

微生物代謝産物およびその誘導体の 血球細胞に対する作用

塩津 行正

血球細胞は全ての脊椎動物において必須の組織であり、酸素運搬、生体防御、血液凝固といった生命維持に欠かせない機能を担っている。全ての血球細胞は造血幹細胞と呼ばれる自己複製能と増殖能を合わせ持つ細胞に由来しており、一部の白血病はこの造血幹細胞が癌化することに起因していると考えられている。本研究では微生物代謝産物およびその誘導体の血球細胞および白血病細胞に対する作用を検討した。

始めに癌治療で用いられる化学療法や放射線療法により引き起こされる血小板減少症の治療薬を目指して、血小板増多活性を有する低分子化合物のスクリーニングを開始した。骨髓中にほんの少量しか存在しない巨核球細胞から血小板は放出されるため、巨核球細胞の増加を指標とする系(無血清巨核球コロニー形成系)を構築し、インターロイキン3存在下で造血前駆細胞に直接作用して巨核球コロニー数を増加させる活性を指標に低分子化合物のスクリーニングを開始した。その過程でインドロカルバゾール骨格を有する KT6352 : 6-Methyl staurosporine がマウス巨核球コロニー数を増加させることを見出した。さらに KT6352 をマウスに腹腔内投与したところ末梢血小板数の増加、巨核球前駆細胞の増加、巨核球細胞の成熟が認められた。しかしながら KT6352 は経口投与での血小板増加作用は示さなかった。

その後、アルキル化剤である塩酸ニムスチン(ACNU)で誘導されるマウス血小板減少モデルにおいて、KT6352 を母骨格とする誘導体をスクリーニングを開始し

た。その過程で ACNU やマイトマイシン C、X 線照射で誘導される血小板減少に対して KF41399 を含むカルバゾール系化合物が経口投与により血小板減少を軽減する作用を示すことを見出した。

KF41399 の血小板減少効果は投与スケジュール依存性であり、ACNU 処理前に KF41399 投与することが必須で、ACNU 処理後に KF41399 を投与しても血小板減少の抑制効果は見られなかった。その作用機序を KF41399 投与マウス由来の造血前駆細胞を用いて解析した結果、KF41399 投与マウスの造血前駆細胞は細胞周期の静止期に留まっており、さらに細胞の自殺：アポトーシス(apoptosis)を抑制する蛋白 Bcl-2 の発現増加および Bcl-2 のリン酸化が見られた。以上のことより、KF41399 は造血前駆細胞を静止期に留め、apoptosis 抑制蛋白の発現増加により ACNU の誘発する細胞死を回避している可能性が示された。

次に、radicicol 骨格を有するオキシム誘導体の慢性骨髄性白血病(chronic myeloid leukemia: CML)治療薬の可能性を検討した。ヒト CML は第 9 番目の染色体にある癌遺伝子 *abl* が第 22 番目の染色体 *bcr* の下流部に転座することにより生じる *bcr-abl* 融合遺伝子が強いチロシンキナーゼ活性を示すことにより生じる白血病である。この転座 $t(9;22)$ により分子量 210KD の $p210^{Bcr-Abl}$ と 185KD の $p185^{Bcr-Abl}$ の 2 種類の遺伝子産物が生じる。 $p210^{Bcr-Abl}$ は 95 %以上の CML で検出され CML の原因遺伝子と言える。

CML に対しては代謝拮抗剤やアルキル化剤が治療薬として施されてきたが、近年ではインターフェロンにより生存率の増加も報告されている。また *bcr-abl* 融合遺伝子である $p210^{Bcr-Abl}$ が強いチロシンキナーゼ活性を示すことより、チロシンキナーゼ阻害を指標にした薬剤の研究・開発も進められている。

一方、ansamycin 系薬剤 Herbimycin A はヒト CML、K562 細胞株に対して赤芽球系への分化誘導作用を示し、そのメカニズムが CML の原因遺伝子の産物である $p210^{Bcr-Abl}$ の阻害であることが示されてきた。また同じ Ansamycin 系である GA が Hsp90 蛋白に結合して、そのシャペロンしている蛋白を不安定化することも既に報告されている。

シャペロンは様々な蛋白のフォールディングに重要な働きをしており、mRNA から翻訳された蛋白は種々のシャペロンの作用により、正確に折りたたまれることにより、本来の機能を保持できる。その過程で正確に折りたたまれた蛋白は少なくとも 3 つのシャペロンから構成される Hsp90/Hsp70/p23 複合体により安定化されており、細胞内の各器官に輸送されてその蛋白の機能を発揮する。また正確にフォールディングできなかった蛋白もシャペロンにより、ユビキチン・プロテアソーム系に輸送されて分解を受ける。近年、シャペロンは蛋白の折りたたみ、輸送、分解に関わるだけでなく、腫瘍との関係も指摘されてきた。正常細胞に比べて癌細胞では Hsp90 の発現量が高いことは多くの研究者により

明らかにされてきたが、Hsp90 自身のシャペロン機能により安定化されている蛋白の多くは癌化と密接な関わりを持つことが、最近になって明らかにされてきた。

その過程で大きな役割を果たしてきたのが微生物代謝産物である ansamycin 系化合物の Geldanamycin(GA)である。GA およびその類縁体である Herbimycin A(HA)はもともとチロシンキナーゼとして広く用いられていたが、不純物を含む v-Src キナーゼに比べて精製した v-Src キナーゼに対する阻害活性が弱いことから、単純にキナーゼ酵素を阻害する薬剤でないことが予想された。その後、NCI の Neckers 等は GA が Hsp90 の N 末の ATP binding site に結合してその ATPase 活性を阻害し、その結合蛋白である Raf-1 を消失させることを報告した。また、我々は radicicol が Raf-1 の消失活性を有することを見出し、radicicol も GA と同様の Hsp90 結合薬であることを見出した。この GA と radicicol といった Hsp90 結合薬（一種のバイオプローブ）により Hsp90 にシャペロンされて安定化される蛋白が徐々に明らかになりつつある。

本研究は radicicol と同様に Hsp90 結合作用を有す GA の類縁体である HA がいわゆるチロシンキナーゼ阻害剤として広く用いられている一方で、CML 細胞株 K562 に対して赤芽球系へ分化誘導作用を示し、CML の原因遺伝子である p210^{Bcr-Abl} のキナーゼ活性を阻害することに注目して開始した。

Radicicol は様々な生理活性を示す新規抗がん剤としての可能性を秘めているが、生体内(血清中)で不安定性なため十分な延命効果、抗腫瘍効果が認められなかった。そこで活性の増強および安定性の向上を目指した radicicol 誘導体合成を展開した結果、オキシム側鎖の誘導体が強い抗腫瘍効果を示すことを見出した。

本研究では最初に、CML 細胞 K562 株に対して radicicol およびオキシム誘導体 (KF25706、KF58333)が赤芽球系へ分化誘導し、増殖と分化が逆相関を示す点を明らかにした。その分化と増殖阻害のメカニズムを解明する目的で、KF58333 処理した K562 細胞のシグナル伝達に参与する因子に対する作用を検討した結果、分化誘導作用に先駆けて、p210^{Bcr-Abl} 蛋白の消失、チロシンリン酸化蛋白の消失が認められ、引き続き Raf-1 蛋白の消失が見られた。KF58333 ではシグナル伝達蛋白の消失に引き続いて起きる、分化誘導と細胞周期の G₁ 期集積作用がほぼ一致しており、CML の原因遺伝子産物である p210^{Bcr-Abl} 蛋白の消失が細胞増殖を停止させ、分化を誘導するものと推定された。また細胞周期制御蛋白の発現に対する影響を検討した結果、G₁ 期に機能する Cdk4 と Cdk6 の減少が認められ、Cyclin/Cdk 複合体を形成できずに G₁ 期から S 期への移行に必須の基質のりん酸化が妨げられて G₁ 期集積作用を示すものと推定される。G₁ 期集積された細胞は最終的には apoptosis に至ることも確認された。

以上の結果より、CMLの原因遺伝子である p210^{Bcr-Abl} 蛋白も Hsp90 により安定化されていることが推測されたため、免疫沈降法で p210^{Bcr-Abl} 蛋白と複合体を形成している蛋白の同定をしたところ、予想通り薬剤未処理の K562 細胞では p210^{Bcr-Abl}/Hsp90/hsp70/p23 複合体を形成していることが明らかになった。一方、KF58333 処理により p210^{Bcr-Abl} は Hsp90/p23 複合体から離脱して、Hsp70 の発現誘導に伴う p210^{Bcr-Abl}/Hsp70/p60^{Hop} という新しい複合体を形成する。これは p210^{Bcr-Abl} 蛋白が最終的にユビキチン・プロテアソーム系で分解されることを示唆するものである。

更に SCID マウスに K562 細胞を移植した白血病モデルでも KF58333 は有意な延命効果を示した。今回の *in vivo* 試験では KF58333 の投与を 5 日間としたが、投与期間を更に延長することにより、Hsp90 に直接作用して、CML の原因遺伝子産物である p210^{Bcr-Abl} 蛋白を消失させるという CML の根本治療の可能性を示唆するものである。