



がん細胞の特性を標的とする阻害剤の化学生物学的研究

慶應義塾大学理工学部 井 本 正 哉

はじめに

20世紀後半にがん遺伝子が相次いで同定され、がん遺伝子およびその関連分子による細胞応答の制御異常によってがんが悪性化していくことが示された。その後、がん遺伝子やそれに関連するがんの悪性化に関わる細胞応答機構、すなわち「がん細胞の特性」の研究が展開されるようになった。

一方、農芸化学分野では伝統的に生理活性物質の単離・構造解析研究が活発になされており、またそれら生理活性物質の作用機構解析を通じて生物応答機構を分子レベルで解析する研究がなされてきた。そのような背景のもとで筆者は農芸化学的手法で「がん細胞の特性」研究に挑み、それを標的とした化合物を主に微生物培養液から探索し、がん悪性化の細胞応答機構の解析研究を行ってきた。ここでは研究成果の概要を述べる。

1. がん細胞の特性を標的とした天然物スクリーニング

1-1. がん遺伝子を標的としたスクリーニング

多くのがん遺伝子がチロシンキナーゼ活性を有していることから、チロシンキナーゼの阻害剤は新たながん治療薬になることが期待された。筆者は世界に先駆けて上皮細胞増殖因子受容体 (EGFR) チロシンキナーゼ阻害剤の探索研究をおこない、1986年に放線菌 MH435-hF3 株から新規物質 アーブスタチンを発見した¹⁾。アーブスタチンは世界で最初に報告された天然由来チロシンキナーゼ阻害物質であり、様々なチロシンキナーゼに有効なスペクトルの広い阻害剤であった。その後、アーブスタチンをモデルに世界中で特定のチロシンキナーゼに対する阻害剤が開発され、2000年代になってグリベックやイレッサなどのチロシンキナーゼ阻害剤が臨床応用され多くの患者を救済している。さらに筆者らはイノシトールリン脂質代謝回転、チロシンホスファターゼ、ゲラニルゲラニル基合成酵素などの「がん細胞の特性」を標的とした阻害剤の探索研究を展開し、多様な作用を有する 10 数個の新規化合物を発見した。

1-2. 去勢抵抗性前立腺癌を標的としたスクリーニング

前立腺癌は男性ホルモンであるアンドロゲンがアンドロゲン受容体 (AR) に結合し、これら複合体が核内に移行して転写因子として機能することで悪性化する。エンザルタミドは第2世代の AR アンタゴニストとして、去勢抵抗性前立腺癌に有効性を発揮している。しかし、AR のミスセンス変異 (F876 L) によってエンザルタミドに耐性を示す前立腺癌細胞が出現し、これを克服する治療薬開発が求められている。そこで、このエンザルタミド耐性を克服する化合物の探索を行った。その結果、富山県大の五十嵐康弘教授との共同研究で放線菌 BB47 株より新規 22 員環マクロライドであるアンタルライド A-F を発見し、NMR スペクトル解析や各種化学変換反応を駆使することでその平面構造及び絶対立体構造を決定した²⁾。その後、同放線菌から 20 員環マクロライド構造を有するアンタルライドファミリーのアンタルライド G および H を発見した。通常、

放線菌が生産するマクロライド環の形成部位はポリケタイド合成酵素により厳密に制御されている。したがって、放線菌 BB47 株のポリケタイド合成酵素では基質認識のゆらぎが生じている可能性が示唆された。

2. 探索から細胞応答機構解析へ

2-1. がん細胞の遊走を阻害する物質の探索

細胞遊走は、胚の形態形成、組織の再生・治癒、白血球による免疫監視などでみられ、生体にとって不可欠な現象である。さらにがん転移におけるがん細胞の浸潤など、さまざまな病理的現象にも深く関わっている。そこで遊走阻害をする化合物を微生物二次代謝産物より探索し、カビの一株が生産する新規化合物 モベラスチン A を発見した³⁾。その作用解析の結果、モベラスチン A がファルネシルトランスフェラーゼ (FTase) を標的とし、その下流での H-Ras/PI3K/Akt 経路を阻害することで遊走阻害することを明らかにした³⁾。

2-2. 阻害剤を用いたがん細胞遊走阻害機構解析

その後、東大の渡邊秀典教授らによって合成されたモベラスチン A の誘導体 UTKO1 はモベラスチン A よりも強く遊走を阻害したが FTase を阻害しなかった。そこで UTKO1 のがん細胞遊走阻害機構を解析した。まず、UTKO1 ビオチン標識体を用いてその結合タンパク質として 14-3-3ζ を同定した。さらに、遊走に関わる Rac1 は 14-3-3ζ が Tiam1 と結合することで活性化されるが、UTKO1 は 14-3-3ζ に結合することで 14-3-3ζ と Tiam1 の結合を阻害し、その結果、Rac1 の活性化→遊走が阻害されることを明らかにした⁴⁾。

では、Tiam1 の発現はどのように制御されているのか？ 5-リボキシゲナーゼ (5-LOX) 阻害剤 BU-4664 L が Tiam1 の発現を阻害することで遊走を阻害することを見出した。この BU-4664 L による遊走阻害と Tiam1 の発現阻害はロイコトリエン C₄ (LTC₄) の添加によって回復することから、LTC₄ が脂質メディエーターとして Tiam1 の発現を制御していることがわかった。さらに LTC₄ の受容体である CysLT1 の阻害剤であるモンテルカストも遊走阻害と Tiam1 の発現阻害を誘導したことから 5-LOX/LTC₄/CysLT1 シグナリングが Tiam1 の発現を

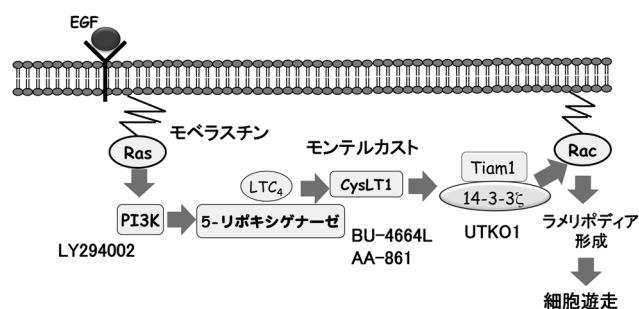


図1. 阻害剤を用いたがん細胞遊走機構解析

抑制し⁵⁾、その結果Rac1の活性化が阻害され、遊走阻害が誘導されることを明らかにした(図1)。

2-3. がん細胞遊走機構の共通性と個別性解析

がん細胞の遊走制御機構は、由来組織や変異遺伝子の違いによって、「全てのがんに存在する普遍的な機構」と「特定のがんにのみ存在する多様性を担う機構」が存在すると考えられる。そこでがん細胞の遊走制御機構の普遍性および多様性を担う分子群を明らかにするため、34種類の低分子化合物の影響を10種類の遊走細胞において定量的に評価し、化合物の遊走阻害プロファイルに対して階層的クラスタリングを行った。クラスタリングの結果、JNK阻害剤は全ての細胞株の遊走を抑制したが、ROCK、GSK-3、p38の阻害剤等は一部の細胞株の遊走のみを抑制することを示した⁶⁾。

3. ビッグデータを利用した標的分子同定

3-1. メタボローム解析による標的分子同定

がん細胞のフィロポディア形成は遊走運動開始の発端にもなっていることから、筆者らはEGF刺激によるフィロポディア形成を阻害する物質を探索した。その結果、放線菌培養液中にA431細胞のフィロポディア形成を阻害する物質が含まれていることがわかった。そこでフィロポディア形成阻害物質の単離・精製を行ったところ、グルコピエリシジンA(GPA)とピエリシジンA(PA)という2つの化合物を共処理することではじめてフィロポディア形成が阻害されることを見出した。

PAはミトコンドリア呼吸鎖複合体Iの阻害剤として報告されているが、GPAの標的タンパク質は不明であるためにGPAの標的分子同定を試みた。In house ケミカルライブラリーからGPAと似た作用をしめす化合物を探したところ、解糖系を阻害する2-デオキシグルコース(2DG)がヒットした。このことからGPAも解糖系の代謝を抑制している可能性が考えられ、慶應大・先端生命科学研究所・曽我朋義教授との共同研究により、GPAを処理した細胞内のメタボローム解析をおこなった。その結果、GPA処理した細胞ではピルビン酸と乳酸が減少していたことから、GPAは解糖系を阻害していることが示唆された。さらに、¹³C-グルコースを用いたメタボローム解析からGPAの標的分子がグルコーストランスポーターであることを明らかにした。これらのことから、PAとGPAを共処理することで細胞内ATP量が減少し、これによってアクチンモノマーの輸送が阻害されてF-アクチン重合が起こらなくなり、結果的にフィロポディア形成が阻害されたと考えられる⁷⁾。

3-2. 結合予測に基づく標的分子同定

多くのヒト腫瘍においてアポトーシス抑制タンパク質Bcl-2やBcl-xLの過剰発現が見られる。Bcl-2/Bcl-xLの過剰発現はがん化やがん悪性化に関与するだけでなく、既存の抗がん剤に対して抵抗性を示す。そこで、Bcl-2/Bcl-xL過剰発現ヒト腫瘍を用いて、Bcl-2/Bcl-xLの機能を阻害する物質を探索した。その結果、*Streptomyces* sp. 694-90F3株の培養液中に新規物質インセドニンを発見した。インセドニンの構造は各種NMRスペクトル解析、コンピュータモデリングにより平面及び相対立体構造を決定し、改良型Mosher法、X線構造解析によりその立体絶対配置を決定した⁸⁾。

次にインセドニンの標的分子同定を試みた。まずインセドニンのアフィニティービーズを合成し、インセドニンビーズに結合したタンパク質のLC-MS/MS解析から53種類のインセドニ

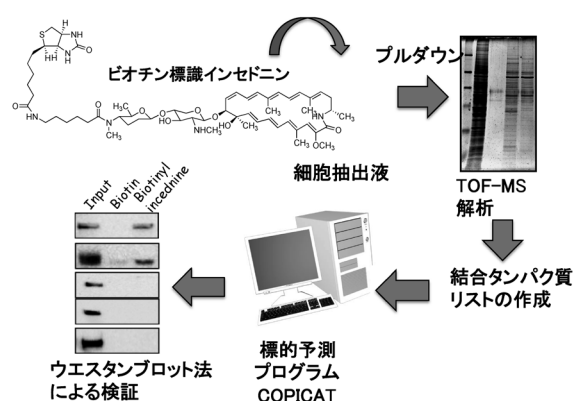


図2. COPICATによるインセドニン標的分子の同定の流れ

ン結合タンパク質を同定した。しかし、この53種類の候補たんぱく質からはインセドニン結合たんぱく質を見出すことはできなかった。そこで次に慶應大・理工・榊原康文教授が開発したCOPICATを用いて計算科学的にインセドニンの結合タンパク質を予測することを試みた。まず既に得られていた53種類のインセドニン結合タンパク質をSVM学習モデルで学習させ、24,245個のヒトのタンパク質の中から182個がインセドニン結合タンパク候補として得られた。さらにメタボローム解析の結果を用いて候補タンパクを絞り込み、それらのビオチン標識インセドニンとの結合を検証し、最終的にアセチルCoAカルボキシラーゼαがインセドニンの機能的標的分子であると示唆された⁹⁾(図2)。

おわりに

創薬開発における天然化合物の重要性は共通に認識されながらも、その標的分子同定の困難さから近年は天然物スクリーニングが敬遠される傾向にある。しかし、天然物スクリーニングは農芸化学のお家芸の一つであり、また我が国の文化ともいえる。多彩な活性と多様な構造を有する天然化合物を探索する「宝さがし」と、天然化合物の標的分子同定を通じて作用機構の解明を目指す「謎解き」に挑む「天然物ケミカルバイオロジー」をこれからも展開していきたい。

(引用文献)

- 1) Umezawa H. *et al. J. Antibiot.*, 39, 170 (1986)
- 2) Saito S. *et al. Angew. Chem. Int. Ed.*, 55, 2728 (2016)
- 3) Takemoto Y. *et al. Chem. Biol.*, 12, 1337 (2005)
- 4) Kobayashi H. *et al. J. Biol. Chem.*, 286, 39259 (2011)
- 5) Magi S. *et al. Cancer. Sci.*, 105, 290 (2014)
- 6) Magi S. *et al. Sci. Rep.*, 2, 823 (2012)
- 7) Kitagawa M. *et al. Chem. Biol.*, 17, 989 (2010)
- 8) Futamura Y. *et al. J. Am. Chem. Soc.*, 130, 1822 (2008)
- 9) Kobayashi H. *et al. BMC Chem. Biol.*, 12, 2 (2012)

謝 辞 本研究の成果はご指導を賜りました財)微生物化学研究所・元所長の故梅澤濱夫先生、慶應義塾大学名誉教授の梅澤一夫先生をはじめとする財)微生物化学研究所や慶應義塾大学の諸先生、研究員、学生、卒業生、および多くの共同研究者のみなさまのご協力によって得られたものです。この誌面をお借りして厚く御礼申し上げます。最後に、本賞にご推薦いただいた山口大学名誉教授の畑中顯和先生、理研・環境資源科学研究センター副センター長・長田裕之先生、および選考委員の先生方に厚く御礼申し上げます。