の場合、これら両者が表裏一体の関係にあることを明らかにしている。今回の研究では一例でしかないが、今後この阻害化合物間相互作用一標的分子間相互作用の関係性をより一般化できれば、表現型を指標にした薬候補化合物の探索で得られた化合物の作用メカニズムや標的分子を明らかにするのに大いに役立つことになる。私の行っている化合物探索研究においても興味深いM期表現型を示す阻害化合物を複数得ているので、これらの作用機序解明や標的分子同定にこの関係性が利用可能であるかどうかを検証していく計画である。

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)

- ① Takeuchi T, Oishi S, Watanabe T, Ohno H, Sawada J, Matsuno K, Asai A, Asada N, Kitaura K, Fujii N.、
“Structure-activity relationships of carboline and carbazole derivatives as

a novel class of ATP-competitive kinesin spindle protein inhibitors”, *Journal of Medicinal Chemistry*, 査読有、54 巻、2011 年、4839-4846
DOI: 10.1021/jm200448n

[学会発表] (計 9 件)

- ① 澤田潤一、 “KSP/Eg5 facilitates elongation of chromatin-derived microtubules during mitotic spindle formation”、Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “The Cell Cycle”、2010 年 5 月 20 日、米国・ニューヨーク州
- ② 澤田潤一、 “KSP/Eg5 facilitates elongation of chromatin-derived microtubules during mitotic spindle formation”、第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 9 日、兵庫・神戸
- ③ 澤田潤一、“表現型を指標にした M 期阻害化合物の探索”、日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会、2011 年 5 月 24 日、東京・目黒
- ④ 澤田潤一、“HCA を活用した創薬探索システムの構築 -ぼくはこうやってスクリーニングを立ち上げた”、第 2 回 HCA 共催セミナー「High-Content Analysis の新展開」、2011 年 6 月 23 日、東京・品川
- ⑤ 澤田潤一、“Sister-chromatid resolution, a possible chemical target molecular event for cancer therapy”、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、神奈川・横浜
- ⑥ 澤田潤一、“細胞イメージングを用いた細胞周期阻害化合物の探索”、第 3 回スクリーニング学研究会、2012 年 11 月 02 日、東京
- ⑦ 澤田潤一、“細胞周期を指標とした抗がん剤スクリーニング研究”、PerkinElmer 75 周年記念イベント For the Better Forum 2012、2012 年 11 月 15 日、東京・六本木
- ⑧ 澤田潤一、“非ステロイド系抗炎症剤の癌予防メカニズム研究 -スリンダクの細胞周期リン酸化酵素 Aurora-B に対する影響”、日本ケミカルバイオロジー学会第 7 回年会、2011 年 6 月 8 日、京都
- ⑨ 澤田潤一、“A possible effect of nonsteroidal anti-inflammatory drug sulindac on mitotic regulation by aurora kinases”、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 12 日、福岡

[その他]

ホームページ等

所属研究機関 web ページ

<http://db.u-shizuoka-ken.ac.jp/show/profile240.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田 潤一 (SAWADA JUNICHI)
静岡県立大学・大学院薬学研究院・准教授
研究者番号：70381738

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：