

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	がんモデルにおけるStreptomyces sp.由来新規天然化合物K-563のKeap1/Nrf2経路阻害作用解析
Title(English)	The discovery and characterization of K-563, a novel inhibitor of the Keap1/Nrf2 pathway produced by Streptomyces sp. in human tumor models.
著者(和文)	堀蘭
Author(English)	Ran Hori
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11164号, 授与年月日:2019年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:中村 聡,丹治 保典,和地 正明,福居 俊昭,八波 利恵
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11164号, Conferred date:2019/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(博士課程)

Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース：	生命理工学	系
Department of Graduate major in	生命理工学	コース
学生氏名：	堀 蘭	
Student's Name		

申請学位 (専攻分野)：	博士	(工学)
Academic Degree Requested	Doctor of	
指導教員 (主)：	中村 聡	
Academic Supervisor(main)		
指導教員 (副)：		
Academic Supervisor(sub)		

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

がん治療において、既存抗がん剤がはじめ効いていても、治療の過程でがんが既存抗がん剤への抵抗性を獲得し、抗がん剤が効かなくなること、再発・進行が起きてしまうことが問題となっている。近年、複数のがんの変異解析において、Keap1/Nrf2 経路という、生体内の酸化ストレス応答や解毒等を制御する経路で重要な Keap1 または Nrf2 において変異を有するがん患者の存在が報告されている。これらの変異によって、Nrf2 は Keap1 による分解を回避し、Nrf2 の転写が常時活性化状態になるため、Keap1/Nrf2 経路が活性化することが報告されている。Keap1/Nrf2 経路が活性化した結果、Keap1/Nrf2 経路による酸化ストレス応答能や解毒能の向上により、既存抗がん剤の抵抗性が獲得され、さらに Keap1/Nrf2 経路によるがん代謝経路の活性化により、がんの悪性化が引き起こされ、がん患者の予後不良に寄与していると考えられている。そのため、Keap1/Nrf2 経路が活性化したがんへの有効な治療薬を開発するために、Keap1/Nrf2 経路阻害薬の開発が注目されている。よって、本研究は、新抗がん剤開発を目指して、Keap1/Nrf2 経路阻害薬を見出すことを目的とした。

まず、Keap1 変異肺がん細胞 A549 に Nrf2 の結合 DNA 配列である ARE 配列を含むレポーターベクターを導入した強制発現系細胞株 (A549/ARE-Luc) と転写因子 E-cadherin の promoter 配列を含むレポーターベクターを導入した強制発現系細胞株 (A549/E-cad promoter-Luc) を樹立し、レポータースクリーニング系を構築した。このスクリーニング系を用いることで、*Streptomyces* sp. 3728-17 株の培養ブロス中に Keap1/Nrf2 経路選択的にレポーター活性を阻害する化合物、K-563 を見出した ($IC_{50} = 190 \text{ nM}$ (A549/ARE-Luc)、 8900 nM (A549/E-cad promoter-Luc、選択性：約 50 倍)。K-563 を *Streptomyces* sp. 3728-17 株の培養ブロスから抽出し、精密質量分析と NMR 分析を行った結果、K-563 は M.W. 828、既知化合物 1100-50 および EM2487 と類似した新規化合物であることが判明した。K-563 は Keap1/Nrf2 経路レポーター活性を阻害するだけでなく、A549 細胞株中の Keap1/Nrf2 経路下流遺伝子の発現も阻害した。さらに、K-563 は Keap1/Nrf2 経路下流タンパク質 HO-1 の発現を阻害し、Keap1/Nrf2 経路が制御する GSH 産生や抗ストレス応答を阻害することを確認した。これらの結果から、新規化合物 K-563 は Keap1/Nrf2 経路阻害薬であることが示唆された。そして、Keap1/Nrf2 経路阻害作用を有することが明らかとなった K-563 が抗がん作用を有するか検討するために、スクリーニングで用いた A549 細胞株を含む Keap1/Nrf2 経路変異がん細胞を用いて、Keap1/Nrf2 経路阻害による細胞増殖阻害と既存治療薬との併用効果を評価した。A549 細胞株だけでなく、さらに Keap1/Nrf2 経路変異がん細胞株である LK-2 細胞株と TGBC-24TKB 細胞株においても、K-563 は Keap1/Nrf2 経路下流遺伝子群の発現を阻害した。これらのことから、K-563 は複数の Keap1/Nrf2 経路変異がん細胞において、Keap1/Nrf2 経路阻害を阻害することが示唆された。また、これら Keap1/Nrf2 経路変異がん細胞株に対して、K-563 は細胞増殖を阻害した。A549 細胞株の Keap1/Nrf2 経路下流遺伝子発現阻害活性と細胞増殖阻害活性を示す濃度が一致したことから、K-563 は Keap1/Nrf2 経路阻害を介して Keap1/Nrf2 経路変異がん細胞の細胞増殖を阻害することが示唆された。過去の報告から、Keap1/Nrf2 経路活性化によって既存抗がん剤の治療抵抗性を獲得することで、Keap1/Nrf2 経路変異がん患者は予後不良になることが報告されている。K-563 は、既存抗がん剤の cisplatin と etoposide に対して、相乗的に細胞増殖を引き起こすことを確認した。そのため、Keap1/Nrf2 経路阻害によって低感受性になっている既存抗がん剤において、K-563 は感受性増強による抗がん作用を引き起こすことが示唆された。K-563 は、酸化ストレス応答、解毒作用、がん細胞の増殖エネルギー供給経路 (がん代謝経路) を制御する Keap1/Nrf2 経路下流遺伝子の発現を阻害した。以上により、がん代謝経路の阻害によって単剤での増殖阻害が、そして酸化ストレス応答と解毒作用の阻害によって既存抗がん剤との

併用効果が起きたと考えられる。

また K-563 の腫瘍における Keap1/Nrf2 経路阻害を検討するために、Keap1 変異肺がん細胞 A549 の皮下移植マウスモデルにおける Keap1/Nrf2 経路阻害作用を評価した。K-563 を投与したマウスの A549 腫瘍では、*in vitro* 同様に、Keap1/Nrf2 経路下流遺伝子の発現阻害が認められた。以上より、K-563 は Keap1/Nrf2 経路が活性化した腫瘍に対しても Keap1/Nrf2 経路を阻害することが示唆された。K-563 を投与したマウスの A549 腫瘍中における Keap1/Nrf2 経路下流遺伝子の mRNA 発現阻害は、*in vitro* の K-563 3 μ M 処置した A549 細胞での下流遺伝子発現阻害と同等であり、*in vitro* と同様に *in vivo* でも、抗酸化ストレス応答、解毒、がん代謝に関わる下流遺伝子の発現阻害が認められた。よって、K-563 は A549 腫瘍に対して、抗腫瘍効果や化学療法剤との併用効果を引き起こす可能性が考えられた。

これらのことから、K-563 を起点とすることで、Keap1/Nrf2 経路阻害作用を有する新規抗がん剤開発に向けた、さらなる研究が期待される。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： 生命理工学 系
Department of Graduate major in 生命理工学 コース
学生氏名： 堀 蘭
Student's Name

申請学位(専攻分野)： 博士 (工学)
Academic Degree Requested Doctor of
指導教員(主)： 中村 聡
Academic Supervisor(main)
指導教員(副)：
Academic Supervisor(sub)

要旨(英文 300 語程度)
Thesis Summary (approx.300 English Words)

Keap1/Nrf2 pathway regulates the antioxidant stress response, detoxification response and energy metabolism. Previous reports found that aberrant Keap1/Nrf2 pathway activation due to Keap1 mutations or Nrf2 mutations induced resistance of cancer cells to chemotherapy and accelerated cell growth via the supply of nutrients. Therefore, Keap1/Nrf2 pathway activation is associated with a poor prognosis in many cancers. These previous findings suggested that inhibition of Keap1/Nrf2 pathway could be a target for anticancer therapies.

To discover a small-molecule Keap1/Nrf2 pathway inhibitor, we conducted high-throughput screening in Keap1 mutant human lung cancer A549 cells using a transcriptional reporter assay. Through this screening, we identified the novel Keap1/Nrf2 pathway inhibitor K-563, which was isolated from actinomycete *Streptomyces* sp. K-563 suppressed the expression of Keap1/Nrf2 pathway downstream target genes or the downstream target protein, which induced suppression of GSH production, and activated ROS production in A549 cells. K-563 also inhibited the expression of downstream target genes in other Keap1- or Nrf2-mutated cancer cells. Furthermore, K-563 exerted anti-proliferative activities in these mutated cancer cells. These *in vitro* analyses showed that K-563 was able to inhibit cell growth in Keap1- or Nrf2-mutated cancer cells by Keap1/Nrf2 pathway inhibition. K-563 also exerted synergistic combinational effects with lung cancer chemotherapeutic agents. An *in vivo* study in mice xenotransplanted with A549 cells to further explore the therapeutic potential of K-563 revealed that it also inhibited Keap1/Nrf2 pathway in lung cancer tumors.

Finally, from this study, it was suggested that K-563, a novel Keap1/Nrf2 pathway inhibitor, might be a lead compound for development as an anticancer agent.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).