

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24年5月25日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650238

研究課題名（和文） 構造解析・発現制御機構解析に基づくPimキナーゼ阻害薬の創製

研究課題名（英文） Generation of Pim kinase inhibitors based on structural and post-transcriptional analysis

研究代表者

藤田 直也 (FUJITA NAOYA)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター基礎研究部・部長

研究者番号：20280951

研究成果の概要（和文）：原がん遺伝子産物Pimキナーゼの阻害剤創製のために、Pim-1とPim-1の新規基質として研究代表者らが同定したp27^{Kip1}のC末端ペプチドとの共結晶を作製し、X線結晶構造解析を行なうことで、1.6Åの解像度で共結晶の構造解析情報を得た。さらに、アルギニン残基が8つつながった細胞内移行シグナル（R8）を付加した抗腫瘍活性を持つp27^{Kip1}ペプチドを作製し、ヒト前立腺がん細胞株DU145細胞にアポトーシスを誘導することに成功した。

研究成果の概要（英文）：The serine/threonine kinase Pim-1 plays an important role in cell cycle progression and apoptosis inhibition, resulting in prostate tumorigenesis. Therefore, Pim-1 inhibition has been expected to be an attractive target for developing new anti-cancer drugs. However, no small compounds targeting Pim-1 have progressed to clinical use because of their lack of specificity. Here we analyzed the X-ray crystal structure of Pim-1 in complex with p27^{Kip1} peptide at 1.6 Å resolution. Adding eight tandem Arg residues, R8, we generated a new cell-permeable Pim-1-inhibitory p27^{Kip1} peptide that could interfere with the binding of Pim-1 to its substrates and act as an anti-cancer drug. Treatment of prostate cancer DU145 with the peptide induces G1 arrest and subsequently apoptosis *in vitro*. The peptide could also inhibit tumor growth in *in vivo* prostate cancer xenograft models.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	570,000	3,470,000

研究分野：がん化学療法、細胞生物学

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：Pimキナーゼ、結晶構造解析、阻害剤、p27^{Kip1}

1. 研究開始当初の背景

(1)セリン・スレオニンキナーゼであるPim-1は、もともとマウス染色体へのレトロウイルス挿入に起因するがん化に関連する原がん

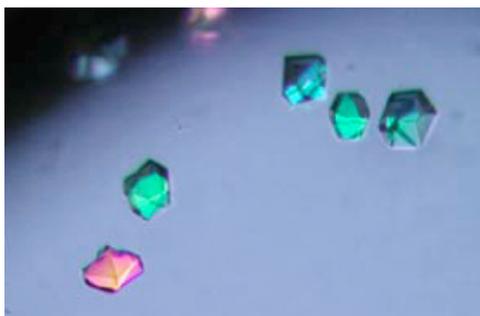
遺伝子としてCell誌に1984年に報告された。その後、Pim-1 transgenic mouseが作製されそのマウスががんになりやすい傾向にあったことから、Pim-1はがん遺伝子であること

が示唆されている。臨床においても Pim-1 の過剰発現が白血病や前立腺がんでは報告されている。Pim-1 には Pim-2、Pim-3 というアイソフォームが存在するが、この Pim-2 についても前立腺がんにおける過剰発現が報告されている。また、Pim-3 についても肝がんや膵がんにおける過剰発現が報告されている。このような事実から、がん化における Pim の重要性に注目が集まっている。

(2)Pim は cdc25A や cdc25c をリン酸化することにより細胞周期を進行させること、アポトーシス誘導因子である Bad をリン酸化することによりそのアポトーシス誘導活性を阻害することなどが報告されている。研究代表者は 2008 年、Pim の新規基質として cyclin dependent kinase (CDK) inhibitor である p27^{Kip1} を同定し、さらに Pim がリン酸化する p27^{Kip1} 上のアミノ酸残基を同定し、Cancer Res 誌に報告した。さらに Pim は、リン酸化依存的に細胞の増殖を負に制御する p27^{Kip1} の発現を抑制し、結果的に細胞増殖を促進していることを明らかにしてきた。この結果は、Pim と p27^{Kip1} の結合・リン酸化は、抗がん剤開発の際の標的となることを示唆している。また、Pim と p27^{Kip1} の結合面を薬剤標的とすることにより、ATP 結合部位を標的とした場合に問題となっていた薬剤の特異性についても、改善されることが期待されている。

2. 研究の目的

研究代表者は、Pim-1 と新規基質として同定した p27^{Kip1} ペプチドとの共結晶を作製することに既に成功しており（下図）、この共結晶



の X 線結晶構造解析を進めることで、Pim 阻害剤創製のための構造的基盤情報を得る。また、p27^{Kip1} ペプチドを元にした Pim-1 キナーゼ阻害の可能性を検討する。

本課題では、このような Pim の活性制御ならびに発現制御に関わる構造的・分子生物学的解析結果を基盤として、これまで報告のある Pim 阻害剤とは全く作用機序が異なる新たな Pim 特異的阻害剤の創製を目指す。

3. 研究の方法

(1)Pim-1 と p27^{Kip1} ペプチドの共結晶に関しては、左図のような小さな結晶が得られている。まだ X 線結晶構造解析に耐えうるほどの大きさではないこと、精製に用いる溶媒等の種類により析出が見られる等のことから Pim-1 の精製方法の再検討が必要と考えている。そこで、Pim-1 の N 末端あるいは C 末端を少し削った変異 Pim-1 も含め精製方法をいろいろと検討し、大きな共結晶の作製に努める。

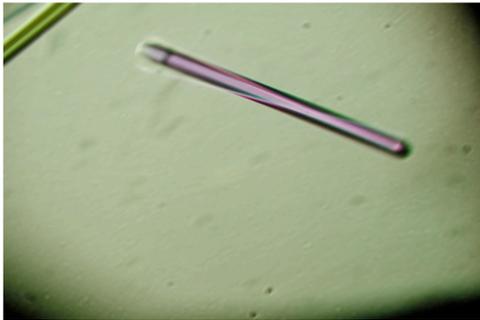
(2)作製できた共結晶に関しては、Spring-8 にて X 線結晶構造解析を行ない、少なくとも 2Å 以下の解像度で三次元構造を明らかにする。解析により得られた構造は、PDB に既に登録されている Pim-1 の構造情報と比較検討するとともに、p27^{Kip1} ペプチドとの結合面に関する詳細な構造情報を得る。

(3)結晶化に使用する p27^{Kip1} ペプチドは、*in vitro* において、Pim による他の基質のリン酸化を阻害することを見いだしている。このことは、Pim-1 上のペプチド結合部位が Pim-1 の他の基質との結合部位と同一である可能性を示唆している。そこで、p27^{Kip1} ペプチドの N 末端に HIV 由来 TAT タンパク質に代表される細胞内移行シグナルを付加し、細胞内へ移行することができるペプチドを作製する。その細胞内移行 p27^{Kip1} ペプチドに蛍光標識し、培養細胞への細胞内移行を蛍光顕微鏡にて検証する。この細胞内移行 p27^{Kip1} ペプチドによる Pim 阻害効果を、ヒト前立腺がん細胞など Pim-1 高発現細胞による内在性 p27^{Kip1} タンパク質のリン酸化阻害活性を指標に検証する。Pim-1 高発現細胞では、Pim-1 によるアポトーシス誘導タンパク質 Bad のリン酸化に伴う不活化がアポトーシス抑制に寄与していることが知られているため、この細胞内移行 p27^{Kip1} ペプチド処理時のヒト前立腺がん細胞のアポトーシス並びに Bad の脱リン酸化を検討し、p27^{Kip1} ペプチドの生細胞におけるアポトーシス誘導効果を検証する。また、前立腺がん治療に臨床で用いられているタキソールなどとの併用による抗腫瘍効果の検討もおこなう。

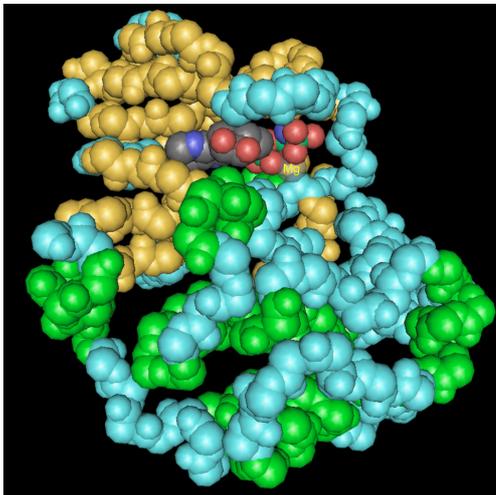
(4)Pim と p27^{Kip1} との結合に関わる構造基盤情報から、細胞内移行 p27^{Kip1} ペプチドが Akt キナーゼをも抑制している可能性が示唆される。細胞内移行 p27^{Kip1} ペプチドによる Akt 阻害活性を、*in vitro* ならびに細胞系で検討する。

4. 研究成果

(1)リコンビナント Pim-1 タンパク質は、N 末やC末を削った各種タンパク質発現ベクターを構築し、大腸菌内で発現させ精製することで、凝集せずに大量に調整可能な条件を探索し、アミノ酸番号にして 14 から 313 番目のペプチド部分が最適であることを見いだした。また、この Pim-1 タンパク質と合成した p27^{Kip1} ペプチドの共結晶条件は、ハンギングドロップ法で、バッファー条件を 200 種類以上ふって検討することにより、最適条件を見いだした。この条件で結晶を作製することにより、SPring-8 における X 線結晶構造解析に耐える大きな結晶を得ることに成功した（下図の紫色の針状結晶）。



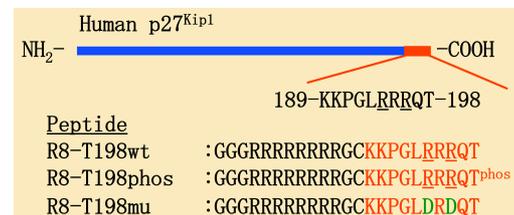
(2)SPring-8 において X 線結晶構造解析した結果、1.6Å の解像度で構造情報を得ることに成功した。この解析結果は、公的データベースである PDB に番号 3A99 として登録した。



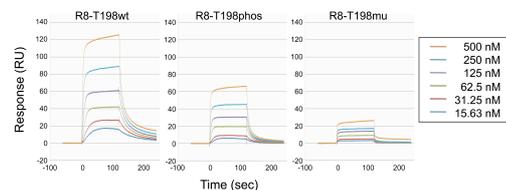
これまでに報告のある Pim-1 とその基質ペプチドとして知られる pimtide の共結晶構造情報と比較した場合、Pim-1 の構造はほぼ同一であること、p27^{Kip1} ペプチドは pimtide と Pim-1 上のほぼ同じ部位に結合することが明らかとなった。

(3)共結晶構造解析で用いた p27^{Kip1} ペプチドは、

Pim-1 キナーゼの基質として細胞内で認識される可能性が示唆されたため、p27^{Kip1} ペプチドは、内在性の Pim-1 基質と競合して、Pim-1 のシグナル伝達を阻害する可能性が示唆された。しかし、p27^{Kip1} ペプチドは培養細胞の培地中に添加しても細胞内には移行しなかったため、p27^{Kip1} ペプチドに HIV 由来 TAT タンパク質に代表される細胞内移行シグナルを付加する必要性が生じた。そこで、アルギニン残基が 8 つつながった細胞内移行シグナル (R8) を p27^{Kip1} ペプチドの N 末端側に付加し、細胞内へ移行可能な R8-T198wt ペプチドを合成した。同時に、共結晶構造解析で明らかになった Pim-1 結合に関わる p27^{Kip1} ペプチド上の塩基性アミノ酸 (R:アルギニン) を酸性アミノ酸 (D:アスパラギン酸) に置換し、Pim-1 キナーゼに結合しないと予測される R8-T198mu ペプチドを合成した（下図）。同

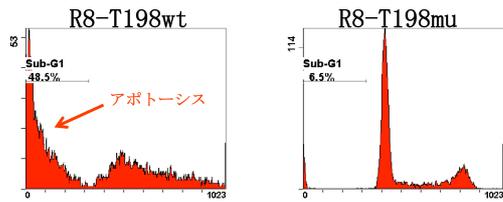


時に、Pim-1 でリン酸化された状態を模倣した R8-T198phos ペプチドの合成も行なった。これら 3 種類の細胞内移行を、それぞれ蛍光 (FITC) ラベルしたペプチドを合成して検討した結果、R8 ペプチドを付加したペプチドのみが細胞内に移行することを蛍光顕微鏡で確認した。そこで、各ペプチドの Pim-1 への結合度を、Biacore を用いて解析した。その結果、野生型 p27^{Kip1} 配列を持つ R8-T198wt ペプチドは Pim-1 に結合するが、共結晶構造より予想された結合に関わるアミノ酸に変異を入れた R8-T198mu ペプチドは、殆ど結合しないことが確認された（下図）。よって、R8

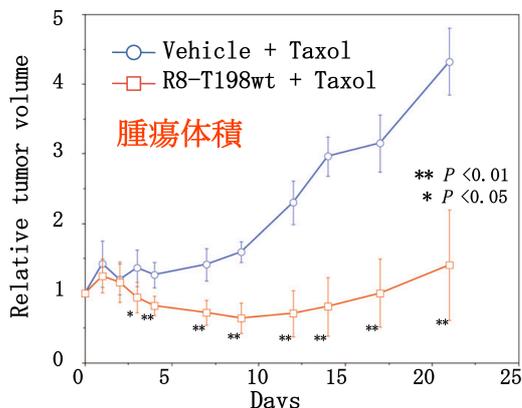


-T198wt ペプチドのみが細胞内で Pim-1 に結合し、この結合が Pim-1 による基質リン酸化を阻害する可能性が示唆された。実際に、R8-T198wt ペプチド処理した前立腺がん細胞では、Pim-1 の基質として知られるアポトーシス誘導因子 Bad の脱リン酸化が起きることが確認された。そこで R8-T198wt ペプチド処理により細胞にアポトーシスが起きているかどうかを PI 染色後に FCAS 法で検討した。

その結果、次頁の図で示すように、R8-T198wt ペプチド処理した前立腺がん細胞ではアポトーシスが誘導されているが、変異ペプチド



である R8-T198mu ペプチド処理した前立腺がん細胞ではアポトーシスが起っていないことが確認された。アポトーシスが生じているかどうかを、アポトーシス実行分子である Caspase-3 の活性化体の出現、ならびに Caspase-3 で切断される PARP の切断断片の出現を Western Blot 法にて確認したところ、どちらも R8-T198wt ペプチド処理により出現することが確認され、アポトーシスの出現が生化学的にも確認された。さらに、R8-T198wt ペプチド処理により前立腺がん細胞の *in vitro* における増殖が、濃度依存的に抑制されることを確認した。一方で、Pim-1 発現レベルが、前立腺がん細胞より低い正常前立腺細胞では、R8-T198wt ペプチドによる増殖抑制効果は認められなかった。ヒト前立腺がんを移植したマウス xenograft モデルで R8-T198wt ペプチドの抗腫瘍効果を検討した結果、R8-T198wt ペプチドは前立腺がんの増殖を *in vivo* で抑制することを見いだした。一方、R8-T198mu ペプチドには、抗腫瘍効果が認められなかった。現在、ホルモン療法が効かない患者さんにはタキソールを用いることが多いが、そのタキソールとの併用療法の可能性を検討した。その結果、特にタキソールとの併用により、*in vivo* での腫瘍増殖



が顕著に抑制されることを見いだした（上図）。よって、R8-T198wt ペプチドは新たな Pim-1 阻害剤のリード化合物として有望であることが示唆された。

(4)Akt は Pim-1 と同様に p27^{Kip1} をリン酸化することを研究代表者らは報告してきた。このため、本研究課題で主に用いている R8-T198wt ペプチドは、細胞内で Akt をも抑制している可能性が示唆されていた。そこで、Akt1 を強制発現させた細胞を用い、Akt1 依存的な p27^{Kip1} のリン酸化を R8-T198wt ペプチドが抑制するかどうかを検討した。その結果、R8-T198wt ペプチドは p27^{Kip1} のリン酸化を抑制することを見いだした。この結果は、R8-T198wt ペプチドが Pim-1 だけでなく Akt1 にも結合する可能性を示唆しており、この点から、R8-T198wt ペプチドの特異性が低い可能性が示唆される。しかし一方で、Pim キナーゼと Akt キナーゼは共に、生存シグナルを伝達するキナーゼであることが明らかとなっている。さらに Pim キナーゼと Akt キナーゼは、がんにおいて高発現あるいは活性化しており、両者とも腫瘍抑制剤開発の際の創薬標的として注目を集めている。R8-T198wt ペプチドが Pim キナーゼと Akt キナーゼを両方とも抑制するという事は、抗腫瘍薬としてより望ましいと考えることもできるため、その点では、現在の R8-T198wt ペプチドの構造を模した化合物は、Pim キナーゼと Akt キナーゼともに抑制するという Dual specificity を持った優れた抗腫瘍薬となる可能性も示唆された。

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 9 件)

- ① Daisuke Morishita, Miho Takami, Seiko Yoshikawa, Ryohei Katayama, Shigeo Sato, Mutsuko Kukimoto-Niino, Takashi Umehara, Mikako Shirouzu, Kazuhisa Sekimizu, Shigeyuki Yokoyama and Naoya Fujita. Cell-permeable carboxy-terminal p27^{Kip1} peptide exhibits anti-tumor activity by inhibiting Pim-1 kinase. **J. Biol. Chem.**, 査読有, 286: 2681-2688, 2011. DOI:10.1074/jbc.M109.092452
- ② Youya Nakazawa, Hiroyuki Arai, and Naoya Fujita. The novel metastasis promoter Merml/Wbscr22 enhances tumor cell survival in the vasculature by suppressing Zacl/p53-dependent apoptosis. **Cancer Res.**, 査読有, 71: 1146-1155, 2011. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-10-2695

- ③ Ryohei Katayama, Toshiyasu Ishioka, Shinji Takada, Ritsuko Takada, Naoya Fujita, Takashi Tsuruo, and Mikihiko Naito. Modulation of Wnt signaling by the nuclear localization of cellular FLIP-L. *J. Cell Sci.*, 査読有, 123: 23-28, 2010.
DOI:10.1242/jcs.058602

[学会発表] (計 11 件)

- ① 藤田直也、転移先微小環境内におけるがんの生存と血行性転移促進。第 1 回新学術領域公開ワークショップ (2011 年 6 月 17 日、東京) (口演)
- ② 三沢彩, 片山量平, 小池清恵, 富田章弘, 渡邊俊樹, 井上聡, 藤田直也、Oncomir miR-21 による癌幹細胞様 SP 細胞の制御機構の解明。第 11 回 東京大学生命科学シンポジウム (2011 年 6 月 4 日、東京) (ポスター)
- ③ Youya Nakazawa, Hiroyuki Arai, Naoya Fujita、A novel histone methyltransferase Merml promotes metastasis by Zacl silencing。第 69 回日本癌学会総会 (2010 年 9 月 22 ~ 24 日、大阪) (口演)
- ④ Daisuke Morishita, Miho Takami, Ryohei Katayama, Shigeo Sato, Kazuhisa Sekimizu, Shigeyuki Yokoyama, Naoya Fujita、p27^{kip1} carboxy-terminal derived peptide possesses anti-tumor activity by inhibiting proto-oncogene pim-1 kinase。第 69 回日本癌学会総会 (2010 年 9 月 22 ~ 24 日、大阪) (口演)

[その他]

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/fundamental/index.html>

<http://www.jfcr.or.jp/english/chemotherapy/department/fundamental/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 直也 (FUJITA NAOYA)

(公財) がん研究会・がん化学療法センター基礎研究部・部長

研究者番号: 20280951