

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：72801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510270

研究課題名(和文) インビボイメージングを用いた経口投与可能なプロテアソーム阻害剤の開発

研究課題名(英文) Development of orally active proteasome inhibitors using in vivo imaging.

研究代表者

百瀬 功 (MOMOSE, Isao)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・沼津支所・主席研究員

研究者番号：10270547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：多発性骨髄腫の治療薬として用いられているプロテアソーム阻害剤は注射剤であるため、経口投与で有効なプロテアソーム阻害剤が求められている。そこで我々はin vivoイメージング法を用いて経口投与可能なプロテアソーム阻害剤を探索した。まずプロテアソームによって分解される蛍光タンパク質を発現する細胞を樹立してマウスに移植し、腫瘍内部のプロテアソーム阻害活性を測定できるin vivoイメージング法を開発した。さらにプロテアソーム阻害剤チロペプチンの誘導体を合成し、in vivoイメージング法を用いて経口投与で有効なプロテアソーム阻害剤を得ることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Proteasome inhibitors were approved for treatment of multiple myeloma. Because these inhibitors are administered by intravenous bolus, new orally active proteasome inhibitors are desired. In this study, we developed a system for in vivo imaging of proteasome inhibition in the tumors of living mice, using a proteasome-sensitive fluorescent reporter. Then we used tyropeptin, which are produced by Kitasatospora sp. MK993-dF2, as a lead compound for the design of proteasome inhibitors, and synthesized tyropeptin derivatives. Finally, we found new orally active proteasome inhibitors using our in vivo imaging system and tyropeptin derivatives.

研究分野：天然物化学

キーワード：インビボイメージング プロテアソーム プロテアソーム阻害剤 経口剤

1. 研究開始当初の背景

真核細胞内の主要なタンパク質分解酵素であるプロテアソームは、細胞内で不要なタンパク質やダメージを受けたタンパク質を分解するのみでなく、細胞周期やシグナル伝達に関与する種々の機能性タンパク質の分解に関与しており、細胞機能の制御に重要な役割を担っている。プロテアソーム阻害剤はこれらのタンパク質の分解を抑制することにより、それらが規則正しく機能できなくなり、アポトーシスを引き起こすと考えられている。特にがん細胞は増殖が盛んであり、かつタンパク質分解も活発であることからプロテアソームの阻害に対して高い感受性で細胞死が誘導される。よってプロテアソームはがん治療の分子標的と考えられており、実際にプロテアソーム阻害剤 **bortezomib** は多発性骨髄腫の治療薬として使用されている。しかし、**bortezomib** の長期投与による毒性や耐性が問題とされており、新たなプロテアソーム阻害剤の開発が必要とされている。また **bortezomib** は注射剤であり患者の QOL (quality of life) を向上させるために、新しい経口投与可能なプロテアソーム阻害剤が求められている。このため国内外においていくつかの新しい経口プロテアソーム阻害剤の開発の報告はあるが、今だ上市に至っていない。

これまでに我々は新しいプロテアソーム阻害剤を探索し、放線菌の培養液より新規プロテアソーム阻害剤チロペプチンを見出した (図 1)。そこでチロペプチンをリード化合物として数十種類の誘導体を合成し、**bortezomib** よりも強いプロテアソーム阻害活性を有する誘導体を得ることに成功した。



図1 新規プロテアソーム阻害剤チロペプチン

これら誘導体のマウスを用いた抗腫瘍活性の測定には、大量のサンプルや長期間の観察が必要になる。全てのサンプルを合成により大量に得ることは困難であることから、各誘導体の *in vitro* の生物活性や薬物動態を指標に総合的に判断し、化合物を絞り込み *in vivo* 抗腫瘍活性を測定する必要がある。しかし *in vivo* 評価への選考に漏れた誘導体でも抗腫瘍活性を示さないと限らず、有望な誘導体を見落とす可能性がある。そこで多くの誘導体を少ないサンプル量で迅速、かつ効率的に抗腫瘍活性を測定するために、*in vivo* イメージングを利用した方法を考案した。マウスに移植した腫瘍のプロテアソーム阻害活性と抗腫瘍活性は相関することが我々のこれまでの研究で明らかになっていることから、

プロテアソーム分解性蛍光タンパク質を利用して腫瘍内プロテアソーム阻害活性を測定する方法を開発した。このタンパク質は通常翻訳後直ちにプロテアソームにより分解され低レベルに抑えられているが、プロテアソーム活性が阻害されると蛍光タンパク質の分解が抑制され細胞内に蓄積し強い蛍光を発する。このプロテアソーム分解性蛍光タンパク質発現細胞をマウスに移植して腫瘍を形成させた後に **bortezomib** を静脈内投与すると、腫瘍内プロテアソームが阻害され強い蛍光を発することが確認できた。よってこの *in vivo* イメージング法を用いて経口投与可能なプロテアソーム阻害剤を簡便に探索できるのではないかとこの着想に至った (図 2)。この *in vivo* イメージング法は、薬剤投与 24 時間後で腫瘍内蛍光が観察されることから、従来の抗腫瘍効果の測定に比べて遥かに短時間で測定できる。また単回投与で判断できるため少量のサンプルで評価することが可能であり、生きたまま非侵襲的な観察のため経時変化を調べることができる等のメリットがある。このような *in vivo* イメージング法を用いて新しいプロテアソーム阻害剤を開発した研究は国内外問わずこれまでにない新しい試みである。

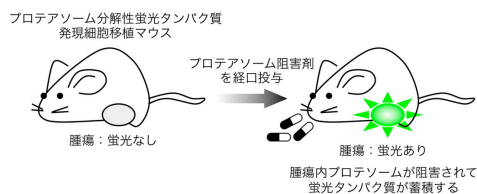


図2 腫瘍内プロテアソーム阻害の *in vivo* イメージング

2. 研究の目的

本研究は *in vivo* イメージング法を用いて迅速かつ効率的に経口投与可能な新しいプロテアソーム阻害剤を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) プロテアソーム阻害剤チロペプチン誘導体の生物活性: *In vitro* のプロテアソーム阻害活性はヒト赤血球由来 20S プロテアソームを用いた。細胞を用いた検討には、ヒト多発性骨髄腫 IM-9、RPMI8226、KMS-11 細胞を用いた。抗腫瘍活性の測定には SCID マウスの鼠蹊部皮下に RPMI8226 細胞を移植したがん移植モデルマウスを用いた。

(2) プロテアソーム阻害剤チロペプチン誘導体の合成: チロペプチンのアルデヒド基をボロン酸に変更し、さらに種々のアミノ酸を導入した誘導体を合成した。

(3) *In vivo* イメージングによる腫瘍内プロテアソーム阻害活性測定法の改良: GFP (Green fluorescent protein) にモノユビキチン

が結合した組み換えタンパク質を発現するヒト大腸がん RKO-PS3 細胞を作製した。この細胞を nude マウスの皮下に移植し腫瘍を形成させ、造腫瘍性やプロテアソーム阻害剤に対する反応性を測定した。

(4) *In vivo* イメージングを用いた経口投与可能なプロテアソーム阻害剤の探索：RKO-PS3 細胞を移植し腫瘍体積が約 1,000 mm³に達したマウスに、50 mg/kg のチロペプチン誘導体を経口投与し (n=3)、24 時間後オリンパス OV110 イメージングシステムを用いて生体蛍光観察を行った。

4. 研究成果

(1) プロテアソーム阻害剤チロペプチン誘導体の生物活性：これまでに合成したチロペプチン誘導体の中で、ヒト赤血球由来 20S プロテアソームに対して bortezomib と同程度の強い阻害活性を示す誘導体 AS-29 について、詳細に生物活性を解析した。まず多発性骨髄腫 IM-9、RPMI8226 および KMS-11 細胞における AS-29 の作用について調べた。AS-29 は細胞内のプロテアソームを阻害し、プロテアソームの基質であるユビキチン化タンパク質の分解を抑制した。生体内ではさまざまなタンパク質がユビキチン化されプロテアソームにより分解されるが、がんの分子標的として注目されている転写因子 NF- κ B の抑制タンパク質 I κ B もその 1 つである。NF- κ B は多発性骨髄腫などで恒常的に活性化しており、プロテアソーム阻害剤の主要な作用点と考えられていることから、AS-29 の NF- κ B 活性化抑制作用について調べた。AS-29 は RPMI8226 細胞において TNF- α 刺激による I κ B- α の分解や NF- κ B の核内移行および DNA 結合活性を著しく抑制した。

さらに AS-29 は RPMI8226 細胞にアポトーシス実行タンパク質であるカスパーゼ 8 やカスパーゼ 9 の活性化を亢進し、カスパーゼ 3 の活性化および PARP の分解を介して、アポトーシスを誘導した。

次に *in vivo* での AS-29 の作用を調べるため、*in vivo* イメージング法を用いた腫瘍内プロテアソーム阻害活性を測定した。プロテアソーム分解性蛍光タンパク質を発現するヒト胎児腎 HEK293 細胞を nude マウスの鼠蹊部皮下に移植し、腫瘍体積が約 1,000 mm³ になったところで AS-29 を静脈内投与した。投与 24 時間後、腫瘍部位のプロテアソーム活性が阻

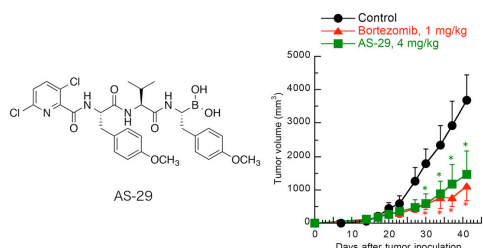


図3 AS-29の抗腫瘍活性

害され、プロテアソーム分解性蛍光タンパク質の蓄積が確認された。次に RPMI8226 細胞を nude マウスの鼠蹊部皮下に移植したヒトがんモデルマウスを用いて抗腫瘍活性を測定した。AS-29 (4 mg/kg) を週に 2 回静脈内投与したところ、著しい抗腫瘍活性が認められた (図 3)。以上によりチロペプチン誘導体の有用性は明らかとなったが、しかしながら目的とした経口投与での抗腫瘍活性は認められなかった。

(2) プロテアソーム阻害剤チロペプチン誘導体の合成：これまでに我々はチロペプチンをリード化合物として数十種類の誘導体を合成した。今回さらに誘導体の拡充を図るべく合成を行った。経口吸収性の良い化合物を創製するためには、水溶性と脂溶性のバランスが重要である。チロペプチンは溶解性の低いペプチド性化合物であることから、水溶性の向上および物性のバリエーションの多様化を目指して、酸性や塩基性、中性等の多岐にわたるアミノ酸を導入した誘導体を合成した。その結果、全体の傾向として水溶性が増加するとプロテアソーム阻害活性が低下することがわかった。またリピンスキーの法則に従いチロペプチンの低分子化を試み、分子量を 2/3 ほど小さくしてもプロテアソーム阻害活性を維持することが確認できた。

(3) *In vivo* イメージングによる腫瘍内プロテアソーム阻害活性測定法の改良：これまでプロテアソーム分解性蛍光タンパク質としてサンゴ ZsGreen 蛍光タンパク質とユビキチン化なしにプロテアソームにより分解される MODC (マウスオルニチン脱炭酸酵素) ドメインを融合させたタンパク質を発現するヒト胎児腎 HEK293 細胞を用いて、腫瘍内プロテアソーム阻害活性を *in vivo* イメージング法にて測定してきたが、実験に適したマウスを作製するのに約 40 日間が必要であることが問題であった。そこで宿主としてヒト大腸がん RKO 細胞、プロテアソーム分解性蛍光タンパク質としてモノユビキチンを予め結合させた GFP を用いてプロテアソーム分解性蛍光タンパク質発現 RKO 細胞 (RKO-PS3 細胞) を作製した。この細胞をマウスの皮下に移植させたところ、高い造腫瘍性を示し移植後 17 日 (HEK293 細胞のおおよそ半分の期間) で 1,000 mm³ の腫瘍を形成した。さらに

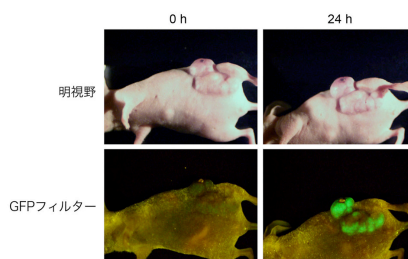


図4 CEP-18770による腫瘍内プロテアソーム阻害活性

このマウスに経口プロテアソーム阻害剤 CEP-18770 (15 mg/kg) を経口投与したところ、腫瘍内のプロテアソームが阻害され蛍光タンパク質の分解抑制および腫瘍内蓄積が明らかとなった (図 4)。よって RKO-PS3 細胞移植マウスを利用することにより腫瘍内プロテアソーム阻害活性を効率的にイメージングすることができ、実験時間の大幅な短縮ならびにスループット性の向上を可能にした。そこで我々はこの RKO-PS3 細胞を用いた *in vivo* イメージング法により経口投与可能なチロペプチン誘導体の探索を開始した。

(4) *In vivo* イメージングを用いた経口投与可能なプロテアソーム阻害剤の探索：RKO-PS3 細胞移植マウスに 50 mg/kg の各種チロペプチン誘導体を経口投与し、24 時間後の蛍光タンパク質の蓄積を *in vivo* イメージング法を用いて測定した。実験に供した 50 種類の誘導体の中で、13 種類の誘導体で明らかな蛍光タンパク質の蓄積が認められた。続いてこの 13 誘導体の中から蛍光強度や化学構造の特徴などを考慮し 4 種類の誘導体について薬剤用量依存性を調べたところ、2 種類の誘導体において明らかな薬剤用量依存性が認められた。そこで、この 2 種類の誘導体について、RPMI8226 細胞移植マウスにおける経口投与での抗腫瘍活性を測定した。いずれの誘導体においても明らかな抗腫瘍活性を示し、本研究の目的である経口投与可能なプロテアソーム阻害剤を得ることに成功した。現在、一部の誘導体について再合成しており、今後それらの抗腫瘍活性の測定から、さらに高活性の化合物を選択し、新しい経口プロテアソーム阻害剤の開発に向けた研究を進めていく予定である。

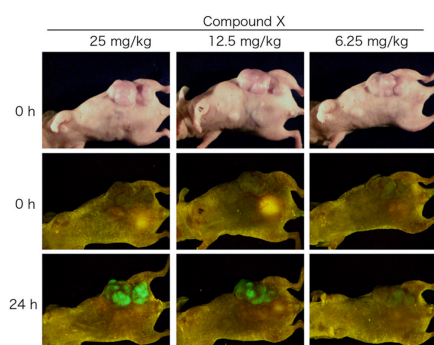


図5 Compound X による腫瘍内プロテアソーム阻害活性

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 5 件)

- ① D. Tatsuda, I. Momose, T. Someno, R. Sawa, Y. Kubota, M. Iijima, T. Kunisada, T. Watanabe, M. Shibasaki, A. Nomoto. Quinofuracins A-E, produced by the fungus *Staphylotrichum boninense* PF1444, show

p53-dependent growth suppression. *J. Nat. Prod.*, 査読有, 78, 2015, 188-195, DOI: 10.1021/np500581m.

- ② Y. Yamazaki, T. Someno, M. Igarashi, N. Kinoshita, M. Hatano, M. Kawada, I. Momose, A. Nomoto. Androprostamines A and B, the new anti-prostate cancer agents produced by *Streptomyces* sp. MK932-CF8. *J. Antibiot.*, 査読有, 68, 2015, 279-285, DOI: 10.1038/ja.2014.135.
- ③ I. Momose, H. Abe, T. Watanabe, S. Ohba, K. Yamazaki, S. Dan, T. Yamori, T. Masuda, A. Nomoto. Antitumor effects of tyropeptin-boronic acid derivatives: new proteasome inhibitors. *Cancer Sci.*, 査読有, 105, 2014, 1609-1615, DOI: 10.1111/cas.12542.
- ④ S. Sakamoto, F. Kojima, I. Momose, M. Kawada, H. Adachi, Y. Nishimura. Decalpenic acid induces early osteoblastic markers in pluripotent mesenchymal cells via activation of retinoic acid receptor γ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 査読有, 422, 2012, 751-757, DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.05.075.
- ⑤ I. Momose, D. Tatsuda, S. Ohba, T. Masuda, D. Ikeda, A. Nomoto. *In vivo* imaging of proteasome inhibition using a proteasome-sensitive fluorescent reporter. *Cancer Sci.* 査読有, 103, 2012, 1730-1736, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02352.x

[学会発表] (計 22 件)

- ① 百瀬功, 立田大輔, 染野哲也, 澤竜一, 久保田由美子, 山崎洋子, 飯島正富, 渡辺匠, 國定隆夫, 柴崎正勝, 野本明男. *Staphylotrichum boninense* PF1444 株の生産する新規化合物キノフラシンの単離・構造決定. 第 56 回天然有機化合物討論会, 2014 年 10 月 15 日, 高知県立県民文化ホール (高知).
- ② 立田大輔, 大庭俊一, 梅沢洋二, 百瀬功, 飯島正富, 野本明男. 骨肉腫に対する geraniin の腫瘍抑制効果. 第 73 回日本癌学会総会, 2014 年 9 月 26 日, パシフィコ横浜 (横浜).
- ③ 立田大輔, 大庭俊一, 飯島正富, 百瀬功, 野本明男. p53-Mdm2 結合阻害剤 geraniin の *in vivo* 抗腫瘍効果と転移抑制の解析. 第 18 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2014 年 6 月 26 日, 仙台市情報・産業プラザ (仙台).
- ④ 立田大輔, 大庭俊一, 梅沢洋二, 百瀬功, 飯島正富, 野本明男. 骨肉腫細胞に対する geraniin の *in vivo* 抗腫瘍効果. 第 72 回日本癌学会総会, 2013 年 10 月 5 日, パシフィコ横浜 (横浜).
- ⑤ 立田大輔, 大庭俊一, 飯島正富, 百瀬功, 野本明男. p53-Mdm2 結合阻害剤である geraniin の *in vivo* 抗腫瘍効果. 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).
- ⑥ Isao Momose, Hikaru Abe, Takumi Watanabe, Shun-ichi Ohba, Masatomi Iijima, Yohko Yamazaki, Tohru Masuda, Akio Nomoto, Antitumor activity of new proteasome inhibitors, tyropeptin-boronic acid derivatives. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, February 24, 2013, Maui (USA).
- ⑦ 飯島正富, 立田大輔, 百瀬功, 野本明男. BarminomycinによるIAP発現阻害. 第71回日本癌学会総会, 2012年9月21日, ホテルロイトン札幌(札幌).
- ⑧ 立田大輔, 飯島正富, 百瀬功, 野本明男. p53-Mdm2の結合を阻害するエラジタンニン類. 第16回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2012年6月28日, 西日本総合展示場AIM3F(北九州).
- ⑨ Isao Momose, Hikaru Abe, Takumi Watanabe, Shun-ichi Ohba, Masatomi Iijima, Tohru Masuda, Akio Nomoto, Antitumor effects of tyropeptin-boronic acid derivatives: New proteasome inhibitors. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, November 30, 2011, 京王プラザホテル東京(東京).
- ⑩ 百瀬功, 飯島正富, 増田徹, 野本明男. プロテアソーム阻害剤チロペプチンのボロン酸誘導体の抗腫瘍効果. 第70回日本癌学会総会, 2011年10月3日, 名古屋国際会議場(名古屋).
- ⑪ 立田大輔, 飯島正富, 百瀬功, 野本明男. Genaniinはp53-Mdm2の結合を阻害する. 第15回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2011年6月23日, ホテル日航東京(東京).

[その他]

ホームページ等

<http://www.bikaken.or.jp/laboratories/numazu/achievements.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

百瀬 功 (MOMOSE, Isao)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所沼津支所・主席研究員

研究者番号：10270547

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

増田 徹 (MASUDA, Toru)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所沼津支所・主席研究員

研究者番号：90165720

渡辺 匠 (WATANABE, Takumi)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・主席研究員

研究者番号：80270544

立田 大輔 (TATSUDA, Daisuke)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所沼津支所・研究員

研究者番号：20442569

大庭 俊一 (OHBA, Shun-ichi)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所沼津支所・研究員

研究者番号：00601600

阿部 光 (ABE, Hikaru)

公益財団法人微生物化学研究会・微生物化学研究所・研究員

研究者番号：10462269