

## V-ATPase 阻害剤をリード化合物とする細胞死誘導型新規制癌剤の探索

著者	大熊 勝治
著者別表示	Ohkuma Shoji
雑誌名	平成12(2000)年度 科学研究費補助金 基盤研究(B) 研究成果報告書
巻	1998-2000
ページ	8p.
発行年	2001-03
URL	<a href="http://doi.org/10.24517/00050625">http://doi.org/10.24517/00050625</a>

# V-ATPase阻害剤をリード化合物とする 細胞死誘導型新規制癌剤の探索

研究課題番号：10557221

平成10～12年度 科学研究費補助金  
(基盤研究 (B) (2)) 研究成果報告書

平成13年 3月

研究代表者 大熊勝治  
(金沢大学薬学部教授)

金沢大学附属図書館



8000-96518-6

冊

V-ATPase阻害剤をリード化合物とする  
細胞死誘導型新規制癌剤の探索

(課題番号：10557221)

平成10～12年度 科学研究費補助金  
(基盤研究 (B) (2)) 研究成果報告書

平成13年 3月

研究代表者 大熊勝治  
(金沢大学薬学部教授)

平成10～12年度 科学研究費補助金  
(基盤研究 (B) (2)) 研究成果報告書

課題番号 10557221

研究課題 V-ATPase阻害剤をリード化合物とする細胞死誘導型新規制癌剤の探索

研究組織

研究代表者：大熊勝治 (金沢大学薬学部・教授)  
研究分担者：荒井國三 (金沢大学薬学部・講師)  
研究分担者：横山 謙 (金沢大学薬学部・助手)  
研究分担者：染井正徳 (金沢大学薬学部・教授)  
研究分担者：永井和夫 (東京工業大学生命理工学部・教授)  
研究分担者：太田哲生 (金沢大学医学部附属病院・助教授)  
研究分担者：畑中保丸 (富山医科薬科大学薬学部・教授)

研究経費	平成10年度	7000	千円
	平成11年度	3500	千円
	平成12年度	2500	千円
	計	13000	千円

## はじめに

近年、細胞増殖・癌化・分化・細胞死等に対する空胞系酸性顆粒の役割が注目されている。我々は、これまでに、空胞系酸性顆粒のpH維持に機能しているプロトン・ポンプ(V-ATPase)の選択的阻害剤を用いて、増殖等に対する酸性顆粒の寄与を検討してきた。先ず、V-ATPaseの選択的阻害剤(bafilomycin類、concanamycin類、destruxin類、等)が細胞増殖を阻害し、細胞死(アポトーシス)を引き起こすだけでなく、PC12細胞を神経様細胞に、M1細胞をマクロファージ様細胞に、それぞれ分化誘導することを見いだした。我々はまた、精製に成功したラット肝リソゾームのV-ATPaseの16kDaプロテオリピド(プロトン輸送路)が、浸潤性悪性膵癌において異常に高発現していること、そしてV-ATPaseの選択的阻害剤がヌードマウスに移植した膵癌細胞の増殖を強力に抑制することを発見した。このことは、様々なタイプのプロトンポンプを脱共役し、V-ATPaseのプロトン輸送のみを特異的に阻害する新たな脱共役剤prodigiosin類でも同様である。本化合物は所謂V-ATPaseの選択的阻害剤とは全く異なる構造であるにも関わらず、細胞の分化・死誘導作用を示した。一方、細胞内pH(リソソームを含む)は直接その生物作用発現に関与しないので、V-ATPase固有の機能と考えられる。

本研究においては、(1) V-ATPaseの選択的阻害剤と比較しつつ、prodigiosin類のプロトン輸送阻害機構を分子レベルで明らかにすること、(2) それらの増殖阻害、分化・死誘導の各機構を明らかにすること、(3) それらの特異性を明らかにすること、を目指した。

その結果、prodigiosin類は、(1) 塩化物イオン依存的且つ可逆的に顆粒内酸性化を強力に阻害し顆粒膨潤を強力に誘導するが、膜電位形成は阻害しない、 $H^+/Cl^-$ 共輸送体であることを、リソソーム、リポソーム、ミトコンドリア、胃粘膜液胞、等を用いて明らかにすることが出来た。又、その作用は、(2) トリブチルチンと似ているが、SH阻害作用はない(酸性でのみ塩化物イオンを有機溶媒層へ移行させ、顆粒内部に取り込み、内部を酸性化させる)点で異なっていた。さらに、prodigiosin類は、(3) 塩素イオン要求性の豚胃粘膜小胞の内部へのプロトン輸送活性を、オメガプラゾールと異なり $K^+$ -ATPase活性を阻害することなく、強力( $I_{50} = 40-200$  pmol/mg 蛋白)かつ可逆的に阻害することも見い出した。

また、V-ATPaseの選択的阻害剤は、PC12細胞の神経突起伸展(NOG)を誘導するが、同じ様に内外のpH差を解消する塩化アンモニウムによって影響を受けないことから、pHは直接NOG誘導に関係しないと結論された。ところが、 $H^+/Cl^-$ 共輸送体であるprodigiosin類やBE-18591もNOGを誘導することを発見した。そこで、両プロトンポンプ阻害剤によるNOG誘導におけるpHの関与について再検討を試みた。その結果、NOG・アポトーシス誘導は、bafilomycin類、concanamycin類、prodigiosin類共に、新たなRNA及び蛋白質合成を必要とし、LiCl(MAPキナーゼ阻害剤)やオカダ酸(セリン・スレオニンホスファターゼ阻害剤)に感受性であるが、K-252a(Cキナーゼ阻害剤)やH-89

(Aキナーゼ阻害剤)には非感受性で、ST-638(チロシンキナーゼ阻害剤)で阻害される等の点で似ているが、アポトーシスはW7(カルモジュリン阻害剤)、ONO-RS-082(ホスホリパーゼA<sub>2</sub>阻害剤)、及びバナジン酸(チロシンホスファターゼ阻害剤)、等に非感受性である点でNOGと異なっていることが示唆された。また、tambjamineグループのBE-18591もH<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>共輸送活性を示し、胃粘膜プロトンポンプ阻害、破骨細胞分化の阻害、免疫細胞の増殖抑制、更にはNOG誘導やアポトーシス誘導作用を示した。しかしながら、同じくH<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>共輸送活性を示すtetrapyrroleは、増殖阻害や細胞死誘導作用はあるものの、NOG作用は示さなかった。別のV-ATPase阻害剤であるdestruxin EのみNOG活性を示し、destruxin Bは活性を殆ど示さなかった。以上の事より、pH変化はV-ATPase阻害剤によるNOGやアポトーシス誘導の直接の引き金にはなっていないと結論した。

なお、bafilomycin類は、V-ATPase遺伝子(特に、Mediatophoreやgap junctionとしても機能すると言われている16 kDa)の発現が高いヒト膵癌細胞や大腸癌細胞にアポトーシスを誘導し細胞増殖を阻害するが、培養ヒト伏在静脈由来筋線維芽細胞MyofibroblastもV-ATPase遺伝子の発現が高く、それに対してbafilomycin類は肥厚を抑制しアポトーシスを誘導し細胞増殖を阻害することが判明した。臨床応用上極めて重大な発見であり、動脈硬化等における研究の伸展が待ち望まれる。なお、bafilomycin類やprodigiosin類のアポトーシス誘導作用機構にも、細胞内pHは直接関係しないことが分かっているが、その詳細はなお現在検討を続行中である。活性化ランソプラゾールlansoprazoleやNEM(N-ethylmaleimide)が同様な作用を有していることを見い出している。特にlansoprazoleは臨床で既に用いられているので可能性は高いと考えられる。

V-ATPaseのプロトンポンプ輸送機構については、高度好熱菌の真性細菌Eubacteriumである*Thermus thermophilus*を用いて、その回転を分子レベルで見ることを目指している。現在、*Thermus thermophilus*のV-ATPase(不活性なADP型を作り易い)もATPを合成すること、その遺伝子構成をはっきりさせるところまで行っている。*Thermus thermophilus*のV-ATPase遺伝子は、真核細胞と異なりoperon構造を作っているので、研究の進展が期待される。また、アフィニティープローブ作成の目処が立ってきた(V-ATPase阻害活性のあるジアジリン・ピオチン・結合concanamycinの作成に成功した)ので、bafilomycin類やconcanamycin類、更にはprodigiosin類等の作用解明が期待できそうである。

なお、その他に、(1) imipramineを材料にして、塩基性薬物の内部酸性pH依存性の濃縮や、(2) リソソームのARF依存性崩壊を見い出し、その機構の新しい理論を打ち立てるのに成功しているが、V-ATPaseの選択的阻害剤の作用の特異性を明らかにする所までは、もう少しの所までは来ているが、出来ていないように思う。

平成13年3月

金沢大学薬学部

教授 大熊勝治

## 研究発表

### ア 学会誌等

#### 学術論文

1. Matsuya, H., Okamoto, M., Ochi, T., Nishikawa A., Shimizui, S., Kataoka T., Nagai, K., Wasserman, H.H. and Ohkuma, S., Reversible and potent uncoupling of hog gastric ( $H^+K^+$ )-ATPase by prodigiosins. *Biochem. Pharmacol.* 60, 1855-1863 (2000).
2. Ohtani, H., Yamamura, T., Nakao, Y., Hattori, U., Fujii, H., Ninomiya, H., Kido, M., Kawaguchi, H., Osako, M., Imamura, H., Ohta, T., and Ohkuma, S., Vacuolar  $H^+$ -ATPase plays a crucial role in growth and phenotypic modulation of myofibroblasts in cultured human saphenous vein. *Circulation* 102 [suppl III], III239-274 (2000).
3. Ishizaki, J., Yokogawa, K., Ichimura, F., and Ohkuma, S., Uptake of imipramine in rat liver lysosomes in vitro and its inhibition by basic drugs. *J. Pharmacol. Exptl. Therapeut.* 294, 1088-1098 (2000).
4. Yokoyama, K., Ohkuma, S., Taguchi, H., Yasunaga, T., Wakabayashi, T., and Yoshida, M., V-type ATPase/synthase from *Thermus thermophilus* - subunit structure and operon-. *J. Biol. Chem.* 275, 13955-13961 (2000).
5. Ohtani, H., Ohmiya, H., Fujii, H., Ninomiya, H., Kido, M., Kawaguchi, H., Osako, M., Imamura, H., Ohta, T., and Ohkuma, S., Potential role of vacuolar  $H^+$ -ATPase in neointimal formation in cultured human saphenous vein. *J. Thorac. Cardiovasc. Sur.* 119, 998-1007 (2000).
6. Elnemr, A, Ohta, T., Yachie, A., Fushida, S., Ninomiya, I., Nishimura, G.-I., Yamamoto, M., Ohkuma, S., and Miwa, K., N-ethylmaleimide-enhanced phosphatidylserine externalization of human pancreatic cancer cells and immediate phosphatidylserine-mediated phagocytosis by macrophages. *Intern. J. Oncol.* 16, 1111-1116 (1999).
7. Ohta, T., Tajima, H., Yachie, A., Yokoyama, K., Elnemr, A., Fushida, S., Kitagawa, H., Kayahara, M., Nishimura, Ge., Miwa, K., Yamamoto, M., Terada, T., and Ohkuma, S., Activated lansoprazole inhibits cancer cell adhesion to extracellular matrix components. *Intern. J. Oncol.* 359, 53-58 (1999).
8. Sato, T., Konno, H., Tanaka, Y., Kataoka, T., Nagai, K., Wasserman, H.H., and Ohkuma, S., Prodigiosins as a new group of  $H^+/Cl^-$  symporters that uncouple proton translocators. *J. Biol. Chem.* 273, 21455-21462 (1998).
9. Konno, H., Matsuya, H., Okamoto, M., Sato, T., Tanaka, Y., Yokoyama, K., Kataoka, T., Nagai, K., Wasserman, H.H., and Ohkuma, S., Prodigiosins uncouple mitochondrial and bacterial F-ATPases: evidence for their  $H^+/Cl^-$  symport activity. *J. Biochem. (Tokyo)* 124, 547-556 (1998).
10. Ohkuma, S., Sato, T., Okamoto, M., Matsuya, H., Arai, K., Kataoka, T., Nagai,

- K., and Wasserman, H.H., Prodigiosins uncouple lysosomal vacuolar-type ATPase through promotion of  $H^+/Cl^-$  symport. *Biochem. J.* 334, 731-741 (1998).
11. Ohta, T., Arakawa, H., Futagami, F., Tajima, H., Fushida, S., Kitagawa, H., Kayahara, M., Nagakawa, T., Miyazaki, I., Kurashima, K., Numata, M., and Ohkuma, S., Bafilomycin A<sub>1</sub> induces apoptosis in human pancreatic cancer cell line capan-1. *J. Pathol.* 185, 324-330 (1998).
  12. Israël, M., Lesbats, B., Tomasi, M., and Ohkuma, S., Enhanced acetylcholine release from cells that have more 15-kDa proteolipid in their membrane, a constituent V-ATPase, and mediators. *J. Neurochem.* 71, 630-635 (1998).
  13. Yokoyama, K., Muneyuki, E., Amano, T., Mizutani, S., Yoshida, M., Ishida, M., and Ohkuma, S., V-ATPase of *Thermus thermophilus* is inactivated during ATP hydrolysis but can synthesize ATP. *J. Biol. Chem.* 273, 20504-20510 (1998).
  14. Ishizaki, J., Yokogawa, K., Nakashima, E., Ohkuma, S., and Ichimura, F., Uptake of basic drugs into rat lung granule fraction in vitro. *Biol. Pharm. Bull.* 21 858-861 (1998).
  15. Ishizaki, J., Yokogawa, K., Nakashima, E., Ohkuma, S., Ichimura, F., Influence of ammonium chloride on tissue distribution of anticholinergic drugs in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 50, 761-766 (1998).

## イ 口頭発表

### 海外および国際学会発表状況

1. Yokoyama, K., Yasunaga, T., Wakabayashi, T., and Ohkuma, S.  
V-Type ATPase/synthase from *Thermus thermophilus*  
11th European Bioenergetics Conference, University of Sussex, UK., 2000. 9.

### 国内学会

1. 荒井 國三, 大熊 勝治, 松川 通, 加藤 聖, 今中 常雄  
ペルオキシソームのオートファジーによる分解  
第73回日本生化学会大会 (横浜)、2000.10.
2. 横山 謙, 大熊勝治, 吉田賢右  
V-ATPaseの回転について  
第73回日本生化学会大会 (横浜)、2000.10.
3. 荒井國三, 大熊勝治, 清水栄, 松川 通, 加藤 聖  
CHO細胞におけるペルオキシソームの誘導と分解  
日本薬学会第120回 (岐阜)、2000.3.
4. 谷垣佳司, 西川あさ子, 濱口景子, 三原裕美, 大熊勝治  
V-ATPase阻害剤によるPC12細胞の分化・細胞死とオートファジー  
日本薬学会第120回 (岐阜)、2000.3.
5. 西川あさ子, 谷垣佳司, 佐藤友彦, 大熊勝治



新規H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporterプロジギオシン類による神経突起伸展作用  
日本薬学会第119回（徳島）、1999.3.

6. 越智隆洋、西川あさ子、谷垣佳司、佐藤友彦、大熊勝治、永井和夫、川島博行  
新規H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> symporter : BE-18591の多彩な生物活性  
日本薬学会第119年会（徳島）、1999.3.
7. 横山 謙、宗行英明、天野豊巳、大熊勝治  
*Thermus thermophilus* V<sub>1</sub>-ATPaseの不活性化とATP合成  
第71回日本生化学会大会（東京）、1998.10.

## ウ 出版物

1. 大熊勝治  
化学と生物 実験ライン43 細胞生物学実験法－I．細胞培養法  
廣川書店  
平成11年6月30日