

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590088

研究課題名（和文）がん転移関連遺伝子産物 ARK5 を標的とした新規阻害剤開発

研究課題名（英文）Development of cancer metastasis inhibitors by release of tolerance of nutrient deprivation

研究代表者

小倉 勤 (OGURA TSUTOMU)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：80211134

研究成果の概要：がん組織での ARK5 の活性化を迅速・簡便に検出するため、得られた抗リン酸化 ARK5 抗体を用いた酵素免疫定量法 (ELISA) を確立した。AMPK およびその関連遺伝子産物 ARK5 の活性化を阻害する化合物の検索により、糸状菌 *Aspergillus terreus* NBRC 6123 株の菌体抽出物 asterriquinone (ARQ) および ARQ の dihydroxy-*p*-benzoquinone 部分の水酸基を化学修飾した ARQ 誘導体が、栄養飢餓耐性解除作用を有し、マウス肺がん細胞の造腫瘍性を抑制する傾向が認められた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	900,000		900,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	600,000	3,500,000

研究分野：腫瘍生化学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：(1) がん治療 (2) 転移 (3) AMPK (4) ARK5 (5) ARQ (6) 造腫瘍性
(7) 転移 (8) ELISA

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は転移・浸潤能が極めて高く予後不良の悪性腫瘍である。膵臓癌の臨床学的な特徴

は、肝臓癌等の栄養血管の豊富な腫瘍と異なり栄養血管が著しく乏しい点にある。このことから、膵臓癌はがん細胞を取り巻く環境の

低酸素・低栄養条件に対して高い耐性能を獲得し、その特性が悪性度と深く関わっていると考えられる。従って、血管新生阻害を標的とした従来のがん治療戦略では成し得ない、低酸素・低栄養状態に対する耐性による発がん進展過程を標的とした治療戦略が求められた。

2. 研究の目的

研究の目的は、がん組織の栄養飢餓耐性に関わる分子を標的とし、その機能を抑制することにより、新たながん治療法を確立することである。我々は、細胞内の AMP 濃度の上昇をセンシングすることにより、ストレスや栄養飢餓状態での細胞内の脂質代謝や解糖系の亢進による細胞内エネルギー代謝系を制御している標的タンパク質をリン酸化する AMP-activated protein kinase (AMPK) に注目した。AMPK のがん発生・進展への関与を解析する過程で、新規の AMPK 関連遺伝子産物 ARK5 (AMP-activated protein kinase-related kinase5) を同定した。ARK5 は、がん細胞の栄養飢餓耐性のみならず、がんの浸潤転移に重要な役割を担い、膵臓がん、大腸がんおよび多発性骨髄腫のがん悪性度と密接に関わることを明らかとした。事実、ARK5 とがん悪性度との関連性において、とくに多発性骨髄腫では種々の悪性度を示す臨床サンプルの転写産物をプロットした 3,000 例のパネルを用いて、ARK5 の発現は既知の遺伝子の中で最も悪性度との相関性が得られた。以上の研究成果から、本研究では、ARK5 の活性化の簡便な評価系の確立とその評価系を用いた ARK5 活性化阻害物質の開発を目的とした。

3. 研究の方法

ARK5 の活性化は、細胞内での ARK5 タンパク質への放射性 ^{32}P の取り込みを検討することが唯一の評価系であり一般的ではない。また、この手法では如何なる部位がリン酸化されているかを同定することはできない。ARK5 は上位リン酸化酵素 AKT および Ndr2

の 2 種のリン酸化酵素によるリン酸化が引き金となり活性化されることも明らかにした。そこで、我々は、ARK5 の上位リン酸化酵素によるリン酸化部位のリン酸化ペプチドを抗原としてそれぞれの部位特異的抗 ARK5 リン酸化抗体の作成を行った。リン酸化 ARK5 の定量を正確に、かつ簡便に検出する ELISA 系を確立した。平成 19 年度は抗体の作成と ELISA 系の確立を行った。平成 20 年度は、ARK5 の活性化とがん悪性度の関連性を種々のがん組織を用いて、AMPK およびその関連遺伝子の活性化を抑制する化合物の検索とその有効性を検討した。

4. 研究成果

ARK5 のリン酸化部位のリン酸化ペプチドを抗原として、リン酸化 ARK5 を特異的に認識する抗体を作成し、がん組織での ARK5 の活性化を迅速・簡便に検出するため、得られた抗リン酸化 ARK5 抗体を用いた酵素免疫定量法 (ELISA) を確立することを目的とした。ARK5 はヒトのアミノ酸一次構造から、Thr211/Ser600 がリン酸化部位である。Thr211 は Ndr2 で Ser600 は AKT によるリン酸化部位である。まず、ARK5 の上位タンパク質リン酸化酵素 AKT によるリン酸化部位である KLH-SVLSSDSFDLLDLQENRPARQRIRS の C 末端のセリン残基のリン酸化ペプチドをウサギに免疫して得られた抗体を、免疫に用いたペプチド配列の非リン酸化およびリン酸化ペプチドを抗原として用いた ELISA 法により抗体価とそれぞれの特異性を検討した。その結果、リン酸化ペプチドに対して 100,000 倍以上の抗体価が得られ、リン酸化ペプチドに特異的に反応し、非リン酸化ペプチドとは全く反応しない抗体を得ることができた。ARK5 の Ser600 の抗リン酸化抗体作成の成功により、本研究の活性化の迅速・簡便な検出法の開発の目標をほぼ達成したと考えられる。次に ARK5 の活性化を阻害する化合物を検索することを目的とした。ARK5 は細胞増殖シグナル伝達の中心的なリン酸化酵素 AKT により活性化し、AMP 活性化リン酸

化酵素 (AMPK) 活性によりがん転移を促進することが知られている。ARK5 の活性化を阻害する化合物を見いだすことは、がん進展の治療薬となりうる。糸状菌 *Aspergillus terreus* NBRC 6123 株の菌体抽出物 asterriquinone (ARQ) および ARQ の dihydroxy-*p*-benzoquinone 部分の水酸基を化学修飾した ARQ 誘導体を被験化合物として、培養細胞を用いた AKT の活性化および AMPK の活性化の抑制を検討した。ARQ、ARQDAc、ARQAcMe、ARQAc、ARQMe は、大腸がん細胞株 SW480 の低栄養培地での AMPK の活性化を顕著に抑制した。また、低栄養培地への血清添加による AKT の活性化も抑制した。腫瘍移植モデルマウスによる抗がん作用の検討では、ARQ はマウスの顕著な体重減少を示し治療目的としては用いることが出来なかった。一方、ARQAcMe は、投与マウスに対する影響は認められず、コントロール群に比しマウス肺がん細胞の造腫瘍性を抑制する傾向が認められた。このことから、本研究で見いだされた ARQ 誘導体は、新たな作用機序を持つ抗がん剤の候補になりうることを示された。

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 4 件)

Tatemichi M, Ogura T, Esumi H.
Impact of inducible nitric oxide synthase gene on tumor progression.
Eur. J. Cancer Prev. 18, 1-8, 2009 査読有

Tajima M, Kurashima Y, Sugiyama K, Ogura T, Sakagami H.
The redox state of glutathione regulates the hypoxic induction of HIF-1.
Eur J Pharmacol. 606, 45-49, 2009 査読有

Kuga W, Tsuchihara K, Ogura T, Kanehara S, Saito M, Suzuki A, Esumi H.
Nuclear localization of SNARK; its impact on gene expression.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 377, 1062-1066, 2008 査読有

Tsuchihara K, Ogura T, Fujioka R, Fujii S, Kuga W, Saito M, Ochiya T, Ochiai A, Esumi H.
Susceptibility of Snark-deficient mice to azoxymethane-induced colorectal tumorigenesis and the formation of aberrant crypt foci.
Cancer Sci. 99, 677-682, 2008 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

服部 真也
低栄養条件下における asterriquinone およびその誘導体の殺細胞効果の検討
日本薬学会第 128 年会 2008.3.28 横浜

畑 友佳子
Asterriquinone dimethyl ether の抗がん剤多剤耐性解除作用の検討
日本薬学会第 128 年会 2008.3.28 横浜

王 瑩瑩
ヒト肝がん由来 HepG2 と Hep3B 細胞における Cytochalasin E 誘導アポトーシスの検討
日本薬学会第 128 年会 2008.3.27 横浜

加部 奈緒美
生体内ストレスにおけるユビキチン調節 X (UBX) 領域を有する UBXD3 の発現誘導
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 2007.12.14 横浜

土原 一哉
Snark 欠損マウスにおける成熟後肥満の発症
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会 2007.12.12 横浜

空閑 亘

紫外線照射による AMPK 関連遺伝子産物 SNARK
の細胞内局在性の検討

第 66 回日本癌学会学術総会 2007.10.3 横
浜

藤岡 ルミ

SNARK 遺伝子欠損マウスは DMBA および TPA 誘
導皮膚発がんが発生しやすい

第 66 回日本癌学会学術総会 2007.10.3 横
浜

〔その他〕

ホームページ

<http://www.hokuriku-u.ac.jp/yakugaku/sejouka2/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小倉 勤 (OGURA TSUTOMU)

北陸大学・薬学部・教授

研究者番号：80211134

(2)研究分担者

倉島 由紀子 (KURASHIMA YUKIKO)

北陸大学・薬学部・助手

研究者番号：40440531