Osaka University Knowledge Archive

Title	Purvalanol A, a CDK inhibitor, effectively suppresses Src-mediated transformation by inhibiting both CDKs and c-Src
Author(s)	疋田, 智也
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58183
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【17】

氏　　名	疋田智也（ひきだともや）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２４１４７　号
学位授与年月日	平成22年8月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科予防環境医学専攻
学　位　論　文　名	Purvalanol A, a CDK inhibitor, effectively suppresses Src-mediated transformation by inhibiting both CDKs and c-Src （CDK阻害剤Purvalanol AはCDKs，c-Src両キナーゼを阻害することによりSrcによるがん化を効率的に抑制する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　岡田　雅人 （副査） 教　授　目加田英輔　　教　授　野島　　博

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

非受容体型チロシンキナーゼであるc-Srcは様々なヒトのがんで発現の亢進や異常な活性化が確認されており、増殖因子受容体と協調してがん化や悪性化に重要な働きを示していることが知られている。このため、c-Srcはがん治療における有力な分子標的として考えられてきたが、Src特異的な分子標的薬は数少なく、まだほとんどのものが臨床試験段階である。そのため今回我々は、様々な天然、合成化合物を新たに構築したスクリーニング系でアッセイすることにより、c-Srcによるがん形質発現を抑制する阻害剤を同定し、その抑制機構を解明することを目的とした。

〔　方法ならびに成績　〕

がん形質発現細胞は足場非依存的条件下でも生存・増殖が可能であることから、抗接着ポリマーpoly-HEMAをコートした96ウェルプレートと通常の96ウェルプレート上でがん形質を発現するCsk-/-/c-Src細胞を培養し、そこに化合物ライブラリーを添加、48時間後にMTTアッセイにより細胞の生存・増殖を評価した。正常細胞に対する細胞毒性も考慮するため同時に、がん形質を有さない正常なMEFを同アッセイ系にかけ接着条件下における細胞増殖つまり足場依存的増殖には影響を与えず、足場非依存的増殖のみを抑制する化合物を候補分子として選択できる新たなc-Src機能阻害剤のスクリーニング系を構築した。本スクリーニング系を用いて様々な天然物化合物、既存の阻害剤をアッセイすることにより、Cdks阻害剤として知られているPurvalanol A（プルバラノールA）を同定した。Purvalanol AはG1期からS期への移行、S期の進行に寄与するCDK2とM期に作用するCDK1に特に選択性の高い阻害剤である。そこでまず、c-Srcによるがん形質発現にCDK1とCDK2が寄与しているのかを検討した。Csk-/-/c-Src細胞でCDK1とCDK2、またその機能調節に関わる分子の発現や活性をウェスタンブロットにより検討したところ、CDK1の活性亢進は見られないものの、CDK2の抑制因子であるp27kip1の顕著な発現低下、それに伴うCDK2活性亢進が確認された。更に、その寄与を明ら

かとするため、各分子のドミナントネガティブ変異体を作製し、Csk-/-/c-Src細胞に導入したところ、CDK2の変異体導入により足場依存的増殖能には影響を与えず、足場非依存的増殖能のみを顕著に抑制することが明らかとなった。以上の結果は、c-Srcによるがん形質発現にはCDK2の活性化が重要であることを示唆している。次にPurvalanol Aによる抑制効果を、現在臨床試験段階にありPurvalanol Aと非常に化学構造が類似しているCDK2阻害剤Roscovitine（ロスコビチン）と比較、検討を行った。Roscovitineは濃度依存的に抑制効果を示したが、Purvalanol Aと比較して非常に弱い抑制作用を示した。また、RoscovitineではPurvalanol A処理時にみられる顕著な細胞形態正常化も見られないことから、Purvalanol AにはCDK2以外の主要な標的分子が存在する可能性が示唆された。Purvalanol Aは2,4,6-三置換プリン誘導体であり、典型的なキナーゼインヒビターの基本骨格であるプリン骨格を有する。また、代表的なSFKs（Src-family kinases）選択的阻害剤PP2もプリン骨格を有することから、Purvalanol AはSrcも標的としている可能性が考えられたためウェスタンブロットによる確認を行った。その結果、Purvalanol Aは、CDK2活性を抑制するとともにSrcの活性を直接抑制する薬剤であることが明らかとなった。このSrc, CDK2両キナーゼを抑制するPurvalanol Aの特徴を正常細胞に対する細胞毒性とがん形質発現を示す細胞の形態学的変化の観点から検討を行った結果、SFKs選択的阻害剤PP2よりも正常細胞に対する毒性が低く、非常に成熟した形態学的正常化を示した。さらに細胞周期に与える影響を検討したところ、PP2とRoscovitineは弱いG1 arrestを誘導するのに対し、Purvalanol Aは強いG2-M arrestを誘導した。このことは、S期に作用する既存の抗がん剤との併用療法により更なる抗腫瘍活性を得られる可能性を示唆しており、新たな抗がん剤としてのPurvalanol A誘導体の利点であると考えられる。

最後に、実際のヒト大腸がん細胞株HT29, HCT116, SW480を用いてPurvalanol Aによるがん形質発現抑制効果を検討した。その結果、PP2やロスコビチンは全ての細胞株においてほとんど有効な抑制効果を示さないのに対し、Purvalanol AはSrc, CDK2両キナーゼ活性が亢進しているがん細胞株HT29, SW480において顕著な抑制効果を示した。

〔　総　　括　〕

腫瘍はヘテロながん細胞の集団であり、単剤で効率的な治療効果を上げるのは困難であることから様々な薬剤のコンビネーションや多くのシグナル伝達経路を阻害するマルチキナーゼ阻害剤が良好な治療成績を示している。実際にソラフェニブやスニチニブといった薬剤はRaf, VEGFやPDGFR, c-kitといったがんで頻繁に活性化や発現亢進が確認されている標的を複合的に阻害する薬剤として認可を受けている。本研究により得たPurvalanol Aの誘導体は、高頻度にがんで発現や活性の亢進が報告されているSrcとCDKsの両分子を複合的に抑制する新たなマルチキナーゼ阻害剤となる可能性があり、その開発が期待される。

論文審査の結果の要旨

分子標的薬が注目を集めている一方、腫瘍はがん細胞のヘテロな集合体であるため単一の標的をもつ薬剤では十分な治療効果を得ることは困難であることが示されつつある。このため実際の癌治療においては、幾つかのがん関連分子を同時に抑制するようなマルチターゲットな分子標的薬が良い治療成績を示している。今回筆者らは、Srcによるがん化においてその下流でCDK2 (cyclin-dependent kinase 2)が活性化することが重要であり、CDKs阻害剤Purvalanol AがCDK2, Srcを共に阻害する薬剤であることを明らかとした。Src, CDK2両分子の阻害は、SrcやCDK2を単独で阻害するより有意な抑制効果を示し、Srcが関係したがんにおいて Purvalanol A誘導体の開発が新たなマルチターゲット分子標的薬となる可能性を示唆している。本研究はSrcによるがん化に重要な分子としてCDK2を新たに同定し、さらに臨床応用へ向けて有効なシード化合物を提示している。本論文内容は今後の抗がん剤開発に向けて非常に重要な要素を含んでおり、社会へ還元される可能性のある有用なものである。よって、本論文は学位の授与に値すると考えられる。