

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25750397

研究課題名(和文) アポトーシス抑制タンパク質Survivinの阻害剤の探索と機能解析

研究課題名(英文) Discovery and characterization of Survivin ligands

研究代表者

河村 達郎 (Kawamura, Tatsuro)

独立行政法人理化学研究所・長田抗生物質研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号：60528561

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：化合物アレイを用いることにより、Survivinと結合する化合物NPD926を見出した。NPD926はがん細胞に細胞死を誘導したが、その主要な作用機序はSurvivinの阻害ではなく、グルタチオンとの結合を介した活性酸素種(ROS)産生誘導であることを明らかにした。さらに、NPD926ががん遺伝子KRASの活性化した細胞に効果的であること、新たな抗がん剤候補として着目されるシステントランスポーター阻害剤の殺細胞効果を高めることを見出し、グルタチオンを標的としたROS産生誘導化合物の有用性を示した。

研究成果の概要(英文)：Using our chemical arrays, we identified NPD926 as a Survivin ligand. We found that NPD926 induced cancer cell death, and elucidated the predominant mechanism of action underlying NPD926-induced cell death: conjugation with and depletion of cellular glutathione, and subsequent generation of reactive oxygen species (ROS), but not Survivin inhibition. NPD926 preferentially induced effects in KRAS-transformed fibroblast cells, compared with their untransformed counterparts. Furthermore, NPD926 sensitized cells to inhibitors of system xc⁻, a cystine-glutamate antiporter considered as a potential therapeutic target in cancers including cancer stem cells. These data show the effectiveness of a newly identified ROS inducer, which targets glutathione metabolism, in cancer treatment.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：がん Survivin 活性酸素種 グルタチオン KRAS

1. 研究開始当初の背景

Survivin は様々ながんで過剰発現し、治療抵抗性や予後不良の原因となっているアポトーシス抑制タンパク質であり、阻害剤の取得は抗がん剤シーズ創出の観点から有意義であった。また、Survivin のようにがん細胞に特異的な分子を標的として細胞死を誘導する化合物の取得は、選択性の高い抗がん剤シーズの創出の観点から重要であった。

2. 研究の目的

本研究では、化合物アレイを活用することにより、Survivin 阻害剤の取得を目指した。また、がん細胞に選択的に細胞死を誘導する薬剤の取得を目指した。さらに、取得した化合物の作用機序と効果を検証することにより、新たな抗がん剤シーズ創出のための知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

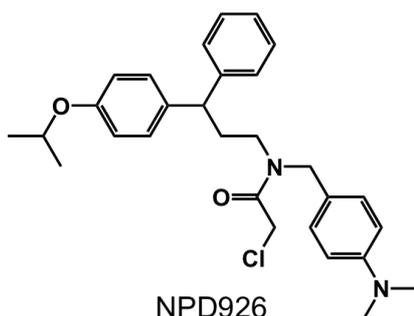
報告者の所属研究室では、理研天然化合物バンク (NPDepo) の天然物や天然物誘導体を中心とする約 3 万化合物が固定化された化合物アレイが開発された。この化合物アレイを活用することにより、Survivin と強固に結合するリガンドのスクリーニングを行った。

また、各種シグナル伝達阻害剤の活用、プロテオーム解析に基づくプロファイリング、アフィニティービーズを用いた結合タンパク質の解析など、ケミカルバイオロジーの様々な手法を駆使することにより、Survivin リガンドの細胞レベルでの作用機序と効果を検証した。

4. 研究成果

(1)Survivin リガンド NPD926 の発見

化合物アレイを用いて Survivin と強固に結合する化合物を探索した結果、NPD926 を見出した。NPD926 はヒト子宮頸がん HeLa 細胞に対して Caspase 依存的なアポトーシスを誘導したこと、アフィニティービーズを用いたプルダウンアッセイで NPD926 と HeLa 細胞由来の Survivin との結合が確認できたことなどから、当初は NPD926 が細胞レベルで Survivin の機能を阻害する可能性を考えて詳細な作用解析を始めた。しかし、その後の実験結果より、NPD926 が細胞死誘導活性を示すための標的分子は他にあることが示唆された。

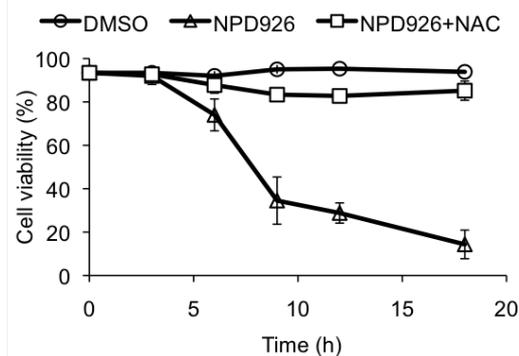
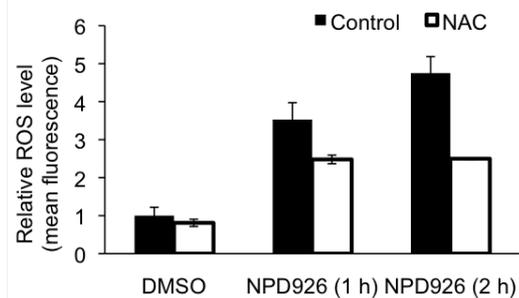


NPD926 はヒト由来の様々ながん細胞株に対して殺細胞効果を示すなど活性が興味深かったため、作用機序と効果の更なる解析を行うこととした。

(2)NPD926 の作用機序と抗がん活性の解明

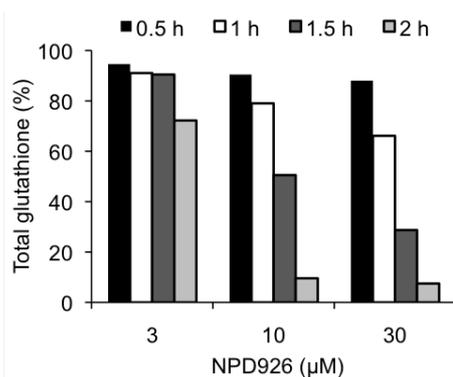
NPD926 はヒト T 細胞リンパ腫 Jurkat 細胞に対して、多くの古典的抗がん剤とは異なり、非常に速やかな細胞死を誘導した。

NPD926 の作用機序を予測するために、まずは化合物が誘導するプロテオーム変動のデータベース “ChemProteoBase” を用いたプロファイリングを行った。その結果、NPD926 は 1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン (CDNB) などの酸化ストレス誘導剤と類似した作用を示すことが示唆された。実際に、NPD926 は時間と濃度依存的に細胞に活性酸素種 (ROS) 産生を誘導した。さらに、NPD926 が誘導する細胞死は抗酸化物質である *N*-アセチルシステイン (NAC) により抑制されたことから、ROS 産生依存的に細胞死を誘導することを明らかにした。

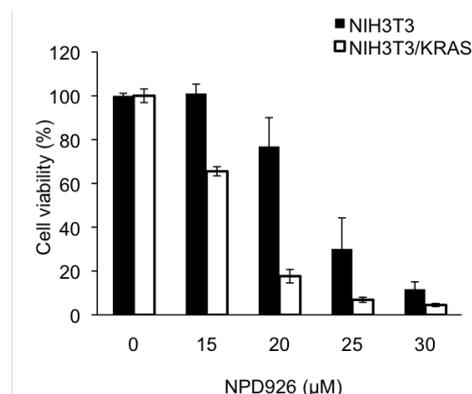


次に、アフィニティービーズを用いたプルダウンアッセイを行い、Jurkat 細胞由来の NPD926 結合タンパク質としてグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) のアイソザイムの 1 つである GSTP を同定した。GST は細胞内外に由来する様々な基質にグルタチオン (GSH) を結合させ、細胞の解毒などの機能を担う酵素である。LC-MS を用いた解析により、NPD926 は *in vitro* および細胞レベルで GST の基質となり、GSH と共有結合して GSH 抱合体を形成することを見出した。さらに、NPD926 は細胞内の GSH の濃度の低下を誘導することを明らかにした。これらの結果から、「NPD926 が GST の基質として細胞内の主要な

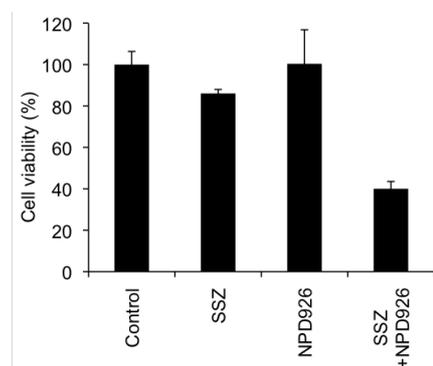
還元物質である GSH と結合し、GSH を枯渇させ、その結果として ROS 産生を介した細胞死を誘導する」という作用機序が示唆された。



次に、がん治療への応用の観点から、NPD926 の効果の更なる解析を行った。がん遺伝子である KRAS が活性化した細胞は恒常的に ROS レベルが高く、そのため更なる ROS レベルの上昇に対して脆弱であることが知られている。実際に、活性型 KRAS により形質転換したマウス繊維芽細胞 (NIH3T3/KRAS) は親株 (NIH3T3) と比べて細胞内 ROS レベルが高く、NPD926 に対して高い感受性を示した。これらの結果は、ヒトで高頻度に認められる KRAS 遺伝子に活性型変異を有するがんに対し、ROS 産生を誘導する化合物が有効であることを示唆している。



さらに、グルタチオン合成に必要なシストランスポーター system xc⁻ の阻害剤 sulfasalazine (SSZ) や erastin の殺細胞効果を NPD926 が高めることも見出した。SSZ は



がん幹細胞を標的とした薬剤として現在着目されており、グルタチオンを標的とした ROS 産生誘導化合物のがん治療への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Tatsuro Kawamura, Yasumitsu Kondoh, Makoto Muroi, Makoto Kawatani, Hiroyuki Osada: A small molecule that induces reactive oxygen species via cellular glutathione depletion. *Biochem. J.* (査読有) 463, 53-63 (2014) doi: 10.1042/BJ20140669
- 2) Yuichi Nakajima, Tatsuro Kawamura, Kazuyuki Maeda, Hinayo Ichikawa, Takayuki Motoyama, Yasumitsu Kondoh, Tamio Saito, Tetsuo Kobayashi, Minoru Yoshida, Hiroyuki Osada, Makoto Kimura: Identification and characterization of an inhibitor of trichothecene 3-*O*-acetyltransferase, TR1101, by the chemical array approach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読有) 77, 1958-1960 (2013) doi: 10.1271/bbb.130153

〔学会発表〕(計 7 件)

- 1) 近藤恭光、河村達郎、本田香織、関根朋美、長田裕之「化合物アレイによるソニックヘッジホッグ(Shh)結合化合物の探索とそれらと Shh との相互作用の解析」日本農芸化学会 2015 年度大会：2015 年 3 月 28 日：岡山大学津島キャンパス：岡山県
- 2) Tatsuro Kawamura, Yasumitsu Kondoh, Makoto Muroi, Makoto Kawatani, Hiroyuki Osada, “NPD926, a small molecule inducer of reactive oxygen species, kills cancer cells via glutathione depletion”: 26th EORTC-NCI-AACR Symposium on Molecular Targets & Cancer Therapeutics: Nov. 19th, 2014: Barcelona, Spain
- 3) 河村達郎、近藤恭光、室井誠、川谷誠、長田裕之「がん細胞に ROS 産生を介した細胞死を誘導する -chloroacetamide の作用機序と効果」日本農芸化学会 2014 年度大会：2014 年 3 月 28 日：明治大学生田キャンパス：神奈川県
- 4) 前田一行、中嶋佑一、河村達郎、近藤恭光、斎藤臣雄、本山高幸、長田裕之、金丸京子、小林哲夫、木村真「化合物アレイを用いたトリコジエンシターゼ阻害剤の探索」日本農芸化学会 2014 年度大会：2014 年 3 月 28 日：明治大学生田キャンパス：神奈川県
- 5) 河村達郎、室井誠、川谷誠、長田裕之「活性酸素種産生を誘導するアセトアミド誘導体の発見」第 72 回 日本癌学会学術総

会：2013年10月5日：パシフィコ横浜：
神奈川県

- 6) 河村達郎、室井誠、川谷誠、長田裕之
「Glutathione S-transferase P1-1 阻害
活性を有するアセトアミド誘導体の同定」
第17回 日本がん分子標的治療学会学術
集会：2013年6月14日：国立京都国際会
館：京都府

- 7) Tatsuro Kawamura, Yasumitsu Kondoh,
Makoto Muroi, Makoto Kawatani, Hiroyuki
Osada, “Identification of a novel
inhibitor of glutathione S-transferase
P1-1”: 2nd symposium of the RIKEN-Max
Planck Joint Research Center for
Systems Chemical Biology: Apr. 16th,
2013: Wako, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河村 達郎 (KAWAMURA, Tatsuro)

独立行政法人理化学研究所・長田抗生物質
研究室・基礎科学特別研究員

研究者番号：60528561