

審査の結果の要旨

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 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報告されている。このように、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。本研究において関根は、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。以下に本研究内容を説明する。

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。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。そこで関根は、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することを見出した。

## 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

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。

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、ME-BS は c-IAP1 の量を著明に減少させることを明らかにした。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 に選択的であることも明らかになった。また、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。さらに *in vitro* ユビキチン化の系においても、ME-BS は c-IAP1 の自己ユビキチン化を促進することが示された。

c-IAP1 は分子内に RING フィンガードメインを有するユビキチンリガーゼであり、この活性によって c-IAP1 の自己ユビキチン化が調節されている。c-IAP1 の RING ドメイン変異体 H588A は自己ユビキチン化ができないことが知られているが、この H588A は ME-BS によって減少しなかった。以上の結果から、関根は ME-BS は c-IAP1 の RING ドメインに依存した自己ユビキチン化を促進して、プロテアソームによる分解を誘導することを明らかにした。

続いて関根は、ME-BS による c-IAP1 減少がアポトーシス増強に重要であることを確認する実験を試みた。c-IAP1 の siRNA を用いてノックダウンし、アポトーシス感受性を検討した結果、c-IAP1 の siRNA は CH11 や TRAIL によるアポトーシスを増強することが分かった。次に、野生型 c-IAP1 と H588A 変異体を用いて ME-BS のアポトーシス増強に及ぼす影響を検討した。ME-BS で減少する野生型 c-IAP1 はアポトーシス促進因子 Bax の強制発現で誘導されるアポトーシスを部分的に抑制し、このアポトーシス抑制作用は ME-BS によって解除された。一方、ME-BS で減少しない H588A は Bax で誘導されるアポトーシスを抑制したが、この抑制作用は ME-BS によって解除されなかった。これらの結果から、関根は ME-BS によるアポトーシス増強作用には c-IAP1 の自己ユビキチン化による減少が重要であることを明らかにした。

### 3. c-IAP1 BIR3 ドメインの重要性

c-IAP1 はN末側に3つの baculovirus IAP repeat (BIR) ドメインとC末側にRING ドメインを持つ。c-IAP2 はc-IAP1 と同一のドメイン構造を持ち、アミノ酸配列でも全長にわたって72%の相同性をもつにも関わらずME-BSで減少しないことから、c-IAP1はME-BSで減少するための特有な配列を有することが示唆された。そこで関根は、両者のキメラタンパク質を人工的に作製し、c-IAP1 のどの配列がME-BS感受性に必要であるかを検討した。その結果、c-IAP1 の BIR3 を含むキメラタンパク質はME-BSで減少したが、c-IAP2 由来の BIR3 を含むキメラタンパク質は減少せず、c-IAP1 の BIR3 ドメインが重要であることを示した。さらに、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、ME-BS は濃度依存的に c-IAP1 と結合することを明らかにした。

### 4. 構造活性相関

次に関根は、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。その結果、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いこと、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いこと、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すること、が明らかになった。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。関根は、c-IAP1 遺伝子が増幅している Ca-Ski 細胞においてME-BSによってc-IAP1量が著明に減少しアポトーシスが増強すること、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いことを見出した。

以上、本研究で関根は、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。さらに、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。また、本研究において関根は、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り、博士（薬学）に充分値するものと判断した。