発見！分子シャペロン Hsp90 が抗がん薬標的に！

抗がん薬標的としての Hsp90 の発見と研究開発

曾我 史朗

要約：天然物由来の生理活性物質 (Geldanamycin, Radicol) の生理活性メカニズムを、酵母やがん細胞を使ったバイオロジーを組み合わせで解析していくことによって、heat shock protein 90 (Hsp90) が重要な抗がん薬標的であることが明らかにされてきた。Hsp90 は、がんの増殖・生存に関わる多くの“クライアントタンパク質”の機能維持に必須であり、Hsp90 阻害によってこれらクライアントタンパク質の機能をマルチに阻害することによって種々のがん細胞に対して抗腫瘍活性を示す。Hsp90 阻害薬の臨床応用は Geldanamycin 誘導体で先行して実施されてきたが、それらとは全く異なる骨格を持つ新規 Hsp90 阻害薬 KW-2478 を創製し臨床試験が進んでいる。本報では Hsp90 が抗がん薬標的として発見されてきた経緯、新規 Hsp90 阻害薬 KW-2478 の研究開発、および Hsp90 阻害薬開発の現状等について紹介する。

1. はじめに

2000 年に入って Dr. Douglas Hannahan, Dr. Robert Weinberg の両氏は、21 世紀におけるがんの定義、すなわち“がんとは何ぞや？”という問いに対する答えを、6つの指標“six hallmarks of cancer” (①自己増殖能の獲得、②増殖抑制系からの逸脱、③浸潤・転移能の獲得、④不死化の獲得、⑤血管新生能、⑥細胞死からの回避) で現わした(1)。10 年が経過し、近年ではさらに腫瘍特異的な細胞・組織環境 (代謝異常、炎症環境、免疫系からの回避、低酸素、低 pH、ゲノム不安定ストレスなど) の新たな指標が加えられ、がんの基礎研究が進展している(2, 3)。

これら基礎研究の成果として“hallmark”に関与する標的分子が明らかにされ、そのいくつかは新規抗がん薬の標的として次々と医療に貢献しはじめている。

Trustuzumab (Her2 レセプターチロシンキナーゼ抗体) や Imatinib (Bcr-Abl キナーゼ阻害薬) が、従来の化学療法薬とは異なる「がん分子標的薬」の皮きりとなり、最近では肺がんの異常染色体として発見された EML4-ALK 融合遺伝子に対するキナーゼ阻害薬 (crizotinib) や、メラノーマに特異的な B-raf 遺伝子変異に対するキナーゼ阻害薬 (vemrafenib) が臨床で優れた効果を示し、新薬として承認されたことは記憶に新しい(4)。これら標的分子薬は、標的分子がメジャードライバーになっているがん細胞に対して特に顕著な効果を示すことから、薬剤の標的に合致した遺伝子異常 (遺伝子増幅、変異、染色体点座など) を生じている患者に合った薬剤をオーダーメイドで投与する個別化医療の考え方へと繋がっている。

しかしながら、これら薬剤が一旦は効果を示しても、がんは標的分子の遺伝子に耐性変異を獲得して不応答になる事例というのは、いずれの分子標的薬においても見られる現実である。また、基礎研究の進展により明らかになった分子標的であっても、キナーゼ阻害薬や抗体の標的となる細胞表面レセプター等のいわゆる druggable な標的ではないために、現状の分子標的薬で狙い切れていない患者は依然として残されている。さらには、上記“cancer hallmarks”で現わされるように、がんは複数因子の異常の蓄積の上で生じているために、単一分子の阻害のみでは十分な臨床効果を発揮できず、やはり既存抗がん薬や分子標的薬どうしの組み合わせ (併用) での治療を考えていくことが必要となっている。

Heat shock protein 90 (Hsp90) は、酵母からヒトにいたる生物種において保存されている分子シャペロンである。“シャペロン”の語源が「社交界デビューするご婦人の介添え役」を意味するように、タンパク質発

キーワード：Hsp90, がん, 分子標的薬

協和発酵キリン株式会社 (〒100-8185 東京都千代田区大手町 1-6-1)

E-mail: shiro.soga@kyowa-kirin.co.jp 原稿受領日：2012 年 9 月 14 日, 依頼原稿

Title: Drug discovery and research of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitor. Author: Shiro Soga

現の過程で正しい折りたたみ（フォールディング）や細胞内局在等を助ける脇役として機能し、生体内で比較的ユビキタスに発現することから考えると、創薬標的としてイメージし難い分子ではある。しかしながら、1990年代に主に天然物由来の低分子化合物を使った chemical biology のアプローチから、分子シャペロンの一つである Hsp90 が、がん細胞においてユニークな機能を有していることが明らかとなり、druggable な抗がん薬標的として注目を集めるようになった。Hsp90 に介添えされる分子はクライアントタンパク質と呼ばれ、これまでにおよそ 200 の分子が報告されているが、がんの hallmarks に含まれる細胞増殖、サバイバル、ストレス耐性因子など重要な分子が多く含まれることが知られている。また興味深いことに、遺伝子増幅等で発現量が異常に増加しているタンパク質（Her2 など）、がんの特異的な変異（EGFR, p53 など）、染色体転座によって生じる異常タンパク質等が正常なタンパク質と比較して Hsp90 依存度が高いといった知見も得られている。また、複数の因子が Hsp90 のクライアントであることから、Hsp90 阻害薬は単一標的を狙った分子標的薬であるが、結果的にがん化に関与するマルチな標的を抑制する特徴（multi-targeted nature with single agent）を有しており、ユニークな抗がん薬標的として注目を集めてきた。

本報では Hsp90 が抗がん薬標的として発見されてきた経緯、新規 Hsp90 阻害薬 KW-2478 の研究開発、および世界的な Hsp90 阻害薬開発の現状等について紹介する。

2. Chemical biology アプローチによる創薬標的 Hsp90 の発見

研究におけるセレンディピティー（当初の意図とは異なる偶然の発見からの展開）とはよく聞く話だが、我々が Hsp90 を抗がん薬標的として注目するようになったきっかけもその類である。酵母を使った表現型スクリーニングによる、v-src シグナル阻害薬取得の試みの過程で、以前から生理活性低分子化合物として報告のあった微生物由来天然物である Radicicol（図 1）を、細胞内で v-src シグナルを阻害するヒット化合物として見出した(5)。しかしながら、Src チロシンキナーゼに対する直接の酵素阻害活性は弱く、酵母におけるシグナル阻害活性のメカニズムは不明であった。

一方、K-ras はすい臓がん、大腸がん、肺がん等で変異が見られる重要ながん遺伝子であるが、この種の G ファミリータンパク質（GTPase 酵素活性を持つ）は、キナーゼ等の酵素阻害薬と比較すると選択的低分子阻害薬の標的としてはハードルが高い。酵母は K-ras タンパク質を持たない生物種であるが、下流の MAPK シグナル伝達経路は種を超えて保存されていることに着目し、ヒト大腸がん由来の活性化変異 K-ras とそのエフェクター分子である Raf 遺伝子を導入して、ヒト活性化 K-ras シグナルが酵母 MAPK シグナル経路へと流れる再構成系を構築した。本系においても Radicicol は非常にクリアーで選択的な活性を示す化合物として同定された(6)。この Ras シグナル阻害活性はヒトがん細胞の活性化 K-ras シグナル阻害に

図 1 天然物由来の Hsp90 阻害薬とその誘導体

においても再現する活性である。その作用メカニズムを解析する過程で、Ras-MAPK 経路の因子への Radicicol の作用を検討していった結果、Ras のエフェクター因子である Raf タンパク質が、Radicicol 濃度依存的に細胞内で消失することを発見した。Radicicol は細胞内において Raf タンパク質を不安定化して分解を促進することによって、活性化 Ras のシグナル伝達経路の途中で遮断して下流 MAPK 経路へと増殖シグナルが伝達されるのを阻害すると考えられる (図 2)。上記 v-src に関しても、Radicicol はキナーゼ阻害活性を示さないものの、v-src タンパク質そのものを不安定化して分解促進することによって、細胞内での阻害活性を示すことが明らかとなった。

図 2 Radicicol による Ras シグナル阻害のメカニズム

これらのことから、細胞内には v-src や K-ras とは別の分子標的が存在し、Radicicol はそれら共通の分子標的を阻害することによって、間接的に細胞系での異なるシグナル経路阻害活性を示していたと考えられる。ちょうど同時期に Radicicol とは異なる骨格を有する天然物 Geldanamycin が類似の活性を示すという報告をしていた米国 NCI の Dr. Neckers らとの共同研究により Radicicol の標的分子が Geldanamycin と同じ Hsp90 であることが明らかになった(7)。これらの低分子化合物は、Hsp90 の ATP/ADP ポケットに結合することにより Hsp90 の平衡状態を ADP 結合型にして、クライアントタンパク質を含むシャペロン複合体の機能をユビキチン化亢進とタンパク質分解の方向へとシフトさせることにより、間接的にクライアントタンパク質の分解を促進する (図 3)。これらのがん細胞における Hsp90 のバイオロジーは Geldanamycin, Radicicol といった低分子プローブの発見により飛躍的に進展した。

3. 抗がん薬標的としての Hsp90

Hsp90 がユビキタスに発現する分子シャペロンであることから、Geldanamycin や Radicicol の標的分子として Hsp90 が同定された当時は抗がん薬標的分子として注目している研究者はあまり多くなかった。この標的分子の抗がん薬標的としての有用性を確認する上では、正常組織への作用も同時に検討できるモデル系での抗がん作用、すなわち in vivo 薬理モデルでの薬効解析が必須であった。Radicicol 自体は血中不安定な

図 3 Hsp90 阻害によりクライアントタンパク質の機能が阻害され抗がん作用を示す

どの課題があったために、誘導体合成による改良が加えられ、マウスに投与可能なオキシム誘導体 KF25706, KF58333 が創製された(5)。これら化合物は、Ras 活性化大腸がん、Her2 高発現乳がん、Bcr-Abl 転座慢性骨髄性白血病などのヒトがん細胞移植マウスモデルにおいて優れた抗腫瘍活性を示す。また重要なポイントとして、それぞれのがん細胞において細胞増殖やサバイバル維持のネックとなる Raf, Her2, Akt, Bcr-Abl などの Hsp90 クライアントタンパク質が、化合物投与によって腫瘍内で消失することが確認されることから抗腫瘍効果を示すメカニズムと考えられた。これらのことより、各種がん細胞において重要な標的分子がクライアントとして、細胞内での機能維持に Hsp90 を必要としており、Hsp90 阻害によって間接的にクライアントタンパク質を機能阻害することによって、ヒトがん移植マウスなどの薬理モデルにおいても抗腫瘍活性を示すことが明らかとなった(8)。

4. Hsp90 阻害薬 KW-2478 の研究開発

Hsp90 阻害薬が注目を集めるのに伴って、その臨床応用は Geldanamycin 誘導体で先行して進められた。Radicicol 同様、Geldanamycin そのものは反応性の高いキノン構造を含むことなどから動物への投与は困難であるが、17 位のメトキシ基が活性に必須でないことからこの部分の誘導体化が進められ、17-allylamino-17-demethoxy-geldanamycin (17AAG) をはじめとする Geldanamycin 誘導体の臨床試験が進められた(図

4)。しかしながら、これら Geldanamycin 誘導体は依然として親化合物の課題を残しており、溶解性の問題から臨床での静脈内投与製剤にも DMSO が含まれることや、この骨格由来の化合物に共通の毒性としての肝毒性などが臨床応用における投与限界の一要因となっていた。Geldanamycin, Radicicol などの天然物やその誘導体からの合成展開では、物性面や活性・毒性相関改良の限界があると考えられることから、Hsp90 への結合活性を指標にして、Geldanamycin 骨格とは全く異なり、かつ全合成可能な低分子化合物のスクリーニングに着手した。Radicicol 誘導体研究で蓄積した細胞系、薬理評価系による構造活性相関解析、さらには標的分子である Hsp90 タンパク質の結晶構造解析からの structure based drug design (SBDD) などの手法を組み合わせることによって、新規 Hsp90 阻害薬 KW-2478 を創製した(図 5)。本化合物は Hsp90 に対して強い結合活性を示すとともに、物性面(溶解性、安定性)でも優れた特性を持つ全合成低分子化合物である(9)。

上述のとおり、Hsp90 阻害薬がそのクライアントタンパク質を発現する種々の血液がん、固形がんに対して効果を示す可能性が示されてきたが、その中でも標的疾患の一つとして多発性骨髄腫 (multiple myeloma = MM) に着目した。MM は B 細胞異常によって引き起こされる疾患であるが、イムノグロブリン重鎖 (IgH) 発現プロモーター下流に種々の細胞増殖制御因子 (cyclinD, FGFR3, MAF 等) の遺伝子が転座する

図 4 第 1 世代 Hsp90 阻害薬として臨床試験が実施された Geldanamycin 誘導体

図5 新規 Hsp90 阻害薬として臨床試験が実施されている化合物

ことによる異常発現が要因の一つと考えられている。Bcr-Abl 転座に対して Hsp90 阻害薬が優れた効果を示すことを Radicicol 誘導体の研究を通じて明らかにしてきた経緯からも、がん特有の染色体転座によって生じる融合タンパク質や異常タンパク質発現は Hsp90 に依存性の高い“クライアント”と考えられる(10)。実際に、KW-2478 は種々の IgH 遺伝子転座を有するヒト MM 細胞に対して *in vitro*, *in vivo* マウスモデルでの抗腫瘍活性を示すことが明らかになった(9)。また冒頭で記載したとおり、近年がんのバイオロジーを考えていく上で、*in vitro* 培養やマウス皮下移植モデルでは再現しきれない要素として“腫瘍環境”が重視されている。実際の MM 病態においても、骨髄腫瘍環境を反映させたモデルでの薬剤の効果が臨床効果を予測する上で重要なファクターと考えられている。KW-2478 は蛍光タンパク質を発現させたヒト MM 細胞をマウス骨髄に移植する同所移植モデル（蛍光イメージングによって抗腫瘍活性を解析）においても、骨髄環境におけるがん細胞増殖を阻害する薬効が確認された(9)。

臨床開発を進めていく上では、併用薬剤の選択も重要な要素である。近年の MM 治療におけるキードラッ

グの一つとしてプロテオソーム阻害薬（bortezomib）が挙げられる。プロテオソーム阻害が MM で優れた効果を示すメカニズムに関しては諸説あるが、B 細胞由来のがん細胞が盛んにイムノグロブリンを産生することや、イムノグロブリンプロモーター転座等によるタンパク質発現亢進が生じていることから、正常細胞と比較して細胞全体で異常タンパク質発現によるストレスが高い状況にあると考えられる。プロテオソーム阻害薬はユビキチン化タンパク質の分解を抑制することから、さらに細胞内での不安定化タンパク質の蓄積が誘導されて細胞死が誘導されると考えられる。Hsp90 阻害薬は Hsp90 にシャペロンされたクライアントタンパク質の不安定化を増進させることからさらにタンパク質ストレスを増大させることにより、プロテオソーム阻害薬の効果を増強すると考えられる。実際に KW-2478 と bortezomib を用いた実験においても、*in vitro* でのアポトーシス誘導を伴う抗細胞作用や *in vivo* マウスモデルでの併用効果が確認された(11)。これら非臨床結果に基づいて、KW-2478 は MM ならびに B 細胞非ホジキンリンパ腫を含む B 細胞疾患での単剤 Phase I 試験を経て、現在 MM 患者を対象とした bortezomib 併用での Phase I / II 試験が進行中である。

5. おわりに

1999年に17AAG (Tanespimycin)の臨床試験が開始されて以降、いくつかのGeldanamycin誘導体の臨床試験が実施されてきた。その過程で、Her2陽性乳がん患者でのtrastuzumab併用やMM患者でのbortezomib併用においてHsp90阻害薬のコンセプトを示す結果が得られているが、当初期待された程の臨床成績を挙げられておらず、現在までに発売承認まで至ったHsp90阻害薬は無い(12)。しかしながら、これらは主として第一世代のHsp90阻害薬としてのGeldanamycin誘導体の結果であり、物性や化合物由来の毒性(肝毒性等)も限界要因になっている。これに対し、2000年代後半からKW-2478を含む非Geldanamycin骨格の新規合成低分子Hsp90阻害薬の臨床試験が進んでいる(図5)。

天然物由来の生理活性物質(Geldanamycin, Radicicol)は、抗がん薬標的としてのHsp90の発見、ならびに臨床応用に向けた抗がん活性の作用メカニズム解析や適合する患者セグメントの考え方など、抗がん薬としてのHsp90阻害薬のコンセプト検証に重要な役割を果たしてきた。さらに、これらの低分子プローブはHsp90のバイオロジーの進展に寄与しており、がん以外の分野でも非常に興味深い知見が得られている。ショウジョウバエやシロイヌナズナを使った研究では、Hsp90が様々な変異表現型のバッファー(通常は表現型の発現を抑制し、環境変化に伴って変異表現

型を発現する)として機能することが明らかになっている。また、細菌が抗生物質に対する耐性を獲得する際にもHsp90の機能が関与することから、多剤耐性に対する応用なども考えられている(13)。

正常細胞に様々な遺伝子変異や染色体異常が蓄積してがん化する過程や、分子標的薬を含む抗がん薬治療に対してがん細胞が様々な戦略(薬剤排出、変異、バイパス経路活性化)で耐性機能を獲得する過程を、生物進化や細菌多剤耐性と重なるイメージとしてとらえれば、これら生物の生存戦略をアシストしているHsp90をがん細胞が利用しているとも考えられ、新しいコンセプトの抗がん薬標的としての可能性を秘めているとも考えられる。今後のサイエンスのさらなる進展、ならびに今後報告されてくる第2、第3世代Hsp90阻害薬のPhase II、Phase III試験の結果に注目したい。

文 献

- 1) Hanahan D, et al. Cell. 2000;100:57-70.
- 2) Luo J, et al. Cell. 2009;136:823-837.
- 3) Hanahan D, et al. Cell. 2010;144:646-674.
- 4) Chin L, et al. Nat Med. 2011;17:297-303.
- 5) Ikuina Y, et al. J Med Chem. 2003;46:2534-2541.
- 6) Soga S, et al. J Biol Chem. 1998;273:822-828.
- 7) Schulte TW, et al. Cell Stress Chaperones. 1998;3:100-108.
- 8) Soga S, et al. Curr Cancer Drug Targets. 2003;3:359-369.
- 9) Nakashima T, et al. Clin Cancer Res. 2010;16:2792-2802.
- 10) Shiotsu Y, et al. Blood. 2000;96:2284-2291.
- 11) Ishii T, et al. Blood Cancer J. 2012;2. Online publication.
- 12) Soga S, et al. Curr Pharm Des. In press.
- 13) Lindquist S. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2009;74:103-108.