

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：23803

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510281

研究課題名(和文) DNAアルキル化剤の新規作用機序に関する研究

研究課題名(英文) A novel mode of action of DNA alkylating anticancer agents

研究代表者

浅井 章良 (ASAI, AKIRA)

静岡県立大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：60381737

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ベンダムスチンは2010年に国内で承認されたリンパ腫の治療薬である。その作用機序はこれまでDNAアルキル化と考えられてきた。本研究ではがん細胞の増殖や生存と深く関わっている転写制御因子STAT3に着目して解析を進めた結果、ベンダムスチンがSTAT3のSH2ドメインに作用することによって、その機能を阻害することを新たに見出した。またベンダムスチンががん細胞内STAT3と共有結合複合体を形成することも示唆された。以上、本薬剤による優れた抗がん活性や免疫調節作用はSTAT3機能阻害と関わっていることが考察され、今後新たな抗がん剤をデザインするための鍵となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Bendamustine (Benda) is an anti-lymphoma drug, which was recently approved in Japan. Although DNA has been believed to be primary target of this agent, the details of mechanism of action still remain unclear. We herein, for the first time, report STAT3 inhibition by Benda. The STAT3-SH2 antagonistic activity was shown by Benda but not by the inactive metabolites in the biochemical assay using recombinant human STAT3 protein. Furthermore, Benda suppressed both DNA-binding and transcriptional activity of STAT3 in the human breast cancer cell line MDA-MB-463. The competitive pull-down assay using the Benda analogs revealed that this agent tightly bound to cellular STAT3. Therefore, those results suggest that the previously reported anti-cancer and immunomodulation effects by this agent might be associated with its inhibitory effect on STAT3.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：がん 抗がん剤 DNAアルキル化剤 転写制御因子 STAT3 SH2

1. 研究開始当初の背景

塩酸ベンダムスチンは1950年に旧東ドイツで合成され、その後1971年からドイツにおいて非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫及び慢性リンパ性白血病の治療薬として長年使用されている。米国では慢性リンパ性白血病及び低悪性度非ホジキンリンパ腫の新規化学療法剤(商標名「TREANDA®」)として、米国食品医薬局(FDA)から2008年に承認取得し、米国臨床腫瘍学会(ASCO)の2008年度に最も重要と考えられる研究を総括した報告書の中で、慢性リンパ性白血病の治療に大きな影響を与えた新薬に選ばれている。日本でも臨床開発が進められ、2010年10月1日厚生労働省において国内製造販売が承認された。ベンダムスチンはN,N-ビス(2-クロロエチル)メチルアミン(HN-2)構造とプリン様ベンズイミダゾール環を連結させた構造を有しDNAアルキル化剤として知られている。しかし近年米国国立がん研究所(NCI)の各種がん細胞パネルを用いたCOMPARE解析においてこれら他のアルキル化剤とは異なる感受性プロファイルを示すことや、通常とは異なるDNA損傷ストレスレスポンスを示すことなどが明らかとなってきた(Leoni et al. Clin Cancer Res 2008)。また、臨床上の優れた効果の点からも、上記DNAアルキル化剤とは異なる作用機序を有することが示唆されている。しかしDNAアルキル化作用以外の作用機序に関する詳細な解析は行われておらず、新たな標的分子候補もこれまでに報告がない。

STAT3は1994年にDarnell JE Jr(ロックフェラー大)らによって発見されたSTATファミリー転写制御因子のひとつである(Zhong et al. Science 1994)。細胞増殖、生存、血管新生などに関わるタンパク質の発現を促進することが知られており、さらにリンパ腫や乳癌、脳腫瘍など多くのがん細胞で恒常的活性化が報告されていることから、新規抗がん剤の標的分子として注目されている。IL-6やEGFなどの刺激により細胞質内のSTAT3のTyr705がJAK等によりリン酸化され、相互のSH2ドメインを介してSTAT3二量体を形成する。二量化したSTAT3は核内に移行し、標的遺伝子のDNAプロモーター領域に特異的に結合し転写が開始されることが知られている。従って二量化はSTAT3の活性化において重要であり、これを阻害した場合STAT3の機能が損なわれがん細胞の増殖抑制やアポトーシス誘導に繋がる。実際に申請者らは、独自のスクリーニング法を開発し(Uehara, Asai et al. BBRC 2009)STAT3の二量化を選択的に阻害し、かつ担がんマウスモデルにおいて経口投与で抗腫瘍活性を示すSTX-0119などを発見してきた(Matsuno, Asai et al. ACS Med Chem Lett 2010)。一方、非ホジキンリンパ腫や多発性骨髄腫においてSTAT3の活性化阻害が既存抗がん剤の作用を増強することも報告されている(Alas et al. Clin

Cancer Res 2003)。

2. 研究の目的

塩酸ベンダムスチンは非ホジキンリンパ腫、マンツル細胞リンパ腫の治療薬として2010年10月に国内での製造販売が承認された抗がん剤である。その作用機序はDNAアルキル化と考えられてきたが、HN-2構造を有する他のDNAアルキル化剤とは異なる作用機序、すなわち他の標的分子の存在が示唆されてきた。そこで本研究ではリンパ腫など多くのがんで恒常的な活性化が報告されている転写制御因子STAT3に着目して、ベンダムスチンによるSTAT3のSH2ドメインを介した作用の詳細を解明し、その優れた薬効を裏付けると共に、次世代抗がん剤のデザインへ繋げることを目的としている。

3. 研究の方法

非細胞系アッセイ

これまでに著者らによって開発されたアルファスクリーン法を基盤とした独自の手法(Uehara, Asai et al. BBRC 2009)及びその改良型(Takakuma, Asai et al. PLoS ONE 2013)を用いた。各種組換えヒトSTATファミリー(rhSTAT)、および他のSH2ドメインを有するタンパク質(Grb2)は大腸菌発現系にて調製し、Avi-tagによりN末特異的にビオチンを導入した。システインをアラニンに置換した各種変異STAT3はインバースPCR法を用いて調製した。これらビオチン化タンパク質とFITCラベル化したリン酸化ペプチドを用いることにより、各タンパク質とリン酸化ペプチドとの特異的結合をフォトシグナルとして検出した。本手法を用いることにより、ベンダムスチンやシスプラチンによる阻害効果を評価した。

細胞系アッセイ

STAT3が恒常的に活性化しているヒト乳がん細胞株MDA-MB-468を解析に用いた。STAT3の標的遺伝子として知られているSurvivin, Bcl-2等のmRNAはRT-PCR法によって、またこれらのタンパク質の発現はウェスタンブロット法によって、薬剤による発現抑制効果を評価した。また核内STAT3のDNA結合活性については、Transcription factor ELISAを用いて評価した。同様にクロマチン免疫沈降(ChIP)アッセイによってSTAT3のc-Mycプロモーターへの結合活性に対する薬剤の作用も検討した。競合的プロダウン法は、ビオチンラベル化ベンダムスチンを用いて、抗STAT3抗体によるプルダウンとアビジン-HRPによってベンダムスチンのSTAT3に対する結合を検出した。

4. 研究成果

著者の主宰する研究室で実施可能な29種類のアッセイ系でベンダムスチンを評価した結果、ベンダムスチンは、組換えタンパク

質を用いた非細胞系での STAT3 の二量化阻害試験で阻害活性を示すことが判明し、その他の標的分子 (Eg5, Survivin, IDO, hTERT, HIF など) に対しては阻害作用を示さなかった。この結果を受けて、さらに STAT ファミリーの中での STAT3 に対する選択性、関連化合物の STAT3 阻害作用、細胞系における STAT3 に対する作用を評価することによって、ベンダムスチンの STAT3 に対する作用を詳細に検討し、以下の結果を得た。

1) 非細胞系における試験結果

著者らは STAT3 の二量化阻害物質の開発を目的として、AlphaScreen 法を用いた独自のアッセイ法を開発し (Uehara, Asai et al. BBRC 2009)、これまでに 5, 15-DPP や STX-0119 (Matsuno, Asai et al. ACS Med Chem Lett 2010) などの二量化阻害物質を発見してきた。また今回新たに rhSTAT3 と rhSTAT5b を用いたマルチプレックス法の開発に成功した。(図 1、Takakuma, Asai et al. PLoS ONE 2013)

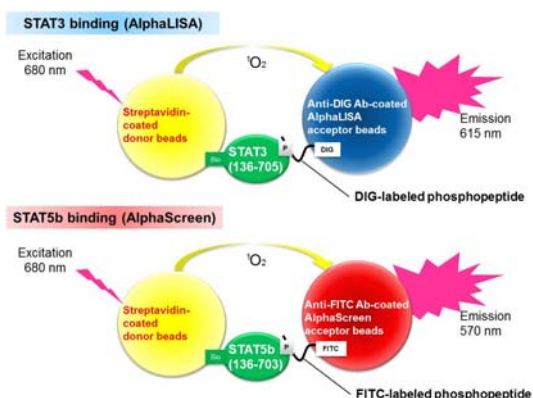
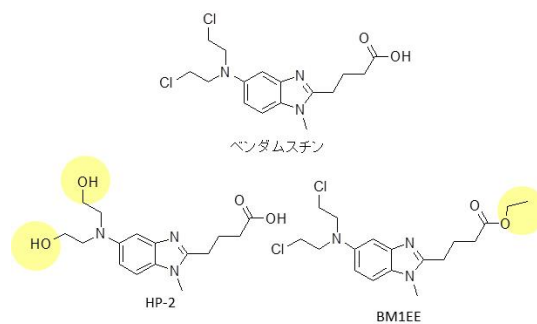


図 1 STAT-SH2 アンタゴニスト評価法

これらの評価系を用いた非細胞系での試験の結果 (図 2)、ベンダムスチンは、rhSTAT3 の SH2 ドメインを介したリン酸化ペプチドとの結合を最も強力に阻害し (IC₅₀=7.5 μM)、STAT1 (IC₅₀=60 μM)、Grb2 (IC₅₀>100 μM) STAT5b (IC₅₀>100 μM) に対しては弱いまたは阻害を示さなかった。したがって、ベンダムスチンが rhSTAT3 に対して選択的な阻害活性を有することが判明した。不活性型の代謝産物として知られる OH 体 (HP-2) は STAT3 二量化阻害活性を示さなかった (IC₅₀>100 μM)。一方、カルボン酸部位を修飾したエチルエステル体 (BM1EE) は STAT3 に対してベンダムスチンと同程度の二量化阻害活性を示した。よって、rhSTAT3 の SH2 ドメインに対するアンタゴニスト活性には、DNA との共有結合に必須な HN-2 構造が重要であることから、rhSTAT3 に対しても NH-2 を介した共有結合複合体を形成していることが容易に推測される。また同様の作用はプラチナ系アルキル化剤であるシスプラチンでも確認され、シスプラチンのプロドラッグ体であるカルボ

プラチンでは阻害が見られなかった。この結果をもとに、共同研究者であるオランダの Radboud University Nijmegen ・ Joost Lesterhuis らによってシスプラチンの STAT ファミリータンパク質への作用を細胞株または臨床組織を用いて検討中である。ベンダムスチンに関しては、さらにシステインのチオール修飾体として知られている Alexa488-C5-madeimide の rhSTAT3 への取り込み実験において部分的ではあるが濃度依存的に蛍光色素の取り込みを阻害し、不活性代謝産物 HP-2 では阻害が見られなかったことから、ベンダムスチンは STAT3-SH2 内またはその近傍のシステインと共有結合複合体を形成していることが強く示唆された。そこでアルキル化部位の同定を目的として、SH2 ドメイン及びその近傍に存在する 5 か所のシステイン (Cys468, Cys550, Cys542, Cys687, Cys712) を選択し、これらをアラニンに置換した変異型 rhSTAT3 を調製した。これらの変異体は、ベンダムスチンの標的となるシステイン残基の絞り込みに有用である。



薬剤	<i>in vitro</i> 二量化阻害 IC ₅₀ (μM)		
	STAT3	STAT1	Grb2
ベンダムスチン	7.5	60	>100
HP-2	>100	>100	>100
BM1EE	6.1	100	>100

図 2 ベンダムスチン関連化合物の構造と STAT-SH2 阻害活性

2) 細胞系における試験結果

細胞系における各種解析には、STAT3 が恒常的に活性化しているヒト乳がん細胞株 MDA-MB-468 を用いた。ベンダムスチンは極めて不安定な薬剤であることから特に細胞系での解析には高濃度の薬剤を必要とした。まず薬剤処理した細胞から核抽出液を取得、抽出液中の STAT3 の DNA 結合を transcription ELISA を用いて *in vitro* で解析した。その結果ベンダムスチン処理細胞では濃度依存的に DNA 結合活性が低下したが、HP-2 処理細胞では変化が見られなかった。次に STAT3 の標的遺伝子として知られている Survivin, Cyclin D1, Bcl-2, Bcl-XL の mRNA レベルを real time RT-PCR 法により解析した。ベンダムスチンまたは HP-2 を細胞に 8 時間接触させ、mRNA お回収、cDNA 合成後に特異的プライマーを用いて解析した結果、ベンダムスチ

ン処理細胞ではいずれも mRNA レベル低下し、HP-2 処理では変化が見られなかった。また c-Myc プロモーターへの STAT3 の結合活性を CHIP アッセイによって解析した結果も同様であった (図 3)。

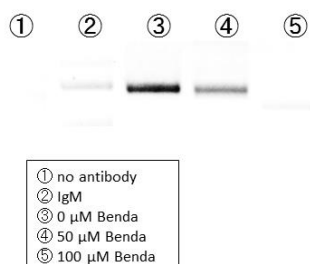


図 3 STAT3 の c-myc プロモーターへの結合に対するベンダムスチンの作用 (ChIP アッセイ)

従ってベンダムスチンは細胞内においても STAT3 の機能を阻害することが明らかとなった。一方、免疫染色法を用いて核内 STAT3 タンパク質レベルの変動を解析したが、ベンダムスチン処理細胞で STAT3 の核内移行の抑制は見られなかった。従ってベンダムスチンによる STAT3 機能阻害は、核内の STAT の量的ではなく STAT3 の質的な変化によって DNA 結合活性が低下したものと考えられた。そこでビオチンラベル化ベンダムスチンを用いることによって、細胞内におけるベンダムスチンと STAT3 の相互作用について解析した (図 4)。

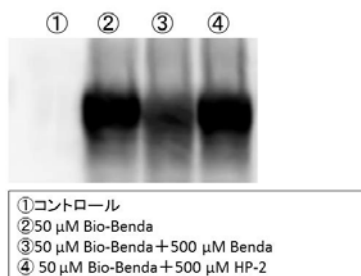


図 4 細胞内 STAT3 とベンダムスチンの結合 (競合的プルダウンアッセイ)

ビオチン化ベンダムスチン処理後の細胞抽出液かに抗 STAT3 抗体を添加し、ビーズ法により STAT3 を免疫沈降させた。免疫沈降物をアビジン—HRP を用いてプロットした結果、STAT3 の位置にビオチン由来のバンドがはっきりと検出された。またこのバンドは過剰量のベンダムスチン処理により消失し、過剰量の HP-2 処理では変化しなかった。以上の結果から、ベンダムスチンは細胞内の STAT3 と強固に結合し、その結合には HN-2 構造が必要であることから、共有結合複合体を形成していることが示唆された。

以上の結果から、ベンダムスチンはこれまでに報告されてきた DNA のアルキル化に加えて、少なくともがんの増殖や生存に重要な STAT3 に共有結合しその機能を阻害すること

が示唆された (図 5)。このことはリンパ腫等に対するベンダムスチンの優れた効果の一部を説明するための機序として興味深いだけでなく、次世代の抗がん剤を開発するうえで有用な情報となることが期待される。

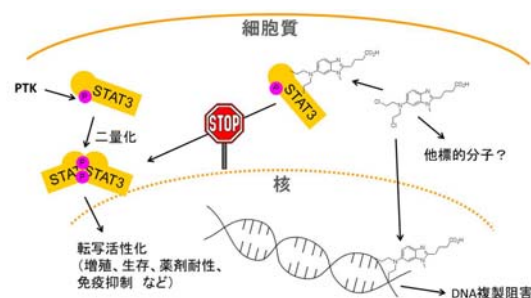


図 5 ベンダムスチン作用機序概念図

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 8 件)

- 1) Ashizawa T, Akiyama Y, Miyata H, Iizuka A, Komiyama M, Kume A, Omiya M, Sugino T, Asai A, Hayashi N, Mitsuya K, Nakasu Y, Yamaguchi K. Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of a temozolomide-resistant glioblastoma cell line. *Int J Oncol.* 41:1-8 (2014) 【査読有】
- 2) Takakuma K, Ogo N, Uehara Y, Takahashi S, Miyoshi N, Asai A*. Novel multiplexed assay for identifying SH2 domain antagonists of STAT family proteins *PLoS ONE.* 8, e71646 (2013) 【査読有】
- 3) Masciocchi D, Gelain A, Porta F, Meneghetti F, Pedretti A, Celentano G, Barlocco D, Legnani L, Toma L, Kwon B, Asai A, Villa S. Synthesis, structure-activity relationships and stereochemical investigations of new tricyclic pyridazinone derivatives as potential STAT3 inhibitors *Med Chem Commun.* 4, 1181-1188 (2013) 【査読有】
- 4) Ashizawa T, Miyata H, Iizuka A, Komiyama M, Oshita C, Kume A, Nogami M, Yagoto M, Ito I, Oishi T, Watanabe R, Mitsuya K, Matsuno K, Furuya T, Okawara T, Otsuka M, Ogo N, Asai A, Nakasu Y, Yamaguchi K, Akiyama Y. Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem-like cells derived from recurrent glioblastoma. *Int J Oncol.* 43, 219-217 (2013) 【査読有】
- 5) Masciocchi D, Villa S, Meneghetti F, Pedretti A, Barlocco D, Legnani L, Toma

- L, Kwon B, Nakano S, Asai A, Gelain A. Biological and computational evaluation of an oxadiazole derivative (MD77) as a new lead for direct STAT3 inhibitors. *Med Chem Commun.* 3, 592-599 (2012) 【査読有】
- 6) Nakano S, Takai K, Isaka Y, Takahashi S, Unno Y, Ogo N, Matsuno K, Takikawa O, Asai A*. Identification of novel kynurenine production-inhibiting benzenesulfonamide derivatives in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 419, 556-561 (2012) 【査読有】
- 7) 浅井章良、小郷尚久 創薬研究における点と線 ドラッグライクとドラッグブルの接点を探る 細胞工学, 32, 644-648, 2013. 【査読無】
- 8) 浅井章良、松野研司 創薬標的としての転写因子 STAT3, *ファルマシア*, 48, 673-677, 2012. 【査読無】

〔学会発表〕(計9件)

- 1) 岩本一徳、上原裕、海野雄加、小郷尚久、浅井章良：STAT3 転写活性に対するベンダムスチンの阻害作用 第73回日本癌学会学術総会 2014年9月25-27日(横浜)
- 2) W. Joost Lesterhuis, Stanleyson V. Hat2, Carl G. Figdor, Susumu Takahashi, Cornelis J.A. Punt, Akira Asai, I. Jolanda M. De Vries: Platinum-based cancer chemotherapeutics inhibit STAT signaling by blocking the SH2 domain. AACR Annual Meeting 2013 April 8, 2013 (Washington, DC)
- 3) 高熊万之、小郷尚久、上原裕、高橋進、三好奈央、浅井章良：STAT ファミリー阻害剤探索のための新規マルチプレックスアッセイ系の開発 日本ケミカルバイオロジー学会第8回年会 2013年6月20日(東京)
- 4) 芦澤忠、飯塚明、小宮山優、浅井章良、山口建、秋山靖人：神経膠芽腫患者由来のがん性幹細胞の増殖に及ぼすSTAT3阻害剤STX-0119の効果 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月4日(横浜)
- 5) 小郷尚久、鈴木紳之、大場舞、小和田和宏、浅井章良：静岡県における化合物ライブラリーシステムの構築 日本ケミカルバイオロジー学会 第7回年会 2012年6月8日(京都)
- 6) Arianna Gelain, Daniela Masciocchi, Stefania Villa, Fiorella Meneghetti, Alessandro Pedretti, Daniela Barlocco, Laura Legnani, Lucio Toma, Byoung-Mog Kwon, Shintaro Nakano, Akira Asai: New STAT3 inhibitors: identification of a lead 21st National Meeting on Medicinal Chemistry 2012

年7月18日(Palermo)

- 7) Arianna Gelain, Daniela Masciocchi, Stefania Villa, Fiorella Meneghetti, Alessandro Pedretti, Daniela Barlocco, Laura Legnani, Lucio Toma, Byoung-Mog Kwon, Shintaro Nakano, Akira Asai: MERGED STRUCTURES AS NEW STAT3 INHIBITORS: THE "CHIMERA" COMPOUNDS 22nd International Symposium on Medicinal Chemistry 2012年9月5日(Berlin)
- 8) Stanleyson V. Hato, Carl G. Figdor, Susumu Takahashi, Anja E. Pen, Cornelis J.A. Punt, Akira Asai, I. Jolanda M. de Vries, W. Joost Lesterhuis: PLATINUM-BASED CANCER CHEMOTHERAPEUTICS DIRECTLY INTERACT WITH STAT PROTEINS AND INHIBIT SIGNALING BY BLOCKING THE SH2 DOMAIN 11th International Symposium on Platinum Coordination Compounds in Cancer Chemotherapy 2012年10月13日(Verona)
- 9) 増田吉昭、室谷歩、高橋理、横田川高峰、古谷利夫、松野研司、上原裕、大川原正、大塚雅巳、小郷尚久、芦澤忠、秋山靖人、浅井章良：In silicoスクリーニングによるSTAT3阻害剤の探索 日本ケミカルバイオロジー学会 第6回年会 2011年5月25日(東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅井 章良 (AKIRA ASAI)
静岡県立大学大学院・薬学研究院・教授

研究者番号：60381737