

## 論文の内容の要旨

論文題目 低分子化合物による c-IAP1 調節機構の解明

氏名 関根 啓子

Inhibitor of apoptosis protein (IAP) ファミリータンパク質は、アポトーシスにおいて中心的な役割を果たす caspase の阻害タンパク質である。一部の癌細胞では IAP が過剰発現していることから、IAP の機能を阻害することにより癌細胞にアポトーシスを誘導できる可能性がある。さらに、細胞内には内因性の IAP 阻害タンパク質として second mitochondria-derived activator of caspase (SMAC) が存在し、IAP に結合してそのアポトーシス抑制作用を解除する。SMAC を模倣したペプチドや低分子化合物が癌細胞にアポトーシスを誘導できることが *in vitro*, *in vivo* の実験系で報告されている。このように、アポトーシス制御の臨床応用が期待されるなか、IAP は癌治療における格好の標的分子として精力的に研究が進められている。

本研究では、低分子化合物のベスタチンメチルエステル (ME-BS) が IAP ファミリータンパク質に属する cellular-inhibitor of apoptosis protein 1 (c-IAP1) をユビキチン・プロテアソーム依存的に減少させて、アポトーシスを増強することを明らかにした。c-IAP1 は様々な癌種で過剰発現が認められており、癌治療に対する抵抗性に関与することが知られている。ME-BS のような低分子化合物で c-IAP1 を選択的に減少させるという治療戦略は、c-IAP1 を過剰発現して治療抵抗性になった癌細胞に対して有効な治療法となる可能性がある。

## 1. ベスタチンおよび ME-BS のアポトーシス増強作用

ベスタチンは宿主介在性の成人急性非リンパ性白血病の治療薬として用いられており、低毒性で長期服用が可能な薬剤である。その作用機序は、免疫担当細胞の aminopeptidase (APase) を阻害することによる免疫賦活作用と考えられている。しかし、ベスタチンは免疫を活性化するだけでなく、癌細胞にも直接作用してアポトーシスを誘導する。また、血管内皮細胞にも作用して血管新生も抑制する。これらの作用が総合的に発揮された結果、抗腫瘍効果を示すと考えられている。ベスタチンは APase を強く阻害するので、抗腫瘍効果は APase 阻害によるものと考えられてきたが、癌細胞に対するアポトーシス誘導作用は APase 阻害では説明できず、新しい標的分子の存在が考えられた。

ベスタチンのアポトーシス誘導における標的分子を見出すため検討を行った。ベスタチンは単独では固型癌細胞に対してアポトーシスを誘導しなかったが、抗 Fas 抗体 (CH11), TNF- $\alpha$  等の death ligand と併用すると、これらの death ligand で誘導されるアポトーシスを増強した。さらに、ベスタチン誘導体の ME-BS はベスタチンよりも強くアポトーシスを増強した (Fig.1)。このように、ME-BS はベスタチンより強くアポトーシスを増強したことから、ME-BS の方が標的分子に対して明確に作用していることが考えられたため、以降の検討は ME-BS を用いて行った。

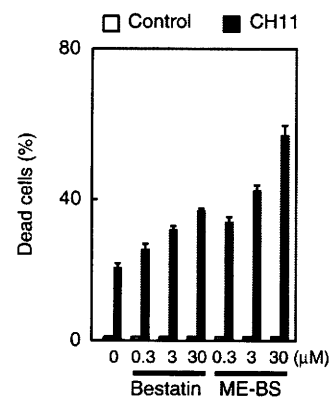


Fig.1 ベスタチンおよび ME-BS のアポトーシス増強作用

## 2. ME-BS による c-IAP1 自己ユビキチン化とプロテアソームによる分解

アポトーシスを制御する分子である IAP ファミリータンパク質は death ligand, 抗癌剤, 放射線等の様々な刺激によるアポトーシスを抑制することが知られている。ME-BS の IAP に対する作用を検討したところ、ME-BS は c-IAP1 の量を著明に減少させることが明らかになった。一方、同じ IAP ファミリーに属する XIAP や c-IAP2 の量は ME-BS で減少せず、ME-BS の作用は c-IAP1 に選択的であった (Fig.2)。

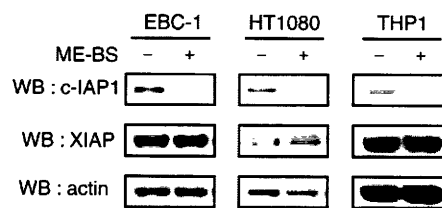


Fig.2 ME-BS による c-IAP1 減少作用

ME-BS による c-IAP1 量の減少は、プロテアソーム阻害剤である MG-132 の前処理によって解除された。また、ME-BS による c-IAP1 量の経時変化を調べたところ、ME-BS 添加後 10 分には減少し始め、MG-132 の共存化ではユビキチン化 c-IAP1 と推測されるスミアーバンドが高分子側に検出された (Fig.3A)。さらに *in vitro* ユビキ



c-IAP1 の BIR3 ドメインが重要であることが示唆された。

次に、ME-BS と c-IAP1 および BIR3 ドメインとの相互作用を表面プラズモン共鳴法により解析した。ME-BS は濃度依存的に c-IAP1 と結合した。c-IAP1 より response unit は小さいものの、ME-BS は BIR3 ドメインとも結合することが確認された。

#### 4. 構造活性相関

次に、ベスタチンの種々の誘導体を用いて、これら誘導体の APase 阻害作用、c-IAP1 量およびアポトーシス増強に対する作用を調べ、構造活性相関解析を行った。APase 阻害活性と c-IAP1 減少活性およびアポトーシス増強活性との相関は低かった。カルボン酸をアルキルエステル化した誘導体は、c-IAP1 減少活性およびアポトーシス増強活性が強かった。一方、他の誘導体は c-IAP1 減少活性およびアポトーシス増強活性が消失あるいは減弱した。これらの結果から、ベスタチン誘導体による c-IAP1 減少活性とアポトーシス増強活性には強い相関が認められ、ME-BS が c-IAP1 を減少させることによりアポトーシスを増強することが再確認された。

#### 5. c-IAP1 遺伝子増幅癌細胞に対する作用

c-IAP1 の遺伝子座 11q22 は子宮頸癌、食道癌、肺癌、胃癌、腎細胞癌、神経膠芽腫等で増幅が認められている。c-IAP1 遺伝子が増幅している Ca-Ski 細胞において ME-BS の感受性を検討したところ、ME-BS によって c-IAP1 量が著明に減少しアポトーシスの増強が認められた。一方、c-IAP1 量が低く XIAP 量が高い ME180 は ME-BS によって c-IAP1 の発現は減少したもののアポトーシスはほとんど増強されなかった。

#### 6. 総括

本研究では、ME-BS のアポトーシス増強能に着目して研究を行い、ME-BS が c-IAP1 を選択的に減少させていることを見出した。その調節機構を検討した結果、ME-BS が BIR3 ドメインと直接結合して、c-IAP1 の自己ユビキチン化を誘導しプロテアソームによる分解を促進していることを明らかにした。c-IAP1 は一部の癌において過剰発現が認められ、癌治療抵抗性や悪性度に関与すると報告されているが、ME-BS はこのような c-IAP1 過剰発現細胞においても c-IAP1 を減少させアポトーシスを増強した。

タンパク質の発現量を制御する方法としてアンチセンスオリゴヌクレオチドや siRNA のように mRNA レベルでタンパク質の *de novo* 合成を制御する方法が知られている。今回、ユビキチン・プロテアソーム系を活性化するという新しい分子機構で、低分子化合物により c-IAP1 タンパク質の量を制御することができることを示した。このような低分子化合物によるタンパク質の安定性の調節は RING や ubiquitin-conjugating enzyme (UBC) ドメインを有する他のタンパク質にも応用できる可能性があり、薬剤開発の新しいコンセプトを提案するものである。