

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「転写機能をターゲットとした創薬」（細胞内ストレス応答機構を標的とした分子標的薬の開発）
2. 研究開発代表者： 小松 雅明（国立大学法人新潟大学医歯学系）
3. 研究開発の成果

【作成上の留意事項】

転写因子NRF2は、抗酸化たんぱく質や解毒酵素群の遺伝子発現だけでなく、核酸合成など同化反応に関与する酵素の遺伝子発現を制御する。したがって、NRF2の恒常的活性化ががん細胞の増殖、ストレス耐性、そして薬物耐性に寄与することが知られている。通常状態では、一分子のNRF2のETGE領域とDLGex領域が、Cul3型ユビキチンリガーゼ複合体のアダプターたんぱく質KEAP1の二量体に認識される。その結果、NRF2はユビキチン化され、26Sプロテアソームにより分解される。結合様式は異なるがETGE領域とDLGex領域は、KEAP1の同じ塩基性アミノ酸に富むポケットに結合する。我々はp62のSTGE領域のセリン残基がリン酸化を受ける（p-p62）とp-p62がKEAP1のNRF2相互作用領域に競合的に結合し、NRF2を活性化する機構があることを見出した。さらに、p-p62を蓄積するヒト肝細胞がん細胞においてNRF2の恒常的活性化が起こっており、それががん細胞の増殖に関与することを明らかにした。

東京大学創薬機構と連携して蛍光標識p-p62ペプチドとKEAP1-DCドメインを用いた蛍光偏光による「p-p62とKEAP1結合阻害剤」のハイスループットスクリーニング（HTS）を開発した。本HTSにより候補化合物を同定し、*in vitro* pull-downアッセイによる二次スクリーニングを行った。その結果、KEAP1とp-p62との結合を阻害し得る低分子化合物K67を得た。本化合物はp-p62およびNRF2-ETGEが相互作用する共通のKEAP1ポケットに結合するが、p-p62ペプチドとKEAP1-DC結合のIC₅₀は0.389 μMに対し、NRF2-ETGEペプチドとKEAP1-DC結合のIC₅₀は1.37 μMであり、p-p62に対する選択的阻害性が示唆された。実際、*in vitro* pull-downアッセイにより、本化合物はNRF2-ETGEおよびNRF2-DLGexとKEAP1の相互作用にほとんど影響を与えなかったが、p-p62とKEAP1の結合を劇的に阻害した。さらに、K67とKeap1 DC複合体の結晶化、X線結晶構造解析を行った結果、K67のp-p62に対する選択的阻害性が確認された。p-p62を蓄積する肝細胞がん株Huh-1細胞に、K67を添加すると、KEAP1とp-p62の結合の減少、KEAP1とNRF2の結合の増加が確認され、NRF2のユビキチン化の促進、NRF2標的遺伝子の発現抑制が確認された。この効果はp-p62を蓄積しない肝細胞がん細胞株Huh-7では全く確認されなかった。さらに、抗がん剤SorafenibないしはCisplatinによるHuh-1の薬効は、本化合物の前処理ないしは本化合物との併用により有意に増強した。このような効果はHuh-7細胞株では確認されなかった。研究支援基盤の支援によりHuh-1をヌードマウスに移植し、マウス個体におけるK67の活性評価を行った結果、有意な腫瘍増殖抑制効果が確認された。病理組織解析では特に薬効が認められた、すなわち縮小した移植片では細胞質の空胞化を伴う変性領域の割合が増加すると共に、明らかな細胞死像が増加する傾向にあった。これらの結果は、p-p62を高発現する腫瘍ではK67に対する感受性が高いことを意味する。