

[3]

氏名	平田佳之
博士の専攻分野の名称	博士(工学)
学位記番号	理工博第19号
学位授与の日付	平成26年9月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ヒストン脱アセチル化酵素 1/2 選択的阻害剤の創製とその経口性抗がん剤への応用
論文審査委員	主査教授 上里新一 副査教授 福永健治 副査教授 長岡康夫 専門審査委員 准教授 下家浩二

論文内容の要旨

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は後天的に遺伝子の発現を制御するタンパク質であり、その欠失や過剰発現は、がん、中枢神経疾患、生活習慣病、等の発症に密接に関わっている。HDAC は 18 種類ものアイソザイムに分類され、生体内の様々な生理作用に関与している。その中でも亜鉛依存性である HDAC1-11 は p53, p21WAF1/CIP1 などのがん抑制遺伝子の発現に深く関与している。これらの酵素を阻害すると、がん抑制遺伝子の発現が活発化し、がん細胞の細胞周期停止やアポトーシスが誘導され、抗がん効果を発揮することが知られている。本研究では、HDAC1/2 アイソザイム選択的阻害活性をもつ HDAC 阻害剤 K-560 を創製することに成功した。本薬剤は、がん細胞の増殖を抑制する一方で、これまで知られている経路とは異なった機構でオートファジーを誘起し、生存シグナルを活性化することが分かった。

第1章では、後天的な遺伝子制御を担う HDACs の阻害剤と、その抗がん作用機構について概説した。また、代表的な HDAC 阻害剤であり、皮膚 T 細胞リンパ腫に対する治療薬として上市されている SAHA (Vorinostat, Zolinza®) や、目下臨床開発中の MS-275 (Entinostat) を例に挙げ、化合物の構造上の特徴と活性との関連性について解説した。

第2章では、SAHA に代表される hydroxamic acid 型 HDAC 阻害剤と MS-275 に代表される 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤の特徴とその問題点について議論し、HDAC アイソザイム選択的阻害剤の合成戦略について提案した。

第3章では、当研究室で合成された 2-aminobenzamide 型 HDAC 阻害剤 K-197 と、陽性対照化合物 MS-275 を用いて行った、ヒト大腸がん細胞株 HCT116 移植ヌードマウス抗腫瘍活性試験の結果を述べるとともに、K-197 の抗がん作用機序の検討を行った。K-197 は、MS-275 と比べ、50 mg/kg では同等の腫瘍縮小効果を示したが、35 mg/kg 及び 45 mg/kg

では MS-275 と比べ、腫瘍縮小効果が乏しかった。生物学的利用率に問題があると思われた。また、K-197 投与群ではマウスが死亡するなどの副作用も観察された。K-197 は、水溶性が低いなどの物性上の問題の他、生物学的利用率の低さが問題点であり、これらの改善が課題として挙げられた。

第 4 章では、K-197 をリード化合物とし、課題であった生物学的利用率をどのように改善すべきかについて考察した。報告によれば、分子内回転の自由度を減少させることにより、物性や生物学的利用率の改善、並びに、代謝抵抗性、抗腫瘍効果の増大が期待されることがある。そこで、K-197 の構造中、回転自由度の高い 3 級アミンを、より自由度の低いアミド結合に改変した化合物を種々合成した。そして、合成化合物の抗腫瘍活性を評価した。

第 5 章では、X 線結晶解析に基づき、HDAC1 及び HDAC2 のポケット状活性部位底部の更なる奥にチエニル基或いはフェニル基が入り込む疎水性ポケットが存在することが報告されたことから、チエニル基置換 2-aminobenzamide 基を持つ新規 HDAC 阻害剤を種々合成し、そのアイソザイム選択性、ヒトがん細胞に対する細胞増殖活性、等々を評価した。創製した化合物から、HDAC1 及び HDAC2 に対して、MS-275 より高い選択的阻害効果を示す、4-ethyl-2, 3-dioxopiperazine 基含有化合物 K-560 を見出した。本化合物は、適度な水溶性を保持し、ヒト大腸がん細胞株 HCT116、SW480、SW620 及び乳がん細胞株 SKBR3 に対し、MS-275 と同等の細胞増殖抑制活性を示すことを認めた。

第 6 章では、K-560 に特化して、その細胞レベル、動物レベルでの抗腫瘍活性、並びに、その活性の作用機序について検討した。K-560 は、HCT116 移植ヌードマウスを用いた経口投与抗腫瘍活性試験において、MS-275 と比べて遜色のない腫瘍縮小効果を示した。また、K-560 には、MS-275 投与群でみられた体重減少は観察されなかった。Flow cytometer 及び蛍光顕微鏡により細胞形態を観察したところ、K-560 を暴露した HCT116 細胞では、G1 期と G2/M 期で細胞周期が停止し、アポトーシス細胞は観察されなかった。また、K-560 は cleaved PARP や cleaved caspase 3 などのアポトーシス関連タンパク質を誘導しなかった。一方、K-560 は、細胞周期関連タンパク質である p-Rb や E2F1 の発現を抑制したことから、主として G1 期において細胞周期停止を誘導することが分かった。そこで、アポトーシスとは異なる細胞処理の一つであるオートファジーに着目するとともに、生存関連タンパク質 (PI3K、Akt、mTOR、ERK) について調べた。結果、K-560 は、PI3K/Akt/mTOR を活性化し、且つ、オートファジーマーカータンパク質である LC3B を誘導した。この LC3B 誘導効果は、既存のオートファジー誘起剤である rapamycin よりも高いものであった。特記すべきことに、rapamycin は mTOR 複合体である mTORC1 の活性を阻害するのに対し、K-560 はこの活性を亢進した。

第 7 章は、上記の結果の総括である。当研究室で合成された K-197 を出発物質として、構造の最適化と HDAC アイソザイム選択性の向上を目指して、構造活性相関を検討しつつ合

成展開を行ってきた。その結果、HDAC1/2 選択的阻害効果の高い K-560 にたどり着くことができた。本化合物は、がん細胞の細胞周期を制御するが、一方で、生存シグナルタンパク質 PI3K/Akt/mTOR を活性化し、オートファジーを誘起して細胞を生存させる新規作用機序をもつ化合物であることが分かった。また、オートファジー誘起剤として広く世の中に知られている rapamycin とは異なったオートファジー誘導作用を有することも明らかとなった。

論文審査結果の要旨

当研究室でこれまでに合成された HDAC 阻害剤の中には、細胞、動物の両レベルで有効な抗腫瘍効果を示す化合物も存在したが、HDAC アイソザイムを広範に阻害するために毒性が比較的高く、安全域に問題があった。今回、生物学的利用率の向上と HDAC アイソザイム選択性を目指して、合成展開を行った。構造活性相関を検討しつつ合成を行った結果、HDAC1/2 選択性の高い K-560 にたどり着くことができた。本化合物は、がん細胞の細胞周期を制御して細胞の増殖を抑制するが、一方で、生存シグナルタンパク質 PI3K/Akt/mTOR を活性化し、オートファジーを誘起して細胞を生存させるという、既存の抗がん剤とは異なった作用機序をもつ化合物であることが分かった。最近、オートファジーの研究が世界的規模で活発にされていて、飢餓応答だけでなく、細菌感染防御、抗原提示、細胞死、発生、老化、癌化などの各種の疾患にも関連していることが明らかにされている。K-560 は、これまで知られている経路とはことなる機構でオートファジーを起こすことが明らかとなり、この方面の研究に貴重な情報を提供するものとして、国内外の注目を集めている。本化合物やその関連化合物は、神経細胞においても、細胞を死から保護することから、中枢神経疾患の新しいタイプの治療薬にも応用される可能性を秘めており、今後のさらなる展開が期待される。

よって、本論文は博士論文として価値あるものと認める。