

審査の結果の要旨

氏名 佐藤 沙織

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。正常細胞における 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、この経路を直接の標的とした薬剤はこれまで明らかではなかった。また、Akt は細胞の生存だけでなく、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が、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。本研究では CDK 阻害分子の一つで癌の悪性化を抑制すると考えられている 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用いて Akt の活性化を抑制する薬剤を探索し、その結果、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 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

まず p27^{Kip1} が Akt によるリン酸化を受けるのかを検討した結果、p27^{Kip1} は細胞内・*in vitro* いずれにおいても Akt によるリン酸化を受け、Akt によるリン酸化の標的分子であることを明らかにした。p27^{Kip1} の deletion mutant や point mutant を作成して、細胞内での Akt による p27^{Kip1} のリン酸化、*in vitro* でのリン酸化を検討した結果、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 であることを明らかにした。

次に Akt によるリン酸化が p27^{Kip1} の機能に与える影響を検討した。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、分解と局在の変化を検討し、その結果、分解に関しては野生型 p27^{Kip1} と T198A-p27^{Kip1} とで差がないのに対し、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いだし、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を明らかにした。以上の結果より、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変化するという新しい p27^{Kip1} の制御機構を明らかにした。

2. staurosporine 誘導体と Hsp90 阻害剤による Akt の活性化抑制機構の解析

既存の抗癌剤や阻害剤を細胞に処理し、Akt の活性化を抑制する薬剤を探索した。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いだし、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。

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 の活性化抑制機構を検討した。UCN-01 と staurosporine は PKC の阻害剤として見いだされた化合物であるが、UCN-01 や staurosporine とは作用部位が異なる PKC 阻害剤の calphostin C では、staurosporine や UCN-01 で見られたような細胞内での Akt の活性化抑制効果は認められず、UCN-01 は PKC の阻害を介して Akt の活性化を抑制するのではなく、Akt のシグナル経路に直接作用することを示唆した。Akt のシグナル経路における UCN-01 の標的分子を探索するため、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 IC₅₀=33 nM という低濃度で PDK1 の活性を抑制することを明らかにした。さらに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 を用いて検討した結果、*in vivo* においても PDK1 の活性が UCN-01 により抑制されることを明らかにした。細胞に活性化型 Akt を発現させると、コントロール細胞や野生型 Akt を発現させた細胞に比べて UCN-01 によるアポトーシス誘導効果が減弱することを示し、UCN-01 のアポトーシス誘導効果には PDK1-Akt 経路の抑制が重要であることを明らかにした。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を初めて明らかにした。

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。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。詳細な検討の結果、Hsp90 阻害剤処理により PDK1 の半減期が短くなることから、これは PDK1 の分解が亢進するためであることを明らかにした。さらに PDK1 は Hsp90 と細胞内で結合していることも見だし、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、という機構を明らかにした。また、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を明らかにした。

以上、本研究は、Akt による細胞周期制御機構に、CDK 阻害分子である p27^{Kip1} をリン酸化し、その局在を機能発揮の場である核から細胞質へと変化させる機構が関わっていることを明らかにした。さらに、Akt の活性化を抑制する薬剤として、現在抗癌剤として開発中の staurosporine 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共に Akt の上流のキナーゼ PDK1 であること、さらにはこれら薬剤のアポトーシス誘導効果に 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。この成果は薬学、特に生命薬学の進歩に貢献する重要な発見であり、博士（薬学）の学位に値するものと判断した。