

論文の内容の要旨

論文題目 「抗癌剤の分子標的としての PDK1-Akt 経路の解析」

氏名

佐藤 沙織

<はじめに>

近年、癌細胞におけるシグナル伝達の研究から、アポトーシス誘導シグナルが減少するだけでなく、それに拮抗する生存シグナルが過剰となっても癌の悪性化・抗癌剤耐性が引き起こされることが明らかとなり、癌細胞で活性化している生存シグナルを標的とした分子標的治療薬の開発が進められている。セリン・スレオニンキナーゼ Akt は多くの癌で活性化や遺伝子増幅が報告されている生存・増殖シグナル伝達分子である。正常細胞では Akt の活性はあまり高くないことから、Akt を介したシグナル伝達経路は抗癌剤の標的として適していると考えられているが、この経路を直接に標的とした薬剤はこれまで明らかではなかった。また、Akt による細胞周期進行の分子機構の解析はまだ十分とは言えない。本研究において私は CDK 阻害分子 p27^{Kip1} が Akt の標的分子であることを同定し、Akt による p27^{Kip1} の制御機構について検討した。また、既存の抗癌剤や阻害剤をスクリーニングすることにより、Akt の活性化を抑制する薬剤として、staurosporine 誘導体と Hsp90 阻害剤の2種類の抗癌剤を見だし、これら薬剤が Akt の活性化を抑制する機構について、その標的分子及び作用機作についての検討を行った。

<1. Akt による p27^{Kip1} のリン酸化と局在の制御>

Akt は細胞の生存だけではなく、細胞周期の G₁ 期から S 期への移行にも促進的に働くことが知

られている。そこで私は、Akt による細胞周期制御の分子機構を解析するにあたり、癌の悪性化を抑制すると考えられている p27^{Kip1} に注目した。p27^{Kip1} は CDK 阻害分子として知られ、サイクリン E-CDK2 複合体に結合し、活性を阻害することで G₁ 期から S 期への移行を抑制することが知られている。まず p27^{Kip1} が Akt の標的分子であるのかを検討した。その結果、p27^{Kip1} は細胞内・*in vitro* いずれにおいても Akt によりリン酸化を受け、Akt によるリン酸化の標的分子であることが明らかとなった。そこで p27^{Kip1} の deletion mutant や点突然変異を入れた mutant を作成し、293T 細胞内での Akt による p27^{Kip1} のリン酸化、さらに *in vitro* でのリン酸化を検討した (図 1)。その結果、Akt による p27^{Kip1} の主なリン酸化部位は細胞内・*in vitro* いずれにおいても Thr¹⁹⁸ であることが明らかとなった。

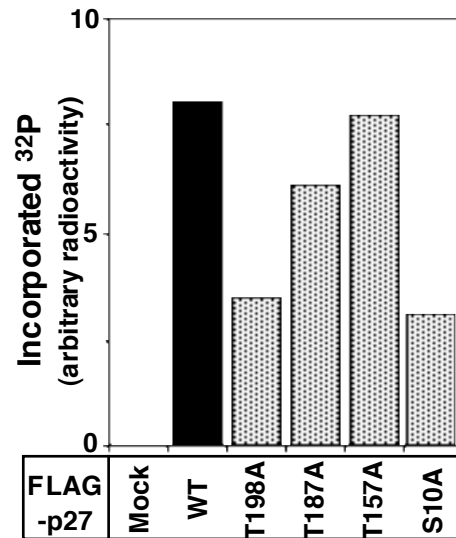


図 1 : *in vitro* での Akt による p27^{Kip1} のリン酸化
293T 細胞から免疫沈降した野生型又は点突然変異体の p27^{Kip1} をリコンビナント Akt と共にインキュベートし、p27^{Kip1} のリン酸化をオートラジオグラフィーで検討したものをグラフ化した。

次に Akt によるリン酸化が p27^{Kip1} の機能にどのように影響するのかを検討するために、293T 細胞に野生型 p27^{Kip1} と Thr¹⁹⁸ を Ala に置換した T198A-p27^{Kip1} を発現させ、その分解と局在の変化を検討した。その結果、分解に関しては野生型 p27^{Kip1} と T198A-p27^{Kip1} とでほとんど差がないのに対し、局在に関しては T198A-p27^{Kip1} は野生型 p27^{Kip1} よりも核に局在する量が多く、Thr¹⁹⁸ がリン酸化された p27^{Kip1} は主に細胞質に局在するようになることを明らかにした。さらに Thr¹⁹⁸ のリン酸化により p27^{Kip1} が細胞質に局在する機構について検討した結果、p27^{Kip1} は Akt によるリン酸化依存的に 14-3-3 タンパク質に結合することを見だし、その結合には Thr¹⁹⁸ のリン酸化が重要であること、14-3-3 タンパク質と恒常的に結合する p27^{Kip1} の変異タンパク質は核だけではなく、細胞全体へと局在が変化することが明らかとなった。以上より、Akt が p27^{Kip1} の Thr¹⁹⁸ をリン酸化すると、14-3-3 タンパク質がリン酸化依存的に結合し、p27^{Kip1} の局在が核から細胞質へと変化することが明らかとなり、Akt は p27^{Kip1} の活性を阻害することで細胞周期の進行を促進することが示唆された。

<2-1. Akt の活性化を抑制する薬剤のスクリーニング>

Akt が細胞の生存・細胞周期の進行に非常に重要な分子であることから、既存の抗癌剤や阻害剤にも Akt の活性化を抑制する薬剤があるのではないかと考え、様々な薬剤を細胞に処理し、Akt の活性化を抑制する薬剤の探索を行った。その結果、staurosporine と geldanamycin に Akt の活性化を抑制する作用があることを見だし、それぞれの薬剤が Akt の活性化を抑制する機構について検討を行った。

<2-2. UCN-01 による Akt の活性化抑制機構の解析>

まず staurosporine と、その誘導体で現在抗癌剤として開発中の UCN-01 を用いて Akt の活

活性化抑制機構を検討した。UCN-01 と staurosporine はもともと PKC の阻害剤として見いだされた化合物であることから、これら薬剤による Akt の活性化抑制が PKC の阻害を介したものであるのかをまず検討した。293T 細胞に UCN-01 とは骨格の異なる PKC 阻害剤の calphostin C を処理したところ、staurosporine や UCN-01 で見られたような Akt の活性化抑制効果は認められなかったことから (図2)、UCN-01 は PKC の阻害を介して Akt の活性化を抑制しているのではなく、Akt のシグナル経路に直接作用していることが示唆された。そこで次に Akt のシグナル経路における UCN-01 の標的分子を探索した。Akt の上流にあたる PI3K と PDK1、そして Akt 自身に対する阻害効果を細胞内・*in vitro* において検討した結果、Akt の上流のキナーゼである PDK1 がその標的であり、UCN-01 は細胞内・*in vitro* いずれにおいても $IC_{50}=33$ nM という低濃度で PDK1 の活性を抑制することを見いだした。さらに *in vivo* における効果も検討した。腫瘍を移植したヌードマウスと BALB/c マウスに UCN-01 を投与し、腫瘍細胞内の PDK1 の活性を腫瘍の lysate を用いて検討したところ、*in vivo* においても UCN-01 により PDK1 の活性が抑制されることが明らかとなった。最後に PDK1-Akt 経路の抑制が UCN-01 のアポトーシス誘導活性に重要であるかを、細胞に活性化型 Akt を発現させて検討した。UCN-01 の処理に伴い、コントロール細胞や野生型 Akt を発現させた細胞ではカスパーゼの活性化・アポトーシス誘導が認められたが、活性化型 Akt を発現させた細胞では UCN-01 によるアポトーシス誘導効果が減弱した。以上より UCN-01 の Akt シグナル経路における標的分子は PDK1 であり、UCN-01 による PDK1-Akt シグナル経路の抑制が UCN-01 のアポトーシス誘導活性に重要であることが明らかになった。

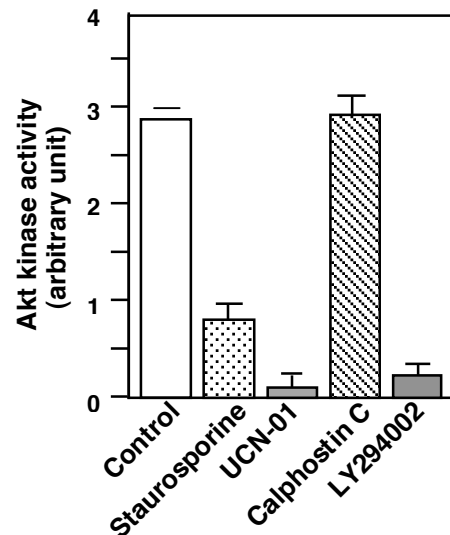


図2：阻害剤による Akt の活性減少
細胞に staurosporine, UCN-01, calphostin C と PI3K 阻害剤の LY294002 を処理後、細胞から Akt を免疫沈降し、活性を測定した。

<2-3. Hsp90 阻害剤による Akt の活性化抑制機構の解析>

次に geldanamycin などの Hsp90 阻害剤により Akt の活性化が抑制される機構についても検討した。細胞に活性化型 Akt を発現させると Hsp90 阻害剤によるカスパーゼの活性化が抑制されたことから、Hsp90 阻害剤においても Akt の活性抑制がそのアポトーシス誘導効果に重要であることが示唆された。そこで、Hsp90 阻害剤が Akt のシグナル経路のどこを阻害するのかを検討した。Hsp90 阻害剤処理により Akt のリン酸化が抑制されることから、Akt の上流の PI3K と PDK1 について Hsp90 阻害剤を処理した際の影響を検討した結果、Hsp90 阻害剤処理により PDK1 の発現量が減少することを見いだした。*in vitro* において Hsp90 阻害剤は PDK1 に対する直接の活性阻害作用は示さなかったため、PDK1 は Hsp90 との結合により安定性が保たれている可能性が考えられた。検討の結果、PDK1 は Hsp90 と細胞内で結合しており、Hsp90 阻害剤を処理することによりその結合が阻害され、Hsp90 から離れた PDK1 の多くは不溶性画分に入り、プロテアソームにより分解を受けることを明らかとした。

<まとめ>

本研究において私は Akt による細胞周期制御機構として、p27^{Kip1} の Thr¹⁹⁸ をリン酸化し、その局在を機能の場である核から細胞質へと変化させる、という新たな機構を見いだした。さらに Akt の活性化を抑制する薬剤として staurosporine 及びその誘導体の UCN-01 と、Hsp90 阻害剤を見だし、これら薬剤の標的分子が Akt の上流のキナーゼ、PDK1 であることを明らかにした。また、これらの薬剤のアポトーシス誘導効果には PDK1-Akt シグナル経路の抑制が重要であることを明らかにした。これらの薬剤は現在抗癌剤としての開発が進められており、そのアポトーシス誘導効果に PDK1-Akt 経路が寄与しているという結果は、PDK1-Akt シグナル経路が抗癌剤の標的として適していることを示唆するものと考えている。

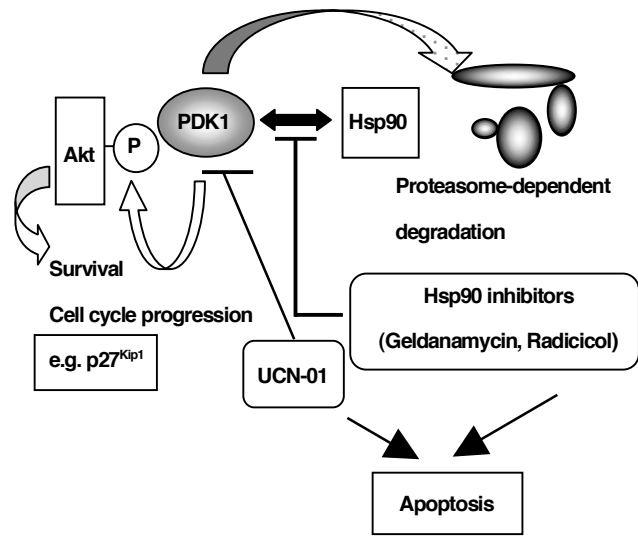


図 3 : Akt による p27^{Kip1} を介した細胞周期制御と UCN-01・Hsp90 阻害剤による PDK1 の阻害機構

<参考文献>

- Sato, S., Fujita, N. and Tsuruo, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000), **97**, 10832-10837
Sato, S., Fujita, N. and Tsuruo, T. *Oncogene* (2002), **21**, 1727-1738
Sato, S., Fujita, N. and Tsuruo, T. *J. Biol. Chem.* (2002), **277**, 39360-39367
Fujita, N.*, Sato, S.* and Tsuruo, T. *J. Biol. Chem.* (2003), **277**, 49254-49260
(* : contributed equally)