

平成22年6月21日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790217  
 研究課題名 (和文) インシリコスクリーニングによる小胞体ストレス応答制御薬剤の探索と作用機序の解析  
 研究課題名 (英文) *In silico* screening and characterization of modulators of the unfolded protein response (UPR)  
 研究代表者  
 齋藤 さかえ (SAITO SAKAE)  
 財団法人癌研究会・癌化学療法センター・研究員  
 研究者番号：20335491

研究成果の概要 (和文)：小胞体ストレス応答とは、細胞のストレス環境への適応機構のひとつであり、様々な疾患への関与が報告されている。固形癌においては、癌細胞の薬剤耐性や悪性化の一因と考えられ、小胞体ストレス応答を標的とした新しい治療法の開発が期待される。本研究では、ゲノム創薬の新しい手法により、小胞体ストレス応答に作用する化合物を複数同定した。これらの化合物は、グルコース飢餓ストレス下の癌細胞に対して選択的にストレス応答を抑制し、増殖阻害及び細胞死へと誘導することが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：The unfolded protein response (UPR) is a homeostatic response in mammalian cells that allows cells to adapt to environmental changes and physiological stresses. The UPR has been recently associated with several human diseases, and UPR activation results in tumor malignancies and anti-tumor drug resistance in poorly vascularized solid tumors. Thus, disrupting the UPR is a promising target for cancer treatments. In the present study, we identified novel UPR-modulatory compounds by *in silico* screening using gene expression profiles. We demonstrated that these compounds inhibited UPR activation and caused selective and massive killing of cancer cells during glucose deprivation stress.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：創薬、癌、分子標的薬、小胞体ストレス

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 小胞体ストレス応答と疾患：細胞小器官

のひとつである小胞体は、タンパク質フォールディングの主要な場である。小胞体には分

子シャペロンやフォールディング酵素が多数存在しており、新生タンパク質は小胞体内で適切な立体構造に折り畳まれて、固有の機能を持つタンパク質へと成熟する。しかし、細胞が生理学的な環境の変化やストレスに曝されたとき、タンパク質の成熟は阻害され、構造異常のタンパク質 (unfolded protein) が増加する。小胞体に unfolded protein が蓄積し、細胞の機能が低下した状態を小胞体ストレスという。小胞体ストレスが過剰あるいは長時間持続する場合、細胞はアポトーシスを起こし死滅する。一方で、細胞にはストレスを解除し、細胞死を回避するための適応応答の機構が備わっており、小胞体ストレス応答あるいは unfolded protein response (以降、UPR と記す) と呼ばれている。

近年、糖尿病や癌、神経変性疾患、虚血性疾患など、様々な疾患や病態に UPR が関与していることが明らかになりつつあり、UPR は治療の標的として注目されている。固形癌では、腫瘍内部の血管形成が不十分であるために起こる、低グルコースあるいは低酸素といった特有の微小環境ストレスが存在し、これが UPR を活性化する要因となっている。UPR の活性化は、癌細胞のストレス耐性の原因のひとつであり、癌の薬剤耐性や悪性化に関与していると考えられている。

(2) UPR の分子生物学的背景：哺乳類細胞における UPR の主要な分子機構には、小胞体膜上に局在してストレスセンサーとして働く activating transcription factor 6 (ATF6)、inositol-requiring protein 1 (IRE1/ERN1)、PRKR-like endoplasmic reticulum kinase (PERK/EIF2AK3) の 3 つの分子を始点としたシグナル伝達経路が知られている。また、その下流では X-box binding protein 1 (XBP1) や activating transcription factor 4 (ATF4) など、多く転写因子が活性化しており、ストレス応答に関与する様々な遺伝子の転写を活性化している。このように、UPR は複雑なシグナル伝達と精巧な調節のメカニズムにより制御されていることが明らかにされつつあるが、UPR の分子機構について未だ明らかになっていない点も多い。

これらの UPR に関与する分子について、最近の臨床研究からは、悪性度の高い乳癌及び神経膠腫 (グリオーマ) で UPR のマーカー遺伝子である小胞体分子シャペロン 78 kDa glucose-related protein (GRP78) の発現が亢進していることが報告されている。また、培養癌細胞や担癌マウスモデルにおいて、GRP78 や UPR のシグナル伝達経路に関与する遺伝子のノックダウンにより、癌細胞の増殖が阻害されること、また、抗癌剤に対する感受性が上がることなどが報告されている。

## 2. 研究の目的

(1) これまでの研究成果：我々はこれまでにヒト癌細胞株を用いたスクリーニング系を構築し、UPR マーカー遺伝子 GRP78 の発現誘導を阻害する化合物の探索を行ってきた。その結果、新家らによって同定された新規化合物 versipelostatatin (VST) (Perk HR, et al. Tetrahedron Lett, 2002) がグルコース飢餓ストレス下 (グルコース無添加培地及び 2DG 処理) で特異的に UPR を阻害することを見出し、また、VST が担癌マウスにおいて抗腫瘍効果を示すことを報告した (Perk HR, et al. J Natl Cancer Inst, 2004)。

さらに、その後の検討により、糖尿病の治療薬であるビグアナイド化合物 (metformin, buformin, phenformin) にも UPR 阻害作用があることを新たに見出した。ビグアナイド化合物については、metformin を服用する糖尿病患者で癌のリスクが低下することを示す疫学的研究の報告があり注目されている。

これらの知見から、UPR を標的とする薬剤は抗癌剤として有効であると考えられ、薬理作用のより高い UPR 制御化合物の同定が期待された。

(2) 本研究の目的：本研究では、UPR を標的として作用し、癌細胞に特異的な細胞毒性を示す薬剤を同定することを目的とした。より効率的な探索のため、化合物に対する細胞応答に関する遺伝子発現データを基にした新規の公的データベースを利用し、ゲノム科学的アプローチによる化合物のスクリーニングを試みた。新たに同定された UPR 制御化合物については、その薬理学的特徴と抗癌剤としての有用性を明らかにすると同時に、その作用機序を明らかにするため、UPR シグナル伝達経路及び関連する遺伝子・因子への化合物の作用を、分子生物学的手法を用いて解析した。

## 3. 研究の方法

細胞を用いた解析は、由来の異なる 5 種類のヒト癌細胞株 HT1080 (繊維肉腫)、HeLa (子宮頸癌)、MKN74 (胃癌)、TH-29 (大腸癌)、786-0 (腎癌) により行った。それぞれの細胞におけるストレス応答性を予備実験により確認し、UPR の誘導と化合物処理を行った場合の最適な実験条件を検討した。UPR の誘導には、グルコース無添加培地のほか、グルコース代謝酵素阻害剤 2-deoxyglucose (2DG)、糖鎖修飾阻害剤 tunicamycin、カルシウムイオノフォア A23187 などの化学薬剤処理を行った。細胞毒性の測定には MTT 法を用い、ストレス誘導及び化合物処理した癌細胞の増殖能を 45 時間後に調べた。

UPR のシグナル伝達経路に関連する遺伝子の解析は、リアルタイム PCR 及びウエスタン

プロット解析等により行った。GRP78 プロモータの活性化、ATF6のプロセッシング及びXBP1のスプライシングによる活性化については、プラスミドベクターを作成し、細胞に導入し、レポーターアッセイ等により解析した。

網羅的な遺伝子発現解析には、Affymetrix社のGeneChip HG-U133 plus 2.0システムを使用した。マイクロアレイデータの解析は、Robust Multichip Average (RMA) 法及びSignificance Analysis of Microarray (SAM) 法により行った。また、遺伝子発現プロファイルの比較解析には、米Broad Instituteにより公開されているConnectivity Map build 02のデータベース及びGene Set Enrichment Analysis (GSEA) のアルゴリズムを使用した。

#### 4. 研究成果

(1) 本研究での主な成果：UPRを標的とした薬剤の作用について、UPRにより誘導される転写プログラムへの影響を明らかにするために、これまでに同定したUPR阻害剤であるVST及びビグアナイド化合物 (metformin、bufornin、phenformin) を用い、マイクロアレイ及びreal-time PCRによる遺伝子発現解析を行った。増殖培養条件下及び小胞体ストレス誘導培養条件下における各種ヒト癌細胞株で比較解析を行った結果、グルコース飢餓ストレス (グルコース無添加培地及び2DG処理) により誘導される178個の遺伝子を同定し、glucose deprivation signatureと名付けた。これらの遺伝子の中には、GRP78、XBP1のほか、小胞体シャペロンGRP94やタンパク質のジスルフィド結合形成に関与する酵素であるdisulfide isomeraseなど、UPRに関連する遺伝子が数多く含まれており、グルコース飢餓ストレスによりこれらの遺伝子の発現が亢進することが示された。VST及びビグアナイドは、これらの遺伝子の発現の亢進をグルコース飢餓ストレス下で特異的に広範囲 (約90%) にわたって阻害した。これまでの研究から、シグナル伝達経路にある個々の遺伝子の欠損は、UPRにより転写誘導される遺伝子群の一部にしか影響を及ぼさないことが報告されており、VST及びビグアナイドは、現在知られているUPR経路の上流に存在する新しいUPR調節因子に作用している可能性が示唆された。

次に、増殖培養条件下においてVST及びビグアナイドを18時間処理したヒト癌細胞の遺伝子発現データより、24遺伝子から成るVST/biguanide signatureを同定し、これをもとにVST及びビグアナイドに類似した作用をもつ化合物を探索した。細胞間の薬剤感受性の比較を基にしたゲノム科学的アプローチにより、Connectivity Mapデータベースに登録されている6100種類の化合物の中から、類似性を表すスコアの高かった13種類の化

合物をUPR制御薬剤の候補として選択し、小胞体ストレス下でGRP78の誘導を抑制する作用があるかどうかを実験により確認した。その結果、pyrivinium pamoate、valinomycinなど、計6種類の化合物に、グルコース飢餓ストレス下の癌細胞で特異的にGRP78のプロモータ活性を抑制する作用があることを見出した。

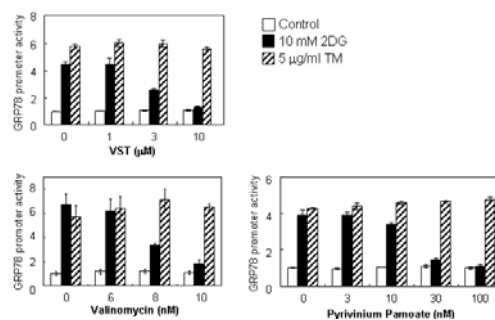


図1 GRP78プロモーターレポーターアッセイ

候補となった化合物の約半数で細胞におけるUPRの抑制活性が示されたこと、また、これらの化合物の構造に際立った類似性は認められなかったことから、遺伝子発現プロファイルを利用した化合物のスクリーニングは、作用の類似する化合物の探索を効率的に行う上で有効な手法であることが示された。

同定された6種類のUPR制御化合物について、UPRシグナル伝達経路への影響を調べた結果、これらの化合物は共通して、グルコース飢餓ストレスにより誘導される① GRP78の誘導を転写レベルで抑制する、② PERK及びeIF2αのリン酸化を阻害しない、③ 翻訳制御因子4E-BP1の脱リン酸化を誘導し、タンパク質合成を阻害する、④ 転写因子XBP1の活性化及びATF4の増加を抑制することが明らかになった。さらに、UPRによる転写調節に対する影響を調べた結果、UPR制御化合物はグルコース飢餓ストレス下でglucose deprivation signatureを広く阻害することが示された。これらの結果から、我々が同定したUPR制御化合物は、グルコース飢餓ストレス下の癌細胞においてUPRの活性化を抑制し、これによって、癌細胞に選択的な細胞毒性を示すことが明らかになった。これらの作用はVST、ビグアナイドと共通しており、また、ミトコンドリア呼吸鎖阻害剤であるrotenone及びantimycin Aとも類似していることが示された。このことから、我々が同定したUPR制御化合物の作用には、ミトコンドリアの機能の阻害を介した機序が存在している可能性が考えられた。

また、これらのUPR制御化合物について、癌細胞に対する細胞毒性を調べた結果、pyrivinium pamoateがグルコース飢餓ストレ

ス下で選択的に強い細胞毒性を示すことが明らかになった。

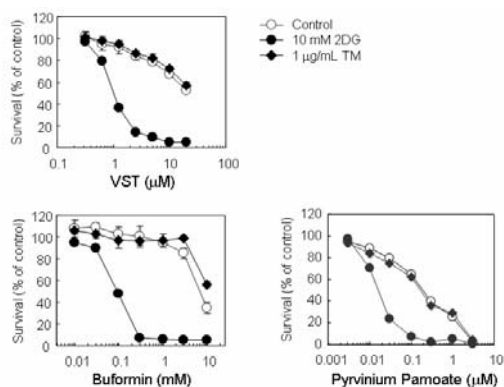


図2 小胞体ストレス下における細胞毒性

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト：本研究は、固形癌における微小環境ストレスの中でも、グルコース飢餓により誘導される小胞体ストレス応答に注目し、独自に同定したグルコース飢餓特異的UPR阻害剤であるVSTを用いて行った独創的な研究である。

遺伝子発現プロファイルを基に行う化合物のスクリーニングのための解析方法は2006年にGolubらによって発表されたが、国内外を通じて使用例は未だ少なく、我々の成果はその有用性を示すものである。近年、マイクロアレイ及び化合物に関する公的データベースが整備・充実されつつあり、これらのデータを利用したゲノム科学的アプローチの試みは、創薬におけるバイオマーカー開発の迅速化や臨床試験の合理化につながるクリティカルパス研究として重要な取り組みであると考えられる。

(3) 今後の展望：本研究により同定されたUPR制御化合物は、UPRを標的とした抗癌剤あるいは糖尿病等の治療薬としての作用が期待され、引き続きその作用機序について解析を続ける予定である。pyruvium pamoateは、担癌マウスモデルで抗腫瘍効果があることが国立がんセンターの江角らによって報告されており、抗癌剤としての開発が期待される。また、valinomycinやrottlerinについても、他グループからUPRとの関連を示す報告がある。

本研究においても示唆されたミトコンドリアの関与の可能性については、芳賀らによって詳細に研究されており、グルコース飢餓ストレス下の細胞ではUPRの誘導にミトコンドリアの正常な機能が必要であることが報告された(後述の5. 主な発表論文等、雑誌論文①)。今後、UPRの制御機構のさらなる解明により、新たな標的分子の同定や、薬剤耐

性を示す癌にも効果のある画期的な治療法の開発につながることを期待する。

## 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6件)

- ① Naomi Haga, Sakae Saito, Yoshinori Tsukumo, Junko Sakurai, Aki Furuno, Takashi Tsuruo, Akohiro Tomida. Mitochondria regulate the unfolded protein response leading to cancer cell survival under glucose deprivation conditions. *Cancer Science*, 査読有, Vol.101, No. 5, 2010, pp. 1125-1132.
- ② Yoshinori Tsukumo, Satomi Tsukahara, Sakae Saito, Takashi Tsuruo, Akihiro Tomida. A novel endoplasmic reticulum export signal: proline at the +2-position from the signal peptide cleavage site. *J Biol Chem*. 査読有, Vol. 284, No. 40, 2009, pp. 27500-27510.
- ③ Sakae Saito, Aki Furuno, Junko Sakurai, Asami Sakamoto, Hae-Ryong Park, Kazuo Shin-ya, Takashi Tsuruo, Akihiro Tomida. Chemical Genomics Identifies the Unfolded Protein Response as a Target for Selective Cancer Cell Killing during Glucose Deprivation. *Cancer Research*, 査読有, Vol. 69, No. 10, 2009, pp. 4225-4234.
- ④ 齋藤さかえ, 富田章弘. がんにおける小胞体ストレス—UPRを標的とした抗がん剤の開発, 最新医学, 査読無, 64巻, 2009年, pp. 242-250.
- ⑤ 齋藤さかえ, 富田章弘. 小胞体ストレス応答を標的とした癌治療, 実験医学, 査読無, 27巻, 2号, 2009年, pp. 298-304.
- ⑥ 齋藤さかえ, 富田章弘. 小胞体ストレスとがん治療, *Cancer Frontier*, 査読無, 10巻, 2008年, pp. 26-31.

[学会発表] (計3件)

- ① Sakae Saito, et al., Gene expression-based analysis identifies the unfolded protein response as a target for selective cancer cell killing. 8th AACR-JCA Joint Conference, February 8, 2010, Hilton Waikoloa Village (Hawaii, U.S.)
- ② 齋藤さかえ, 他、遺伝子発現プロファイルを利用した小胞体ストレス応答制御薬剤の探索, 第68回日本癌学会学術総会, 2009年10月1日、パシフィコ横浜(神奈川県)

- ③ 齋藤さかえ、他、インシリコスクリーニングによる小胞体ストレス応答制御薬剤の探索、第13回日本がん分子標的治療学会学術集会、2009年6月26日、ホテルクレメント徳島（徳島県）

〔図書〕（計1件）

- ① 齋藤さかえ、富田章弘、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析、金芳堂、がん分子標的治療研究実践マニュアル、2009年、pp.150-156.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

齋藤 さかえ (SAITO SAKAE)

(財)癌研究会・癌化学療法センター・研究員

研究者番号：20335491

### (2) 研究協力者

富田 章弘 (TOMIDA AKIHIRO)

(財)癌研究会・癌化学療法センター・部長

研究者番号：40251483