

審査の結果の要旨

氏名 曾我史朗

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結果、癌細胞の増殖阻害やアポトーシス誘導へと導く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。

本研究では、がん細胞増殖シグナル伝達阻害活性を示す天然物 Radicicol (RA) の細胞内標的分子を初めて明らかにすると共に、標的分子として明らかとなった hsp90 の抗癌剤標的としての可能性に関して RA オキシム誘導体を用いて解析することによって以下の成果を得た。

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

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天然物 Geldanamycin(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、両化合物ともに同じ 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。

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

Hsp90 阻害作用が抗腫瘍効果発現に繋がることは、GA を用いた実験からも十分な証明がなされていなかったことから、RA の血中不安定性を改善したオキシム誘導体 radicicol 6-oxime (KF25706) を用いて hsp90 阻害と抗腫瘍活性の関係を明らかにすることを試みた。KF25706 はヒトがん細胞を用いた *in vitro* 抗細胞活性実験において幅広い癌種に対して 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* 抗細胞活性には 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 はヌードマウス皮下に移植した乳癌 MX-1、MCF7、大腸癌 DLD-1、類表皮癌 A431 など種々のヒト癌 xenograft 系に対して静脈内投与により明らかな抗腫瘍効果を示した。また、KF25706 投与後の腫瘍を摘出して解析を行った結果、腫瘍内において client protein (raf-1, cdk-4) の明らかな depletion が起こっていた。一方、血中不安定性のためマウスモデルでは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 は臨床上応用可能な静脈内投与によって腫瘍内においても hsp90 の阻害ならびに client protein の消失を引き起こし、そのことが抗癌活性に重要であると考えられた。

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

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おり、アポトーシス抑制シグナルに關与する Akt を消失させる活性を有す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差との相関が見られた。アポトーシス抑制に關与する 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、この活性に關しても 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關与している可能性が示唆された。

以上、本研究は細胞増殖シグナル伝達阻害活性を示す低分子化合物 RA の作用メカニズムが hsp90 の阻害を介した hsp90 client protein の阻害によること、ならびに hsp90 が erbB2 高発現乳癌をはじめとする hsp90 client protein が癌化形質の発現に關与する固形癌等に対する新たな抗癌剤標的分子であることを RA オキシム誘導体を用いて明らかにし、今後の抗癌剤開発に多くの示唆を与える研究であり博士 (薬学) の学位に値するものと判断した。