

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：32606

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790113

研究課題名（和文） 血管新生抑制を指向した低酸素誘導因子阻害剤の創薬研究

研究課題名（英文） Development of HIF inhibitor as anti-angiogenic agents

研究代表者

潘 鉉承（BAN HYUNSEUNG）

学習院大学・理学部・助教

研究者番号：60433710

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん細胞の増殖や浸潤・転移を促進を誘導する病的血管新生を抑制する血管新生阻害剤の開発とその作用機序の解明を行った。低酸素条件下で GN26361 化合物は HSP60 を阻害することより低酸素誘導因子の発現を低下し血管新生誘導因子の産生を抑制することが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In this research, we developed HIF inhibitors as anti-angiogenic agents and clarified the mechanism of action. We found that compound GN26361 suppressed HIF-1 $\alpha$  protein level via inhibition of HSP60 under hypoxic conditions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：血管新生、低酸素、低酸素誘導因子

## 1. 研究開始当初の背景

血管新生とは、既存の血管から新たな血管が形成する現象であり、傷と骨折の修復や女性の月経周期の場合に生理的血管新生が誘導される。一方、固形腫瘍、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症や乾癬など多くの疾患において病的血管新生が疾患の悪性化を進行する。病的血管新生の分子機構について様々な血管誘導因子が関与することが明らかになっており、特に血管内皮増殖因子（VEGF、vascular endothelial growth factor）が最も重要な役割を果たしていることが報告されている。VEGF は、Ferrara らによって発見

され（Science、246、1306-9、1989）、血管内皮細胞の分裂や遊走、血管透過性の亢進などの作用を示すことが明らかになり、様々な疾患の治療標的分子である。さらに、VEGF の発現には増殖因子やサイトカイン、ケミカルメディエーターが関与しており、近年低酸素による VEGF 発現亢進が注目されている。特に、固形腫瘍内の化学療法や放射線治療に抵抗性を示す低酸素領域では低酸素応答を制御する重要な転写因子である低酸素誘導因子（HIF、hypoxia-inducible factor）が発現し VEGF を誘導することが報告されている。通常状態（酸素濃度 20%）では、酸素依存的に

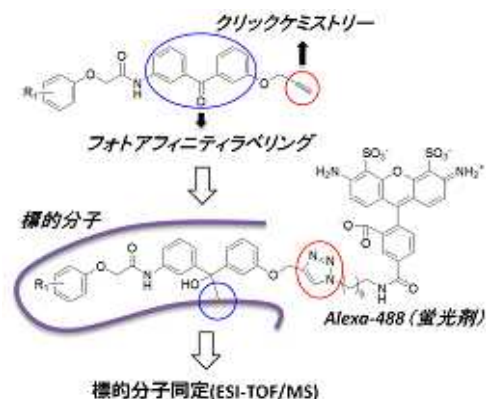
活性化する酵素であるプロリン水酸化酵素 (PHD, Prolyl hydroxylase) により HIF-1 $\alpha$  の特定のプロリン残基 (P402 と P564) が水酸化され、ユビキチンリガーゼ E3 の一つのサブユニットである VHL が結合し、ユビキチン/プロテアソーム経路によって分解される。一方、酸素濃度が低下すると (低酸素状態)、PHD の酵素活性が低下され、HIF-1 $\alpha$  は分解されず、核内に移行し低酸素応答配列 (HRE, hypoxia response element) 依存性の遺伝子である VEGF、赤血球造血を亢進するエリスロポエチンやグルコース輸送にかかわるグルコーストランスポーターなどを発現する。このような経路によりがん細胞から産生された VEGF を標的とした病的血管新生の抑制剤として、現在ヒトモノクローナル抗体ベバシズマブ (アバスタ<sup>TM</sup>) が大腸がんや肺がん、乳がんなどの治療に用いられている。

## 2. 研究の目的

固形腫瘍内の低酸素領域において低酸素誘導因子 HIF は、血管内皮増殖因子 VEGF などの血管誘導因子の発現を亢進することにより病的血管新生を誘導する。このような経路を介してがん細胞の増殖や浸潤・転移を促進することから HIF はがん治療の標的分子として最近注目されているが、選択的な阻害剤の報告はまだ数少ない。そこで研究は、病的血管新生抑制を指向した HIF 阻害作用を示す新規低分子化合物の開発と、ケミカルバイオロジー的手法を用いて阻害剤の標的分子同定及び作用機序を明らかにすることを目的とした本研究を行った。

## 3. 研究の方法

アントラニルアミド及びアリールオキシフェニルアセトアミド誘導体の合成と HRE-ルシフェラーゼ安定発現細胞 (HeLa 及び HCT116) を用いたレポーター遺伝子アッセイ法にて低酸素条件下 HIF 阻害活性の評価を行うことで構造活性相関を解析した。細胞内の HIF-1 $\alpha$  と VEGF を含む各種タンパクや mRNA の



Scheme 1. Design of probe for photoaffinity labeling and click reaction

発現レベルに対する化合物の作用について解析した。さらに、阻害剤の作用機序を明らかにするため、フォトアフィニティラベリング、クリックケミストリーあるいはビオチンを修飾した阻害剤プローブ (Scheme 1) を用いてケミカルバイオロジー的手法により標的分子の同定を行った。さらに、標的分子に対して高いアフィニティを示す化合物の設計・合成と活性評価を行うことで、より強い HIF-1 $\alpha$  阻害剤を開発した。

## 4. 研究成果

### (1) アントラニルアミド及びアリールオキシフェニルアセトアミド誘導体の合成と HIF 阻害活性の評価

100 種類のアントラニルアミド及びアリールオキシフェニルアセトアミド化合物の HIF-1 $\alpha$  転写活性を 5HRE-Luciferase-pGL プラスミドを安定発現させたヒト子宮がん細胞株 HeLa を用いてレポーターアッセイにてスクリーニングした結果、多数の化合物が低酸素による HIF-1 $\alpha$  活性化抑制作用を示すことを見出した。そこで、HIF-1 $\alpha$  活性化抑制の構造活性相関を解析するため、アントラニルアミド及びアリールオキシフェニルアセトアミド化合物の誘導体を合成した。

### (2) ケミカルバイオロジー的手法による標的蛋白質の同定及び作用機序の解析

HIF 阻害活性を示す化合物の作用機序を明らかにする目的として、標的タンパクの同定に有効な手法であるフォトアフィニティラベル法とクリックケミストリー法を用いた。プローブは光反応により標的タンパクと共有結合を形成する光反応性官能基ベンゾフェノン修飾した。さらに、末端にアセチレンを修飾したプローブは、アジド含有蛍光剤と銅を触媒とするクリックケミストリーライゲーション法を用いて結合可能である (Figure 1)。

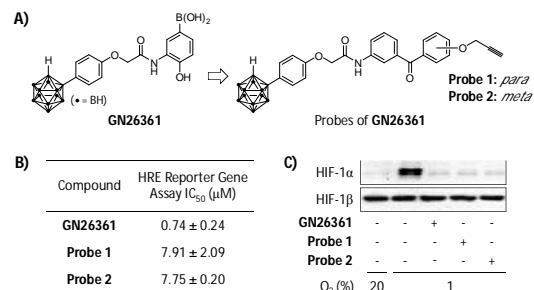


Figure 1. Design of GN26361 probes and HIF inhibitory activity

このようなプローブと反応させた細胞ライゼートをポリアクリルアミド電気泳動を行い、蛍光イメージングシステムにて化合物と共有結合した蛋白質を可視化し、ゲル内トリ

プシン消化法で断片化した(Figure 2)。ゲルから抽出されたペプチドを液体クロマトグラフィー-連結質量分析装置(LC/ESI-TOF-MS)を用いてペプチドマスフィンガープリンティング法(PMF)により解析した結果、標的分子であるHSP60の同定に成功した。

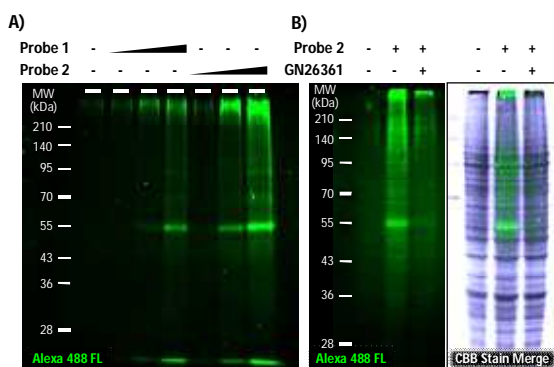


Figure 2. Fluorescence imaging of target protein bound to probe

また、プローブとリコンビナントHSP60の結合はGN26361によって抑制された。さらに、既知HSP60阻害剤であるETBはGN26361と同様にHIF-1 $\alpha$ レベルを抑制し、HIF転写活性を阻害した。以上のことからGN26361のHIF-1阻害作用機序を明らかになり、HSP60はHIF阻害剤開発の新たなターゲットになると思われる。

### (3) VEGFR阻害剤AAL993によるHIF活性化抑制

既知VEGFR阻害剤であるアントラニルアミドAAL993によるHIF活性化抑制作用及びその作用機序について解析した。ヒト子宮がん細胞HeLaを低酸素条件下で培養後、細胞内各種蛋白のレベルをWestern blot法により、HIF-1 $\alpha$ 及びVEGF mRNAレベルをRT-PCR法により検出した。また、HIFの転写活性はHRE-Lucを安定発現させたHEK293細胞を用いてレポーターアッセイにより、培養液上清中のVEGFの量をELISA法により測定した。さらに、HIF-1 $\alpha$ の細胞内局在を蛍光免疫染色法により解析した。低酸素条件下でAAL993はHIF-1 $\alpha$ レベルの亢進を濃度依存的に抑制した。また、AAL993は低酸素によるHIFの転写活性化を阻害し(IC<sub>50</sub>; 6.53  $\mu$ M)、VEGF産生を抑制した(IC<sub>50</sub>; 4.17  $\mu$ M)。さらに、AAL993は低酸素によるHIF-1 $\alpha$ の分解経路に影響せずHIF-1 $\alpha$ のmRNAレベルを低下することによりHIF-1 $\alpha$ の発現を抑制した。このようなAAL993のHIF-1 $\alpha$ の発現抑制作用にはERKの活性化抑制が大きく関与しており、VEGFRの非依存的な作用であることが分かった。これらの結果から、AAL993はVEGFRの阻害作用だけではなく、低酸素によるHIF-1 $\alpha$ の活性化経路を抑制することにより血管新生を抑制する作用があることが示唆された。

## 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4件)

Hyun Seung Ban, Yoshikazu Uto, Hiroyuki Nakamura. Hypoxia-inducible factor inhibitors: A survey of recent patented compounds (2004-2010). Expert Opinion on Therapeutic Patents, 査読有, 21(2), 2011, 131-146

DOI:10.1517/13543776.2011.547477

Hyun Seung Ban, Kazuki Shimizu, Hidemitsu Minegishi, Hiroyuki Nakamura. Identification of HSP60 as a primary target of o-carboranylphenoxyacetanilide, an HIF-1 $\alpha$  inhibitor. Journal of American Chemistry Society, 査読有, 132(34), 2010, 11870-11871

DOI:10.1021/ja104739t

Hyun Seung Ban, Masaharu Uno, Hiroyuki Nakamura. Suppression of hypoxia-induced HIF-1 $\alpha$  accumulation by VEGFR inhibitors: Different profiles of AAL993 versus SU5416 and KR633. Cancer Letters, 査読有, 296(1), 2010, 17-26

http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2010.03.010

Kazuki Shimizu, Minako Maruyama, Yuka Yasui, Hidemitsu Minegishi, Hyun Seung Ban, Hiroyuki Nakamura. Boron-containing phenoxyacetanilide derivatives as hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 $\alpha$  inhibitors. Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 査読有, 20(4), 2010, 1453-1456

http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.12.037

[学会発表](計5件)

潘鉉承、清水一希、峯岸秀充、中村浩之、HIF阻害剤GN26361の作用機序の解明。第8回がんとハイポキシア研究会、札幌、2011年1月29-30日

H. Ban、K. Shimizu、H. Minegishi、H. Nakamura、Action mechanism of HIF-1 inhibitor GN26361: Identification of target protein with multifunctional molecular probe. 2010 環太平洋国際化学会議、Honolulu (ハワイ)、2010年12月15-20日

潘鉉承、清水一希、峯岸秀充、中村浩之、低酸素誘導因子(HIF)阻害剤GN26361の作用機序の解明。第14回日本がん分子標的治療学会学術集会、東京、2010年7月6-8日

潘鉉承、清水一希、峯岸秀充、中村浩之、  
カルボラン含有小分子化合物 GN26361 に  
よる低酸素誘導因子(HIF)阻害と作用機序。  
第7回日本中性子捕捉療法学会学術集会、  
東京、2010年8月5-6日

- ⑤ 潘鉉承、清水一希、峯岸秀充、中村浩之、  
HIF阻害剤 GN26361の標的分子HSP60の同  
定。第29回メディシナルケミストリーシ  
ンポジウム、京都、2010年11月17-19日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

潘 鉉承 (BAN HYUNSEUNG)  
学習院大学・理学部・助教  
研究者番号：60433710

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

中村 浩之 (NAKAMURA HIROYUKI)  
学習院大学・理学部・教授  
研究者番号：30274434