

計算化学を用いた転写因子 NF- κ B の立体構造を分子標的とする新しい抗がん戦略に関する研究

申請者（所属・役職・氏名）

名古屋市立大学大学院

医学研究科 教授 岡本 尚

共同研究者（所属・役職・氏名）

名古屋市立大学大学院

医学研究科 講師 朝光 かおり

【研究目的】多くの悪性腫瘍で転写因子 NF- κ B の活性化が起こり、そのことが発がんやその進展と深く関連している。また、腫瘍細胞が悪性化を進める中で、周囲組織への浸潤能や遠隔臓器への転移能およびがん化学療法に対する薬剤耐性能などを獲得してゆくことが明らかにされているが、興味深いことに、これらの現象においても NF- κ B は主要な制御的役割を担っている（論文 1）。これらの腫瘍細胞は通常の化学療法薬剤に耐性であり、実験結果より NF- κ B 活性化との深い関連が示唆される。

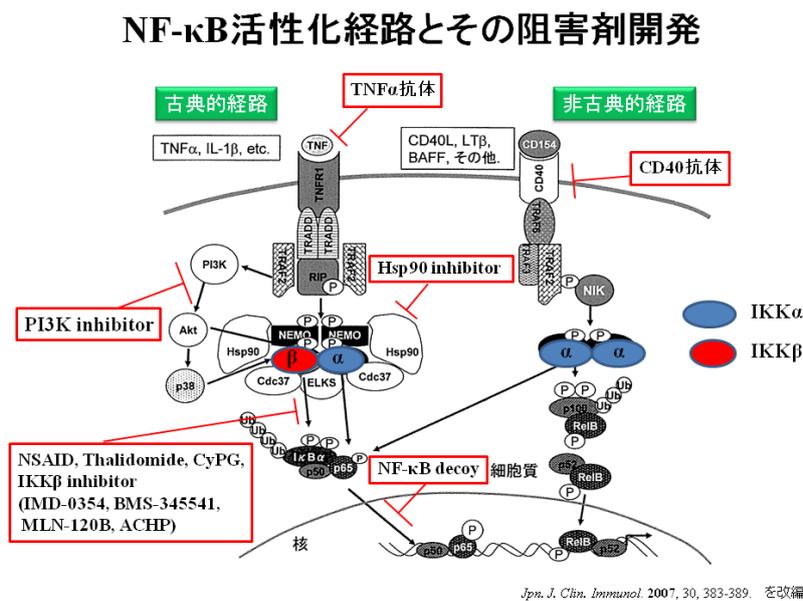
本研究課題の最終目的は、腫瘍細胞ごとに異なると考えられる NF- κ B 活性化機転を包括的に解明し、その活性化機構を治療標的とする新たな悪性腫瘍の治療法を開発することである。このためには、最近になって更にその複雑性と多様性が明らかになってきた NF- κ B 活性化機構と、その際に NF- κ B と相互作用する他の細胞分子、主として蛋白質、の同定と機能の解明が不可欠である。さらに、近年ヒト細胞でもその役割の注目されるマイクロ RNA(miR)など非コード RNA(ncRNA)の作用も合わせて考え、複雑性を背後に持つ生体調節系のシステム特性を追求してきたが、紙面の都合上本報告書では詳細は省略する。これらの解析結果の中で最も被制御性が高く、技術的に薬剤開発が可能な分子過程を明らかにしてゆく。また、このことは個々の腫瘍ごとに異なる NF- κ B 活性化のメカニズムを解明することにもなる。

そのために本研究計画の中では、これまでに私たちが追求してきた NF- κ B 主要サブユニット p65 と相互作用する各種細胞因子の同定を進め、さらにこの経路を構成する蛋白分子の立体構造解析を主体とする複合体の形成過程を明らかにしその挙動を解析し、薬剤開発のための基礎情報を獲得することを進めた。

【研究結果と考察】本研究計画は独立した次の3項目よりなっているので個別に記載する。

- 1) NF- κ B 活性化シグナルの複雑性の解明と阻害剤リード化合物の開発。
- 2) NF- κ B を構成する新たな主要サブユニット蛋白の同定と機能の解明。
- 3) 計算化学の手法による蛋白質複合体の構造解析と薬剤開発。

- 1) NF- κ B 活性化シグナルの複雑性の解明と阻害剤リード化合物の開発：



左図は NF- κ B 活性化に関わる細胞内シグナル伝達系の模式図であるが、通常の細胞では「古典的経路」が作用し、種々の標的遺伝子の活性化が起こる。これらの標的遺伝子の中には、炎症・免疫応答に関わる遺伝子群以外に、細胞増殖を促進するものやアポトーシスを抑制するものがあり、結果的に細胞増殖を促す。

図1 NF- κ B 活性化に関わる細胞内シグナル伝達系

炎症応答に関わるものには種々の炎症性サイトカイン以外に細胞接着因子やケモカインなどがあり、炎症とがんの密接な関連を分子レベルでサポートしている。その中核を担っているのが IKK β である。NF- κ B 活性化経路に対する多くの阻害化合物はこの IKK β を標的に開発されたものであるが、その作用が極めて多種類の細胞種に普遍的に起こるため、阻害剤によって頻繁に副作用が生じるために、多くの製薬会社の開発が滞っている。これに対して「非古典的経路」は、ごく限られた細胞種で作用している（論文 2）。IKK β 遺伝子ノックアウトが胎児死亡を来すのに対して、IKK α 遺伝子ノックアウトでは2次リンパ装置の発生不全や皮膚の低形成および不妊が起こる程度であり、致死的な変化ではない。

我々は ATP に類似した様々な合成化合物の NF- κ B 活性化阻害作用を系統的に探索する中で、比較的強い NF- κ B 活性化阻害作用を持ち、動物にも投与でき、副作用も軽微であるものを見出した（論文 3,4）。

2) NF- κ B を構成する新たな主要サブユニット蛋白の同定と機能の解明：

申請者らは 1990 年より NF- κ B と悪性腫瘍との関係に着目し一貫して研究を続けてきた。特に 1999 年より NF- κ B の p65 サブユニットと相互作用する宿主因子の包括的同定を進め、既に 7 種類の p65 相互作用分子を新規に同定し、それぞれの機能を明らかにしてきた(論文 5-12 など)。また、別途、計算化学の手法に注目し、生体高分子の立体構造をもとにした蛋白分子間相互作用(PPD)の解析と複合体構造の解析を進め、とりわけ両者の接触面構造を標的とする小分子化合物の *in silico* および HTP 探索を試みてきた。ATL や多発性骨髄腫細胞での NF- κ B の恒常的活性化と NF- κ B 活性化阻害剤を用いた細胞死誘導療法の妥当性研究はすでに終了した (論文 5, 6)。

さらに、数多くの悪性腫瘍細胞におけるこれら p65 相互作用分子の挙動とシグナル伝達系や転写制御における役割を解明し、悪性腫瘍の個性をこれらの分子の働きによって記載することによって悪性腫瘍の「個別化治療」への道を開拓する。

3) 計算化学の手法による蛋白質複合体の構造解析と薬剤開発 (進行中)：

研究期間が短かったために実施できた範囲は極めて限られていたが、すでに開始していた別の蛋白分子間相互作用、Cyclin T1 と Tat、を対象にして解析を行った結果を述べる (論文 7, 8)。

Tat による HIV 転写活性化の過程は、ウイルス由来の Tat と TAR が宿主転写伸長因子 P-TEFb(サイクリン T1(CycT1)と CDK9 からなる)と結合することから開始される(図 2)。

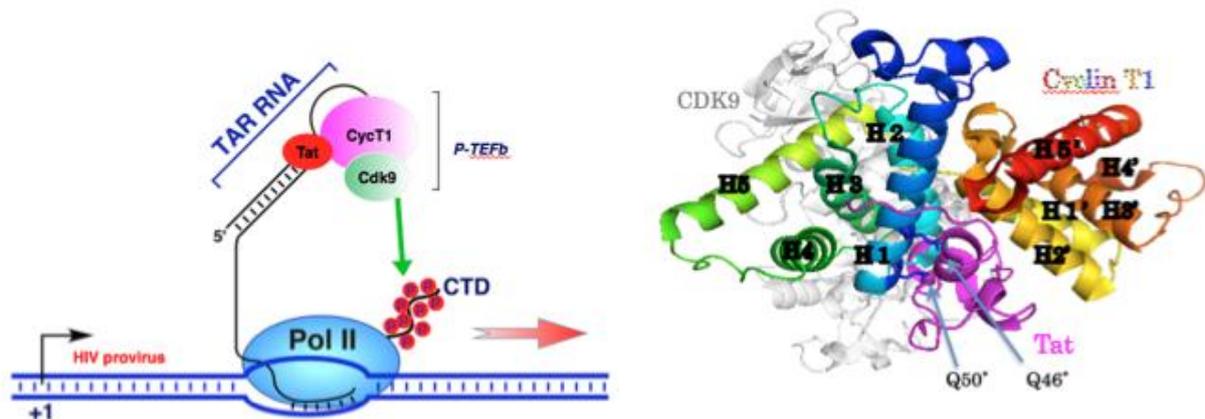


図 2 宿主転写伸長因子 Cyclin T1 と HIV 転写活性化因子 Tat との複合体形成と転写活性化作用(左)および分子間相互作用の立体構造解析(右)。

TAR/Tat/P-TEFb 複合体の 3D 部分的立体構造はこの数年以内に複数の欧米のグループによって X 線結晶解析によって解かれた。Tat はいわば “glue (にかわ)” として HIV mRNA の TAR と CycT1 および CDK9 との間の橋渡しをしている。HIV の高い変異性を考慮すると、HIV 自身のコードする分子を標的にする治療法はいずれ耐性ウイルスが出現することが危惧される。そこで、本研究計画では Tat と CycT1 との相互作用を薬剤標的のための標的と考えて阻害剤設計を進める。なお、本阻害剤は Tat の安定性自体も低下させることが期待できる (論文 8, 9)。

生体高分子は他の生体高分子とフレキシブルな相互作用を持つことによってその機能を果たし、これらの総和としての生命現象はこれら生体高分子の相互作用によって動的平衡状態を保っている。この際の複合体構造の維持と継続および動的変化には生体高分子の分子間相互作用の微小な変化が関与し、温度や溶液条件などにも依存するとともに確率論的な要素が関わる。すなわち、生体高分子間相互作用は、空間と時間の 4 次元的空間を超え、さらに分子間相互作用の微妙な確率論的相互作用が加わった「5次元」的な空間(Takano Y., *Prog Theor Phys.* 26: 304-314, 1961)を仮想する必要がある。このような化合物の開発を効率的に実行するために、静止した結晶構造を対象とする X 線構造解析や時間軸も含めた NMR 構造解析などでは網羅できず、計算化学の手法を導入する必要性があり、薬剤設計でもこのことを前提とする必要がある。構成する宿主およびウイルス蛋白質およびウイルス RNA からなる機能的複合体の立体構造からタンパク構造の動的変化を分子動力学(MD)法などを適用して解析し、統計解析なども加えてその機能に直結する局所構造とその多次元動的変化を解析した (投稿準備中)。今後は、構造依存的な相互作用をその多次元動的なダイナミズムを含めて理解し、かつ最適な薬剤標的構造を導出するための解析を進め、分子間結合の「遷移状態」にある阻害剤開発に適切な構造を選び出し、この標的構造を対象とした阻害剤を探索し、*in vitro* および生細胞を用いた *in vivo* の実際の実験を通してその作用を検証する。

【まとめ】悪性腫瘍の増殖やウイルスの複製などの生物学的過程はそれを構成する生体高分子、蛋白質を主体とする、の相互作用とその結果引き起こされる生化学的反応によって進められ、高度な制御機構のもとに実行される。また、以前と比べて構造生物学的データベースも格段に拡充され、解析のための計算化学的手技の開発も進んだ。ヒトゲノム計画の次の段階として、得られた情報を如何に活用してがん治療に応用するかが我々に課せられた課題であるが、本報告はそのためのひとつの解法を提示するものである。

・参考文献

- 1) Okamoto T, Sanda T and Asamitsu K: NF- κ B signaling and carcinogenesis. <Review> *Curr. Pharm. Design*, 13:447-462, 2007
- 2) Jiang X, Takahashi N, Matsui N, Tetsuka T and Okamoto, T: The NF- κ B activation in the lymphotoxin beta receptor signaling depends on the phosphorylation of p65 at serine 536. *J. Biol. Chem.*, 278: 919-926, 2003
- 3) Asamitsu K, Yamaguchi T, Nakata K, Hibi Y, Victoriano AFB, Imai K, Onozaki K, Kitade Y and Okamoto T: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by blocking I κ B kinase with noraristeromycin. *J. Biochem.*, 144: 581-589, 2008
- 4) Ito M, Hamano T, Komatsu T, Asamitsu K, Yamakawa T, Okamoto T: A novel IKK α inhibitor, noraristeromycin, blocks the chronic inflammation associated with collagen-induced arthritis in mice. *Mod Rheumatol.*, 2014 (in press)
- 5) Sanda T, Asamitsu K, Ogura H, Iida S, Utsunomiya A, Ueda R and Okamoto T: Induction of cell death in adult T-cell leukemia cells by a novel I κ B kinase inhibitor. *Leukemia*, 20: 590-598, 2006
- 6) Sanda T, Iida S, Ogura H, Asamitsu K, Murata T, Bacon KB, Ueda R and Okamoto T: Growth inhibition of multiple myeloma cells by a novel I κ B kinase inhibitor. *Clin. Cancer Res.*, 11: 1974-1982, 2005
- 7) Jadowsky KJ, Nojima M, Schulte A, Geyer M, Okamoto T and Fujinaga K: Dominant negative mutant Cyclin T1 proteins inhibit HIV transcription by specifically degrading Tat. *Retrovirology*, 5: 63, 2008
- 8) Asamitsu K, Hibi Y, Imai K, Victoriano AFB, Kurimoto E, Kato K and Okamoto T: Functional characterization of human cyclin T1 N-terminal region for human immunodeficiency virus-1 Tat transcriptional activation. *J. Mol. Biol.*, 10: 887-895, 2011
- 9) Imai K, Asamitsu K, Victoriano AFB, Fujinaga K and Okamoto T: Cyclin T1 stabilizes expression levels of HIV-1 Tat in cells. *FEBS J.*, 276: 7124-7133. 2009