治療薬

シリーズ(29)

標的分子薬 -2- ①

ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬の探索研究経緯

中島 秀典

要約：微生物が産生する生理活性物質，醗酵天然物は，人間に時間を飛び越えていきなり生命機構の本質を教えてくれることがある。なぜなら，そのような化合物は，微生物が地球環境の変化を予想して生き残るために，未知の他の生物あるいは環境因子との相互作用を効率的かつ効果的に実現する手段として合目的的に生産されているからである。それらが他の生物に作用する場合，必ず微生物から哺乳動物まですべての生物に共通に保存されている標的タンパク質に作用する。従って，醗酵天然物は通常の帰納的な生物学の解析手法では解明困難な生命現象の課題を解決するポテンシャルを有している。ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬は，有用な医薬品を人類に提供しただけでなく，永らく概念では理解されていても，そのダイナミズムが不明であった転写調節機構という生物学の課題を一気に解明したのである。

1990年のある日，私はいつものように醗酵天然物からの抗がん物質のスクリーニングを行っていた。SV40のプロモーターによって活性化されるCAT (chloramphenicol acetyltransferase) 遺伝子をレポーター遺伝子として用いたヒト乳がん細胞の転写活性 (cellular transcriptional regulation) を測定する系を流していた。サンプル処理細胞を粉碎し，CAT反応を行い，酢酸エチルで抽出し，薄層クロマトグラフィー (TLC) でアセチル化クロラムフェニコールを分離するという作業を1サンプルずつ手作業で行うという今から考えると恐ろしく手間のかかるスクリーニングであった。UVランプでTLCプレートを照らしたとき，私は思わず，「あっ」と声を上げた。あるサンプル添加群において加えた基質である chloramphenicol がすべて 1,3- ジアセチル体に変換されていたのである。

CAT タンパク質が非常にたくさんできている，即ち，細胞の転写活性が著しく活性化されていることを示すものであった。本系において，それまで転写を活性化する微生物産物として私が把握していたのは，テレオサイジン (teleocidin) だけであった。しかも，その活性は見えるか見えないかの微々たるものであったので，この転写活性化作用は尋常ではなかった。この物質こそ，この物語の主題であるヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 FR901228 (FK228, Romidepsin, 図1) であり，その「再」発見であったのである。

この発見の2年前の1988年，私は，藤沢薬品工業 (現アステラス製薬) 探索研究所 醗酵探索担当から，国立がんセンター研究所の生物学部 (当時，西村 進部長) の田矢洋一先生の元に国内留学していた。最先端の知見を醗酵天然物からの新規抗がん薬探索研究に活かすためであった。1980年代は，がん遺伝子の研究が飛躍的に進展した。当時の西村研では発がんのメカニズムの解析が精力的に行われていた。西村先生は，がん遺伝子 *ras* 研究の大家であったので，*ras* による細胞形質転換を正常復帰させる物質探索も行われていた。*ras* 等の細胞質に存在するがん遺伝子については，80

図1 FR901228, FK228, depsipeptide, Romidepsin

キーワード：醗酵天然物，転写調節，HDAC 阻害薬

アステラス製薬株式会社 醗酵研究所 (〒300-2698 つくば市東光台 5-2-3)

e-mail: hidenori.nakajima@jp.astellas.com 原稿受領日：2008年4月25日，依頼原稿

Title: How and why was a histone deacetylase inhibitor created? Author: Hidenori Nakajima

年代半ばより、「detransformation（脱形質転換）」ということで、大学や企業で創薬スクリーニングが行われるようになっていたのである。このことも後に本物語の重要な部分となってくる。一方、*ras*等の細胞質に存在するがん遺伝子に比べて、*myc*や*fos/jun*という核内がん遺伝子については不明な点が多く、当時創薬の対象とは考えられていなかった。私が興味を持ったのは、むしろ転写因子である核内がん遺伝子であった。80年代後半は、この核内がん遺伝子において大きな発見が相次いであり、研究が飛躍的に進歩した非常にエキサイティングな時期であった。正に、私はその最前線にいたのである。田矢先生は、自らが発見された*N-myc*遺伝子のアミノ酸配列を詳細に解析することにより、そのC末部分におよそ α -ヘリックスの1ピッチに相当する7アミノ酸残基ごとにロイシン、イソロイシン、バリン等の疎水性アミノ酸が繰り返し現れる特異なモチーフに気づいていた。しかも同様のモチーフが、*c-myc*でも観察された。現在と違いコンピュータを使ってホモロジー検索が簡単にできるような時代ではない。このような配列特性を見抜くということは抜群の洞察力がないとできないことであった。田矢先生の研究能力の偉大さを示すエピソードの一つである。私は、光栄にもこの素晴らしい発見の実験的検証をお手伝いさせて頂くことになった。しかしながら世界は広い。私ががんセンターに行く少し前、1988年3月、*Nature*誌にDNA結合タンパク質の二量体形成モチーフとしてMcKnightのグループが「ロイシン・ジッパー構造」を提唱したのである(1)。そして、同年11月、同じく*Nature*誌にその生物学的意義も含めた報告がZiffのグループによってなされ(2)、*Oncogene*誌に発表した我々田矢グループの研究成果(3)も合わせて、ここに転写調節機構の一翼を担う転写因子である核内がん遺伝子の活性発現構造が解明された。一方、同時期の1988年7月、これも*Nature*誌に、Ed Harlowのグループにより、DNA発がんウイルスであるアデノウイルスのがん遺伝子産物E1Aが、がん抑制遺伝子Rbと結合するという報告がなされた(4)。がん遺伝子が、がん抑制遺伝子を結合・除去して細胞をがん化へと向かわせるという魅力的なメカニズムであった。しかしながら、この核に存在するRbがいかなる機序でがん化を抑制しているのかは不明であった。ただ、当時、E1Aは*myc*などの転写調節因子型がん遺伝子と同様に「核内がん遺伝子」に分類されていた。従って、Rbはなんらかの転写調節機構を介して発がんを抑制しているのではないかとの推測はできた。この時点では、思いもよらなかったが、実は

この点に対する解こそ、後にヒストン脱アセチル化酵素の作用の本質となって結実することになるのである。いずれにしても、1988年から1989年の田矢グループの発見を含むこれら重要な発見は、発がんや細胞増殖のメカニズムにおける転写調節という現象の解明が、その後大きく進歩する舞台をつくったのは間違いない。あと必要なのは役者であった。

がんセンターでのエキサイティングな留学を終え、1989年に会社に戻った私は、転写調節こそが新しいタイプの抗がん薬を生み出すメカニズムであると確信するに至った。すぐに、がん細胞の転写調節活性をモニターする系を構築することにした。今でこそ、レポーターアッセイというのはスクリーニング系としては一般的であるが、当時は実験のコントロールとしては使われていたが、それを創薬スクリーニングに使おうという発想は殆どなかったと記憶している。系としては極めて簡単で、乳がん細胞であるMCF-7をSV40のプロモーターの下流にCATをつないだレポーター遺伝子によって安定的に形質転換した細胞を用いた。SV40のプロモーターは、AP-1(*fos/jun*複合体)、NF- κ B、OBPといった各種転写因子の結合部位を含んでおり、細胞全体の転写活性をモニターするには好適であった。当初、この転写活性を抑制するのがいいのか、活性化するのがいいのか当時のサイエンスのレベルでは判断がつかなかった。核内がん遺伝子が活性化されてがんになるので、抑制の方がいいと考えるのが普通であると思うが、ただでさえ感度の悪い系で細胞毒性物質の影響を受けやすい「抑制」というのは選択枝としては取りにくかった。そこで私は、細胞の転写活性を促進するということを指標に醗酵天然物をスクリーニングすることにした。この常識はずれの判断が、後に大きな生物学のmissing linkを埋める発見へとつながったのである。

醗酵天然物というのは、最終的な目に見えるアウトプットとしては多様な活性を発現することが多い。従って、最初、別の活性で見つかっていて、後に本来の活性で再発見されることがある。例えば、移植の薬として使われている免疫抑制薬のサイクロスポリンは、最初、抗真菌物質として発見されていた。1972年に、サンド・ファーマ社（現・ノバルティス社）のJ. ボレルらが、T細胞に対して特異的な強い免疫抑制作用を示す物質として再発見することにより医薬品としての開発の道が拓かれたのである。FR901228は、実は1990年代の半ば過ぎに、藤沢薬品工業 探索研究所 醗酵探索担当の上田博嗣研究員（現アステラス製薬 醗酵研究所）らによって、先のdetransformation活性を

図2 Trichostatin A

指標とした巧みなスクリーニングでヒットしていた(5)。FR901228は、*ras*を含むがん遺伝子を導入したNIH-3T3細胞の形態を正常細胞様に変化させる活性を有していたのである。ただ、当時の多くの同様のdetransformation活性を示す物質がそうであったように、「なぜ、そのような活性を発現するのか?、標的タンパク質はなにか?」については全く分かっていなかった。一つ分かっていたのは、このdetransformation誘導を指標としたスクリーニングにおいて、トリコスタチンA(Trichostatin A, TSA, 図2)がFR901228と非常によく似た細胞変形を誘導する物質として頻繁にヒットしていたことであった。

TSAの示すユニークな生物活性は、当時、東京大学農学部の別府輝彦教授(現日本大学大学院総合科学研究科)の研究室で詳細な研究がなされていた。私が、FR901228を転写調節の系で再発見した同じ1990年に別府研究室の吉田 稔先生(現理研 吉田化学遺伝学研究室)はJBCにTSAは、ヒストン脱アセチル化酵素(ヒストンデアセチラーゼ, histone deacetylase, HDAC)という当時あまり馴染みのない酵素を阻害するという報告を出されていた(6)。別府先生の研究室では、がん細胞の細胞周期停止や分化誘導の機序解明研究が種々の微生物産物を用いてなされていたので、この「無名の役者」の発見が、後に細胞周期停止、分化誘導そしてアポトーシス誘導を特徴とするdetransformationという現象とHDAC阻害との関連へと発展していくことになるのである。一方、勿論、当時は、HDACと転写調節なんていうことは誰も考えてはいなかったのである。私も、まさかHDACが転写調節にかかわっているとは考えていなかった。ただ、TSAとFR901228は、detransformationにおいて類似の生物活性を示したのみならず、私の転写調節の系でも同様の転写促進活性を示していたのである。そこで、私はTSAの研究知見からFR901228の転写調節のメカニズムが解明できるのではないかと考えていた。ちょうど1991年に当時の文部省癌特別研究「核内癌遺伝子研究」の「若い研究員」に田矢先生に推挙して頂いたので、迷わず本研究課題として「TSAの転写調節

機構の解明」を選んだ。残念ながら、開発中のFR901228は対外的な研究には使えなかったのである。当時私は、TSAやFR901228は特定の転写因子をなんらかのメカニズムで活性化していると考えていた。そこでSV40のプロモーターからエンハンサー部分を取り除いて基本転写因子結合部位のみのレポーターを造り、当時知られていた種々の転写因子のDNA結合配列を挿入してTSAを作用させてみた。驚いたことに、TSAは調べたすべての転写因子の転写活性を著しく増強した。それだけではなく、なんと基本転写因子だけのコントロールレポーターの転写も増強したのである。勿論、FR901228も全く同様の活性を示したことは言うまでもない。ここに至り、FR901228の転写促進活性は、転写機構のもっと上流において生じているのではないかと考えるようになった。また、興味深いことに、研究を進めるとTSAとFR901228は、detransformation活性や転写促進活性だけでなく、細胞周期停止作用(G1 & G2/M phase arrest)やアポトーシス様細胞死誘導作用など、殆ど同じと言っていいほど共通の生物活性を有していることが明らかとなったのである。これらの多彩な生物活性が下流に位置する特定の転写因子の制御によるとは考えられなくなっていたのである。また、FR901228と同様に強力な転写促進活性を有するFR901464という新規物質を私は既にFR901228と同じくバクテリアの培養物より取得していた。本物質も転写因子に依存しない転写活性化能を有していたのである。本物質は、2007年に吉田先生のグループによりスプライシングにかかわるSF3bが標的タンパク質であることが明らかとなり、サイエンスの新たなページを拓くことになるが本稿で

図3 AUTゲル (Exp Cell Res. 1998;241:126-133. より転載)

は詳細には述べない。このように微生物は転写調節機構において、人間の常識を超える何かを教唆しようとしてくれていたのである。当時、未熟な創薬研究者であった私でもその標的タンパク質が明らかとなれば大発見であり科学の進歩に大きく貢献できるという確信を持つことはできた。

癌特研究を終えた後、私は、HDACの父である東大の吉田先生とFR901228のメカニズム解析に関して共同研究をすることとなった。そしてついに、1995年のある日、私は1枚のAUTゲル(Acid/Urea/Tritonゲル)というアセチル化ヒストンを分離した1枚のポリアクリルアミドゲルを得た(図3)。非常に美しく、明確で、感動的なゲルであった。まぎれもなく、FR901228はTSAと同様に処理細胞のHDACを強力に阻害していた(7)。Detransformation、細胞周期調節そして転写調節が、HDACという酵素を介して1本につながった瞬間であった。

1996年には、Harvard大学Chemistry & Chemical BiologyのStuart L. Schreiber教授の研究室で吉田先生が研究されていた別のHDAC阻害薬トラボキシンの誘導体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、ヒトHDAC-1遺伝子がクローニングされた(8)。このとき、HDAC-1と複合体を形成していたRb binding proteinも同時にクローニングされた。これが前述の1988年以来不明であったRbのがん抑制機構、すなわち、「がん抑制遺伝子産物RbはHDACと転写抑制複合体を形成し、細胞増殖に関連する遺伝子の発現を抑制する」の解明へとつながっていく。私は、1997年に、Schreiberグループに留学する栄誉を得た。Harvard大学に赴任して、Schreiber教授と面談したときに、FR901228が転写調節活性を有しておりHDACを阻害するということを話したときのSchreiber教授の驚いた顔を今でも忘れることはできない。Schreiberグループは、その後、HDAC研究の方向性を、detransformationから転写調節機構の解明へと大きく方向転換し、クロマチンのダイナミズム(クロマチンリモデリング)としての転写調節の理解において素晴らしい研究成果を挙げることになるのである。その熱気溢れる研究現場に、私はまたも居合わせ、その大きな学問の新潮流を目の当たりにすることになった。もうこれは幸せというより運命というしかない。

さて、FR901228は、前臨床段階の早い時点で、米国NCI(National Cancer Institute)へ渡った。FR901228は、当時の藤沢薬品の開発力や日本での臨床開発の限界を超えていた。米国に出さなかったら、日本で潰れていただろう。画期的過ぎた。藤沢薬品では、FK228と

いう開発コードがつけられていたが、米国では“depsi-peptide”というニックネームで呼ばれていた。ユニークな化学構造と抗腫瘍スペクトラムを有するので、NCIの興味を惹いたが動物実験で既存の抗がん薬に比し特に著効を示した訳ではなかった。NCIを一気に臨床試験へと向かわせる原動力になったのは、やはり本剤がHDAC阻害薬であるということが明らかとなり、一躍、サイエンスの最先端と歩調を合わせるようになったことが大きかったと思う。しかしながら、HDAC阻害薬は一体どういうがんによく効くのかについては全く知見がなかった。実際、著効を示す固形がんはフェーズI試験で特定できなかった。この苦境を救ったのが、NCIの一医師であるDr. Suzan E. Btesであった。彼女は、FK228が、CTCL(cutaneous T cell lymphoma)という稀なT細胞白血病に著効を示すことを見出したのである。天然物が医薬品となるとときには、多くの場合、一気にブレイクスルーをもたらしてくれる臨床医の理解者が現れるものである。FK228は、米国の抗がん薬開発ベンチャーであるGloucester社にライセンスアウトされ、Romidepsinという物質名で近いうちに上市される予定である。ただ、なぜ、HDAC阻害薬はCTCLに著効を示すのか、他にもっとよく効くがんはないのか、さらにはがん以外の疾患に適用できないのか等、今後の課題である。

医薬品の開発研究は、10年以上の長きに渡る苦難との戦いである。しかしながら、醗酵天然物からの創薬の場合、それは研究に携わっている人間にとって、患者さんの歓びとサイエンスの進歩の両方に貢献できる非常にエキサイティングでかけがえのない体験を与えてくれることがある。私もこの栄誉に与った幸せな人間の一人である。これは運かもしれない。あるいは準備ができていて、それをつかむことができる者だけに許されるシンクロニシティーかもしれない。いずれにしても、常識にとらわれず、常に「なぜなんだ？」と真摯に真理を探究し続ける姿勢を持った研究者のみが、素晴らしいパートナーとの出会いを得、運や偶然を呼び込むということは間違いのないところであろう。

文 献

- 1) Landschulz WE, et al. Science. 1988;240:1759-1764.
- 2) Kouzarides T, et al. Nature. 1988;336:646-651.
- 3) Nakajima H, et al. Oncogene. 1989;4:999-1002.
- 4) Whyte P, et al. Nature. 1988;334:124-129.
- 5) Ueda H, et al. J Antibiot. 1994;47:301-310.
- 6) Yoshida M, et al. J Biol Chem. 1990;265:17174-17179.
- 7) Nakajima H, et al. Exp Cell Res. 1998;241:126-133.
- 8) Taunton J, et al. Science. 1996;272:408-418.