



私の研究

低酸素応答性転写因子 HIF-1 α に 作用するがん分子標的治療薬の探索

～福島県土壌由来微生物を用いた創薬研究～

金 容必 (きむ よんぴる)

いわき明星大学薬学部 教授



1. はじめに

いま、医療の場で用いられている薬のほとんどは、約60年前に世の中に存在していなかったと言われている。言いかえると、この60年余りの間に今日の医療になくってはならない薬のほとんどが新薬として登場してきたのである。

新薬がひとりで生まれてくることはまずなく、そこには砂漠の中からダイヤモンドを探すような努力が必要である。新たに発見もしくは化合物として創製された物質を、病気の予防・治療や症状の改善に役立つ薬として医療の場に送り出すまでの研究と開発の仕事を創薬と呼んでいる。人体の仕組みや症状について新しい知識が得られると、病気の予防や治療についてのヒントや情報がいくつも生まれてくる。そこで天然物由来新薬候補物質の探索や化学合成が試されるが、それら候補化合物が新薬になる確率は約10,000分の1であり、化学実験から生物を用いた試験と治験（人での安全性や有効性を確かめる試験）を経て新薬として世の中に送るまでの歳月は9～20年という長い期間を必要とする。その間、沢山の開発費用も必要

とする。創薬は膨大な時間と多くの人の英知と費用を要する、リスクの大きな仕事である。新薬は、ときには手術の必要をないものにするし、入院期間を短くし、在宅で病気の多くをコントロールできるようにするなど、医療の様相を一変させてきたのも事実である。現代における新薬開発は、医療の進歩向上に欠くことのできないものになっている。

そこで、私たち研究室では現在日本の死亡原因1位であるがんをターゲットとして福島県土壌由来微生物を用いて副作用の少ないがん分子標的薬を目指し、創薬研究を行った。

2. 背景および目的

乳がん、子宮頸がん、卵巣がんなど多くの悪性腫瘍において細胞への酸素供給はがんが生き延びるために重要な因子のひとつであることが知られている。1992年に Semenza と Wang らによって初めて生体における酸素恒常性を司る因子として Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α 、低酸素応答性転写因子) が報告され¹⁾、1995年に単

離、精製されて以来、分子レベルの研究が加速的に進み、がんの微小環境における HIF-1 の機能が次々と明らかになってきた²⁾。HIF-1 はヘリックススループヘリックス構造を持つ α サブユニット (HIF-1 α) と β サブユニット (HIF-1 β) から構成されるヘテロ二量体タンパク質である。HIF-1 β は恒常的に細胞内に存在しているタンパク質であるのに対し、HIF-1 α は正常組織において通常の酸素濃度分圧下ではプロテアソームによる分解を受けるため、殆ど検出することができない。しかし、一旦細胞が低酸素に暴露されると HIF-1 α の水酸化が阻害され安定化することで、HIF-1 α の急速な蓄積を生じることが明らかとなっている。その後、細胞質に蓄積した HIF-1 α は HIF-1 β と二量体を形成し核内標的遺伝子である Hypoxia responsive elements (HREs) に結合することで血管新生因子である Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の産生を促す (図 1)。

がん組織内はがん新生血管の構造異常や無秩序な増殖などによって低酸素環境におかれているにも関わらず、がん細胞は低酸素環境に適応し効率的に増殖することができる。むしろ、低酸素環境は、がん細胞の悪性化、血管新生などのがん細胞

増殖にプラスの要因となっている。これらを可能にしている因子は、低酸素条件下のがん細胞内で活性化され、血管内皮増殖因子を制御することによりがん細胞の増殖や転移を促進する作用をもつ HIF-1 α である。従って、HIF-1 α 機能を制御する化合物は選択性の高く、かつ副作用の少ない新しいタイプの抗がん剤になる可能性が高い。そこで私たち研究室では、土壌由来糸状菌代謝産物を用いて HIF-1 α をがん分子標的としてスクリーニングを行った。

3. 低酸素条件およびスクリーニング方法

スクリーニングにおいては、ヒト子宮頸がん (HeLa) 細胞を糸状菌培養画分存在下で 3 時間前処理し、さらに細胞を低酸素条件下 (1%O₂、94%N₂、5%CO₂) で 4 時間培養後、細胞内の HIF-1 α 、 β タンパク質レベルを Western blot 法により検出した。また、ヒト乳がん細胞である MCF-7 および T47D 細胞に対する活性成分の選択性については、低酸素下あるいは鉄キレート剤である deferoxamine (DFO) 刺激で核内移行する HIF-1 α 、 β タンパク質レベルを核抽出タンパク質を作成して Western blot 法により検出した。

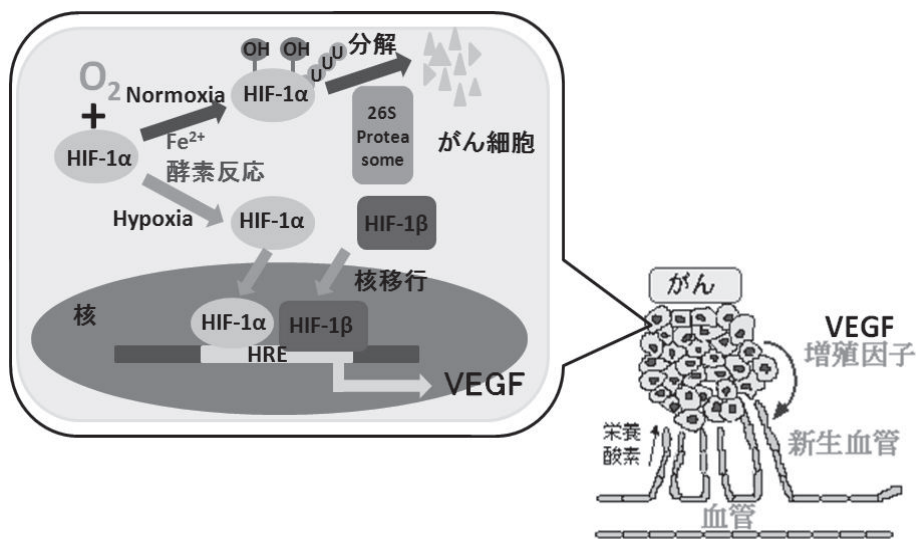


図 1 がん細胞における HIF-1、VEGF と血管新生の関係

4. スクリーニング結果、糸状菌の培養・精製および構造解析

土壌由来糸状菌の126培養画分でスクリーニングを行った結果、最も強い HIF-1 α タンパク質の細胞内蓄積抑制を示した IMU-0051株のフラクション2が選択された。糸状菌 IMU-0051株は福島県いわき市三崎公園で採集した土壌より分離され、Pitt の分離法に従って菌学的性質を調べた結果、*Penicillium* 属と同定された (図2)。本菌株をいわき産米を主成分とする生産培地で25日間静置培養し、酢酸エチルを用いて抽出した後、得られた抽出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分離して最終的にオクタデシルシリル (ODS) カラムを用いる分取高速液体クロマトグラフィ (HPLC) により3つの活性成分を単離し

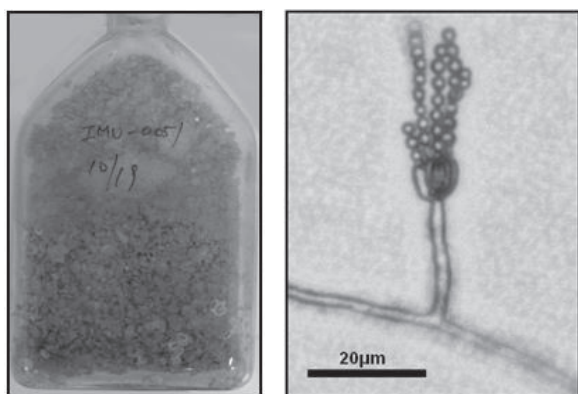


図2 IMU-0051株の米培地による生産培養および顕微鏡写真

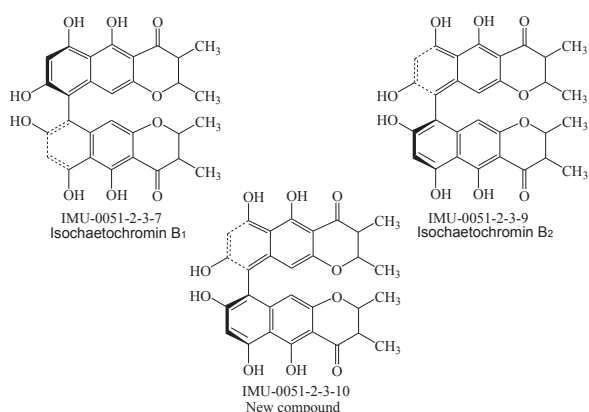


図3 IMU-0051-2-3-7、IMU-0051-2-3-9 および IMU-0051-2-3-10の構造

た。黄色粉末状物質として単離された3成分は核磁気共鳴分光法 (NMR) を初めとする各種機器分析により IMU-0051-2-3-7は isochaetochromin B1、IMU-0051-2-3-9は isochaetochromin B2、IMU-0051-2-3-10は IMU-0051-2-3-9の新しい立体異性体であることが明らかとなった (図3)。

5. IMU-0051-2-3-7による HIF-1 α タンパク質の細胞内蓄積抑制効果

IMU-0051株から活性成分として単離された3つの化合物は、低酸素条件下で HeLa 細胞の細胞質内に蓄積する HIF-1 α タンパク質を濃度依存的に抑制した。そのうち活性の強かった IMU-0051-2-3-7を用いて、3種類の細胞で低酸素下または DFO 刺激による核内に移行する HIF-1 α タンパク質レベルを検討した。その結果、IMU-0051-2-3-7は、全ての細胞において低酸素下で核移行する HIF-1 α タンパク質レベルを1から30 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で濃度依存的に強く抑制したが、核内 HIF-1 β タンパク質レベルには殆ど影響を与えなかった。このようにして、IMU-0051-2-3-7の抑制作用が、HIF-1 α タンパク質に選択的であることが明らかになった (図4)。一方、DFO 刺激により核移行した核内 HIF-1 α 、 β タンパク質レベルに対しては、低酸素条件のように強い抑制活性は見られなかった (データ未掲載)。以上の結果から、IMU-0051-2-3-7は低酸素下の核内 HIF-1 α タンパク質レベルに対して最も強い活性を示し、DFO 刺激により核移行した核内 HIF-1 α 、 β タンパク質レベルに対する作用が弱いことから、がん治療における選択的な治療薬として副作用の少ない抗がん薬のリード化合物になる可能性が示唆された。

6. IMU-0051-2-3-7における HIF-1 α タンパク質の細胞内蓄積抑制の作用機序

がん細胞が低酸素下で HIF-1 α タンパク質を細胞内に蓄積するためには、p44/42MAP kinase 経路、PI3 kinase-Akt-mTOR 経路またはミトコンド

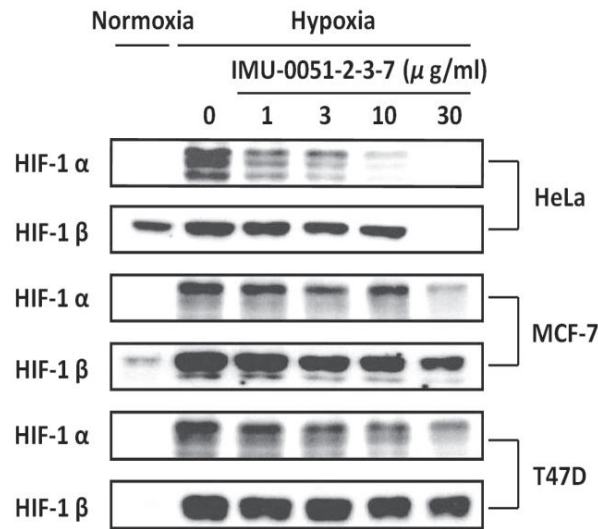


図4 各種がん細胞の低酸素下による HIF-1 α および HIF-1 β の核移行に対する IMU-0051-2-3-7 の作用
 Normoxia：通常の酸素状態、Hypoxia：低酸素状態、HeLa：ヒト子宮頸がん細胞、MCF-7 および T47D：ヒト乳がん細胞

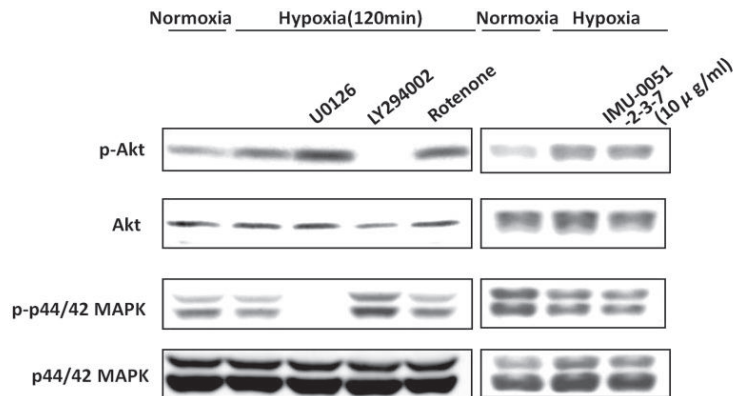


図5 HeLa 細胞の低酸素下における Akt および p44/42MAP kinase リン酸化に対する各種阻害薬の作用
 Normoxia：通常の酸素状態、Hypoxia：低酸素状態
 HeLa：ヒト子宮頸がん細胞、U0126 (MEK-1阻害薬)、LY294002 (PI3 kinase 阻害薬)、Rotenone (ミトコンドリア電子伝達系 Complex1阻害薬)、p-Akt：リン酸化された Akt バンド、p-p44/42 MAPK：リン酸化された p44/42MAPK バンド

リアからの ROS (reactive oxygen species) などの細胞内シグナル伝達経路が深く関わっている^{3,4)}。そこで、IMU-0051-2-3-7の抑制作用機序を明らかにすることを目的として3つの経路の阻害薬を用いて作用機序の解析を行った。低酸素条件下あるいは DFO 刺激で U0126 (MEK-1阻害薬)、LY294002 (PI3 kinase 阻害薬)、または rotenone (ミトコンドリア電子伝達系 Complex 1 阻害薬)

を添加することにより低酸素下で3つの阻害薬は HIF-1 α 、 β タンパク質レベルに対しては強い抑制活性を示し、DFO 刺激では U0126 および LY294002 は弱い抑制活性を、rotenone は低酸素下および DFO 刺激共に強い抑制活性を示した(データ未掲載)。以上のことから、IMU-0051-2-3-7 の HIF-1 α 、 β の核内タンパク質レベルに対する抑制作用傾向は、U0126 または LY294002 の

抑制傾向と類似していることが示唆されたので、p44/42MAP kinase および Akt のリン酸化に対する IMU-0051-2-3-7 の効果について解析したところ、両方共に抑制活性は認められなかった（図5）。

以上の知見から、IMU-0051-2-3-7による低酸素下における HIF-1 α タンパク質の細胞内蓄積抑制作用は、これまで知られている p44/42MAP kinase、Akt シグナル経路およびミトコンドリア経路を介さないことが明らかとなり、新しい経路の存在が強く示唆された。今後、これらの化合物の作用機序が解析できれば、新しい作用機序を持つ副作用の少ない抗がん分子標的薬の開発に結び付く可能性が高いと思われる。

7. 最後に

本稿では、私たち研究室が行っているがんに対する創薬研究について紹介しました。その他にも微生物資源から薬剤耐性がん、炎症およびメラニン合成（皮膚がんや美白成分）に対する有効な生物活性物質を探索することを柱として研究を行っています。近年の成果として、福島県土壌由来糸状菌から新しいタイプの抗炎症薬（IRAK-4阻害剤）を世界で初めて発見し、イギリスの論文雑誌に発表をしました⁵⁾。また、メラニン合成阻害剤も発見し、日本薬学会で研究発表したところ、2013年5月の化学工業日報に紹介され実用化が期待されています。私たちはこのような創薬研究が逸早く社会に役立てるよう、日々研究に邁進しています。

<参考文献>

- 1) Gregg L. Semenza and Guang L. Wang. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5447-5454 (1992)
- 2) Gregg L. Semenza and Guang L. Wang. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J. Biol. Chem.* 270, 1230-1237 (1995)
- 3) Darren E. Richard, Edurne Berra, Emmanuel Gothié, Danièle Roux and Jacques Pouyssegur. p44/42 mitogenactivated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. *J. Biol. Chem.* 274, 32631-32637 (1999)
- 4) Ning Gao, Liqin Shen, Zhuo Zhang, Stephen S. Leonard, Hengjun He, Xue-Guang Zhang, Xianglin Shi and Bing-Hua Jiang. Arsenite induces HIF-1 α and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells. *Mol. Cell. Biochem.* 255, 33-45 (2004)
- 5) Tadahiro Etoh, Yongpil Kim, Haruo Tanaka, Masahiko Hayashi. Anti-inflammatory effect of berkeleyacetal C through the inhibition of interleukin-1receptor-associatedkinase-4activity. *Eur. J. Pharm.* 698, 435-443 (2013)

<プロフィール>

1968年生まれ。いわき明星大学 薬学部 教授。1991年韓国高麗大学卒業、2001年東北大学で薬学博士を取得。北里大学 北里生命科学研究所 研究員、アメリカ Mississippi 大学 薬学部 PD 研究員、北里研究所 基礎研究所 研究員を経て2007年いわき明星大学薬学部へ。2013年から現職。専門は微生物代謝産物を用いた抗がん・抗炎症薬の創薬研究