

論文内容の要旨

論文題目 Radicicol ならびにオキシム誘導体による Hsp90 阻害作用と抗腫瘍効果

氏 名 曾我 史朗

正常細胞が癌化する過程では複数の遺伝子異常が蓄積され、活性制御や発現量が異常な蛋白の発現や正常蛋白の欠失を生じ、その結果として(正常)細胞は異常な増殖能を獲得し、老化から逸脱して不死化し、更にアポトーシスによる自殺をも回避し生存し続けるようになり、やがて癌化し更に悪性化すると考えられている。近年、癌分子標的療法のターゲットとして細胞の増殖および生存のシグナル伝達異常に関与する種々の分子が注目され、それらをターゲットとした新たな抗癌剤の開発が試みられている。Hsp90 は分子量 90kDa の分子シャペロンとして知られている蛋白であるが、他の分子シャペロンから際立って特徴づけられる点は細胞内シグナル伝達経路に関わる分子と特異的に複合体を形成しその安定性・局在・機能発現に関与していることである。これら一連の hsp90 結合蛋白は “hsp90 client protein” と呼ばれており、癌細胞の増殖・生存維持に重要なキナーゼなどのシグナル伝達因子や転写因子など癌分子標的療法のターゲットと考えられている分子が数多く含まれている。よって、hsp90 の機能を阻害すると間接的かつ多発的にこれら複数の client protein 不安定化や機能阻害を引き起こす新規メカニズムを有する抗癌剤となりうる可能性が考えられる。

Radicicol (RA) は微生物より単離された 14 員環マクロサイクリック構造を有する天然物で、その生物活性に関してはこれまで数多く報告があるが多様な生物活性を説明する RA の細胞内標的分子や作用メ

カニズムに関して明らかにされていなかった。本研究を通じて新たに RA が細胞内の特異的な蛋白 depletion 作用を有することを見出し、その標的分子として分子シャペロン hsp90 を見出すに至った。RA 以外の hsp90 作用薬としてこれまでにベンゾキノロンアンサマイシン系低分子化合物である geldanamycin (GA) が報告されているが、動物モデルにおける抗癌活性や薬効メカニズムを報告した例はほとんど無かった。そこで RA の新規抗癌剤としての可能性を検証するとともに、hsp90 を分子標的とした薬剤の観点からターゲット(=hsp90) 阻害が抗腫瘍効果発現に関わっている事を証明したいと考えた。RA 自体の動物モデルにおける抗癌活性は、体内安定性等の問題点からあまり強くない。その点を克服する目的で誘導体化された化合物 (オキシム誘導体) を用いて、ヒト癌細胞に対する *in vitro* での細胞増殖抑制やアポトーシス誘導活性と hsp90 に対する作用の相関、さらに *in vivo* (ヌードマウス皮下移植モデル) での抗腫瘍効果と腫瘍内での hsp90 阻害効果の相関について解析を行った。本論文では RA の新たな作用として hsp90 阻害活性を発見した経緯ならびに RA 誘導体を用いた一連の研究に関して、(1) RA による raf-1 depletion 活性 (hsp90 client depletion) を介したシグナル伝達阻害作用、(2) RA 誘導体 (KF25706) の *in vitro*, *in vivo* での抗癌活性と hsp90 阻害作用から見た活性相関、(3) RA 誘導体 KF58333 の erbB2 高発現乳癌に対する抗癌活性とオキシム側鎖の立体異性体 (KF58332) との活性差に関する解析、の項目で研究の結果をまとめた。

ヒト大腸癌、膵臓癌等で高頻度に活性化変異が見られる K-ras に着目し、その下流の細胞増殖シグナル伝達阻害剤を見出すために、出芽酵母と哺乳類のシグナル伝達経路の類似性を利用した活性化 K-ras-MAPK カスケードシグナル伝達再構成系を構築し低分子阻害剤スクリーニングを行った結果、明らかなシグナル伝達阻害作用を有する化合物として RA を再発見した。上記酵母系での活性は動物細胞系においても再現し、RA はヒト大腸癌由来の活性化変異 K-ras 遺伝子導入細胞において、K-ras 下流の MAPK リン酸化亢進を抑制した。さらに RA の作用点を明らかにしていく過程において、ras のエフェクター分子である raf-1 蛋白が RA 処理により細胞内で消失 (depletion) し、それに伴って raf-1 以降の MAPK カスケードシグナルが遮断されることを見出した。このような、raf-1 depletion 作用は当時報告されていた GA と類似の活性であった。GA は当初チロシンキナーゼ阻害剤として見出されたがチロシンキナーゼに対する直接阻害作用は弱く、その後の研究により hsp90 を阻害する化合物である事が明らかにされた経緯がある。Raf-1 は hsp90 client protein の一つであり、GA による hsp90 阻害の結果細胞内で不安定化され depletion が引き起こされる。RA と GA は構造的に異なる化合物であるが、raf-1 を選択的に消失させる共通の活性発現のターゲットとして hsp90 阻害の可能性が示唆された。その後、米国 NCI の Dr. Neckers らとの共同研究により、RA が GA と同じ hsp90 N 末端領域に直接結合しその機能を阻害する事を証明した。

Hsp90 阻害の観点から RA の抗癌剤としての応用を検討するにあたっては、親化合物 RA の血中不安定性を克服する目的で合成されたオキシム誘導体 radicicol 6-oxime (KF25706) を用いた。KF25706

は in vitro で幅広い癌種のヒト癌細胞に対して RA と同等以上の強い抗細胞活性を示す。最も強い感受性を示した erbB2 高発現ヒト乳癌細胞 SK-BR-3 を用いた解析により、KF25706 が hsp90 client protein (erbB2、raf-1、cdk-4、変異型 p53) を選択的に depletion させる活性を有すること、またその活性と抗細胞活性との相関が見られることを明らかにした。また、GA affinity beads との競合反応系を用いて hsp90 に対する直接結合を調べた結果、KF25706 の hsp90 結合活性は RA の約 3 倍増強されていた。一方、KF25706 の 1/10 以下の抗細胞活性しか示さない不活性誘導体 KF29163 は hsp90 結合活性においても 1/10 以下に減弱しており、細胞系における client depletion 活性を示さなかった。これら結果より、RA 誘導体の in vitro 抗腫瘍活性には hsp90 結合とそれに伴う client protein depletion が関与する事が示唆された。さらに、KF25706 はヌードマウス静脈内投与によって乳癌 MX-1、MCF7、大腸癌 DLD-1、類表皮癌 A431 など種々のヒト癌 xenograft 系に対して明らかな抗腫瘍効果を示した。Hsp90 阻害が活性発現に関与することを確認する目的で化合物投与後に腫瘍を摘出して解析を行った結果、KF25706 投与後の腫瘍内では client protein (raf-1、cdk-4) の明らかな depletion が起こっていた。一方、抗腫瘍活性を示さない親化合物 RA ならびに不活性誘導体 KF29163 はともに腫瘍内 client depletion を起こさなかった。以上の結果より、KF25706 は临床上応用可能な静脈内投与によって、腫瘍内においても client protein の消失を引き起こし、種々の癌細胞に対して抗癌活性を示すと考えられた。

RA オキシム誘導体はオキシム側鎖立体異性の混合物 (E/Z 体) として合成されるが、KF55823 (6-O-[2-(2-pyrrolidonyl)-ethyl] radicicol oxime) からの HPLC 立体異性体分離により KF58333 (E 体) と KF58332 (Z 体) を得る事ができる。ヒト乳癌細胞パネルを用いた抗細胞活性解析の結果、2 つの立体異性体間には明らかな活性差が存在し、KF58333 (E 体) がすべてのヒト乳癌細胞に対して KF58332 (Z 体) を上回る活性を示した。またこの高活性体 KF58333 が乳癌の中でも悪性度が高いとされるホルモン非依存性 erbB2 高発現細胞に対して強い活性を示したことより、同特徴を有する KPL-4 細胞を用いて難治性乳癌に対する抗癌剤としての可能性を検証するとともに、立体異性体 (KF58332) との比較による作用メカニズム解析を行った。

KF58333 は KPL-4 細胞に高発現している erbB2 蛋白をはじめとする client protein を $0.1 \mu\text{M}$ の低濃度で消失させるとともに、この細胞で恒常的に活性化しているアポトーシス抑制シグナルに関与する Akt を depletion させる事を新たに見出した。オキシム立体異性体 KF58332 では、これら活性も減弱しており細胞増殖抑制活性の差との相関が見られた。アポトーシス抑制に関与する Akt の消失が起こる事から TUNEL 法によるアポトーシス誘導能の解析を行った結果、KF58333 処理による明らかなアポトーシス誘導が確認され、この活性に関しても KF58332 との活性差が再現していた。以上の結果より、KF58333 が hsp90 阻害を介した erbB2 depletion 等による増殖シグナルの阻害、ならびに Akt depletion による生存シグナルの遮断によるアポトーシス誘導を引き起こし、抗癌活性を示す可能性が示

唆された。さらに、KF58333 はヌードマウス皮下移植 KPL-4 xenograft に対する投与実験で優れた抗腫瘍効果を示した。興味深い事にオキシム異性体 KF58332 は KF58333 と同量を投与しても腫瘍の増殖に影響を与えず明らかな活性差が見られた。両立体異性体間に静脈内投与後の血中濃度推移には大きな差は見られなかったが、KF58333 を投与した腫瘍内でのみ erbB2, Akt の明らかな depletion が見られるとともにアポトーシスが明らかに促進されていた。以上の結果より両立体異性体の in vivo での活性差には腫瘍内における hsp90 阻害とそれに伴うアポトーシス誘導が関与している可能性が示唆された。

以上の研究により、以下の諸点が明らかになった。

- 1) RA は活性化 K-ras シグナル伝達阻害活性を有しており、hsp90 への結合とその結果生じる raf-1 depletion が作用メカニズムと考えられる。
- 2) RA の癌細胞増殖抑制効果には hsp90 阻害とそれに伴う client protein 選択的消失活性が重要であり、オキシム誘導体の in vivo 抗腫瘍活性においても腫瘍内での hsp90 阻害が抗腫瘍効果発現に関わっていると考えられる。
- 3) オキシム誘導体 KF58333 は悪性固形腫瘍であるホルモン非依存性 erbB2 高発現乳癌細胞に対して優れた抗腫瘍効果を示す。この時、erbB2, Akt 等の client depletion を介した増殖シグナルやアポトーシス抑制シグナルの遮断が重要であり、この活性にはオキシム側鎖の立体構造が影響する。