

10. ユビキチン-プロテアソーム経路を標的とした抗がん剤

百瀬 功

Key words: プロテアソーム阻害剤, チロペプチン,
ボロン酸誘導体, インビボイメージング

微生物化学研究会 微生物化学研究所
沼津支所

緒言

ユビキチン-プロテアソーム経路は細胞周期やシグナル伝達に関与する色々な機能性タンパク質を分解し、その制御を介して細胞機能を調節する極めて重要な細胞内タンパク質分解経路である。近年本経路が、がん、神経変性疾患、免疫疾患などのさまざまな難治性疾患に非常に重要な役割を果たしていることがわかってきた。タンパク質分解酵素であるプロテアソームは特にがん細胞において活性が高く、またがん細胞はその活発な細胞増殖に伴う盛んなタンパク質分解からプロテアソームに高い依存性を示す。従って、プロテアソーム阻害剤は正常細胞に比べてがん細胞に特異的な細胞増殖抑制効果を示すことが知られており、実際にプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブなどは多発性骨髄腫の治療薬となっている。しかしながらボルテゾミブの長期投与による末梢神経障害や耐性細胞の出現が問題となっており、新しいプロテアソーム阻害剤の開発が望まれている。これまでに我々は微生物代謝産物よりプロテアソーム阻害剤を探索し、放線菌 *Kitasatospora* sp. MK993-dF2 株が新規プロテアソーム阻害剤チロペプチンを産生することを見いだした¹⁾。さらにチロペプチンをリード化合物として 100 種類以上の誘導体を合成し^{2,3)}、それらの中で強い抗腫瘍活性を示す化合物を見いだしたので報告する (図 1)⁴⁾。

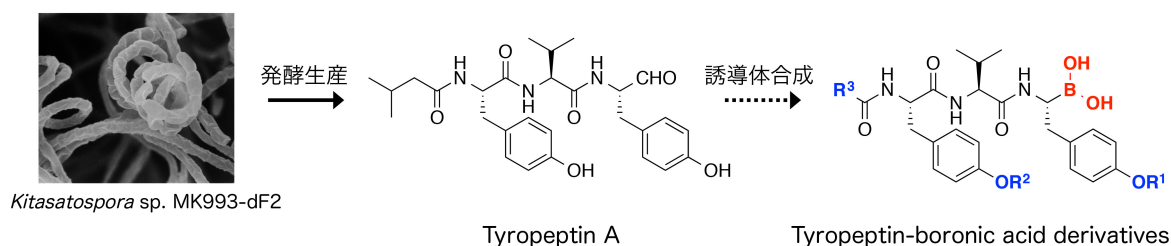


図 1. プロテアソーム阻害剤チロペプチン A およびチロペプチンボロン酸誘導体.

方法および結果

1. チロペプチンボロン酸誘導体 AS-29 のプロテアソーム阻害活性

チロペプチンボロン酸誘導体 AS-29 のヒト赤血球由来 20S プロテアソームに対する酵素阻害活性について調べた (図 2)。AS-29 はプロテアソームのキモトリプシン様活性に対して非常に強い阻害活性を示し、既存プロテアソーム阻害剤であるボルテゾミブと同程度の阻害活性を示すことがわかった。細胞内のプロテアソームに与える影響を調べるため、プロテアソーム分解性蛍光タンパク質 ZsProSensor-1 を恒常的に発現するヒト胎児腎 HEK293 細胞を用いて、AS-29 の作用を調べた。通常、ZsProSensor-1 は翻訳後すみやかにプロテアソームにより分解されるため無処理群では蛍光は観察されないが、AS-29 を 18 時間作用させると強い蛍光を示す細胞が観察され、細胞内のプロテアソームが阻害されたことによる ZsProSensor-1 タンパク質の蓄積が認められた。生体内ではプロテアソームはユビキチン化した

タンパク質を分解するため、ヒト多発性骨髄腫 IM-9 細胞を用いて AS-29 の細胞内ユビキチン化タンパク質に与える影響についてウェスタンブロット法で調べた。その結果、AS-29 処理により明らかなユビキチン化タンパク質の蓄積が認められた。生体内ではさまざまなタンパク質が適切なタイミングでユビキチン化されプロテアソームにより分解される。プロテアソーム阻害剤はさまざまなタンパク質の分解を抑制することができるが、細胞増殖や生存能と深く関わる転写因子 NF- κ B もその 1 つである。NF- κ B は多発性骨髄腫などで恒常的に活性化しており、プロテアソーム阻害剤の薬効の主要なメカニズムの 1 つと考えられている。そこで AS-29 の NF- κ B 活性化抑制効果について調べた。多発性骨髄腫 RPMI8226 細胞に TNF- α を作用させると内在性 NF- κ B 阻害因子である I κ B- α が減少し、NF- κ B の p65 サブユニットの核内移行が促され、p65 の DNA 認識部位への結合活性が増加する。ここに AS-29 を作用させると I κ B- α の減少が抑制され、I κ B- α リン酸化体の蓄積および NF- κ B p65 の核内移行が抑制され、さらに p65 の DNA 認識部位への結合活性が明らかに抑制された。よって AS-29 は *in vitro* アッセイにおいても、細胞を用いた系においてもプロテアソームを阻害することが明らかとなった。

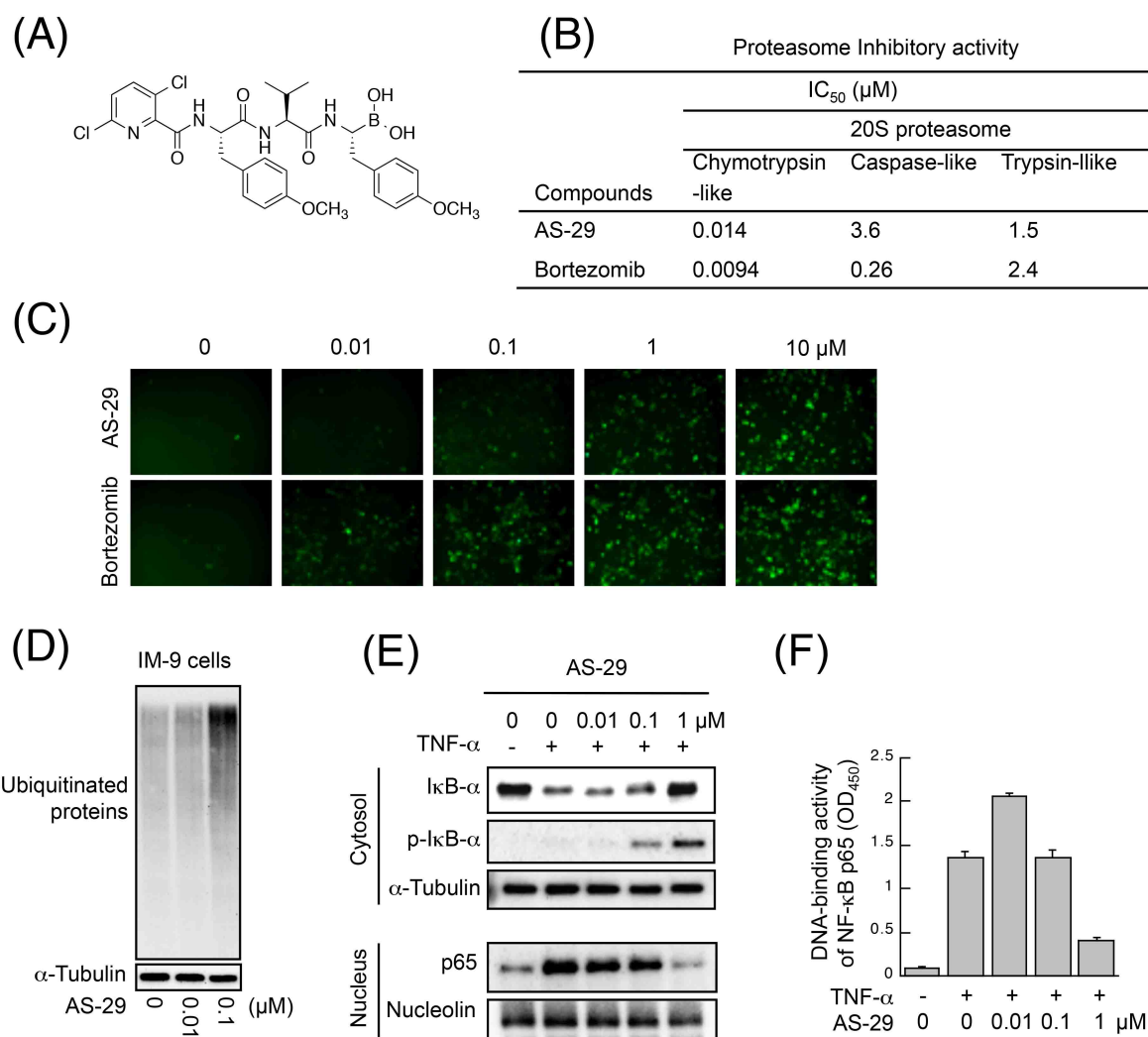


図 2. AS-29 によるプロテアソーム阻害。

(A) AS-29 の化学構造。 (B) *In vitro* プロテアソーム阻害活性。 AS-29 はヒト赤血球由来 20S プロテアソームに対して強い阻害活性を示した。 (C) プロテアソーム分解性蛍光タンパク質 ZsProSensor-1 の蓄積。 プロテアソーム分解性蛍光タンパク質を発現する HEK293 細胞に AS-29 を作用させると細胞内に蛍光タンパク質の蓄積が認められた。 (D) ユビキチン化タンパク質の蓄積。 ヒト多発性骨髄腫 IM-9 細胞に AS-29 を作用させるとユビキチン化タンパク質が増加した。 (E) I κ B- α の分解抑制と NF- κ B p65 の核内移行。 AS-29 は TNF- α による I κ B- α の分解を抑制し、リン酸化 I κ B- α の蓄積および NF- κ B p65 の核内移行を抑制した。 (F) NF- κ B の DNA 結合能。 AS-29 は TNF- α による DNA 結合活性を抑制した。

2. AS-29 によるアポトーシス誘導

RPMI8226 細胞における AS-29 のアポトーシス誘導能をアネキシン V とヨウ化プロピジウムで二重染色しサイトフローメーターにて調べたところ、無処理群の細胞に比べてアネキシン A 陽性およびヨウ化プロピジウム陽性の後期アポトーシスを示す細胞数が約 3 倍増加した (図 3)。さらにアポトーシス実行酵素であるカスパーゼの活性化について調べたところ、AS-29 によりプロカスパーゼ 8 および 9 が減少し、活性型中間体カスパーゼ 8 および活性型カスパーゼ 9 の出現が確認された。続いてプロカスパーゼ 3 の減少および活性体の出現、ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼの分解が観察され、カスパーゼ 3 の酵素活性も AS-29 の用量依存的に増加した。

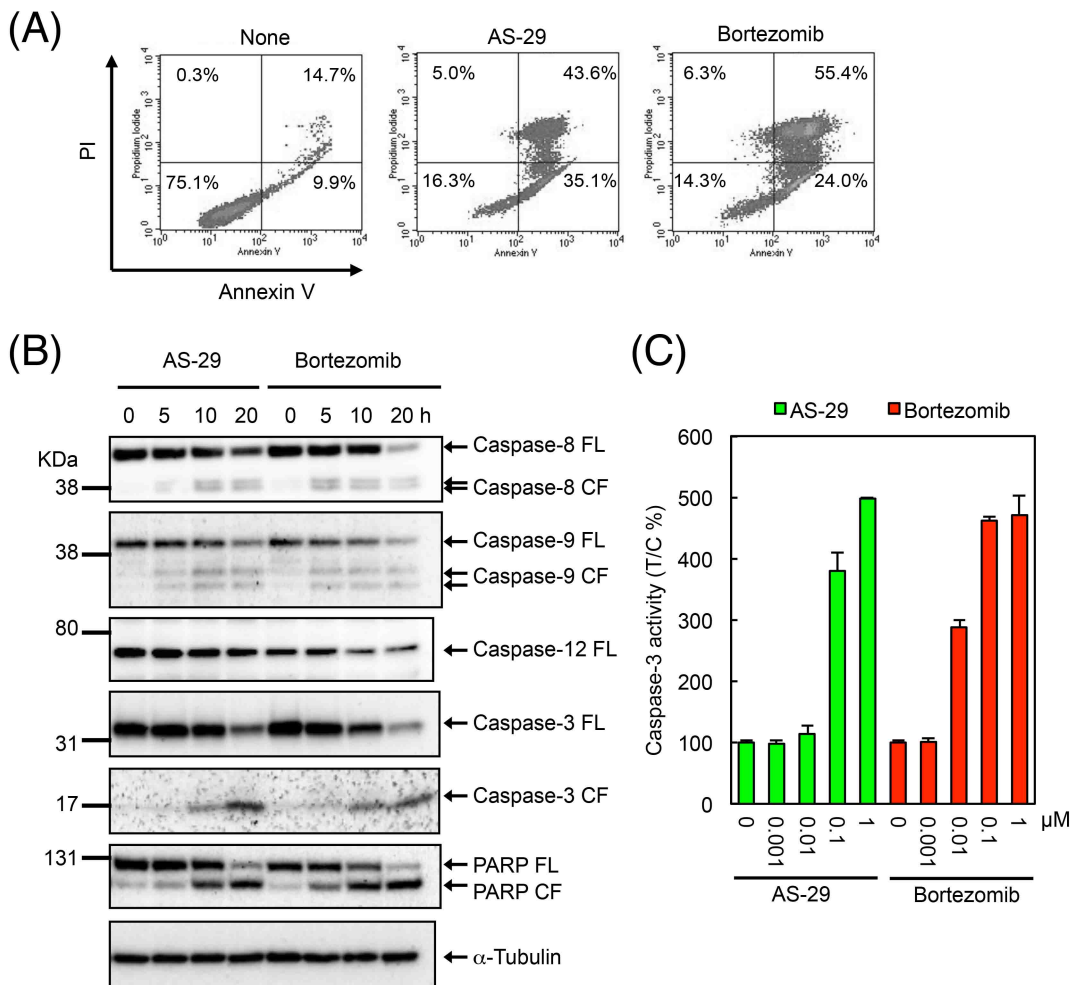


図 3. AS-29 によるアポトーシス誘導.

(A) アポトーシス細胞の検出. RPMI8226 細胞を AS-29 で処理すると後期アポトーシス細胞が増加した. (B) カスパーゼの活性化. AS-29 はカスパーゼ 3, 8 および 9 を活性化し PARP を分解した. (C) カスパーゼ 3 の活性. AS-29 はカスパーゼ 3 の酵素活性を亢進した.

3. AS-29 の抗腫瘍活性

In vivo での AS-29 の作用を調べるため、*in vivo* イメージングを用いて腫瘍内プロテアソーム阻害活性を測定した⁵⁾. プロテアソーム分解性蛍光タンパク質 ZsProSensor-1 を恒常的に発現する HEK293 細胞をヌードマウスの鼠蹊部皮下に移植し、腫瘍体積が約 1,000 mm³ になったところで AS-29 を静脈内投与した. 投与後 24 時間で腫瘍部位に強い

蛍光が観察され、これは腫瘍内のプロテアソーム活性が阻害され蛍光タンパク質が蓄積したことを示しており、また腫瘍を摘出後に腫瘍内プロテアソームの酵素活性を測定すると明らかに腫瘍内のプロテアソーム活性が低下していた。次に RPMI8226 細胞をヌードマウスの鼠蹊部皮下に移植したがんモデルマウスに 4 mg/kg の AS-29 を週に 2 回静脈内投与したところ、非常に強い抗腫瘍活性を示した。

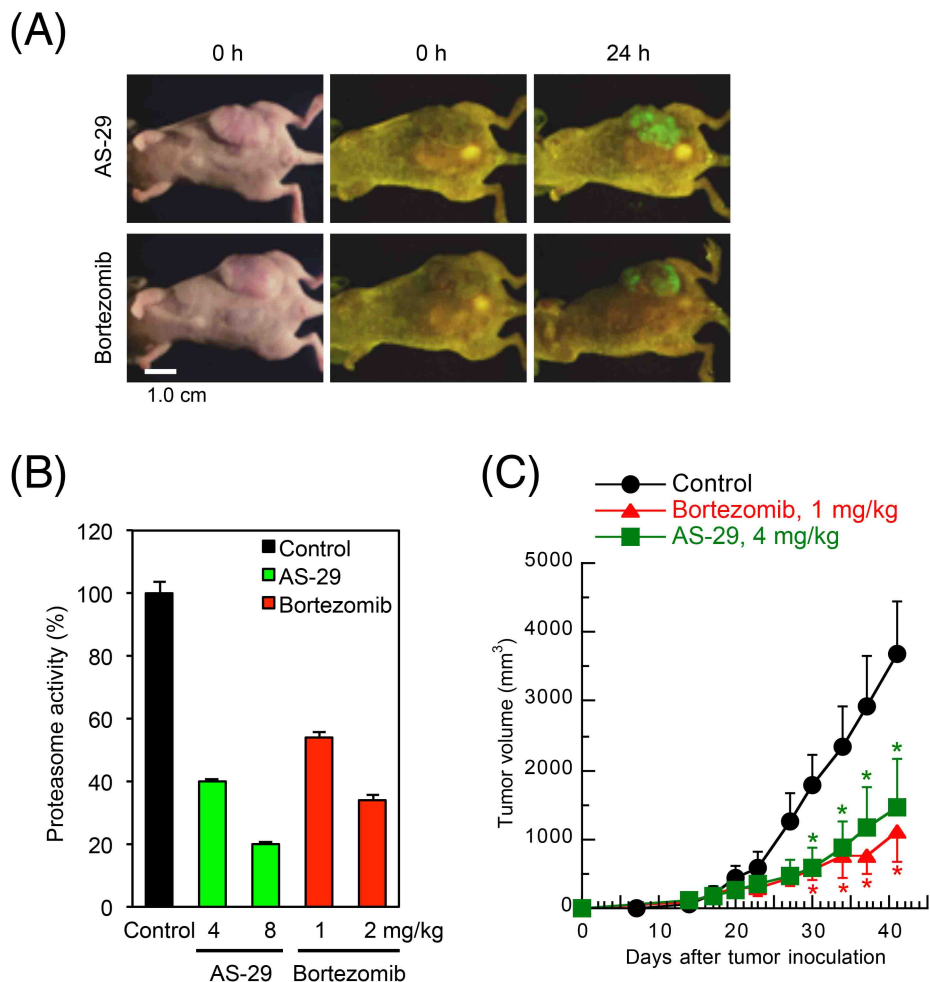


図 4. AS-29 による抗腫瘍活性.

(A) 腫瘍内プロテアソーム阻害の *in vivo* イメージング. AS-29 を静脈内投与すると腫瘍内のプロテアソームが阻害され蛍光タンパク質が蓄積した. (B) 腫瘍内プロテアソーム活性. AS-29 を静脈内に投与すると腫瘍内のプロテアソーム活性が低下した. (C) AS-29 の抗腫瘍活性. RPMI8226 細胞移植がんモデルマウスに AS-29 を週 2 回静脈内投与すると、明らかに腫瘍増殖が抑制された. * $P < 0.001$, Student's *t*-test, 無処理群との比較.

考 察

本研究において、我々は放線菌の生産する天然物化合物チロペプチンのボロン酸誘導体のプロテアソーム阻害活性および抗腫瘍活性を調べた。チロペプチンボロン酸誘導体の 1 つである AS-29 は *in vitro* および *in vivo* においてプロテアソームを低濃度で阻害し、強い抗腫瘍活性を示すことを明らかにした。ボルテゾミブは末梢神経障害などの毒性が問題となっているが、マウスにおいて AS-29 はボルテゾミブよりも低い毒性を示した。一方で、数十種類のがん細胞株を用いた感受性試験を実施したところ AS-29 はボルテゾミブと類似した感受性パターンを示したが、AS-29 に対して高い感受性を示す細胞株も存在し、がん種の選択や感受性因子の解析により本化合物が新しい抗がん剤となり得る可能性が示唆された。今後さらに本研究を発展させる予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、微生物化学研究所沼津支所の大庭俊一、微生物化学研究所有機合成研究部の阿部 光、および渡辺 匠である。最後に本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

文 献

- 1) Momose, I., Sekizawa, R., Hashizume, H., Kinoshita, N., Homma, Y., Hamada, M., Inuma, H. & Takeuchi, T. : Tyropeptins A and B, new proteasome inhibitors produced by *Kitasatospora* sp. MK993-dF2. I. Taxonomy, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J. Antibiot.*, **54** : 997-1003, 2001.
- 2) Momose, I., Umezawa, Y., Hirose, S., Inuma, H. & Ikeda, D. : Structure-based design of derivatives of tyropeptin A as the potent and selective inhibitors of mammalian 20S proteasome. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15** : 1867-1871, 2005.
- 3) Watanabe, T., Abe, H., Momose, I., Takahashi, Y., Ikeda, D. & Akamatsu, Y. : Structure-activity relationship of boronic acid derivatives of tyropeptin: proteasome inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **20** : 5839-5842, 2010.
- 4) Momose, I., Abe, H., Watanabe, T., Ohba, S., Yamazaki, K., Dan, S., Yamori, T., Masuda, T. & Nomoto, A. : Antitumor effects of tyropeptin-boronic acid derivatives: New proteasome inhibitors. *Cancer Sci.*, **105** : 1609-1615, 2014.
- 5) Momose, I., Tatsuda, D., Ohba, S., Masuda, T., Ikeda, D. & Nomoto, A. : *In vivo* imaging of proteasome inhibition using a proteasome-sensitive fluorescent reporter. *Cancer Sci.*, **103** : 1730-1736, 2012.