

博士論文

抗悪性腫瘍薬ベンダムスチンによる **STAT3** 阻害作用

Inhibition of STAT3 by anticancer drug bendamustine

本論文は、静岡県立大学大学院薬学研究科博士論文である。

2017 年 9 月

September 2017

静岡県立大学大学院 薬学研究科製薬学専攻 博士後期課程

創薬探索センター

岩本 一徳

Kazunori Iwamoto

目次

序論.....	1
第1章 無細胞系での BENDA による STAT3-SH2 ドメイン阻害作用の解析.....	12
1-1 実験材料及び実験方法.....	12
1-1-1 実験材料.....	12
1-1-2 発現プラスミドの構築.....	13
1-1-3 組換えビオチン化タンパク質の発現と精製.....	15
1-1-4 変異型 STAT3 の発現と精製.....	16
1-1-5 ALPHA Screen Assay による阻害試験.....	18
1-1-6 チオール反応性蛍光色素を用いた阻害試験.....	18
1-1-7 ALPHA Screen Assay による組換え STAT3-SH2 結合阻害試験.....	19
1-2 実験結果.....	19
1-2-1 BENDA による STAT3-SH2 結合阻害活性.....	19
1-2-2 BENDA と STAT3 のシステインを介した相互作用.....	21
1-3 考察.....	25
1-4 小括.....	26
第2章 BENDA による細胞内 STAT3 阻害作用の解析.....	27
2-1 実験材料及び実験方法.....	27
2-1-1 実験材料.....	27
2-1-2 細胞培養.....	29
2-1-3 競合条件において Bio-BENDA を用いた免疫沈降アッセイ.....	29
2-1-4 蛍光共鳴エネルギー移動法を用いた二量体化阻害試験.....	30

2-1-5	転写因子 ELISA 法を用いた STAT3 のコンセンサス配列への結合阻害試験	30
2-1-6	クロマチン免疫沈降法を用いた BENDA による c-myc 遺伝子プロモーター結合阻害試験.....	31
2-1-7	定量 PCR 法を用いた BENDA による STAT3 標的遺伝子の発現抑制試験	33
2-1-8	BENDA による STAT3 標的遺伝子のタンパク質発現抑制試験	34
2-1-9	STAT3 siRNA を用いたがん細胞増殖抑制試験.....	35
2-1-10	BENDA によるリン酸化 STAT3 高発現がん細胞に対する選択的増殖阻害試験.....	35
2-1-11	Epirubicin、Camptothecin、Taxol、BENDA 及び HP2 を用いたがん細胞増殖抑制試験.....	36
2-1-12	データ解析.....	36
2-2	実験結果.....	37
2-2-1	Bio-BENDA と細胞内 STAT3 の相互作用.....	37
2-2-2	蛍光共鳴エネルギー移動法を用いた BENDA による細胞内 STAT3 二量体化阻害活性	38
2-2-3	BENDA による STAT3 のコンセンサス配列への結合阻害活性	39
2-2-4	クロマチン免疫沈降法を用いた BENDA による STAT3 の c-myc 遺伝子プロモーターへの結合阻害活性	40
2-2-5	BENDA による c-myc の発現抑制.....	40
2-2-6	定量 PCR 法を用いた BENDA による標的遺伝子の発現抑制	42
2-2-7	STAT3 siRNA を用いた STAT3 依存的な細胞増殖の解析	43
2-2-8	BENDA と HP2 によるリン酸化 STAT3 高発現がん細胞株に対する増殖阻害活性	45
2-3	考察.....	47
2-4	小括.....	50

総括.....	51
謝辞.....	53
参考文献.....	54

略語

AF488 maleimide : Alexa Fluor 488 C5 maleimide

Alpha : amplified luminescence proximity homogeneous assay

BENDA : bendamustine

Bio-BENDA : biotinylated BENDA

BM1EE : bendamustine ethyl ester

β -ME : β -mercaptoethanol

CBB : coomassie brilliant blue

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

CFP : cyan fluorescent protein

ChIP : chromatin immunoprecipitation

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

DMSO : dimethyl sulfoxide

ECL : enhanced chemiluminescence

EDTA : ethylenediamine-*N, N, N', N'*- tetraacetic acid

EGF : epidermal growth factor

EGFR : epidermal growth factor receptor

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

FBS : fetal bovine serum

FRET : fluorescence resonance energy transfer

FITC : fluorescein isothiocyanate

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Grb2 : growth factor receptor-bound protein 2

HEPES : *N*-(2-hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid)

HIF-1 : hypoxia-inducible factor 1

HEK293 : human embryonic kidney 293

HP2 : dihydroxy bendamustine

HRP : horseradish peroxidase

HTS : high-throughput screening

IC₅₀ : 50% inhibitory concentration

IP : immunoprecipitation

IFN- γ : interferon- γ
IL-6 : interleukin-6
IPTG : isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JAK : janus kinase
NE : nuclear extract
NP-40 : octylphenoxypolyethoxyethanol (nonidet P-40)
OD : optical density
PBS : phosphate buffered saline
PCR : polymerase chain reaction
PMSF : phenylmethylsulfonyl fluoride
PTK : protein tyrosine kinase
PVDF : polyvinylidene difluoride (immobilon-P transfer membrane)
pY : phosphorylated tyrosine
RT : reaction time
SD : standard deviation
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
S/N : signal-to-noise
SH2 : src-homology 2
siRNA : short interfering RNA
STAT : signal transducer and activator of transcription
TBS : tris buffered saline
TBS-T : tris-buffered saline containing Tween-20
VEGF : vascular endothelial growth factor
WB : western blotting
YFP : yellow fluorescent protein

序論

Signal transducer and activator of transcription (STAT) ファミリーは、細胞質に局在し、種々のサイトカインや成長因子のシグナルを核内に伝達する転写因子として同定され、細胞の分化、増殖に関連する遺伝子の転写を誘導する。STAT ファミリーは様々な生物学的機能を有しているが、特に STAT3 や STAT5 などは様々ながん細胞で活性化していることが報告されている [1-4]。Janus kinase (JAK) などのタンパク質チロシンキナーゼ (protein tyrosine kinase、PTK) を介するシグナル伝達経路は細胞の動態や機能の制御に重要な役割を担っており、きわめて広範なシグナル伝達経路に関与する。そのシグナル伝達経路の中で、JAK-STAT シグナル伝達経路は細胞の分化や増殖と密接に関係があると報告されている [5-7]。JAK-STAT シグナル伝達経路では、サイトカインや成長因子の刺激により活性化された JAK などのチロシンキナーゼが、細胞質に局在する STAT のチロシン残基をリン酸化する。チロシン残基のリン酸化は STAT ファミリーに保存されている Src homology 2 (SH2) ドメインとリン酸化チロシン部位との相互作用を促し、STAT の二量体が形成される。二量体化した STAT は核内に移行した後、DNA の特異的なエンハンサー配列に結合し、増殖や分化などに関連する遺伝子の転写を誘導する (Figure 1A)。

哺乳類の STAT ファミリーには STAT1、STAT2、STAT3、STAT4、STAT5a、STAT5b、STAT6 の 7 種類が知られている (Figure 1B)。これらサブファミリーは、細胞の分化、増殖、血管新生、アポトーシスなど多様な生物学的機能を有する。その中でも 1994 年に JE Darnell Jr らによって報告された STAT3 シグナル伝達や転写の活性化を担い、epidermal growth factor (EGF) と interleukin-6 (IL-6) に反応性の DNA 結合タンパク質であり、多くのがん種において恒常的に活性化する事が報告されている [8]。がんの種類によって活性化している STAT は異なっているが、多くの STAT シグナルが多発性骨髄腫、白血病、乳がん、前立線がん、頭頸部扁平上皮がんなど様々な造血性細胞腫瘍や固形腫瘍で恒常的に活性化している。取り分け、大型顆粒リンパ球白血病、皮膚 T 細胞性リンパ腫、黒色腫などのがんにおいては STAT3 が恒常的に活性化していることが報告されている (Table 1) [10-11]。このように STAT3 は種々の腫瘍に恒常的に発現しており、さらに STAT3 の活性化が予後不良の重要な因子の 1 つとして報告されている [12]。STAT3 は細胞の分化、増殖 [13-14]、血管形成 [15-16]、アポトーシス [17-18]、炎症等を活性化することが報告されている。JAK-STAT シグナル伝達経路では、interleukin-6 (IL-6) 等のサイトカイン、EGF や platelet-derived growth factor (PDGF) 等の成長因子と受容体が結合すると、受容体のチロシン残基

のリン酸化により JAK2、Src チロシンキナーゼが活性化され、STAT3 (Tyr705) がリン酸化される [19]。リン酸化 STAT3 は、SH2 ドメインを介した二量体を形成し核内に移行し、その後 STAT3 の DNA binding domain と DNA の特異的なエンハンサー配列に結合し、転写が誘導され、c-myc、cyclin D1、survivin、Bcl-xL、VEGF 等のがん細胞の増殖、生存、血管新生に重要な遺伝子群の転写が活性化されることが報告されている [1、4、5、20]。実際に、STAT3 に対して阻害する性質を有するドミナントネガティブ変異体である STAT3 β がメラノーマ細胞の増殖を抑制することや、乳がん細胞を移植したマウスで STAT3 特異的 siRNA が腫瘍増殖を抑制すること、及び STAT3 結合配列を有する二本鎖 DNA のデコイオリゴが頭頸部がん細胞の増殖を抑制することなどによって [21-23]、STAT3 シグナル経路の抑制によりがん細胞の増殖が抑えられることが明らかになっている。一方、STAT3 シグナル阻害と抗がん剤との併用による相乗作用についても報告があり、シスプラチンと JAK2 阻害剤であるルキソリチニブを併用することで、シスプラチンに耐性をもつ非小細胞肺癌 (Non-small cell lung cancer (NSCLC)) の増殖を抑制できるとの報告がされている [24]。また、JAK-STAT シグナル伝達経路で STAT3 の下流に位置する Bcl-2 に対しても抗がん剤に対する耐性との関連性が示唆されている [25]。また、STAT3 と免疫逃避機構との関係も注目されている。2005 年に M. Kortylewski らは、STAT3 遺伝子をノックアウトしたマウスを用いることで、STAT3 の欠損により腫瘍組織で制御性 T 細胞が減少し NK 細胞や好中球など抗腫瘍免疫に関わる細胞群が活性化すること、及びそれに伴い顕著に腫瘍増殖性が抑制されることを報告した [26]。また、がん細胞で恒常的に活性化した STAT3 は、がん細胞から VEGF や IL-6、IL-10 などの産生を促進し、腫瘍組織中に浸潤している免疫細胞のがん細胞に対する免疫作用を抑制することも報告されている [27-30]。

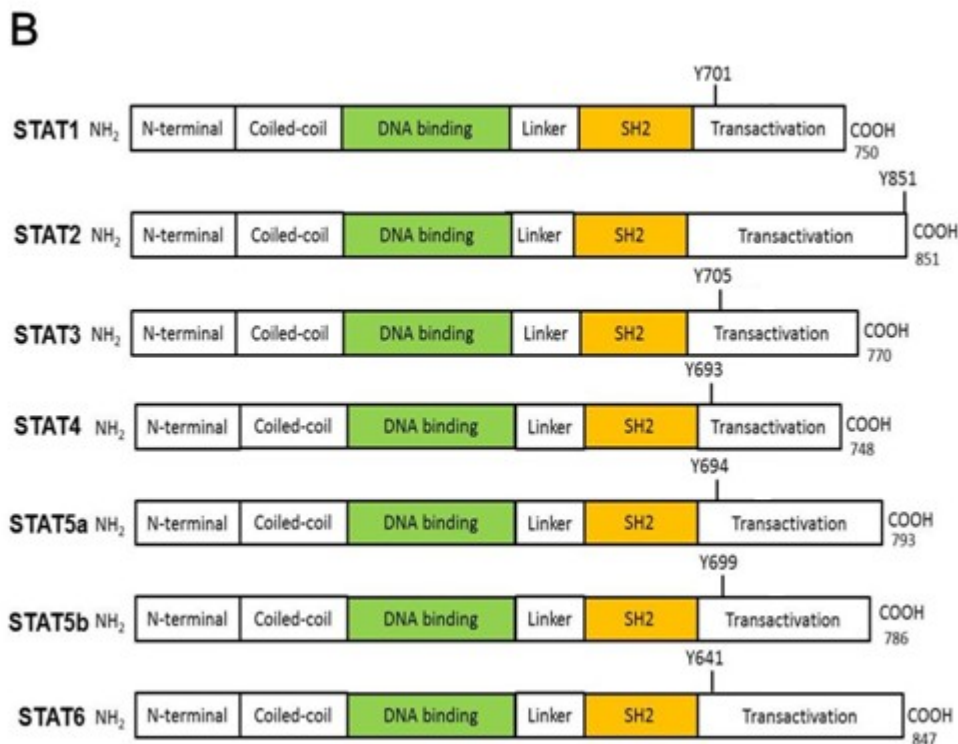
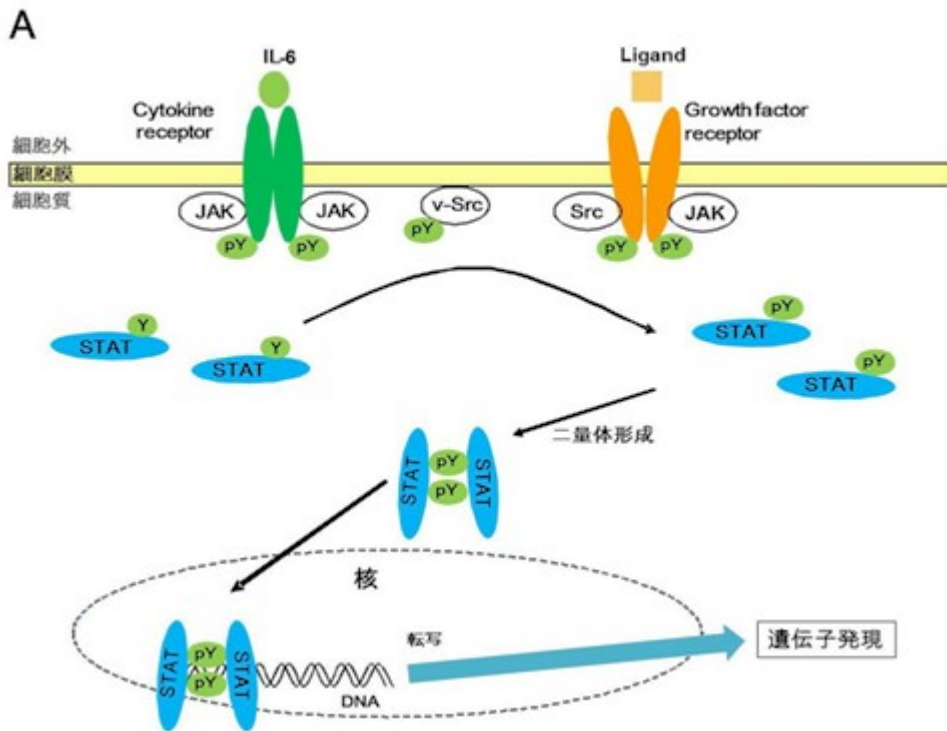


Figure 1. STAT ファミリーの構造と JAK-STAT シグナル経路の概念図

(A) IL-6 等のサイトカイン、及び EGF や PDGF 等の成長因子が細胞表面の各受容体に結合すると、受容体のチロシン残基がリン酸化され JAK 及び Src チロシンキナーゼが活性化される。STAT のチロシン残基 (STAT3 は Tyr705) はこれらの活性化したチロシンキナーゼによりリン酸化され、STAT の C 末端に存在する SH2 ドメインを介して二量体を形成する。二量体化した STAT は核内に移行し、DNA 上の特異的エンハンサー配列に結合し、分化や増殖に関係した遺伝子の転写を誘導する。(B) STAT ファミリーの構造。

Table 1. がん細胞における STAT シグナル経路の活性化

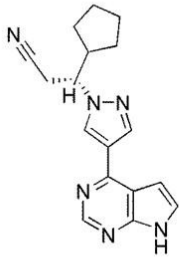
Tumour Type	Activated STAT
<i>Blood tumours</i>	
Multiple myeloma	STAT1, STAT3 , STAT5
<u>Leukaemias</u> :	
HTLV-1-dependent	STAT3 , STAT5
Erythroleukemia	STAT1, STAT3
Acute myelogenous leukaemia (AML)	STAT1, STAT3 , STAT5
Chronic myelogenous leukaemia (CML)	STAT5
Megakaryocytic leukemia	STAT1, STAT3 , STAT5
Large granular lymphocyte leukaemia (LGL)	STAT3
<u>Lymphomas</u> :	
Anaplastic large T cell lymphoma	STAT3
Sezary syndrome	STAT3 , STAT5
EBV-related Burkitt's lymphoma	STAT3
HSV Saimiri-dependent (T cell)	STAT3
Cutaneous T-cell lymphoma	STAT3
Non-Hodgikins lymphoma (NHL)	STAT3
Mycosis fungoides	STAT3
<i>Solid tumours</i>	
Breast cancer	STAT1, STAT3 , STAT5
Brain cancer	STAT3 , STAT5
Head and neck cancer	STAT1, STAT3 , STAT5
Melanoma	STAT3
Ovarian cancer	STAT3
Lung cancer	STAT3
Pancreatic cancer	STAT3
Prostate cancer	STAT3

上述したように転写制御因子 **STAT3** の阻害は、腫瘍及びその周辺環境に作用し抗腫瘍効果を導く事が示されている。この様な **STAT3** の活性化を阻害する方法は、4つ考えられる (**Figure 2**)。1つ目は、**STAT3** の **Tyr705** のリン酸化の上流チロシンキナーゼである **JAK** 等を阻害する方法である。**STAT3** をはじめとした **STAT** ファミリーは、**JAK1**、**JAK2**、**JAK3** 及び **TYK2** の4つから構成される **JAK** ファミリーによりリン酸化される。**JAK2** は様々なサイトカインや増殖因子によって活性化される。**JAK2** の活性化は **STAT3** のリン酸化を誘導し、その結果、**STAT3** の2量体形成を引き起こす。低分子 **JAK2** 阻害剤 **Ruxolitinib** は **STAT3** 活性を阻害することで、がん細胞のアポトーシスを誘導する [31]。また、**JAK** 阻害剤としては **STAT3** のリン酸化を抑制する **AZD1480** やリン酸化 **STAT3** から脱リン酸化をする **Morin** などが報告されている [32-34]。その他、**Src** など他のチロシンキナーゼも **STAT3** の活性化に関与すると報告されており、実際、**Src** 阻害剤である **Dasatinib** は、**STAT3** のリン酸化阻害能を有している [35-39]。2つ目としては、**STAT3** の二量体化を阻害する方法である。**STAT3** に直接作用して二量体化を阻害するタイプの薬剤はチロシンキナーゼに対する阻害剤と比較してより **JAK-STAT** シグナル伝達経路の下流に位置するため他の経路への影響が少なく副作用の低減が期待できると考えられる。また、**Src**、**Abl** など他のチロシンキナーゼによる **STAT3** の活性化機構にも対応できる利点もある。**STAT3** の **SH2** ドメインを標的として設計されたペプチド性 **STAT3** 阻害剤は、**STAT3** のリン酸化チロシン残基に高い親和性を持つ **SH2-like peptide** や **STAT3-SH2** ドメインに特異的に結合する **small peptide mimetics** があり、**STAT3** の転写活性を抑制することが報告されている [40-41]。さらに、**H. Song** らが報告したバーチャルスクリーニングを用いて見出された **STA-21**、**T. Berg** らがスクリーニングから見出した **Stattic**、その他 **S3I-201**、**Eriocalyxin B**、**Cryptotanshinone** などの低分子化合物は、**STAT3** の **SH2** ドメインを標的として **STAT3** の機能を阻害することが報告されている [42-48]。さらに、当研究室でも **5, 15-diphenylporphyrin** が二量体形成に重要な **STAT3** の **SH2** ドメインを介する結合（以降、**STAT3-SH2** 結合と称する）を阻害することで **STAT3** の二量体化を阻害することを報告した [49]。3つ目の方法としては、**STAT3** の核内移行の阻害がある。インシリコ創薬によって見いだされた **LY5** は、**STAT3** の核内移行を阻害することが報告されている [50]。4つ目の方法としては、**DNA** 結合阻害がある。**DNA** 結合阻害剤である **platinum (IV) tetrachloride** は非競合的に **STAT3** の **DNA** 結合を阻害することが報告されている。**Galiellalactone**、

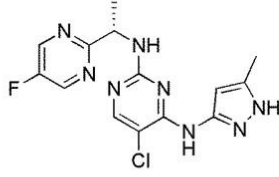
CPA-1 や CPA-7 も STAT3 の DNA 結合を阻害し、がん細胞の増殖抑制やアポトーシス促進を誘導することが報告されている [51-52]。

当研究室ではアルファスクリーン技術を基盤として、STAT3 に直接作用する二量体化阻害物質を同定する独自の High-throughput screening (HTS) 系を確立した。本アッセイ系では、無細胞系で STAT3 の SH2 ドメインとリン酸化チロシン含有ペプチドとの相互作用に対する低分子化合物の拮抗作用を測定することができる。このスクリーニング系を用いて化合物ライブラリーのスクリーニングを実施し、これまでに 5, 15-diphenylporphyrin や 2-chloro-1, 4-naphthalenedione 誘導体である PVCB0308 を選択的な STAT3-SH2 アンタゴニストとして同定した [49、53]。一方、当研究室とファルマデザイン社と共同で、バーチャルスクリーニングと上記 HTS 系との組合せにより、N-[2-(1,3,4-oxadiazolyl)]-4-quinolinecarboxamide 誘導体である STX-0119 を STAT3-SH2 アンタゴニストとして新たに見出した。STX-0119 は、c-Myc プロモーターのコンセンサス配列に対する STAT3 の結合を阻害すること、STAT3 により転写促進されるタンパク質 (c-Myc や Survivin など) の発現を抑制すること、STAT3 が活性化されているがん細胞株 (MDA-MB-468 細胞) における選択的なアポトーシスを惹起することなどを明らかとしてきた [54]。その後の解析で、STX-0119 はヒトリンパ腫、テモゾロミド耐性ヒト神経膠芽腫などを移植したヌードマウスモデルにおいて、経口投与で有意な抗腫瘍活性を示すことや [55-56]、再発性神経膠芽腫から得たがん幹細胞においても増殖阻害を示すこと、STX-0119 とラパマイシンを併用することでテモゾロミド耐性ヒト神経膠芽腫細胞に対し増殖阻害の効果が単剤よりもより高くなることが明らかとなった [57-58]。

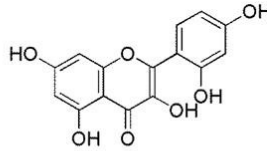
JAK阻害剤



Ruxolitinib

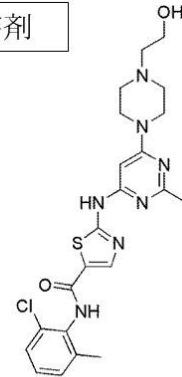


AZD1480



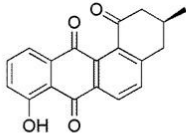
Morin

Src阻害剤

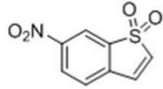


Dasatinib

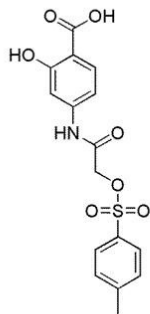
STAT3二量体化阻害剤



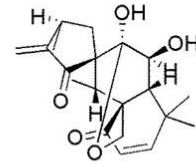
STA-21



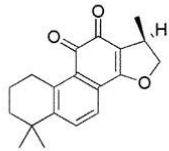
Stattic



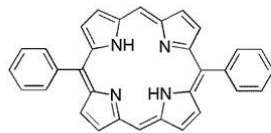
S3I-201



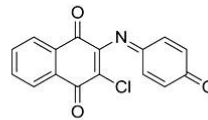
Eriocalyxin B



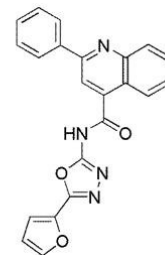
Cryptotanshinone



5,15-diphenylporphyrin

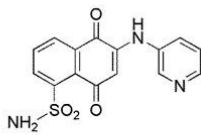


PVCB0308



STX-0119

STAT3核内移行阻害剤

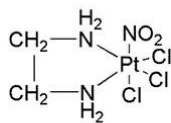


LY5

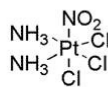
DNA結合阻害剤



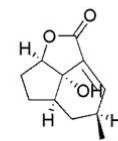
platinum (IV) tetrachloride



CPA-1



CPA-7

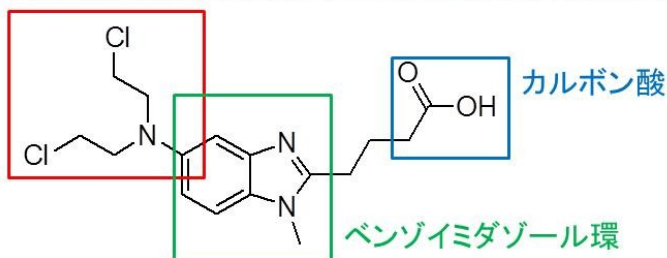


Galiellalactone

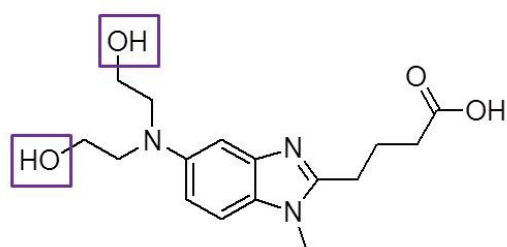
Figure 2. STAT3 阻害が報告されている低分子化合物の構造

当研究室では前述した阻害物質以外にも既存医薬品ライブラリーを用いたスクリーニングによってベンダムスチン (BENDA) をヒット化合物として同定した。BENDA は、1960 年代初めに旧東ドイツで合成され、1971 年より同国内で血液がん及び乳がんなどの固形腫瘍に対して用いられてきた薬剤である。東西ドイツ統一後は、適応症についての再評価並びに欧州諸国への承認申請のため非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫及び慢性リンパ性白血病を対象とした臨床試験が実施され、2005 年にドイツにおいて非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫の適応症で再承認、2008 年には慢性リンパ性白血病が追加申請された。2007 年にはドイツを参照国として非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫及び慢性リンパ性白血病を適応症とした承認申請がなされ、各国で順次承認された。米国では 2008 年 3 月に慢性リンパ性白血病、2008 年 10 月には非ホジキンリンパ腫の適応症が承認された。本邦では、2009 年 10 月には、「再発又は難治性の低悪性度 B 細胞性非ホジキンリンパ腫又はマントル細胞リンパ腫」を適応症として承認申請され、2010 年 10 月に承認された。BENDA は、適応症として非ホジキンリンパ腫 [59-60]、慢性リンパ性白血病 [61]、多発性骨髄腫 [61-63] の治療に使用されている。また、転移性乳癌患者の無増悪生存期間を延長すること [64]、小細胞肺癌患者に効果があること [65-66] など様々ながんに対して効果があることが報告されている。BENDA は、N、N-ビス (2-クロロエチル) メチルアミン (HN-2) 構造、プリンアナログ様化学構造を持つベンゾイミダゾール環、水溶性の向上をもたらすカルボン酸の構造を有している [67]。HN-2 構造はナイトロジェンマスタード系 DNA アルキル化剤と共通の構造でありアルキル化作用を有している。一方、ベンゾイミダゾール環は代謝拮抗作用 [68-69] を示し、当構造を持つことが、BENDA が従来のナイトロジェンマスタード構造を持つ薬剤との違いである [70]。

HN-2構造 (N、N-ビス (2-クロロエチル) メチルアミン)



BENDA



Dihydroxy BENDA (HP2)

Figure 3. BENDA と HP2 の構造

BENDA 代謝の主要な経路は、ジヒドロキシベンダムスチン (HP2) への加水分解であり、HP2 は不活性型の代謝産物であることが知られている (Figure 3) [71]。BENDA は、他のアルキル化剤と同様に DNA 架橋剤である。しかし、BENDA が引き起こす DNA 損傷は、シクロホスファミド等が引き起こす作用より広範囲で、持続性がある [72]。がん細胞株を用いた実験系で、BENDA 単剤 [73]、または、他の抗がん剤との併用 [74] においてアポトーシスを引き起こすことが報告されている。近年、米国国立がん研究所において、BENDA の細胞増殖抑制作用についてヒト腫瘍細胞株パネル (55 種) を用いて活性プロファイルを他の抗悪性腫瘍剤 (全 175 種) と比較した COMPARE 解析が行われ、他のアルキル化剤とは異なる感受性プロファイルを示すことや、通常とは異なる DNA 損傷ストレスレスポンスを惹起することが報告された [75]。しかし、BENDA について DNA アルキル化作用以外の作用機序に関する詳細な解析は行われておらず、新たな標的分子や感受性因子の候補もこれまでに報告がない。

以上の背景を踏まえ、本論文ではリンパ腫など多くのがんで恒常的な活性化が報告されている転写制御因子 STAT3 に着目して、BENDA による STAT3 阻害作用の詳細を解明することを目的とした。その結果、BENDA は細胞内 STAT3 に直接作用して、その機能を阻害すること、及び STAT3 が恒常的に活性化しているがん細胞株に対して選択的に細胞増殖阻害を示すことが明らかにした。

本論

第 1 章 無細胞系での BENDA による STAT3-SH2 ドメイン阻害作用の解析

STAT3 の SH2 ドメインは、STAT3 二量体形成をはじめとするタンパク質相互作用において重要なドメインである。当研究室では、STAT3-SH2 とリン酸化チロシン含有ペプチドとの相互作用の阻害を指標とした STAT3 阻害剤スクリーニングによって、BENDA をヒット化合物として同定した。本章では BENDA による STAT3-SH2 の阻害活性、及びその機序について生化学的に解析した。チオール存在によって BENDA による STAT3-SH2 の阻害活性が低下したことから BENDA が STAT3 のシステインに作用していることが推察された。そのため蛍光標識マレイミドを用い、競合結合実験及び変異型 STAT3 を用いたアッセイ系によって BENDA の作用部位を推測した。

1-1 実験材料及び実験方法

1-1-1 実験材料

- Bendamustine (BENDA) (SymBio Pharmaceuticals より供与)
- Dihydroxy bendamustine (HP2) (SymBio Pharmaceuticals より供与)
- Bendamustine ethyl ester (BM1EE) (SymBio Pharmaceuticals より供与)
- FITC-GY (PO₃H₂) LPQTY-NH₂ ペプチド (Nippi)
- FITC-GY (PO₃H₂) DKPHVL-NH₂ ペプチド (Nippi)
- FITC-PSY (PO₃H₂) VNVQN-NH₂ ペプチド (Nippi)
- Ac-GY (PO₃H₂) LPQTY-NH₂ ペプチド (Nippi)
- Ac-GYLPQTY-NH₂ ペプチド (Nippi)
- Alexa Fluor[®] 488 C5 Maleimide (Invitrogen)
- AlphaScreen FITC Detection Kits (PerkinElmer)
- AlphaScreen Streptavidin Donor beads (PerkinElmer)
- 大腸菌AVB99 (Avidity)
- EnVison Xcite (PerkinElmer Life Sciences)
- pBluescript II KS (+) (Novagen)

- エタノール (99.5%) (Wako)
- Ligation High (TOYOBO)
- Ligation High ver.2 (TOYOBO)
- *HindIII* (TOYOBO)
- *DpnI* (TOYOBO)
- *XhoI* (TOYOBO)
- QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN)
- NucleoSpin[®] Plasmid QuickPure (TaKaRa)
- 25 mM MgSO₄ (TOYOBO)
- 2 mM dNTPs (TOYOBO)
- KOD-Plus- (TOYOBO)
- DH5 α (Stratagene)
- 大腸菌 BirA-BL21 株 (Stratagene)
- 抗 STAT3 抗体 (CellSignaling TECHNOLOGY)
- Streptavidine-HRP conjugate (Amersham Biosciences)
- 抗 STAT1 抗体 (CellSignaling TECHNOLOGY)
- 抗 Grb2 抗体 (CellSignaling TECHNOLOGY)
- 5' - STAT3 (*HindIII*) : 5' - CGACAAGCTTGCATGGCCCAATGGAATCAGCT -3'
(北海道システムサイエンス)
- 3' - STAT3 (*XhoI*) : 5' - ATCGCTCGAGATCACATGGGGGAGGTAGCG -3'
(北海道システムサイエンス)
- 5' - STAT1 (*BamHI*) : 5' - ATCGGGATCCATGTCTCAGTGGTACGAACTT -3'
(北海道システムサイエンス)
- 3'- STAT1 (*Sall*) : 5'- ATCGGTTCGACCTATACTGTGTTTCATCATACTG -3'
(北海道システムサイエンス)
- 5'- Grb2 (*BamHI*) : 5'- AGTCGGATCCATGGAAGCCATCGCCAAATAT -3'
(北海道システムサイエンス)
- 3'- Grb2 (*XhoI*) : 5'- AGTCCTCGAGATTAGACGTTCCGGTTCACGG -3'
(北海道システムサイエンス)

1-1-2 発現プラスミドの構築

組換えビオチン化 STAT3 (1-770aa) 発現プラスミドを構築した。全長ヒト STAT3 cDNA は、ヒト cDNA ライブラリーから KOD-plus-を用いた PCR により増幅し、

Ligation High を用いて pBluescript II KS (+) にサブクローニングした。プライマー (北海道システムサイエンス) は、

5'-STAT3 (*HindIII*): 5'-CGACAAGCTTGCATGGCCCAATGGAATCAGCT-3'と

3'-STAT3 (*XhoI*): 5'-ATCGCTCGAGATCACATGGGGGAGGTAGCG-3'を使用した。

PCR 反応は、1 ng の cDNA、10 μM のフォワードプライマーとリバースプライマーを 0.75 μl、2 mM dNTPs を 2.5 μl、10×buffer を 2.5 μl、そして 1 U の KOD-Plus-を含む最終容量 25 μl の反応液を作成し、94°C で 2 分間の加熱後、94°C15 秒間、61°C30 秒間、68°C2 分 18 秒間を 30 サイクル行い、68°C で 1 分間反応させた。

		final Conc.
10× PCR buffer	2.5 μL	1×
2 mM dNTPs	2.5 μL	0.2 mM
25 mM MgSO ₄	1 μL	1 mM
10 μM 5'-STAT3 (<i>HindIII</i>)	0.75 μL	0.3 μM
10 μM 3'-STAT3 (<i>Xho I</i>)	0.75 μL	0.3 μM
100% DMSO	0.5 μL	2%
2 ng/μL cDNA ライブラリー	0.5 μL	
KOD -plus-	0.5 μL	1unit
H ₂ O	16 μL	
		25 μL

94°C 2min

94°C 15sec

61°C 30sec

68°C 2min18sec

30cycles

68°C 1min

増幅した DNA 断片は、アガロース電気泳動により確認した。約 2.3 kbp の DNA 断片を QIAquick Gel Extraction により精製した後、*HindIII*、*XhoI* による制限酵素処理

を行った後、pBluescript II KS (+) の *HindIII/XhoI* サイトに Ligation High を用いて環化反応を行った。反応液を DH5 α コンピテントセルへとトランスフォーメーションし、LB プレート (100 μ g/mL ampicillin) にて 37°C で一晩培養した。培養により形成されたコロニーを LB 液体培地 (100 μ g/mL ampicillin) で 37°C 一晩振盪培養した。培養液を集菌し、QIAprep Spin Miniprep Kit を用いてプラスミドを精製した後、ABI Sequencer 3100-Avant を用いて塩基配列の確認を行い、STAT3 cDNA を得たことを確認した。続いて、得られた STAT3 cDNA を、マルチクロニングサイトの N 端側に 6 \times His-tag と Avi-tag が付加されている大腸菌発現ベクター pET-28a (+) (Novagen) (以下、改変 pET-28a (+)) の *HindIII/XhoI* サイトに Ligation High を用いて環化反応を行った。反応液を DH5 α コンピテントセルへとトランスフォーメーションし、LB プレート (30 μ g/mL kanamycin) にて 37°C で一晩培養させた。培養により形成されたコロニーを LB 液体培地 (100 μ g/mL kanamycin) を用いて 37°C にて一晩振盪培養させた。培養液を集菌し、QIAprep Spin Miniprep Kit にてプラスミドを精製した後、*HindIII*、*XhoI* による制限酵素処理を行い、1% アガロースゲル電気泳動により解析することで、改変 pET-28a (+) _STAT3 を得たことを確認した。

組換えビオチン化 STAT1 (1-751aa) 発現プラスミドを構築した。STAT1 cDNA の単離は STAT3 cDNA と同様に行った。プライマー (北海道システムサイエンス) は、5'-STAT1 (BamHI) : 5'-ATCGGGATCCATGTCTCAGTGGTACGAACTT-3' と 3'-STAT1 (Sall) : 5'-ATCGGTCGACCTATACTGTGTTTCATCATACTG-3' を使用した。

組換えビオチン化 Grb2 (1-217aa) 発現プラスミドを構築した。Grb2 cDNA の単離は STAT3 cDNA と同様に行った。使用したプライマー (北海道システムサイエンス) は、5'-Grb2 (BamHI) : 5'-AGTCGGATCCATGGAAGCCATCGCCAAATAT-3' と 3'-Grb2 (XhoI) : 5'-AGTCCTCGAGATTAGACGTTCCGGTTCACGG-3' を使用した。

1-1-3 組換えビオチン化タンパク質の発現と精製

組換えビオチン化 STAT3 を発現させ、精製した。改変 pET-28a (+) _STAT3 を導入した大腸菌 AVB99 を、30°C の LB 培地 (30 μ g/mL kanamycin、10 μ g/mL chloramphenicol) にて OD₆₀₀ = 0.6 になるまで振盪培養した。その後、培養液に 0.4 mM IPTG、50 μ M biotin を加え、30°C にて 3 時間発現誘導した後、4°C、4000 \times g、25 分間遠心し大腸菌を回収した。得られた大腸菌を PBS (-) にて洗浄後、4°C、4000 \times g、25 分間遠心し再び沈殿させた。培養液 500 mL あたり、20 mL の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、500 mM NaCl、5 mM β -ME、0.1% NP-40、1 Tab/50 mL Complete

protease inhibitor cocktail tablet) に懸濁後、超音波処理 (SONIFIER[®] (Branson)) により細胞を破碎した。この細胞破碎液を8000×g、30分間遠心し、得られた上清を細胞溶解液とした。組換えタンパク質の精製はHis-tagアフィニティー精製法に従いカラム法で行った。細胞溶解液にNi Sepharose[™] High Performance (以下、Ni Sepharose) 20 μLを加え、4°Cにて回転振盪しながら90分間反応させた。反応後、1500×gで15分遠心し、Ni Sepharoseを遠沈させ、細胞溶解液と分離した。Wash buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.4)、300 mM NaCl、0.2 mM EDTA、0.1% NP-40、5 mM β-ME、20 mM imidazole、10% Glycerol) 中にNi Sepharoseを懸濁し、ポリエンプティーカーラム (Bio-Rad) に通した後、Wash bufferで3回洗浄し、イミダゾールを含むHis-tag用Elution Buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.4)、300 mM NaCl、0.2 mM EDTA、0.1% NP-40、5 mM β-ME、10% Glycerol) で溶出した。溶出したHis6-Avi-STAT3 (ビオチン化) は透析膜UC8-32-25 (三光純薬株式会社) に詰めた後、透析buffer (10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、125 mM NaCl、10 mM β-ME、0.1 mM EGTA、0.02% NP-40、0.2 mM PMSF、10% glycerol) を用いて透析した。透析後のHis6-Avi-STAT3 (ビオチン化) のタンパク質濃度を、BSAを標準試料としたBCA Protein Assay (Pierce) により測定した。得られたタンパク質溶液をSDS-PAGEで解析した後、抗STAT3抗体 (CellSignaling TECHNOLOGY) 、Streptavidine-HRP conjugate (Amersham Biosciences) を用いたウェスタンブロット法により発現を確認した。

組換えビオチン化 STAT1 の発現・精製は、組換えビオチン化 STAT3 の発現・精製方法に準じて行った。得られたタンパク質を SDS-PAGE で解析した後、抗 STAT1 抗体 (CellSignaling TECHNOLOGY) 、Streptavidine-HRP conjugate を用いたウェスタンブロット法により発現を確認した。

組換えビオチン化 Grb2 の発現・精製は組換えビオチン化 STAT3 の発現・精製方法に準じて行った。得られたタンパク質溶液を SDS-PAGE で解析した後、抗 Grb2 抗体 (CellSignaling TECHNOLOGY) 、Streptavidine-HRP conjugate を用いたウェスタンブロット法により発現を確認した。

1-1-4 変異型 STAT3 の発現と精製

改変 pET-28a (+) _STAT3 を制限酵素 *Hind*III、*Xho*I で処理し、フェノールクロロホルム沈殿、エタノール抽出を行った。その後アガロースゲルで電気泳動し、約 2.3 kbp のバンド (STAT3 cDNA) を切り出し、QIAquick Gel Extraction を用いて精製した。ベクターである pBluescript II KS (+) の *Hind*III、*Xho*I サイトに Ligation High

ver.2 を用いてライゲーションを行った。これを DH5 α コンピテントセルにトランスフォーメーションし、LB プレート (50 μ g/mL ampicillin) にて 37°C で一晩培養させた後、LB 液体培地 (50 μ g/mL ampicillin) を用いて、37°C にて一晩振盪培養させた。培養液を集菌し、NucleoSpin Plasmid QuickPure にてプラスミドを精製した後、Operon DNA シーケンス受託サービスにて塩基配列の確認を行った。

配列が確認された STAT3 を用いてインバース PCR (反応液組成 : 1 \times PCR バッファー、1.5 mM MgSO₄、5'プライマー及び 3'プライマー各 15 pmol、0.2 mM dNTPs、50 ng STAT3 cDNA、1U KOD-Plus-) を行った。プライマー (sigma-aldrich) は、Cys468 (forward : 5'-TCCAACATCG CTCAGATGCC AAATG-3'、reverse : 5'-GATCACCACA ACTGGCAAGG AGTGG-3') ; Cys542 (forward : 5'-GAATTATTCA GGGGCTCAGA TCACATGGGC TAAAT-3'、reverse : 5'-ACACCAGGTC CCAAGAGTTT CTCTGCC-3') ; Cys550 (forward : 5'-GCTAAATTTG CCAAAGAAAA CATGGCTGGC-3'、reverse : 5'-CCATGTGATC TGACACCCTG AATAATTCA CACC-3') ; Cys687 (forward : 5'-GGAAAGTATG CTCGGCCAGA GAGCCAG-3'、reverse : 5'-GAATGCCTCC TCCTTGGGAA TGTCAGG-3') ; and Cys712 (forward : 5'-AAGTTTATCG CTGTGACACC AACGACCTGC-3'、reverse : 5'-GGTCTTCAGG TATGGGGCAG CGCTAC-3') を使用した。PCR サイクルは、94°C で 2 分間加熱後、98°C 10 秒間、68°C 6 分 30 秒間加熱を 7 回繰り返した。その後、PCR 後の溶液を制限酵素 *DpnI* で処理し、アガロースゲル電気泳動で目的の産物が得られたかを確認し、Ligation High ver.2 を用いてセルフライゲーションした。得られた産物は上記と同様にトランスフォーメーションし、プラスミドを精製した。これを Operon DNA シーケンス受託サービスにて塩基配列の確認を行い、目的の部位がシステインからアラニンに翻訳されるコドンに変異していることを確認した。

確認された変異 STAT3 を再び制限酵素 *HindIII*、*XhoI* で処理し、組み換えビオチン化 STAT3 作成時と同様の操作を行い、DNA を精製した。His-Avi-pET28a (+) の *HindIII*、*XhoI* サイトに Ligation High ver.2 を用いてライゲーションを行った。これを DH5 α コンピテントセルにトランスフォーメーションし、同様の方法で培養した。培養液を集菌し、NucleoSpin Plasmid QuickPure にてプラスミドを精製した。Operon DNA シーケンス受託サービスにて精製したプラスミドの塩基配列の確認を行い Cys468、Cys542、Cys550、Cys687、Cys712 がアラニンに変異した変異型 STAT3 His-Avi-pET28a (+) の構築が完了した。

構築した変異型 STAT3 His-Avi-pET28a(+) の発現・精製は組換えビオチン化 STAT3 の発現・精製方法に準じて行った。pBirAcm プラスミドを組み込んだ大腸菌 BirA-BL21 を用いてタンパク質を発現させた。得られたタンパク質を SDS-PAGE で解析した後、CBB 染色とウェスタンブロット法により発現を確認した。

1-1-5 ALPHAScreen Assay による阻害試験

ビオチン化した STAT3 タンパク質と FITC- GY (PO₃H₂) LPQTY-NH₂ ペプチド、ビオチン化した STAT1 タンパク質と FITC- GY (PO₃H₂) DKPHVL-NH₂ ペプチド、ビオチン化した Grb2 タンパク質と FITC- PSY (PO₃H₂) VNVQN-NH₂ ペプチドを反応バッファー (10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、50 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% (w/v) NP-40、0.001% (w/v) BSA) で希釈した。96 穴プレートを用いて最終ボリュームを 25 μ L/well とし、遮光下で試験を行った。50 nM STAT3 タンパク質と DMSO で希釈した BENDA を混合し、500 rpm、1 分で遠心分離後、シェーカーで 30 秒混合し、24°C で 15 分間プレインキュベーションした。反応液として、STAT3 では、FITC- GY (PO₃H₂) LPQTY-NH₂ ペプチドを、STAT1 では FITC- GY (PO₃H₂) DKPHVL-NH₂ ペプチド、Grb2 では FITC- PSY (PO₃H₂) VNVQN-NH₂ ペプチドを添加し、500 rpm、1 分で遠心分離後、30 秒混合し、24°C で 90 分間インキュベーションした。その後、Anti-FITC acceptor beads (0.1 μ L/well) を添加し、500 rpm、1 分で遠心分離後、30 分混合しながら 24°C でインキュベーションした。更に、Streptavidin-coated donor beads (0.1 μ L/well) を添加し、500 rpm、1 分で遠心分離後、シェーカーで 90 分混合しながらインキュベーションした後、EnVison Xcite で化学発光を測定した。positive control (Ac- GY (PO₃H₂) LPQTY-NH₂) と negative control (Ac-GYLPQTY-NH₂) についても、1 μ M において上記と同様の条件でアッセイを行った。阻害剤を添加していないときのシグナルを 0% 阻害とし、被試験物質の各濃度の阻害率を算出した。IC₅₀ 値は Graph pad prism 4.0 で算出した。HP2、BM1EE、BENDA に 200 μ M β -ME を添加したもの、BENDA に 200 μ M L-Cystein を添加したものについても同様の条件で Alpha Screen assay を行った。

1-1-6 チオール反応性蛍光色素を用いた阻害試験

100 mM HEPES を含む pH7.4 なるように希釈した STAT3 タンパク質溶液 1.5 μ l に、300 μ M あるいは 150 μ M の BENDA 溶液、または BENDA を含まないコントロール溶液 1.5 μ l を加え、さらに 10 μ M のチオール基修飾蛍光物質 Alexa Fluor 488 C5

Maleimide (AF488 maleimide) 反応試薬 1.5 μ l を加え、アルミホイルで遮光した状態で室温、2 時間インキュベーションした。ジメルカプトエタノールの入っていない 4xSDS サンプルバッファー 1.5 μ l を加え、加熱せずそのままアルミホイルで遮光した状態で SDS-PAGE を行い、LAS-3000 で蛍光を確認した。

1-1-7 ALPHAScreen Assay による組換え STAT3-SH2 結合阻害試験

STAT3 のシステイン部位 (468 番、542 番、550 番、687 番、712 番) をアラニンに変異した組換え STAT3 を用いて ALPHAScreen assay を行った。ビオチン化した組換え STAT3 タンパク質と、FITC- GY (PO₃H₂) LPQTY-NH₂ ペプチドを反応バッファー (10 mM HEPES-NaOH (pH 7.4)、50 mM NaCl、1 mM EDTA、0.1% (w/v) NP-40、0.001% (w/v) BSA) で希釈した。96 穴プレートを用いて最終ボリュームを 25 μ L/well とし、遮光下で試験を行った。375 nM STAT3 タンパク質と DMSO で希釈した 100 μ M BENDA を混合し、500 rpm、1 分で遠心分離後、30 秒混合し、24°C で 15 分間プレインキュベーションした。反応液に FITC- GY (PO₃H₂) LPQTY-NH₂ ペプチドを添加し、500 rpm、1 分で遠心分離後、シェーカーで 30 秒混合し、24°C で 90 分間インキュベーションした。その後、Anti-FITC acceptor beads (0.1 μ L /well) を添加し、500 rpm、1 分で遠心分離後、シェーカーで 30 分混合しながら、24°C でインキュベーションした。更に、Streptavidin-coated donor beads (0.1 μ L /well) を添加し、500 rpm、1 分で遠心分離後、シェーカーで 90 分混合しながらインキュベーションした後、EnVison Xcite で測定した。1 μ M の positive control (Ac- GY (PO₃H₂) LPQTY-NH₂) 及び negative control (Ac-GYLPQTY-NH₂) を使用し、上記と同様の条件でアッセイを行った。3 μ M シスプラチンについても同様の条件で ALPHAScreen assay を行った。溶媒のみを添加した際のシグナルを 0% 阻害として、被試験物質の各濃度の阻害率を算出した。各濃度 n = 3 の平均値を計算し、標準偏差をエラーバーとしてグラフにプロットした。

1-2 実験結果

1-2-1 BENDA による STAT3-SH2 結合阻害活性

ALPHAScreen assay [49] を用いて BENDA、HP2、BM1EE (Figure 4-A) の STAT3-SH2 結合阻害活性及び選択性を評価した。その結果、BENDA は STAT3 の SH2

結合を濃度依存的に阻害し ($IC_{50} = 7.4 \mu M$)、その阻害活性は、STAT1 ($IC_{50} = 60 \mu M$)、Grb2 ($IC_{50} > 100 \mu M$) に比べて高かった (Figure 4-B)。以上より BENDA は、選択的に STAT3-SH2 の結合阻害活性を有することが *in vitro* の解析で明らかとなった。BENDA は加水分解により不活性型代謝産物である HP2 へと変換されることが知られている [71]。HP2 による STAT3-SH2 とリン酸化チロシン含有ペプチドとの結合阻害活性は、BENDA と比して顕著に弱かった ($IC_{50} > 100 \mu M$)。以上の結果から STAT3-SH2 に対する BENDA の結合阻害活性には DNA アルキル化に必須な HN-2 構造が重要であり、STAT3 に対しても HN-2 構造を介した共有結合複合体を形成することが推測された。一方、BENDA と同様に BENDA のエチルエステル体の BM1EE の IC_{50} 値は $6.1 \mu M$ と BENDA と同等であった (Figure 4-C)。さらに本アッセイ系に $200 \mu M$ 2-ME または、 $200 \mu M$ L-Cystein を添加したもので評価を行ったところ、顕著に BENDA の阻害活性が抑制された。このことから BENDA は、チオールと容易に反応し不活性化されると考えられ、さらに STAT3 のアミノ酸配列中に存在するシステインのチオール部位に作用し STAT3 を阻害していることが予想された (Figure 4-D)。

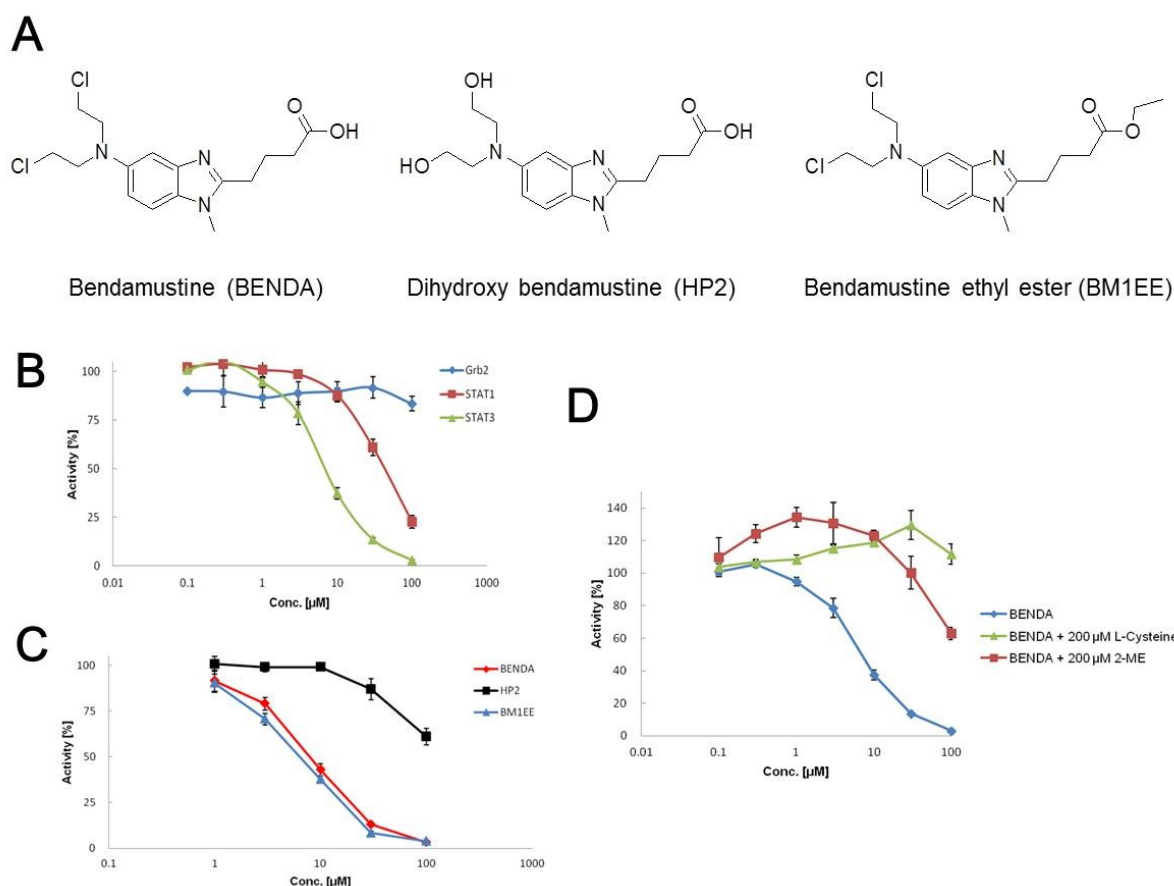


Figure 4. BENDA 類似体の構造及び BENDA による STAT3-SH2 結合の阻害

(A) BENDA、HP2 と BM1EE の構造を示した。(B) ALPHAScreen assay を用いて、BENDA による FITC- GY (PO_3H_2) LPQTY-NH₂ ペプチドに対する STAT3、FITC- GY (PO_3H_2) DKPHVL-NH₂ ペプチドに対する STAT1 及び FITC- PSY (PO_3H_2) VNVQN-NH₂ ペプチドに対する Grb2 の、SH2 結合に対する阻害活性を測定した。DMSO (溶媒) のみを用いたときのシグナルを 100% として相対値 (Activity [%]) をプロットした。各濃度 n=3 のデータの平均値を算出し、標準偏差をエラーバーで示した。(C) ALPHAScreen assay を用いて BENDA、HP2 及び BM1EE の、STAT3-SH2 結合に対する阻害活性を測定した。DMSO (溶媒) のみを用いたときのシグナルを 100% として、相対値 (Activity [%]) をプロットした。各濃度 n=3 のデータの平均値を算出し、エラーバーで標準偏差を示した。(D) ALPHAScreen assay を用いて、L-Cysteine 及び β -ME の存在下における、BENDA の、STAT3-SH2 結合に対する阻害活性を測定した。DMSO (溶媒) のみを用いたときのシグナルを 100% として相対値 (Activity [%]) をプロットした。

1-2-2 BENDA と STAT3 のシステインを介した相互作用

1-2-1 では BENDA が選択的に STAT3-SH2 結合を阻害し、さらにその作用はチオール存在で打ち消されることを明らかにした。そこで STAT3 のシステイン部位に結合するチオール基修飾蛍光物質 AF488 maleimide を用い、BENDA が STAT3 のシステイン残基に結合しているかを検討した。その結果、AF488 maleimide が STAT3 のシステイン部位に結合して生じる SDS-PAGE の蛍光シグナルバンドの蛍光強度が BENDA 処理により濃度依存的に低下することが見出された (Figure 5-A、B)。一方、

BENDA の最終濃度が 50 μ M と 100 μ M のとき、それぞれ 62%と 52%に蛍光が減少するのに対し、HP2 処理では蛍光の減少が見られなかった (Figure 5-C、D)。以上より、BENDA が STAT3 のシステインに結合し、さらに HN-2 構造が STAT3 の阻害活性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

次に、STAT3 の変異体を用いて、BENDA による STAT3-SH2 結合阻害活性を評価した。STAT3 には、全部で 14 個のシステイン (108 番目、251 番目、259 番目、328 番目、367 番目、418 番目、426 番目、468 番目、542 番目、550 番目、687 番目、712 番目、718 番目、765 番目) が含まれるが、そのうち STAT3-SH2 結合に重要な役割を果たす SH2 ドメイン内及びその周辺に含まれるのは 468 番目、542 番目、550 番目、687 番目 (SH2 ドメイン)、712 番目 (SH2 ドメイン) のシステインである。そこで、これらのシステインをそれぞれアラニンに変異した組換え STAT3 を作製し、STAT3 の SH2 ドメインを介したリン酸化チロシン含有ペプチドとの結合の阻害活性を検証した。その結果、550 番目、712 番目のシステインをアラニンに変異することで BENDA による阻害率が各々 3%、25%に有意に減少することが明らかになった

(Figure 6-A)。また、すでに STAT3-SH2 とリン酸化チロシン含有ペプチドを阻害することが知られているシスプラチンでは、システインのアラニン置換による阻害率の有意な差が得られなかったことから、BENDA が特異的に STAT3 の 550 番目、712 番目のシステインに結合し、STAT3-SH2 結合阻害を引き起こしていることが示唆された (Figure 6-B)。

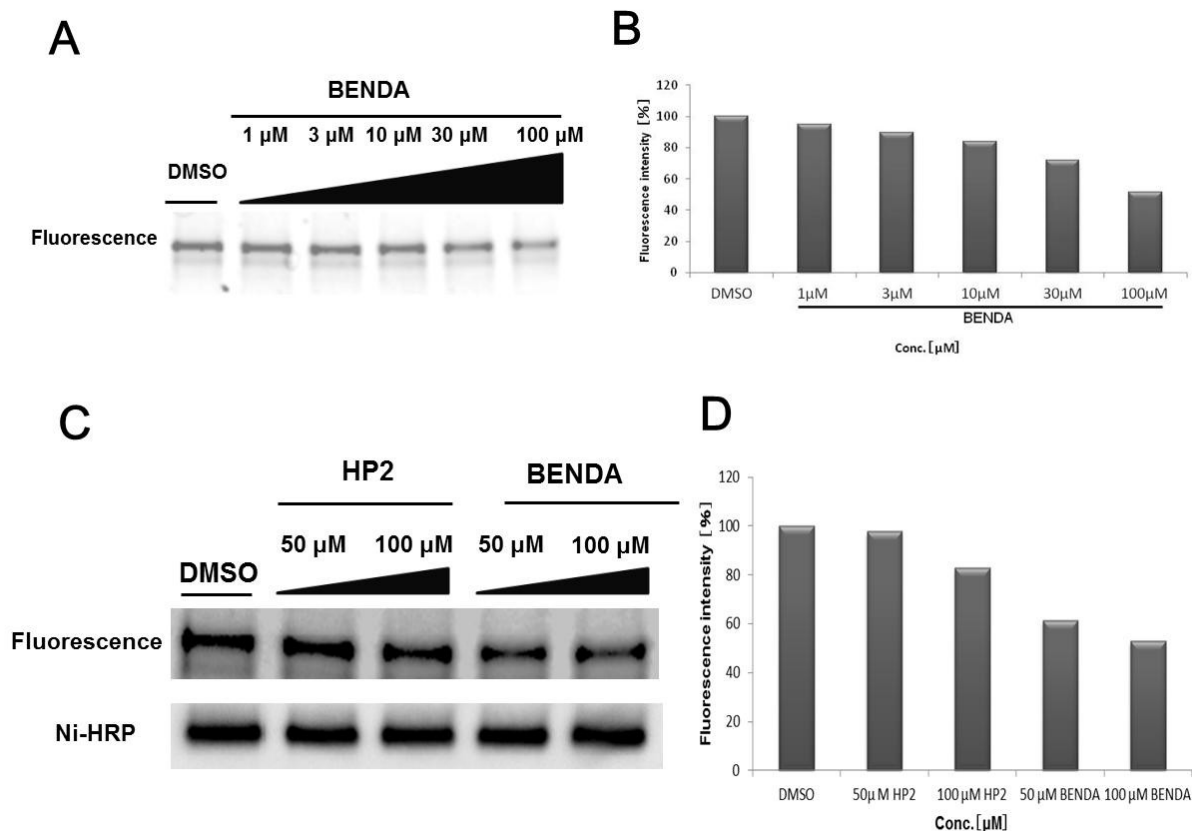


Figure 5. システインを媒介にした **BENDA** と **AF488** の競合試験

(A) 組換え STAT3 と AF488 maleimide の混合液に、BENDA を添加し、AF488 maleimide の蛍光 (ex/em : 493/516 nm) を測定した。(B) (A) の蛍光強度を定量してグラフにしたもの。(C) 組換え STAT3 と AF488 maleimide を含む反応溶液に、BENDA と HP2 を競合的に反応させた。AF488 maleimide の蛍光 (ex/em : 493/516 nm) を測定した。総 STAT3 のタンパク量は、Ni-HRP を用いたウェスタンブロッティングで確認した。(D) (C) の蛍光を定量してグラフにしたもの。

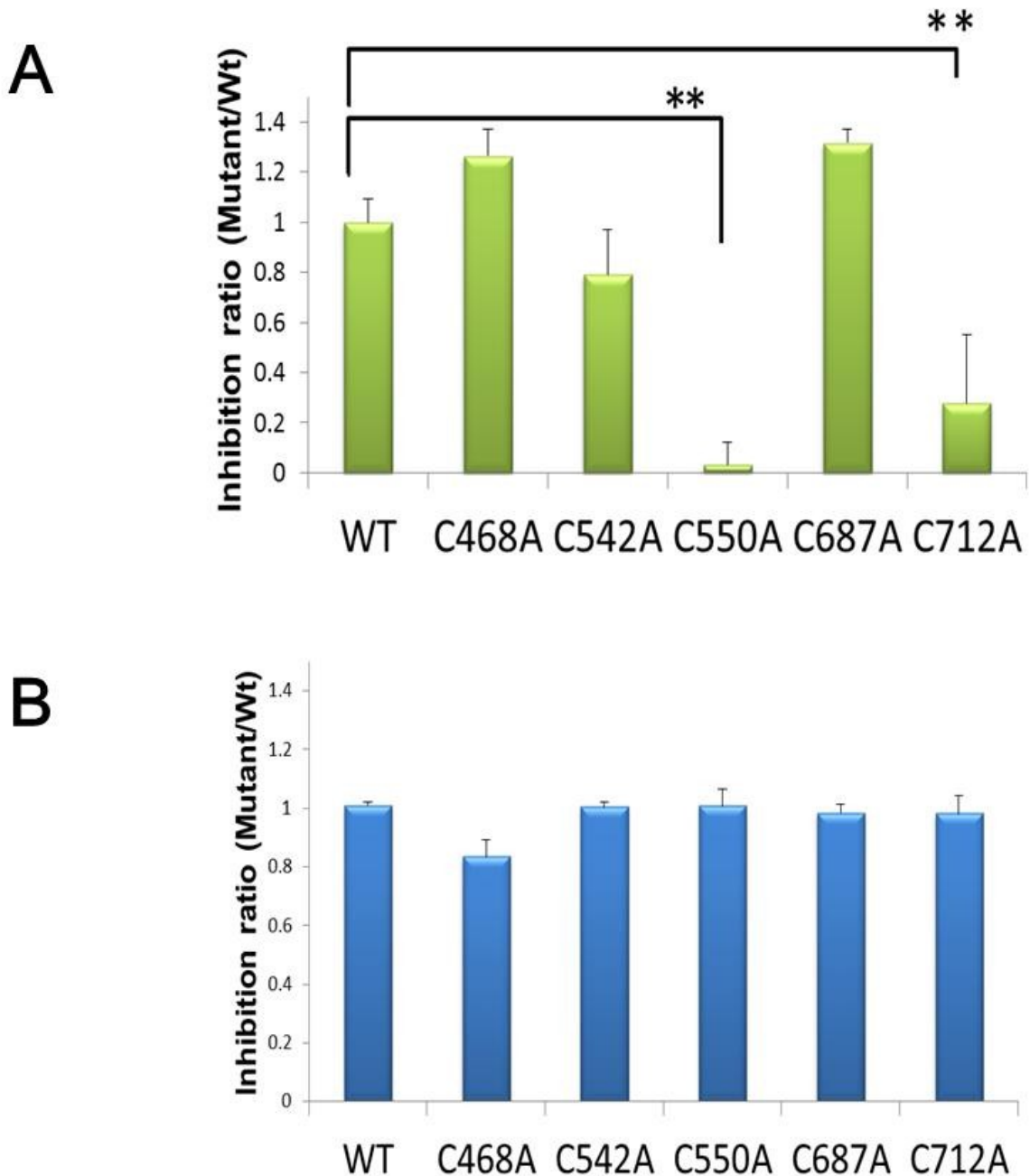


Figure 6. 変異型 STAT3 を用いた BENDA 及びシスプラチンの STAT3-SH2 結合阻害試験
 (A) システインをアラニンに置換した変異型組換え STAT3 (C468A、C542A、C550A、C687A、C712A) を用いて、100 μ M BENDA の STAT3-SH2 結合阻害試験を ALPHAScreenassay で行った。
 (B) (A) と同様の条件下で BENDA の代わりに 3 μ M シスプラチンを用いて STAT3-SH2 結合阻害試験を行った。各濃度 $n = 3$ のデータの平均値を算出し、標準偏差をエラーバーで示した。Student's t-test で vehicle に対する有意差を検定した (** $P < 0.01$)。

1-3 考察

本章では、無細胞系での STAT3-SH2 ドメイン阻害作用の解析を行った。組換え STAT3 とリン酸化チロシン含有ペプチドとの相互作用阻害を指標としたアッセイ系において、BENDA は、SH2 ドメインとリン酸化チロシン含有ペプチドとの結合を濃度依存的かつ選択的に阻害した。また、STAT3-SH2 に対する結合阻害活性には、BENDA と DNA との共有結合に必須な HN-2 構造が重要であり、STAT3 に対しても HN-2 構造を介した共有結合複合体を形成していること、及び STAT3 のシステイン残基のチオール部位に作用をしていることが示唆された。近年 STAT3 のシステインに結合することによって STAT3 阻害作用を示す化合物が多数報告されている [76、77、78、79]。例えば、Stattic は、Cys251 (coiled-coil domain)、Cys259 (coiled-coil domain)、Cys367 (DNA-binding domain)、Cys426 (DNA-binding domain) をアルキル化し、STAT3 の 2 量体化阻害やリン酸化阻害及び DNA への結合を阻害することが報告されている [77]。さらに、Galiellalactone は Cys367 (DNA-binding domain)、Cys468 (DNA-binding domain)、Cys542 (linker domain) に結合し、STAT3 の DNA への結合を阻害する [78]。このように STAT3 のシステイン残基はドラッグブルな標的として注目されている。本研究では BENDA と相互作用するシステインの候補として Cys550 (linker domain) と Cys712 (transcription activation domain) を同定した。この部位は上記システイン修飾化合物とは異なる作用部位である点は興味深い。今後は質量分析等による解析によって明確に結合部位を特定する必要がある。

BENDA のエチルエステル体の BM1EE が BENDA と同等の阻害活性を示していることは、BENDA の阻害活性にはカルボン酸部位が影響しないことを示唆している。このことから、BENDA をビオチンで標識する際には、BENDA 内のカルボン酸構造の部分にビオチンを付加しても阻害活性に影響しないと考えられた。先に述べたとおり STAT3 との結合においても DNA アルキル化同様に HN-2 を介したシステインとの結合が重要であるとするとカルボン酸は STAT3 に対して外側を向いており、そのため STAT3 との相互作用に重要ではないことが予想される。

今回、BENDA の STAT3 の SH2 結合に対する阻害活性は、 $IC_{50}=7.4 \mu M$ であった (Figure 4-B)。臨床試験では、投与量として 120 mg/m^2 (非ホジキンリンパ腫) が推奨投与量とされている。BENDA 投与後の最高血中濃度が約 $15.2 \mu M$ (非ホジキンリンパ腫) であることから [80]、BENDA の IC_{50} 値である $7.4 \mu M$ という濃度は、治療濃度域に含まれるため患者生体内において BENDA の二量体化阻害作用が発揮される可能性があり、これが BENDA の重要な作用メカニズムのひとつかもしれない。

チオール基修飾蛍光物質 AF488 maleimide による STAT3 のシステイン残基の修飾に対する BENDA の阻害作用を検討した結果 BENDA の最終濃度が 50 μ M と 100 μ M のとき、それぞれ 62%と 52%程度にしか蛍光が減少しなかった (Figure 5-C、 D)。この蛍光の減少率が低いのは以下の理由が考えられる。BENDA が STAT3 の SH2 ドメイン付近の特定のシステイン 550 番目と 712 番目に選択的に結合する可能性と AF488 maleimide が STAT3 のシステイン残基のすべてに非特異的に結合する点から考えると、100 μ M BENDA で結合が飽和していることが推測される。しかしシステイン残基との共有結合の詳細については、今後、質量分析法などを取り入れた詳細な解析が必要である。一方、STAT1 に対しては、SH2 ドメインの結合阻害活性が弱く、また Bio-BENDA を用いた免疫沈降実験でも細胞内 STAT1 への結合が確認されなかった。このことは、これは STAT1 の SH2 ドメイン付近には、STAT1 の 550 番目、712 番目のシステイン残基に相当するシステインを有さないことが原因として考えられる。よって上記システイン残基は STAT3 選択的な阻害のための標的として重要であることが示唆された。

1-4 小括

本章では、無細胞系での STAT3-SH2 結合に対する BENDA の阻害作用について解析した。BENDA が、試験管内で STAT3-SH2 結合を用量依存的に阻害することを明らかにした。また、BENDA の加水分解物 HP2 は、STAT3-SH2 結合を阻害しなかった。2-ME と L-Cystein を添加したところ、顕著に BENDA の阻害活性が抑制されたことから BENDA は、STAT3 のシステインのチオール部位に作用をしていることが示唆された。STAT3 のシステイン残基をチオール基修飾蛍光物質 AF488 maleimide にて標識した場合、BENDA が蛍光を用量依存的に減少させることから、BENDA が STAT3 のシステイン部位に結合していることを推定した。さらに、STAT3 の特定のシステインをアラニンに変異した組換え STAT3 を用いて ALPHAScreenassay を行い、STAT3 の 550 番目、712 番目のシステインに変異があると STAT3-SH2 結合に対する BENDA の阻害活性が減少したことから、STAT3 の 550 番目、712 番目のシステインが BENDA の阻害活性に重要であることを明らかとした。

以上の結果から、BENDA は STAT3 の 550 番目、712 番目のシステインに共有結合することで、STAT3 の活性化に必要な STAT3-SH2 ドメインの機能を阻害することが示唆された。

第2章 BENDAによる細胞内 STAT3 阻害作用の解析

第1章では、無細胞系での STAT3-SH2 結合に対する BENDA の阻害作用について解析した。

本章では、生理的条件下において BENDA の STAT3-SH2 結合に対する作用を明らかにするため、細胞系を用いた検討を行った。がん細胞内において、BENDA と STAT3-SH2 の結合が解析可能か否かを検証するため、ビオチン標識した BENDA と STAT3 が細胞内で結合するかを免疫沈降アッセイにより検証した。次に、BENDA によるがん細胞内 STAT3 の機能阻害について解析を行った。

2-1 実験材料及び実験方法

2-1-1 実験材料

- DMEM (Life Technologies)
- MDA-MB-468細胞 (ATCC)
- Bio-BENDA (静岡県立大学 創薬探索センターにて合成した)
- 抗 STAT3抗体 (Cell Signaling Technology)
- 抗 STAT1抗体 (Cell Signaling Technology)
- Protein G Plus/Protein A Agarose Suspension (Calbiochem (EMD Millipore))
- PhoshoSafe™ Extraction Reagent (NOVAGEN)
- Streptavidin-HRP (Cell Signaling Technology)
- Fetal bovine serum (Life Technologies)
- Penicillin and streptomycin (Life Technologies)
- MDA-MB-453細胞 (ATCC)
- SpectraMax M5SK (Molecular Devices)
- TransAM™ STAT Family Assay Kit (Active Motif)
- Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)
- ExactaChIP™ Human/Mouse STAT3 Chromatin Immunoprecipitation Kit (R&D systems)
- 1%ホルムアルデヒド (Sigma-Aldrich)
- SONIFIER® (Branson)
- GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)

- RNeasy kit (QIAGEN)
- One Step SYBR[®] PrimeScript PLUS RT-PCR Kit (TAKARA)
- 抗STAT3抗体 (Cell Signaling Technology)
- 抗リン酸化STAT3抗体 (Tyr705) (Cell Signaling Technology)
- 抗c-myc抗体 (Cell Signaling Technology)
- 抗GAPDH抗体 (abcam)
- ECL Anti-Rabbit IgG, HRP-linked F(ab')₂ fragment (GE Healthcare)
- ECL Anti-Mouse IgG, HRP-linked F(ab')₂ fragment (GE Healthcare)
- SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce)
- LAS-3000 (FUJIFILM)
- HEK293 (RIKEN Cell Bank)
- DMEM/F-12 (Gibco)
- pAmCyan1-N1 (Clontech)
- pZsYellow1-N1 (Clontech)
- Lipofectamine 2000 (invitrogen)
- Human c-myc forward primer : 5'- TACCCTCTCAACGACAGC AG -3'
(Sigma-Aldlich)
- Human c-myc reverse primer : 5'- TCTTGACATTCTCCTCGGTG -3' (Sigma-Aldlich)
- Human cyclin D1 forward primer : 5'-GCTGGAGCCCGTGAAAAAGA-3'
(Sigma-Aldlich)
- Human cyclin D1 reverse primer : 5'-CTCCGCCTCTGGCATTTTG-3'
(Sigma-Aldlich)
- Human survivin forward primer : 5'-ACCAGGTGAGAAGTGAGGGA-3'
(Sigma-Aldlich)
- Human survivin reverse primer : 5'-AACAGTAGAGGAGCCAGGGA-3'
(Sigma-Aldlich)
- Human Bcl-2 forward primer : 5'-TCTTTGAGTTCGGTGGGGTC-3'
(Sigma-Aldlich)
- Human Bcl-2 reverse primer : 5'-TGCATATTTGTTTGGGGCAGG-3'
(Sigma-Aldlich)
- Human GAPDH forward primer : 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'
(Sigma-Aldlich)

- Human GAPDH reverse primer : 5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCAT-3'
(Sigma-Aldrich)
- Thermo Scientific PikoReal Real-Time PCR System (Thermo Scientific)
- Epirubicin (Sigma-Aldrich)
- Camptothecin (Sigma-Aldrich)
- Taxol (Sigma-Aldrich)
- Stat3 siRNA II (Cell Signaling Technology)

2-1-2 細胞培養

MDA-MB-468 細胞は、DMEM/F-12 (10% FBS、20 units/mL Penicillin、20 µg/mL Streptomycin) を用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養し継代した。

HEK293 細胞は、DMEM (10% FBS、20 units/mL Penicillin、20 µg/mL Streptomycin) を用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養し継代した。但し、トランスフェクションに用いた培地には Penicillin/Streptomycin は含有されていない。

2-1-3 競合条件において Bio-BENDA を用いた免疫沈降アッセイ

MDA-MB-468 細胞を、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間前培養した後、培養液を吸引除去し、最終濃度 50 µM の Bio-BENDA を含む培養液 5 mL に過剰量の BENDA もしくは HP2 を加えて 37°C、5% CO₂ 存在下で 4 時間インキュベーションした。培養液を吸引除去した後 PBS で洗浄し、PhosphoSaf Extraction Reagent を 1.0 mL 加え室温で 5 分インキュベーションした。スクレイパーを用い細胞を遠心チューブに回収し 16000×g、4°C で 5 分間遠心した。上清を新しいチューブに移し、30 µl の protein G Plus/Protein A Agarose Suspension (33%懸濁液) で 1 時間洗浄し、10 分間遠心することにより上清を得た。細胞溶解液 200 µl に 1 µl の抗 STAT3 抗体を加え、4°C で振盪しながら一晩インキュベーションした。30 µl の protein G Plus/Protein A Agarose Suspension (33%懸濁液) を加えて 4°C で 4 時間振盪した後、16000×g、4°C で 30 秒遠心し、PhosphoSaf Extraction Reagent 500 µl で沈殿物を 5 回洗浄した。SDS サンプルバッファーに沈殿物を懸濁し、ボルテックスで攪拌した後 95°C で 3 分加熱し、さらに 16000×g で 1 分遠心して得られた上清を SDS-PAGE に用い、ウェスタンブロッティング後 streptavidin-HRP 用いて反応させた。STAT1 についても一次抗体に抗 STAT1 抗体を用いて同様の条件で実験を行った。

2-1-4 蛍光共鳴エネルギー移動法を用いた二量体化阻害試験

96 穴黒色プレートにフェノールレッド不含 DMEM (5% FBS) で希釈した HEK293 細胞を 2×10^4 cells/well になるように播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で一晩培養した。培養後、STAT3- CFP 発現プラスミドと STAT3- YFP 発現プラスミドを DNA 量が 0.2 µg ずつになるように、Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション開始より 6 時間後、フェノールレッド不含 DMEM (2% FBS、20 units/mL Penicillin、20 µg/mL Streptomycin) に培地を交換し、37°C、5% CO₂ 存在下で 48 時間インキュベーションした。その後、BENDA と HP2 を最終濃度 10、20、50 µM になるように培養液に加え、37°C、5% CO₂ 存在下で 23 時間プレインキュベーションした後、50 ng/mL IL-6 を添加して 37°C、5% CO₂ 存在下でさらに 1 時間インキュベーションした。インキュベーション後、SpectraMax M5SK を用いて FRET シグナル (Ex : 436 nm/Em : 528 nm) を測定した。

2-1-5 転写因子 ELISA 法を用いた STAT3 のコンセンサス配列への結合阻害試験

本アッセイは、TransAM STAT Family Assay Kit を用いて行った。直径 10 cm の培養皿に、フェノールレッド不含 DMEM/F-12 (2% FBS、20 units/mL Penicillin、20 µg/mL Streptomycin) で希釈した MDA-MB-468 細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した後、培養液を吸引除去し、BENDA を最終濃度 0、50、100 µM になるように HP2 を最終濃度 100 µM になる様に調整した培養液 5 mL を加え、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間インキュベーションした。核抽出液は以下の方法で調製した。直径 10 cm の培養皿に播種してある細胞を Buffer 1 (125 mM NaF、250 mM β-glycerophosphate、250 mM para-nitrophenyl phosphate、25 mM NaVO₃) で洗浄した後、Hypotonic buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH7.4)、5 mM NaF、0.1 mM EDTA、10 µM Na₂MoO₄、10% NP-40) で細胞抽出液を調製し、15000 x g、30 秒間、4°C にて遠沈した。得られた沈殿物をキット付属の Complete Lysis Buffer にて溶解し、核抽出液を得た。核抽出液中のタンパク質の濃度は Bio-Rad Protein Assay を用いて測定した。

STAT3 が結合するコンセンサス DNA オリゴヌクレオチド (5'-TTCCCGGAA-3') が固定化された 96 穴プレートに、BENDA 処理済みの核抽出液を 20 µg/well になるように添加し、25°C で 1 時間振盪しながら反応させた後、Antibody Binding Buffer (5% BSA、TBS-T (50 mM Tris-HCl (pH7.4)、100 mM NaCl、0.1% Tween-20)) で 1000 倍希釈した抗 STAT3 抗体を 25°C にて 1 時間反応させた。反応後 Washing

Buffer で洗浄し、Antibody Binding Buffer で 5000 倍希釈した抗ウサギ HRP 結合 IgG を 25°C にて 1 時間反応させた。反応後 Developing Solution で発色させた後、H₂SO₄ を添加し発色反応を止めた。測定は、SpectraMax M5SK を用いて 450 nm の吸光度を検出した。バックグラウンドとして 655 nm の吸光度を測定した。DNA 結合阻害率は次式で算出した。

$$[\text{STAT3 activation of control}] (\%) = 100 \times \frac{(\text{Abs}_{450/\text{chem}} - \text{bkgd})}{(\text{Abs}_{450/\text{DMSO}} - \text{bkgd})}$$

Abs_{450/chem} : 化合物を添加した反応溶液の吸光度

Abs_{450/DMSO} : DMSO のみを添加した反応溶液の吸光度

bkgd : 各ウェルの反応溶液 655 nm の吸光度

2-1-6 クロマチン免疫沈降法を用いた BENDA による c-myc 遺伝子プロモーター結合阻害試験

本試験は、ExactaChIP Human/Mouse STAT3 Chromatin Immunoprecipitation Kit を用いて行った。c-myc プロモーター領域 (-1304~-969) に対するプライマーを使用した。

Human c-myc forward primer : 5'-GAAGCCTGAGCAGGCGGGGCA-3'

Human c-myc reverse primer : 5'-GCTTTGATCAAGAGTCCCAG-3'

6 穴プレートに、フェノールレッド不含 DMEM/F-12 (2% FBS、20 units/mL Penicillin、20 µg/mL Streptomycin) で希釈した MDA-MB-468 細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した後、BENDA を最終濃度 0、25、50、100 µM になるように加え、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間インキュベーションした。並行して、HP2 を最終濃度 0、50、100 µM になるように加え、同様の条件でインキュベーションした。

STAT3 と DNA のクロスリンクを目的として最終濃度 1%ホルムアルデヒドを添加後、25°C にて 10 分間振盪しながら反応させた。固定化した細胞を Lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH7.4)、10 mM EDTA、1% SDS、1 Tab./50 mL protease inhibitor cocktail tablets) に懸濁し、超音波処理 (SONIFIER) により細胞溶解液を調製した。細胞溶解液を 12000×g、10 分間遠心し、上清を除いた後、Dilution buffer で沈殿を懸濁し、ビオチン化抗 STAT3 抗体を加えた。ネガティブコントロールとしては、Normal Sheep IgG を加えたサンプルを準備した。抗体添加後、4°C にて一晩反応させ、その後 Streptavidin agarose beads を 50 µL 添加して 4°C にて回転振盪しながら 30 分間

反応させた。反応後、12000 x g、1 分間遠心し、agarose beads を遠沈させた。遠沈させた agarose beads を洗浄し、Chelating Resin Solution を 100 μ L 添加して 100°C で 10 分間反応させることにより DNA 断片を beads から解離した。得られた DNA 断片を鋳型にして、下表の PCR サイクルで c-myc プロモーター DNA を増幅させた。PCR 反応は、2 ng の DNA 断片、それぞれ 20 μ M のフォワードプライマーとリバースプライマーを 0.75 μ l、2 mM dNTPs を 5 μ l、10 \times buffer を 5 μ l 及び 1 U の酵素を含む最終容量 50 μ l の反応液を作成し、GeneAmp PCR System 9700 を使用して、95°C 9 分間の後、94°C 1 分間、60°C 1 分間を 47 サイクル反応させ、その後 60°C で 10 分間反応した。得られた PCR 産物は 2%アガロース電気泳動しバンドを検出した。

		final Conc.
10 \times PCR buffer	5 μ L	1 \times
2 mM dNTPs	5 μ L	0.2 mM
25 mM MgSO ₄	2 μ L	1 mM
20 μ M Forward primer	0.75 μ L	0.3 μ M
20 μ M Reverse primer	0.75 μ L	0.3 μ M
100% DMSO	1 μ L	2%
2 ng/ μ L DNA 断片	1 μ L	
KOD-plus-	1 μ L	1 unit
H ₂ O	34.5 μ L	
50 μ L		

95°C 9 min

94°C 1 min

60°C 1 min

47 cycles

60°C 10 min

2-1-7 定量 PCR 法を用いた BENDA による STAT3 標的遺伝子の発現抑制試験

本試験は、RNeasy kitと One Step SYBR PrimeScript PLUS RT-PCR Kitを用いて行った。下記のプライマーを使用した。

Human c-myc forward primer : 5'-TACCCTCTCAACGAC AGCAG-3'

Human c-myc reverse primer : 5'-TCTTGACATTCTCCTCGGTG-3'

Human cyclin D1 forward primer : 5'-GCTGGAGCCCGTGAAAAAGA-3'

Human cyclin D1 reverse primer : 5'-CTCCGCCTCTGGCATTTTG-3'

Human survivin forward primer : 5'-ACCAGGTGAGAAGTGAGGGA-3'

Human survivin reverse primer : 5'-AACAGTAGAGGAGCCAGGGA-3'

Human Bcl-2 forward primer : 5'-TCTTTGAGTTCGGTGGGGTC-3'

Human Bcl-2 reverse primer : 5'-TGCATATTTGTTTGGGGCAGG-3'

Human GAPDH forward primer : 5'-TGATGACATCAAGAAGGTGGTGAAG-3'

Human GAPDH reverse primer : 5'-TCCTTGGAGGCCATGTGGGCAT-3'

6穴プレートにフェノールレッド不含DMEM/F-12 (2% FBS、20 units/mL Penicillin、20 µg/mL Streptomycin) で希釈したMDA-MB-468細胞を播種し、37°C、5% CO₂存在下で24時間培養した後、BENDAを最終濃度0、25、50、100 µMになるように、またHP2を最終濃度100 µMになるように調整し、37°C、5% CO₂存在下で8時間インキュベーションした。細胞培養液を除きPBSで洗浄した後、Buffer RLTを600 µL添加して細胞溶解液を回収した。回収した細胞溶解液をQiashredderに添加し、16000×gで2分遠心した。抽出液に70%エタノールを600 µL加えてピペッティングした。2 mLのコレクションチューブにセットしたRNeasyスピンカラムに回収した細胞溶解液をセットし、10000 rpmで15秒遠心した。その後、Buffer RW1及びbuffer RPEにて洗浄した。RNeasyスピンカラムに新しい1.5 mLのコレクションチューブをセットしてRNaseフリー水30 µLを添加し、RNAを回収した。得られたRNAを鋳型にして下表の様にPCRでc-mycのDNAを増幅させた。定量PCR反応は、100 ngのRNAテンプレート、それぞれ10 µMのフォワードプライマーとリバースプライマーを2 µl、PrimeScript PLUS RTase Mixを0.4 µl、2 × One Step SYBR[®] RT-PCR Buffer 4を10 µl及び1.2 µlのTaKaRa Ex Taq HS Mixを含む最終容量20 µlの反応液を作成し、Thermo Scientific PikoReal Real-Time PCR Systemを使用して、42°C 5分間、95°C 10秒間の後、94°C 30秒間、55°C 30秒間、72°C 30秒間を40サイクル反応させ、その後60°C30秒間、20°C10秒間反応した。得られたPCR産物はPikoRealソフトウェアで解析した。

2 ×	One Step SYBR [®] RT-PCR Buffer 4	10 μL
	TaKaRa Ex Taq HS Mix	1.2 μL
	PrimeScript PLUS RTase Mix	0.4 μL
10 μM	Forward primer	2 μL
10 μM	Reverse primer	2 μL
100 μg/mL	RNA テンプレート	1 μL
	RNase フリー水	3.4 μL
		20 μL

42°C 5 min

95°C 10 sec

94°C 30 sec

55°C 30sec

72°C 30 sec

40 cycles

60°C 30 sec

20°C 10 sec

2-1-8 BENDA による STAT3 標的遺伝子のタンパク質発現抑制試験

直径 10 cm の培養皿にフェノールレッド不含 DMEM/F-12 (2% FBS、20 units/mL Penicillin、20 μg/mL Streptomycin) で希釈した MDA-MB-468 細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間培養した。BENDA を最終濃度 0、50、100 μM になるように、また HP2 を最終濃度 100 μM になるように調整し培養液へと加え、37°C、5% CO₂ 存在下で 24 時間インキュベーションした。PhosphoSafe Extraction Reagent を 1.0 mL 加えて室温で 5 分インキュベーションし、細胞抽出液を回収した。細胞抽出液のタンパク質濃度は Bio-Rad Protein Assay を用いて測定した後、抽出液を、30 μg/well

になるように 7.5% ポリアクリルアミドゲルに添加して SDS-PAGE を行った。電気泳動後、Transfer buffer (25 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM Glycine、20% Methanol) を用いて、4°C において、40 V で 40 分間、更に 90 V で 90 分間通電し、ゲル内のタンパク質を PVDF 膜に転写した。

転写後の PVDF 膜を Blocking buffer (5% skim milk/TBS-T (100 mM Tris-HCl (pH7.4)、150 mM NaCl、0.1% Tween-20)) で 60 分間室温にてブロッキングした。PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄した後、抗 STAT3 抗体、抗リン酸化 STAT3 抗体 (Tyr705)、抗 c-myc 抗体、抗 GAPDH 抗体を 4°C にて一晩反応させた。全ての 1 次抗体は、1.5% skim milk/TBS-T で 1000 倍希釈して使用した。

抗 STAT3 抗体、抗リン酸化 STAT3 抗体 (Tyr705) 及び抗 c-myc 抗体の 2 次抗体として ECL Anti-Rabbit IgG, HRP-linked F(ab')₂ fragment を、抗 GAPDH 抗体の 2 次抗体として ECL Anti-Mouse IgG, HRP-linked F(ab')₂ fragment を TBS-T で 5000 倍希釈し、室温で振盪させながら PVDF 膜と 1 時間反応させた。TBS-T で PVDF 膜を 3 回洗浄し、SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate を用いて化学発光させ、LAS-3000 にて検出した。

2-1-9 STAT3 siRNA を用いたがん細胞増殖抑制試験

MDA-MB-468 細胞は、DMEM/F-12 (10% FBS、20 units/mL Penicillin、20 µg/mL Streptomycin) を用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養し継代した。MDA-MB-453 細胞は、DMEM (10% FBS、20 units/mL Penicillin、20 µg/mL Streptomycin) を用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養し継代した。直径 10 cm の培養皿に播種した 1×10⁶ cells の MDA-MB-468 細胞及び MDA-MB-453 細胞に 100 nM Stat3 siRNA II を加え CLB-Transfection System を用いエレクトロポレーションを行い、72 時間インキュベーション後に細胞数をカウントした。

2-1-10 BENDA によるリン酸化 STAT3 高発現がん細胞に対する選択的増殖阻害試験

MDA-MB-468 細胞は、DMEM/F-12 (10% FBS、20 units/mL Penicillin、20 µg/mL Streptomycin) を用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養し継代した。MDA-MB-453 細胞は、DMEM (10% FBS、20 units/mL Penicillin、20 µg/mL Streptomycin) を用い、37°C、5% CO₂ 存在下で培養し継代した。各細胞株を 10000 cells/well になるように調製し、96 穴プレートに播種して 37°C、5% CO₂ 存在下で一晩培養した。BENDA 及び HP2

を最終濃度 0.1、0.3、1.0、3.0、10、30 もしくは 100 μM になるように培地へと添加し、37°C、5% CO_2 存在下で 48 時間反応させた。その後、CellTiter96 AQueous One Solution Reagent を 20 $\mu\text{L}/\text{well}$ 添加し、37°C、5% CO_2 存在下で 1 時間インキュベーションした後、SpectraMax M5SK を用いて吸光度 ($\lambda = 492 \text{ nm}$) を測定した。測定した吸光度から下記の算出方法にて cell viability を算出した。

$$[\text{Cell viability}] (\%) = 100 \times (\text{Abs}_{\text{chem}} - \text{bkgd}) / (\text{Abs}_{\text{DMSO}} - \text{bkgd})$$

Abs_{chem} : 化合物を添加した場合の吸光度

Abs_{DMSO} : DMSO を添加した場合の吸光度

bkgd : 細胞培養用培地に CellTiter96 AQueous One Solution Reagent を添加した場合の吸光度

2-1-11 Epirubicin、Camptothecin、Taxol、BENDA 及び HP2 を用いたがん細胞増殖抑制試験

MDA-MB-468 細胞は、DMEM/F-12 (10% FBS、20 units/mL Penicillin、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin) を用い、37°C、5% CO_2 存在下で培養し継代した。MDA-MB-453 細胞は、DMEM (10% FBS、20 units/mL Penicillin、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Streptomycin) を用い、37°C、5% CO_2 存在下で培養し継代した。96 穴プレートに播種した 1×10^4 cells/100 $\mu\text{L}/\text{well}$ の MDA-MB-468 細胞 と 2×10^4 cells/100 $\mu\text{L}/\text{well}$ の MDA-MB-453 細胞に、種々の濃度の Epirubicin、Camptothecin、Taxol、BENDA 及び HP2 を加え、48 時間インキュベーションした後 WST-8 溶液を加え、プレートリーダーで 450 nm における吸光度を測定した。DMSO 存在下のシグナルを 100%として相対値 (Activity [%]) をプロットした。各濃度 $n = 3$ のデータの平均値を算出し、標準偏差をエラーバーで示した。

2-1-12 データ解析

蛍光共鳴エネルギー法、転写因子 ELISA 法及び定量 PCR 法、細胞増殖試験の結果について Student's t-test を行い、Vehicle に対する統計学的な有意差を検討した。Vehicle に対して * $P < 0.05$ 及び ** $P < 0.01$ を表した。

2-2 実験結果

2-2-1 Bio-BENDA と細胞内 STAT3 の相互作用

STAT3 が恒常的に活性化しているヒト乳がん細胞株 MDA-MB-468 細胞に Bio-BENDA を処理した後、細胞抽出液を回収し、免疫沈降法を用いて Bio-BENDA と STAT の結合について検討した。Bio-BENDA の構造式を Figure 7A に示す。Bio-BENDA は、BENDA のカルボン酸側に十分な長さのスペーサーを介してビオチンを結合させたプローブである。MDA-MB-468 細胞に対する細胞増殖阻害活性は、BENDA で IC₅₀ 値が 7.4 μM、Bio-BENDA で 23.3 μM であり、Bio-BENDA は BENDA 比較して弱いものの細胞増殖阻害活性を保持していた。

Bio-BENDA 処理した細胞の抽出液を抗 STAT3 抗体または抗 STAT1 抗体で免疫沈降して Streptoavidin-HRP を用いてブロッティングした結果、Bio-BENDA が細胞内の STAT1 とは結合せず、細胞内 STAT3 に対して強固に結合していることが判明した。また、その結合は過剰量の HP2 (500 μM) の添加では阻害されなかったが過剰量の BENDA (500 μM) の添加によって阻害された (Figure 7-B、C)。このことは、BENDA と細胞内 STAT3 の結合には、無細胞系と同様に BENDA の HN-2 構造が必要であることを示しており、BENDA は STAT3 とシステインを介した共有結合複合体を形成していることが示唆された。

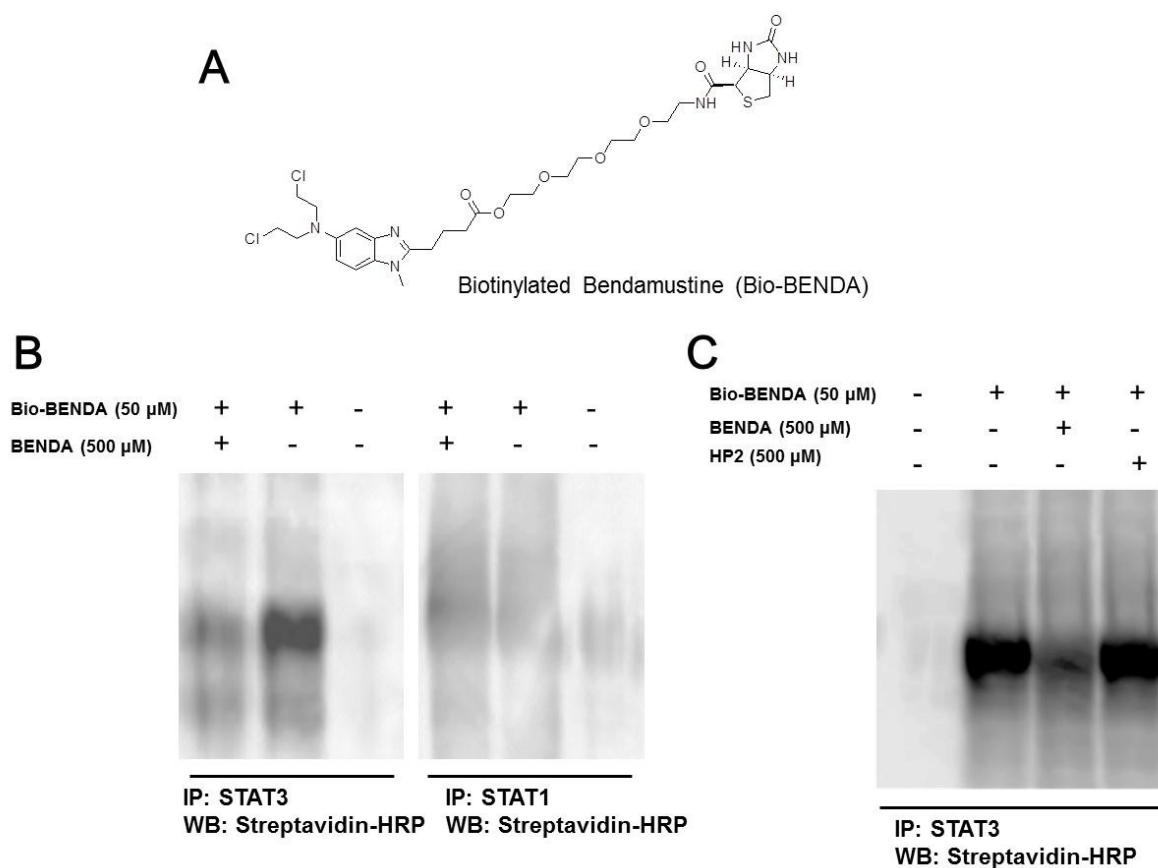


Figure 7. ビオチン化 BENDA を用いた競合的免疫沈降アッセイ

(A) Bio-BENDA の構造。(B) 競合条件で Bio-BENDA を用いた免疫沈降アッセイを行った。Bio-BENDA と BENDA を MDA-MB-468 細胞に 4 時間反応させた。抗 STAT3 抗体と抗 STAT1 抗体で免疫沈降法を行った。Bio-BENDA は Streptavidin-HRP を用いて検出した。(C) 競合条件で Bio-BENDA を用いた免疫沈降アッセイを行った。Bio-BENDA と BENDA もしくは HP2 を MDA-MB-468 細胞に 4 時間反応させた。抗 STAT3 抗体で免疫沈降法を行い Streptavidin-HRP を用いて Bio-BENDA の結合を評価した。

2-2-2 蛍光共鳴エネルギー移動法を用いた BENDA による細胞内 STAT3 二量体化阻害活性

FRET 検出系による細胞内 STAT3 二量体化阻害試験系を用いて、BENDA が細胞内での STAT3 の二量体化を阻害するかを検証した。本試験は、STAT3-CFP と STAT3-YFP が物理的に近接したとき、STAT3-CFP に励起光 ($\lambda = 436 \text{ nm}$) の照射により励起された STAT3-CFP から STAT3-YFP へエネルギーが転移され、STAT3-YFP から蛍光 ($\lambda = 528 \text{ nm}$) が放出されることを STAT3 の二量体化の指標とした。濃度段階的に調製した BENDA と HP2 を用いて評価した結果、BENDA による濃度依存的な FRET シグナルの減少が確認できた。BENDA の 50 μ M における細胞内 STAT3 二量体化阻害率は $52 \pm 4.3\%$ 、HP2 の 50 μ M における細胞内 STAT3 二量体化阻害率は

-0.5±0.4%であった (Figure 8)。この結果から、BENDA は細胞内 STAT3 の二量体化を阻害し、その阻害活性には HN-2 構造が必要であることが明らかとなった。

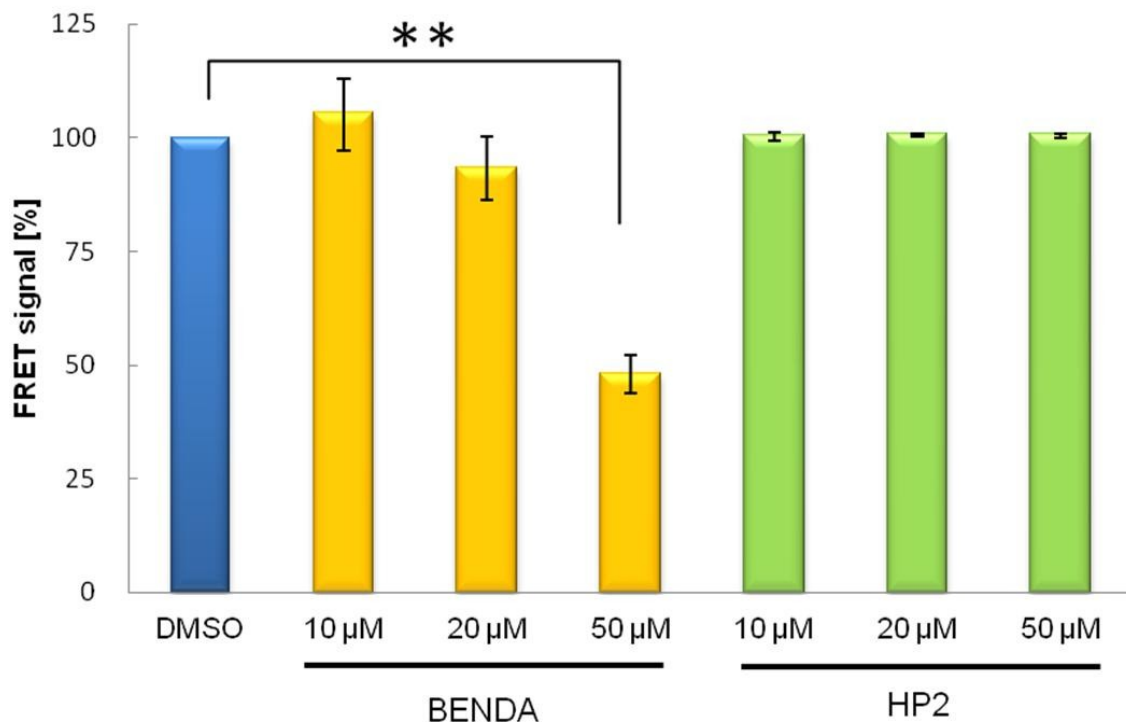


Figure 8. 蛍光共鳴エネルギー法による細胞内 STAT3 二量体化阻害作用

HEK293 細胞を BENDA または HP2 と 23 時間インキュベーションした後 IL-6 で 1 時間刺激し、STAT3-CFP と STAT3-YFP の相互作用による FRET signals を測定した。各濃度 n = 3 のデータの平均値を算出し、標準偏差をエラーバーで示した。Student's t-test で vehicle に対する有意差を検定した (** P < 0.01)。

2-2-3 BENDA による STAT3 のコンセンサス配列への結合阻害活性

STAT3 とコンセンサス配列との結合を BENDA が阻害するかを検証した。転写因子 ELISA 法は、STAT ファミリーに共通して結合するコンセンサスオリゴヌクレオチドを用いて、各 STAT の DNA への結合を評価する方法である。MDA-MB-468 細胞を BENDA にて処理し、核抽出液を回収した後、STAT3 のコンセンサス配列への結合能を検討した。その結果、50 μM 及び 100 μM の BENDA 処理により STAT3 のコンセンサス配列への結合能が、62%及び58%と有意に減少することを明らかにした。また、バックグラウンドとして加熱変性処理した核抽出液である Heat-denatured NE を測定したがコントロールの約 30%であった。一方、HP2 処理では有意差のある阻害は確認されなかった (Figure 9)。

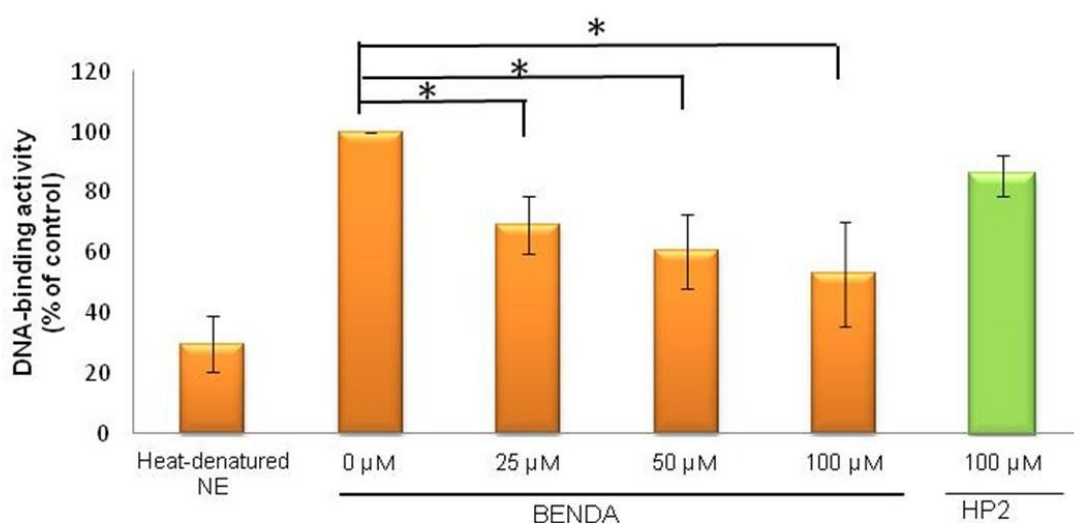


Figure 9. 転写因子 ELISA 法を用いた BENDA 処理後における核内 STAT3 とコンセンサス DNA ヌクレオチドとの結合の評価

MDA-MB-468 細胞を BENDA または HP2 で 24 時間処理した後、TransAM STAT Family Assay Kit を用いて、核内 STAT3 の DNA 結合活性を評価した。各濃度 $n = 3$ のデータの平均値を算出し、標準偏差をエラーバーで示した。Student's t-test を用いて vehicle に対する有意差を検定した (* $P < 0.05$)。

2-2-4 クロマチン免疫沈降法を用いた BENDA による STAT3 の c-myc 遺伝子プロモーターへの結合阻害活性

BENDA が STAT3 の c-myc 遺伝子プロモーターへの結合を阻害することを、クロマチン免疫沈降法を用いて評価した。c-myc は STAT3 の標的遺伝子として知られており、実際に、がん細胞において STAT3 の転写活性の上昇が、c-myc の発現レベルを上昇させると報告されている [1、4、7、15]。また、STAT3 の標的遺伝子の c-myc の発現には、STAT3 シグナルの寄与が最も大きいとの報告もある [4]。BENDA で処理した MDA-MB-468 細胞を用いて評価を行った結果、BENDA が濃度依存的に STAT3 の c-myc 遺伝子プロモーターへの結合を減少させることが明らかとなった。この場合も HP2 は STAT3 の c-myc 遺伝子プロモーターへの結合を抑制しなかった (Figure 10-A)。

2-2-5 BENDA による c-myc の発現抑制

MDA-MB-468 細胞を BENDA にて処理し、定量 PCR 法を実施した結果、濃度依存的に c-myc の mRNA の発現量が減少することを明らかにした。また、HP2 については有意差が得られなかった (Figure 10-B)。

次に、MDA-MB-468 細胞を 50 μ M または 100 μ M の BENDA にて 24 時間処理し、c-myc のタンパク質の発現レベルをウェスタンブロット法にて確認した。その結果、BENDA の処理濃度依存的に c-myc のタンパク質の発現レベルが減少するが、HP2 では変化が見られなかった。さらに、STAT3 のリン酸化レベル (Tyr705) についても検討した結果、BENDA 処理により STAT3 の発現は変化せず STAT3 のリン酸化レベルのみが減少すること、及びこの変化は HP2 で処理では見られないことが明らかになった (Figure 10-C)。これらの結果及び前述した 2-2-4 の結果から、BENDA は細胞内 STAT3 に直接作用して、その転写因子としての機能を阻害することが示唆された。

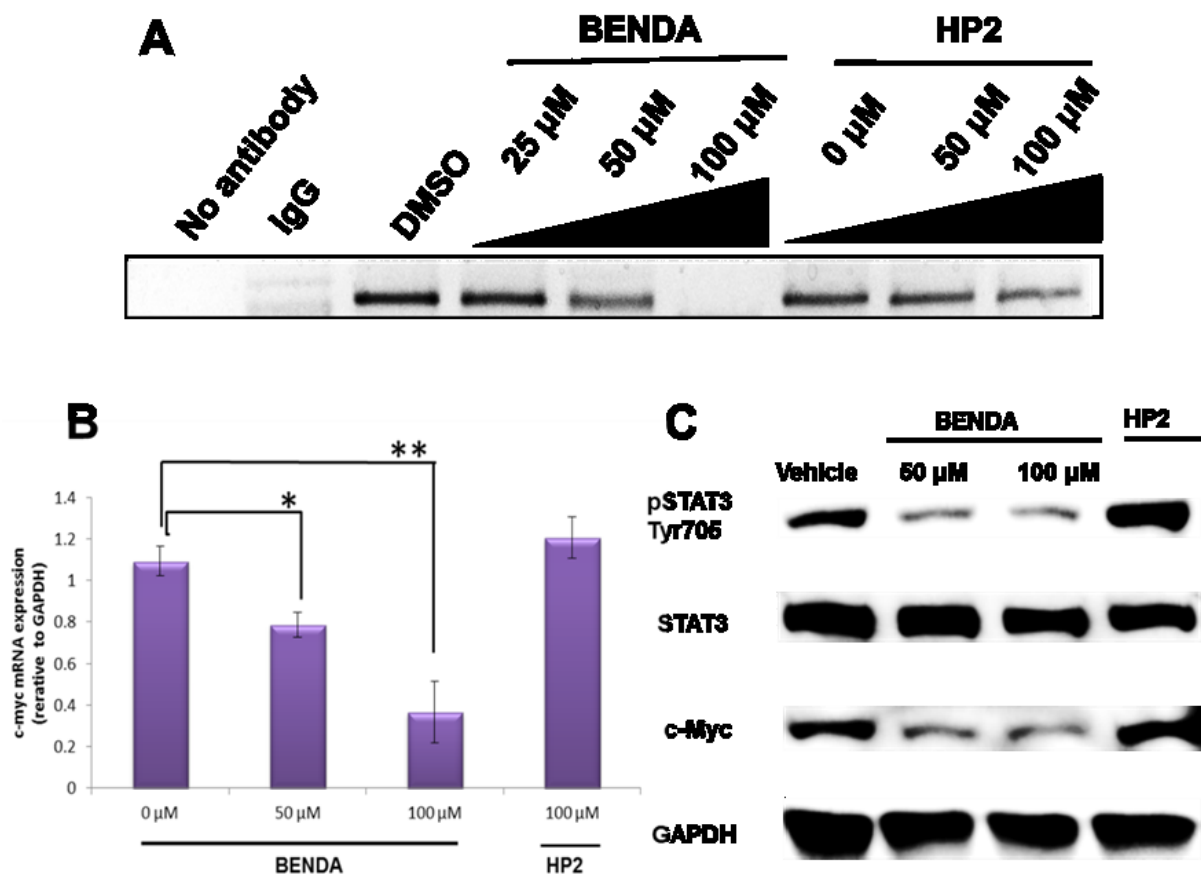


Figure 10. BENDAによるがん細胞のSTAT3の機能阻害

(A) STAT3とc-myc promoterの結合に対するBENDAの阻害作用について検証した。MDA-MB-468細胞を、25、50、100 μMのBENDAで24時間前処理した後、クロマチン免疫沈降法を行った。陰性対照群としてNormal Sheep IgGを添加したサンプルを用いた(IgGレーン)。(B) BENDA及びHP2がc-mycのmRNAの発現レベルへ及ぼす影響を評価した。MDA-MB-468細胞に、BENDAまたはHP2を添加し、8時間後、定量PCR法にて評価した。Vehicleのシグナルを100%として各濃度における相対的なc-mycのmRNA発現レベルを算出した。各濃度n=3のデータの平均値を算出し、平均値をグラフにプロットした。標準偏差をエラーバーで示した。Student's t-testでvehicleに対する有意差を検定した(*P<0.05、**P<0.01)。(C) BENDAによるSTAT3のTyr705に対するリン酸化と、c-mycタンパク質の発現レベルを確認した。MDA-MB-468細胞を、50 μM BENDA、100 μM BENDA、または100 μM HP2で処理した後、ウェスタンブロット法によって抗STAT3抗体、抗リン酸化STAT3抗体(Tyr705)、抗c-myc抗体及び抗GAPDH抗体を用いてタンパク質の発現レベルを検証した。

2-2-6 定量PCR法を用いたBENDAによる標的遺伝子の発現抑制

c-mycに加え、STAT3の標的遺伝子であるCyclin D1、Survivin及びBcl2の発現変化についても、定量PCR法で評価した。その結果、Cyclin D1、Survivin及びBcl2のmRNAの発現量が、BENDAの濃度依存的に有意に減少することが確認された

(Figure 11-A、-B、-C)。このことから、BENDAはSTAT3が関与する転写活性化を阻害することが示された。

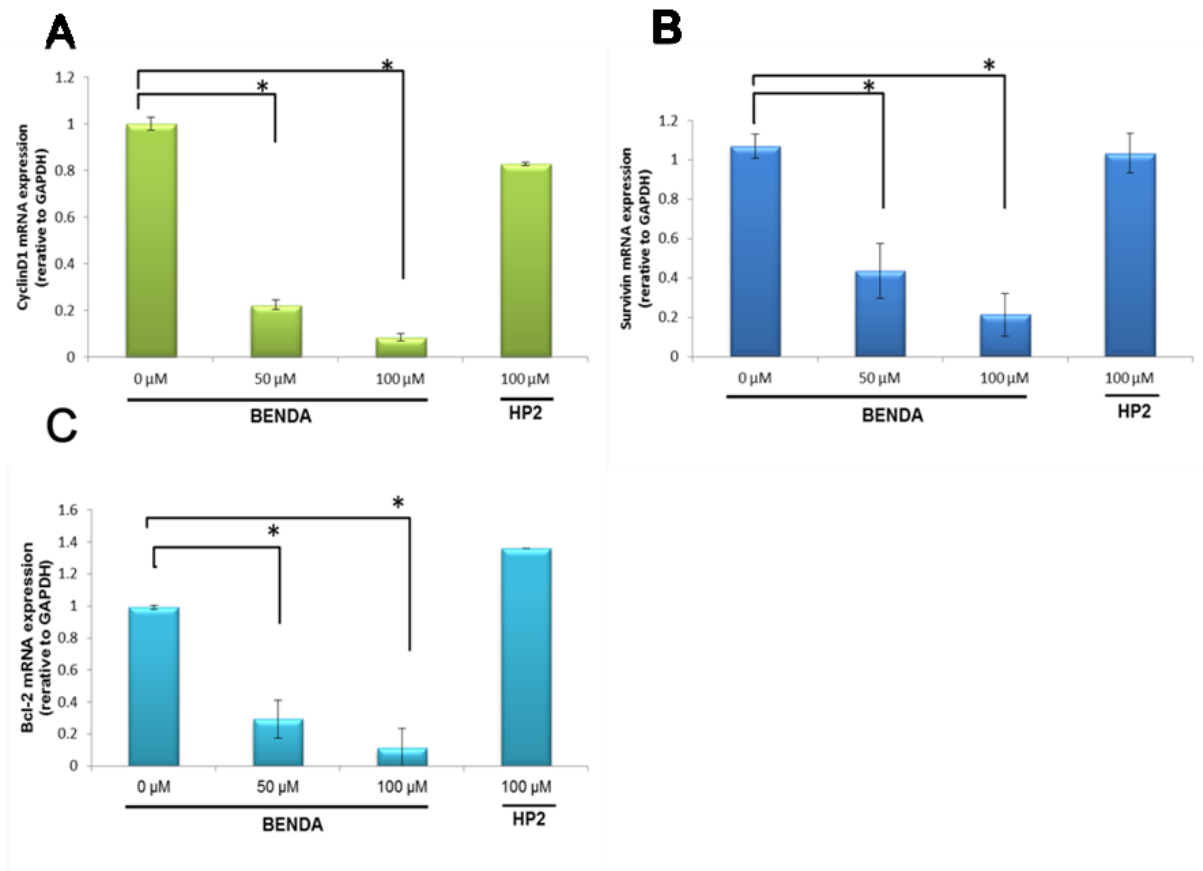


Figure 11. STAT3 標的遺伝子に対する BENDA の影響

BENDA 及び HP2 による、CyclinD1 (A)、Survivin (B) 及び Bcl2 (C) の mRNA の発現レベルの変化を評価した。MDA-MB-468 細胞に BENDA または HP2 を添加して 8 時間インキュベーションしたサンプルを用い、定量 PCR 法を実施した。Vehicle のシグナルを 100% として各濃度における mRNA 発現レベルを算出した。各濃度 $n = 3$ のデータの平均値を算出し、平均値をグラフにプロットした。標準偏差をエラーバーで示した。Student's t-test を用いて vehicle に対する有意差を検定した (* $P < 0.05$)。

2-2-7 STAT3 siRNA を用いた STAT3 依存的な細胞増殖の解析

リン酸化 STAT3 が恒常的に発現し活性化している MDA-MB-468 細胞と MDA-MB-453 細胞の細胞増殖が STAT3 依存性かを検証するため、STAT3 siRNA を用いて細胞増殖抑制試験を行った。その結果、STAT3 siRNA によって MDA-MB-468 細胞の細胞増殖が 48.7% に抑制されたのに対し、MDA-MB453 細胞では細胞増殖について差はなかった (Figure 12A、B)。一方、STAT3 阻害以外の作用機序を有する、以下の既存抗がん物質である Epirubicin (DNA と複合体を形成して阻害する。)、Canptohecin (I 型 DNA トポイソメラーゼを阻害する。)、Taxol (微小管蛋白重合を

促進し、紡錘体の機能を障害する。)を用いて、MDA-MB-468細胞とMDA-MB-453細胞に対する細胞増殖阻害を評価した。その結果、いずれの化合物もBENDAと異なりMDA-MB-468に対する選択的な細胞増殖阻害活性は認められなかった(Figure 13)。これらの結果から、MDA-MB-468細胞の増殖はSTAT3に依存し、MDA-MB-453細胞の増殖はSTAT3に依存しないことが示された。

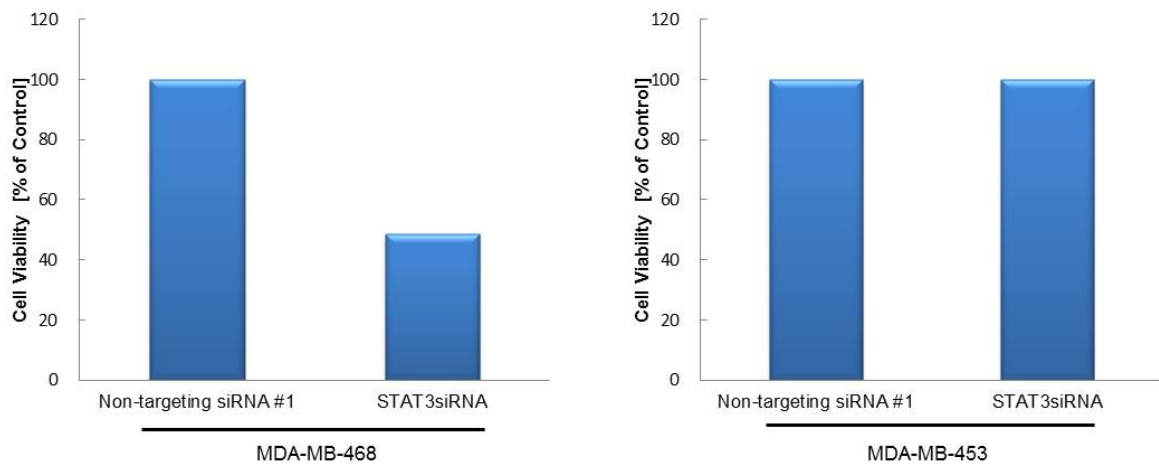


Figure 12. STAT3 siRNAのリン酸化STAT3高発現がん細胞に対する選択的増殖阻害

(A) MDA-MB-468細胞(リン酸化STAT3高発現)と(B)MDA-MB-453細胞(リン酸化STAT3低発現)にSTAT3 siRNA、Non-targeting siRNAをエレクトロポレーション法で導入し、72時間インキュベーションした後、細胞数を評価した。

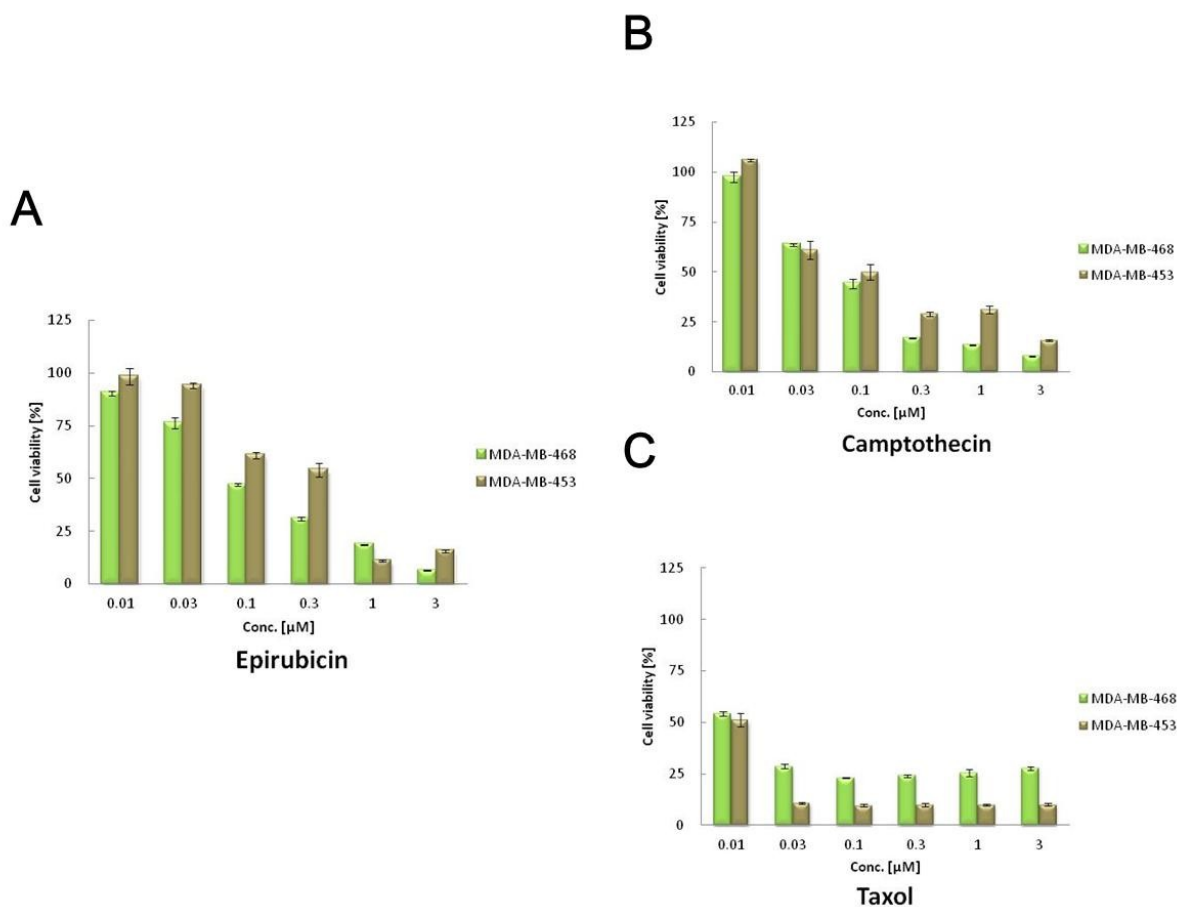


Figure 13. Epirubicin、Camptothecin 及び Taxol による MDA-MB-468 細胞及び MDA-MB-453 細胞に対する細胞増殖阻害

MDA-MB-468 細胞と MDA-MB-453 細胞を、Epirubicin、Camptothecin 及び Taxol で 24 時間処理し、細胞生存率を測定した。DMSO 存在下のシグナルを 100%とした相対値をプロットした。各濃度 $n = 3$ のデータの平均値を算出し、標準偏差をエラーバーで示した。

2-2-8 BENDA と HP2 によるリン酸化 STAT3 高発現がん細胞株に対する増殖阻害活性

STAT3 が恒常的に活性化するヒト乳がん細胞株に対して、BENDA の細胞増殖阻害作用を検証した。恒常的に STAT3 が活性化している細胞株である MDA-MB-468 細胞において、30 μM 及び 100 μM の BENDA 処理により、細胞生存率が 58.9%及び 24.3%に減少した。一方で、リン酸化 STAT3 低発現細胞株である MDA-MB-453 細胞では、30 μM 及び 100 μM の BENDA 処理により細胞生存率は、95.9%及び 81.8%でありほとんど減少はなかった (Figure 14)。以上より、BENDA は STAT3 依存的に増殖する MDA-MB-468 細胞に対して強い阻害増殖阻害を示し、また STAT3 非依存的な MDA-MB453 細胞に対してはほとんど増殖阻害活性を示さないことが明らかとなっ

た。このことから Epirubicin、Camptothecin 及び Taxol などの抗がん物質と異なり (Figure 13)、BENDA が STAT3 の機能を阻害することによって増殖阻害を示すことが示唆された。一方で、STAT3 阻害活性を示さない主代謝産物である HP2 の場合、両細胞に対して増殖阻害を示さなかった。

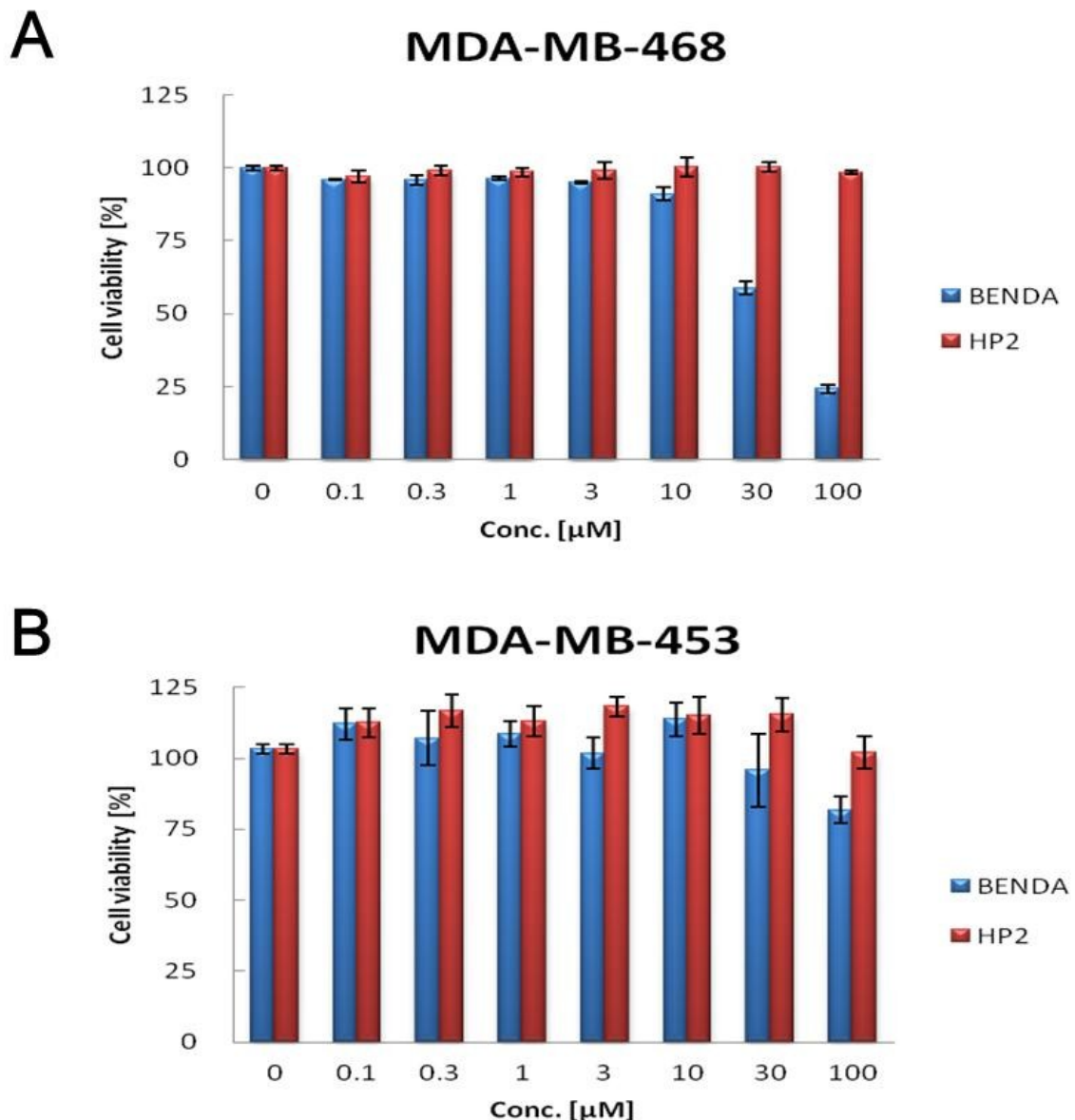


Figure 14. BENDA のリン酸化 STAT3 高発現がん細胞に対する選択的増殖阻害

MDA-MB-468 細胞 (リン酸化 STAT3 高発現) (A) と MDA-MB-453 細胞 (リン酸化 STAT3 低発現) (B) に BENDA または HP2 を添加し、48 時間インキュベーションした後、WST assays を行い細胞生存率を測定した。各濃度 $n = 3$ のデータの平均値を算出し、平均値をグラフにプロットした。標準偏差をエラーバーで示した。

2-3 考察

本章では STAT3 阻害に基づく BENDA の作用を、各種細胞アッセイ系を用いて解析した。細胞内 BENDA の解析用ツールとして Bio-BENDA を用いた。このプローブは BENDA の活性に対する影響を極力抑えるために、カルボン酸側に十分な長さのスペーサーを介してビオチンを結合させた分子プローブである。Bio-BENDA は BENDA と同程度の細胞増殖阻害活性を示すことから、細胞膜透過についても BENDA と同等と考えられる。このプローブを細胞株に接触させた後の免疫沈降物を解析した結果、本プローブは STAT3 に結合するが STAT1 にほとんど結合しなかった。この結合は界面活性剤を含む免疫沈降条件で解離しないことから、第一章の結果を併せて考えるとシステインとの共有結合複合体と考察される。また過剰量の BENDA 存在下でこの結合が阻害されることから BENDA と競合的であり、本プローブが BENDA 同様に STAT3 に結合していることが示唆された。

BENDA が細胞内 STAT3 の二量体化を阻害し、STAT3 によって発現誘導される遺伝子の発現を抑制したことから、BENDA が細胞内においても STAT3 に直接結合してその機能を阻害している可能性が考えられる。しかしながら、BENDA は STAT3 の Tyr705 のリン酸化を抑制した。Tyr705 は JAK 等のチロシンキナーゼによってリン酸化される部位であり、STAT3 の活性化に重要な部位である。この部位のリン酸化の阻害は、STAT3 の上流のチロシンキナーゼなどに対する何らかの作用を BENDA がもつ可能性を示唆しており、その可能性の排除はできない。一方、Stattic の場合、STAT3 の SH2 ドメインに結合することによってチロシンキナーゼへのリクルートが阻害される可能性も指摘されている [77]。したがって BENDA によるチロシンリン酸化阻害については今後さらなる解析が必要と考えられる。

STAT3 が恒常的に活性化しているがん細胞株として MDA-MB-468 細胞が一般的に用いられる。Figure 10C に示されているとおり、IL6 等の刺激なしでもリン酸化 STAT3 の発現が認められる。一方、MDA-MB-453 細胞ではリン酸化 STAT3 は発現していない。実際に siRNA を用いた実験 (Figure 12) から MDA-MB-468 細胞が STAT3 に依存して増殖することが検証された。また STX-0119 や Stattic や EriocalyxinB などの STAT3 阻害剤でも同様に MDA-MB-468 細胞選択的な細胞増殖阻害が報告されている [45、46、54]。STAT3 以外の作用機序を有する抗がん物質ではこのような選択毒性は認められなかった (Figure 13)。BENDA が MDA-MB-468 細胞選択的な細胞増殖阻害を示したことは、この化合物が STAT3 の機能を阻害していることを示唆している。また興味深いことに、BENDA の細胞周期に対する作用の解析結果から、この

化合物が二相性の細胞周期停止作用を有することが報告されている。具体的には、**HeLa** 細胞（子宮頸がん細胞）、**BXPC3** 細胞（膵臓腺癌細胞）、**MCF7** 細胞（乳がん細胞）、**OVCAR 5** 細胞（卵巣がん細胞）や **U2932** 細胞（リンパ腫細胞）のなどの多くのがん細胞を用いた場合 **BENDA** は **50 μM** などの低濃度域では **G2** 期で、**200 μM** などの高濃度域では **S** 期で細胞周期を停止させることが報告されている [83]。使用している細胞株や解析方法が異なるため比較はできないが、その二相性は **BENDA** による **DNA** アルキル化作用と **STAT3** 阻害のデュアルな作用に起因するかもしれない。すなわち、**STAT3** 阻害により **G2** 期の停止 [86]、あるいは **DNA** アルキル化作用により **DNA** 合成が阻害され **S** 期の停止が、**BENDA** によって誘導されていると推察される。

無細胞系と細胞系で **BENDA** の **IC₅₀** 値が 10 倍程度異なるのは **BENDA** の物理化学的性質、安定性、溶解性が影響している可能性が考えられる。無細胞系では **0.2 mM** の **Cysteine** や **2-mercaptoethanol** で **BENDA** の阻害活性が抑制されたことから、細胞系では、がん細胞におけるグルタチオンが **BENDA** の阻害活性に影響している可能性が考えられる。**BENDA** の水溶液中での不安定性からより高濃度 **BENDA** 処理を必要とする可能性も考えられる。前章で述べたとおり、**BENDA** 投与後の最高血中濃度が約 **15.2 μM**（非ホジキンリンパ腫）であり、乳がん細胞株に対する増殖抑制活性はこの濃度に比べて高めである。固形腫瘍の場合の腫瘍内濃度に関する報告がないため、**MDA-MB-468** などの乳がん細胞株を用いた本実験系での濃度域が妥当かどうかは議論の余地がある。細胞増殖阻害試験において **BENDA** の **IC₅₀** 値はリンパ性白血病由来細胞や骨髄性白血病由来細胞では **10 μM** から **60 μM** と報告されている [82]。したがって今後はより感受性の高いリンパ性白血病細胞株などを用いた解析が必要と考えられる。

転写因子 **ELISA** 法では、**BENDA** 処理後の **MDA-MB-468** 細胞の核抽出液を用いた評価を実施した。**STAT3** のコンセンサス配列への結合能を検討した結果、当結合阻害における阻害濃度は全体的に細胞増殖阻害試験での値より高かった。しかし、**TransAM ELISA kit** で用いる核抽出液には **STAT3** 以外にも非特異的にコンセンサス配列に結合するバックグラウンドが含まれることが考えられ、そのバックグラウンドが見た目の阻害濃度を高くしていることが考えられる。そこで、バックグラウンドを示すため核抽出液を加熱処理した **Heat denatured NE** を示した。**Heat denatured NE** の値は約 **30%**を示しており、このことから全体の約 **30%**がバックグラウンドであると考えら

れ、そのことを考慮に入れると転写因子 **ELISA** 法と細胞増殖阻害試験で得られる阻害濃度は概ね同じと考えられる。

BENDA は低悪性度 **B** 細胞性非ホジキンリンパ腫やマントル細胞リンパ腫の血液がんで承認されており、乳がん等の固形腫瘍への使用は承認されていない。本研究では実験モデルとして一般的に **STAT3** 阻害剤研究で用いられている乳がん細胞株を用いた。今後はリンパ腫での作用の解析が重要である。また **STAT3** の活性化状態が感受性因子として重要であれば、将来的には **BENDA** の治療効果予測のための生物学的指標すなわちバイオマーカーとしても期待される。

2-4 小括

本章では第 1 章の無細胞系での実験結果を基に、ビオチン化 BENDA を用いてがん細胞内 STAT3 と BENDA の相互作用及び BENDA によるがん細胞内 STAT3 の機能阻害に関する解析を行った。

STAT3 が恒常的に活性化しているヒト乳がん細胞株 MDA-MB-468 細胞を用いて、Bio-BENDA 処理後の細胞抽出液でプルダウンアッセイを行った。その結果、Bio-BENDA は細胞内の STAT1 とは結合せず、STAT3 に対して強固に結合した。また、その結合は過剰量の BENDA の添加によって阻害され、HP2 では阻害されなかった。したがって細胞系においても BENDA による STAT3 への結合には HN-2 構造が必要であり、BENDA はがん細胞内 STAT3 とシステインを介した共有結合複合体を形成していることが示唆された。

BENDA による STAT3 の二量体化阻害が、細胞内における JAK-STAT3 シグナル経路にどのような影響を与えるかを分子レベルで解明した。まず、FRET を用いて検証したところ、細胞内で BENDA が STAT3 の 2 量体化を阻害した。次に、転写因子 ELISA 法を用いて検証したところ BENDA が STAT3 のコンセンサス DNA ヌクレオチドへの結合を低下した。さらに、クロマチン免疫沈降法により STAT3 の c-myc のプロモーター部位への結合を検討したところ、BENDA の濃度依存的に c-myc プロモーター部位への STAT3 の結合が阻害され、mRNA レベル及びタンパク質レベルの両方で c-myc の顕著に減少することが確認された。さらに、c-myc 以外の STAT3 の標的遺伝子である CyclinD1、Survivin 及び Bcl2 の mRNA 量も減少した。以上の結果より、BENDA は細胞内の STAT3 に直接作用し、その転写因子としての機能を阻害することが示唆された。また、細胞増殖阻害試験では、STAT3 が恒常的に活性化している MDA-MB-468 細胞に対して BENDA は細胞増殖阻害効果を示したが、STAT3 阻害とは異なる作用機序を有する Epirubicin、Camptothecin 及び Taxol は、この細胞株の増殖を選択的に阻害しないことも示した。これらの結果から、活性型 STAT3 は BENDA の標的タンパク質だけでなく、BENDA の治療効果予測のためのバイオマーカーの候補としても考えられることを示した。以上の結果より、BENDA は細胞内で STAT3 に直接作用し二量体化を阻害することで、がん細胞内 STAT3 の機能阻害をしていることが示唆された。

総括

本研究ではリンパ腫など多くのがんで恒常的な活性化が報告されている転写制御因子 STAT3 に着目して、BENDA による STAT3 阻害作用の詳細を解明することを目的とした。

第 1 章では、BENDA は、STAT3 の SH2 ドメインを介したリン酸化チロシン含有ペプチドとの結合を濃度依存的かつ選択的に阻害した。また不活性型の代謝産物として知られる HP2 は阻害活性を示さなかった。よって、STAT3-SH2 に対する BENDA のアンタゴニスト活性には、HN-2 構造が重要であり、STAT3 に対して NH-2 を介した共有結合複合体を形成していることが推測された。さらにチオール基修飾蛍光物質を用いた競合実験から BENDA が STAT3 のシステイン残基に結合することが示唆された。そこで STAT3 の SH2 ドメイン及びその周辺のシステインをアラニンに置換した変異型 STAT3 を用いて、リン酸化チロシンペプチドとの結合阻害試験を行った。その結果、STAT3 の 550 番目、712 番目のシステインをアラニンに置換した変異体を用いた場合に、BENDA による阻害活性が減弱した。よって、BENDA は、これらのシステイン残基に共有結合することによって STAT3-SH2 ドメインの機能を阻害することが示唆された。以上の結果から、BENDA は STAT3 の 550 番目及び 712 番目のシステインに共有結合することで、STAT3-SH2 結合を介した STAT3 の二量体化を阻害することが示唆された。

第 2 章では、Bio-BENDA を用いて BENDA のがん細胞内 STAT3 と相互作用に関する解析を行った。STAT3 が恒常的に活性化しているヒト乳がん細胞株 MDA-MB-468 に競合条件で Bio-BENDA 処理しプルダウンアッセイを行った。その結果、Bio-BENDA は細胞内の STAT1 とは結合せず、STAT3 に対して強固に結合した。またその結合は過剰量の BENDA の添加によって阻害され、HP2 では阻害されなかった。したがって、BENDA による細胞内 STAT3 への結合には無細胞系同様に HN-2 構造が必要であり、STAT3 とシステインを介した共有結合複合体を形成していることが示唆された。次に、蛍光共鳴エネルギー移動法を用いて BENDA が細胞内で STAT3 の二量体化を阻害するか検証したところ、BENDA によって STAT3 の二量体化が阻害された。BENDA 処理後の MDA-MB-468 の核抽出液では、STAT3 のコンセンサス配列への結合能が低下した。また、クロマチン免疫沈降法により BENDA が STAT3 の c-myc 遺伝子プロモーターへの結合を阻害した。さらに BENDA は c-myc の mRNA とタンパク質のレベルを濃度依存的に低下させた。これらの結果から、BENDA は細

胞内 **STAT3** に直接作用して、その転写因子としての機能を阻害すると考えられる。また、ヒト乳がん細胞株を用い細胞増殖試験により、**BENDA** は **STAT3** が恒常的に活性化しているがん細胞株に対して、選択的に細胞増殖阻害を示した。したがって、活性型 **STAT3** は **BENDA** の標的タンパク質だけでなく、**BENDA** の治療効果予測のための生物学的指標すなわちバイオマーカーの候補としても考えられる。

以上、**BENDA** の新たな標的タンパク質候補として **STAT3** を同定し、またシステインを介した阻害機構の一部を明らかとした。本知見は、ベンダムスチンの優れた薬効を裏付けるものであり、将来的にはレスポンダーの選択や **STAT3** のシステインを標的とした新たな創薬コンセプトの提案 [84, 85] の一助となることが期待される。

謝辞

本研究において、終始懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜り、最高の研究環境を与えていただき、また研究だけでなく私生活や体調面にもお気遣いいただきました、静岡県立大学大学院薬学研究院教授浅井章良先生に心より感謝申し上げます。

本論文審査に際し、御指導、御助言を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院教授 鈴木隆先生、伊藤邦彦先生、橋本博先生に篤く御礼申し上げます。

本研究の遂行及び本論文の作成にあたり、終始御指導、御鞭撻を賜り、貴重な御助言をいただきました静岡県立大学大学院薬学研究院講師小郷尚久先生に深く感謝致します。折に触れ有益な御助言をいただきました同助教村岡大輔先生に心より感謝致します。本研究の遂行やデータ解析にあたり、多大なる御尽力をいただいた田口今日子氏をはじめ、たくさんの御助言と御激励のお言葉を頂きました静岡県立大学大学院薬学研究院創薬探索センターの諸兄に篤く御礼申し上げます。

また、貴重な化合物ライブラリーをいつも迅速に提供して頂いた静岡県環境衛生科学研究所安藤隆幸博士と大場舞博士に篤く御礼申し上げます。

最後に、叱咤激励をしてくださり、研究生活を全面的に支えてくださった両親をはじめ家族に心より感謝致します。

参考文献

- [1] Turkson J, Jove R. STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene*. 2000; 19(56):6613-6626.
- [2] Darnell JE Jr. Transcription factors as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(10):740-749.
- [3] Turkson J. STAT proteins as novel targets for cancer drug discovery. *Expert Opin Ther Targets*. 2004; 8(5):409-422.
- [4] Yu H, Jove R. The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(2):97-105.
- [5] Bowman T, Garcia R, Turkson J and Jove R. STAT in oncogenesis. *Oncogene*. 2000; 19(21):2474-2488.
- [6] Turkson J and Jove R. STAT Proteins: novel molecular target for cancer drug discovery *Oncogene*. 2000; 19(56):6613-6626.
- [7] James E.Darnell, Jr. Transcription factors as target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2(10):740-750.
- [8] Zhong Z, Wen Z, Darnell JE Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. 1994; 264(5155):95-98.
- [9] Mora LB, Buettner R, Seigne J, Diaz J, Ahmad N, Garcia R, Bowman T, Falcone R, Fairclough R, Cantor A, Muro-Cacho C, Livingston S, Karras J, Pow-Sang J, Jove R. Constitutive activation of Stat3 in human prostate tumors and cell lines: direct inhibition of Stat3 signaling induces apoptosis of prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2002; 62(22):6659-6666.
- [10] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(1):41-51
- [11] Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, Niu G, Kay H, Mulé J, Kerr WG, Jove R, Pardoll D and Yu H. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med*. 2005; 11(12):1314-1321.

- [12] Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, Yakata Y, Yoshizaki A, Inoue K, Nagayasu T, Sekine I. Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2006; 15(6):1445-1451.
- [13] Sinibaldi D, Wharton W, Turkson J, Bowman T, Pledger WJ and Jove R. Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene.* 2000; 19(48):5419-5427.
- [14] Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D, Wharton W, Pledger WJ, Sedivy JM, Irby R, Yeatman T, Courtneidge SA and Jove R. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(13):7319-7324.
- [15] Xu Q, Briggs J, Park S, Niu G, Kortylewski M, Zhang S, Gritsko T, Turkson J, Kay H, Semenza GL, Cheng JQ, Jove R and Yu H. Targeting Stat3 blocks both HIF-1 and VEGF expression induced by multiple oncogenic growth signaling pathways. *Oncogene.* 2005; 24(36):5552-5560.
- [16] Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R and Yu H. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene.* 2002; 21(13):2000-2008.
- [17] Gritsko T, Williams A, Turkson J, Kaneko S, Bowman T, Huang M, Nam S, Eweis I, Diaz N, Sullivan D, Yoder S, Enkemann S, Eschrich S, Lee JH, Beam CA, Cheng J, Minton S, Muro-Cacho CA and Jove R. Persistent activation of stat3 signaling induces survivin gene expression and confers resistance to apoptosis in human breast cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(1):11-19.
- [18] Karni R, Jove R, and Levitzki A. Inhibition of pp60c-Src reduces Bcl-XL expression and reverses the transformed phenotype of cells overexpressing EGF and HER-2 receptors. *Oncogene.* 1999; 18(33):4654-4662.
- [19] Luo C, Laaja P. Inhibitors of JAKs/STATs and the kinases: a possible new cluster of drugs. *Drug Discov Today.* 2004; 9(6):268–275.
- [20] James E Darnell, Jr. Transcription factors as target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(10):740-750.

- [21] Niu G, Heller R, Catlett-Falcone R, Coppola D, Jaroszeski M, Dalton W, Jove R, Yu H. Gene therapy with dominant-negative Stat3 suppresses growth of the murine melanoma B16 tumor in vivo. *Cancer Res.* 1999; 59(20):5059-5063.
- [22] Ling X, Arlinghaus RB. Knockdown of STAT3 expression by RNA interference inhibits the induction of breast tumors in immunocompetent mice. *Cancer Res.* 2005; 65(7):2532-2536.
- [23] Leong PL, Andrews GA, Johnson DE, Dyer KF, Xi S, Mai JC, Robbins PD, Gadiparthi S, Burke NA, Watkins SF, Grandis JR. Targeted inhibition of Stat3 with a decoy oligonucleotide abrogates head and neck cancer cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(7):4138-4143.
- [24] Hu Y, Hong Y, Xu Y, Liu P, Guo DH, Chen Y. Inhibition of the JAK/STAT pathway with ruxolitinib overcomes cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Apoptosis.* 2014; 19(11):1627-1636.
- [25] Rakesh K, Srivastava, Carl Y, Sasaki, J, Marie Hardwick, Dan L, Longo. Inhibition of Apoptosis by Blocking Nuclear Factor of Activated T Lymphocytes (Nfat)-Induced FAS Ligand Transcription. *J Exp Med.* 1999; 190(2): 253–266.
- [26] Kortylewski M, Kujawski M, Wang T, Wei S, Zhang S, Pilon-Thomas S, Niu G, Kay H, Mulé J, Kerr WG, Jove R, Pardoll D, Yu H. Inhibiting Stat3 signaling in the hematopoietic system elicits multicomponent antitumor immunity. *Nat Med.* 2005; 11(12):1314-1321.
- [27] Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol.* 2007; 7(1):41-51
- [28] Kortylewski M, Yu H. Role of Stat3 in suppressing anti-tumor immunity. *Curr Opin Immunol.* 2008;20(2):228-233.
- [29] Yu H, Pardoll D, Jove R. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9(11):798-809. .
- [30] Villarino AV, Kanno Y, O'Shea JJ. Mechanisms and consequences of Jak-STAT signaling in the immune system. *Nat Immunol.* 2017; 18(4):374-384.
- [31] Hu Y, Hong Y, Xu Y, Liu P, Guo DH, Chen Y. Inhibition of the JAK/STAT pathway with ruxolitinib overcomes cisplatin resistance in non-small-cell lung cancer. *Apoptosis.* 2014; 19(11):1627-1636

- [32] Scuto, A.; Krejci, P.; Popplewell, L.; Wu, J.; Wang, Y.; Kujawski, M.; Kowolik, C.; Xin, H.; Chen, L.; Kretzner, L.; et al. The novel JAK inhibitor AZD1480 blocks STAT3 and FGFR3 signaling, resulting in suppression of human myeloma cell growth and survival. *Leukemia*. 2011; 25(3):538–550.
- [33] Yan, S.; Li, Z.; Thiele, C.J. Inhibition of STAT3 with orally active JAK inhibitor, AZD1480, decreases tumor growth in Neuroblastoma and Pediatric Sarcomas in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2013; 4(3):433–445.
- [34] Gupta, S.C.; Phromnoi, K.; Aggarwal, B.B. Morin inhibits STAT3 tyrosine 705 phosphorylation in tumor cells through activation of protein tyrosine phosphatase SHP1. *Biochem Pharmacol*. 2013; 85(7):898–912.
- [35] Chen, Z.; Lee, F.Y.; Bhalla, K.N.; Wu, J. Potent inhibition of platelet-derived growth factor-induced responses in vascular smooth muscle cells by BMS-354825 (dasatinib). *Mol. Pharmacol*. 2006; 69(5):1527–1533.
- [36] Michels, S.; Trautmann, M.; Sievers, E.; Kindler, D.; Huss, S.; Renner, M.; Friedrichs, N.; Kirfel, J.; Steiner, S.; Endl, E.; et al. SRC signaling is crucial in the growth of synovial sarcoma cells. *Cancer Res*. 2013; 73(8):2518–2528.
- [37] Chang, A.Y.; Wang, M. Molecular mechanisms of action and potential biomarkers of growth inhibition of dasatinib (BMS-354825) on hepatocellular carcinoma cells. *BMC Cancer*. 2013; 13:267.
- [38] Premkumar, D.R.; Jane, E.P.; Agostino, N.R.; Scialabba, J.L.; Pollack, I.F. Dasatinib synergizes with JSI-124 to inhibit growth and migration and induce apoptosis of malignant human glioma cells. *J. Carcinog*. 2010; 14:9.
- [39] Rice, L.; Lepler, S.; Pampo, C.; Siemann, D.W. Impact of the SRC inhibitor dasatinib on the metastatic phenotype of human prostate cancer cells. *Clin. Exp. Metastasis*. 2012; 29(2):133–142.
- [40] Turkson J, Ryan D, Kim JS, Zhang Y, Chen Z, Haura E, Laudano A, Sebti S, Hamilton AD, Jove R. Phosphotyrosyl peptides block Stat3-mediated DNA binding activity, gene regulation, and cell transformation. *J Biol Chem*. 2001; 276(48):45443–45455.
- [41] Siddiquee KA, Gunning PT, Glenn M, Katt WP, Zhang S, Schrock C, Sebti SM, Jove R, Hamilton AD, Turkson J. An oxazole-based small-molecule Stat3 inhibitor

- modulates Stat3 stability and processing and induces antitumor cell effects. *ACS Chem Biol.* 2007; 2(12):787–798.
- [42] Pan Y, Zhou F, Zhang R, Claret FX. Stat3 inhibitor Stattic exhibits potent antitumor activity and induces chemo- and radio-sensitivity in nasopharyngeal carcinoma. *PLoS One.* 2013; 8(1):e54565.
- [43] Fletcher S, Page BD, Zhang X, Yue P, Li ZH, Sharmeen S, Singh J, Zhao W, Schimmer AD, Trudel S, Turkson J, Gunning PT. Antagonism of the Stat3-Stat3 protein dimer with salicylic acid based small molecules. *ChemMedChem.* 2011; 6(8):1459–1470.
- [44] Miyoshi K, Takaishi M, Nakajima K, Ikeda M, Kanda T, Tarutani M, Iiyama T, Asao N, DiGiovanni J, Sano S. Stat3 as a therapeutic target for the treatment of psoriasis: a clinical feasibility study with STA-21, a Stat3 inhibitor. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(1):108-117.
- [45] Schust J, Sperl B, Hollis A, Mayer TU, Berg T. Stattic: A small-molecule inhibitor of STAT3 activation and dimerization. *Chem Biol.* 2006; 13(11):1235–1242.
- [46] Yu Xiaokui, LiHe Peng Cao, Yu Qiang. Eriocalyxin B Inhibits STAT3 Signaling by Covalently Targeting STAT3 and Blocking Phosphorylation and Activation of STAT3. *PLoS One.* 2015;10(5):e0128406.
- [47] Don-Doncow N, Escobar Z, Johansson M, Kjellström S, Garcia V, Munoz E, et al. Galiellalactone is a direct inhibitor of the transcription factor STAT3 in prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2014; 289(23):15969-15978.
- [48] Shin DS, Kim HN, Shin KD, Yoon YJ, Kim SJ, Han DC, et al. Cryptotanshinone inhibits constitutive signal transducer and activator of transcription 3 function through blocking the dimerization in DU145 prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2009; 69(1):193–202.
- [49] Uehara Y, Mochizuki M, Matsuno K, Haino T, Asai A. Novel highthroughput screening system for identifying STAT3-SH2 antagonists. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 380(3):627–631.
- [50] Chongqiang Zhao, Wenlong Wang, Wenying Yu, David Jou, Yina Wang, Haiyan Ma, et al. A novel small molecule STAT3 inhibitor, LY5, inhibits cell viability, colony formation, and migration of colon and liver cancer cells. *Oncotarget.* 2016; 7(11): 12917–12926.

- [51] Turkson J, Zhang S, Palmer J, Kay H, Stanko J, Mora LB, Sebti S, Yu H, Jove R. Inhibition of constitutive signal transducer and activator of transcription 3 activation by novel platinum complexes with potent antitumor activity. *Mol Cancer Ther.* 2004; 3(12):1533-1542.
- [52] Don-Doncow N, Escobar Z, Johansson M, Kjellström S, Garcia V, Munoz E, Sterner O, Bjartell A, Hellsten R. Galiellalactone Is a Direct Inhibitor of the Transcription Factor STAT3 in Prostate Cancer Cells. *J Biol Chem.* 2014; 289(23):15969-15978.
- [53] Takakuma K, Ogo N, Uehara Y, Takahashi S, Miyoshi N, Asai A. Novel multiplexed assay for identifying SH2 domain antagonists of STAT family proteins. *PLoS One.* 2013; 8(8):e71646.
- [54] Matsuno K, Masuda Y, Uehara Y, Sato H, Muroya A, Takahashi O, Yokotagawa T, Furuya T, Okawara T, Otsuka M, Ogo N, Ashizawa T, Oshita C, Tai S, Ishii H, Akiyama Y, Asai A. Identification of a New Series of STAT3 Inhibitors by Virtual Screening. *ACS Med Chem Lett.* 2010; 1(8):371-375.
- [55] Ashizawa T, Miyata H, Ishii H, Oshita C, Matsuno K, Masuda Y, Furuya T, Okawara T, Otsuka M, Ogo N, Asai A, Akiyama Y. Antitumor activity of a novel small molecule STAT3 inhibitor against a human lymphoma cell line with high STAT3 activation. *Int J Oncol.* 2011; 38(5):1245-1252.
- [56] Ashizawa T, Akiyama Y, Miyata H, Iizuka A, Komiyama M, Kume A, Omiya M, Sugino T, Asai A, Hayashi N, Mitsuya K, Nakasu Y, Yamaguchi K. Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of a temozolomide-resistant glioblastoma cell line. *Int J Oncol.* 2014; 45(1):411-418.
- [57] Ashizawa T, Miyata H, Iizuka A, Komiyama M, Oshita C, Kume A, Nogami M, Yagoto M, Ito I, Oishi T, Watanabe R, Mitsuya K, Matsuno K, Furuya T, Okawara T, Otsuka M, Ogo N, Asai A, Nakasu Y, Yamaguchi K, Akiyama Y. Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of cancer stem-like cells derived from recurrent glioblastoma. *Int J Oncol.* 2013; 43(1):219-227.
- [58] Miyata H, Ashizawa T, Iizuka A, Kondou R, Nonomura C, Sugino T, Urakami K, Asai A, Hayashi N, Mitsuya K, Nakasu Y, Yamaguchi K, Akiyama Y. Combination of a STAT3 Inhibitor and an mTOR Inhibitor Against a Temozolomide-resistant Glioblastoma Cell Line. *Cancer Genomics Proteomics.* 2017; 14(1):83-91.

- [59]** Friedberg JW, Cohen P, Chen L, et al. Bendamustine in patients with rituximab-refractory indolent and transformed non-Hodgkin's lymphoma: results from a phase II multicenter, single-agent study. *J Clin Oncol*. 2008; 26(2):204-210.
- [60]** Rummel MJ. Bendamustine plus rituximab is effective and has a favorable toxicity profile in the treatment of mantle cell and low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol*. 2005; 23(15):3383- 3389.
- [61]** Bergmann MA. Efficacy of bendamustine in patients with relapsed or refractory chronic lymphocytic leukemia: results of a phase I/II study of the German CLL Study Group. *Haematologica*. 2006; 90(10):1357-1364.
- [62]** Knop S, Straka C, Haen M, Schwedes R, Hebart H, Einsele H. The efficacy and toxicity of bendamustine in recurrent multiple myeloma after high-dose chemotherapy. *Haematologica*. 2005; 90(9):1287-1288.
- [63]** Ponisch W, Mitrou PS, Merkle K, et al. Treatment of bendamustine and prednisone in patients with newly diagnosed multiple myeloma results in superior complete response rate, prolonged time to treatment failure and improved quality of life compared to treatment with melphalan and prednisone: a randomized phase III study of the East German Study Group of Hematology and Oncology (OSHO) . *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006; 132(4):205-212.
- [64]** von Minckwitz G, Chernozemsky I, Sirakova L, et al. Bendamustine prolongs progression-free survival in metastatic breast cancer (MBC): a phase III prospective, randomized, multicenter trial of bendamustine hydrochloride, methotrexate and 5-fluorouracil (BMF) versus cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil (CMF) as first-line treatment of MBC. *Anticancer Drugs*. 2005; 16(8):871-877.
- [65]** Schmittel A. Phase II trial of second-line bendamustine chemotherapy in relapsed small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*. 2007; 55(1):109-113.
- [66]** Koster W. Phase II trial with carboplatin and bendamustine in patients with extensive stage small-cell lung cancer. *J Thoracic Oncol*. 2007; 2(4):312-316.
- [67]** Ozegowski, W.K.D., Krebs, D. IMET, 3393, (-[1-Methyl-5-bis-(chloroethyl)-amino-benzimidazolyl-(2)]-butyric acid

- hydrochloride, a new cytostatic agent from among the series of benzimidazole mustard compounds. *Zbl Pharm.* 1971; 110:1013–1019.
- [68] Woolley DW. Some biological effects produced by benzimidazole and their reversal by purines. *J Biol Chem.* 1944; 152:225-232.
- [69] Hirschberg E, Gellhorn A, Gump WS. Laboratory evaluation of a new nitrogen mustard, 2-[di-(2-chlorethyl) aminomethyl] benzimidazole and of other 2-chlorethyl compounds. *Cancer Res.* 1957; 17(9):904-910.
- [70] Hartmann M, Zimmer C. Investigation of cross-link formation in DNA by the alkylating cytostatic IMET 3106, 3393 and 3943. *Biochim Biophys Acta.* 1972; 287:386-389.
- [71] Dubbelman AC, Rosing H, Darwish M, D'Andrea D, Bond M, Hellriegel E, et al. Pharmacokinetics and excretion of ¹⁴C-bendamustine in patients with relapsed or refractory malignancy. *Drugs R&D.* 2013; 13(1):17–28.
- [72] Strumberg D, Harstrick A, Doll K, Hoffmann B, Seeber S. Bendamustine hydrochloride activity against doxorubicin-resistant human breast carcinoma cell lines. *Anticancer Drugs.* 1996; 7(4):415-421.
- [73] Nowak D, Boehrer S, Brieger A, et al. Upon drug induced apoptosis in lymphoma cells X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) translocates from the cytosol to the nucleus. *Leuk Lymphoma.* 2004; 45(7):1429-1436.
- [74] Chow KU, Nowak D, Boehrer S, et al. Synergistic effects of chemotherapeutic drugs in lymphoma cells are associated with down-regulation of inhibitor of apoptosis proteins (IAPs), prostate-apoptosis-response-gene 4 (Par-4), death-associated protein (Daxx) and with enforced caspase activation. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66(5):711-724.
- [75] Lorenzo M, Leoni, Brandi Bailey, Jack Reifert, et al. Bendamustine (Treanda) Displays a Distinct Pattern of Cytotoxicity and Unique Mechanistic Features Compared with Other Alkylating Agents. *Clin Cancer Res.* 2008; 14(1):309-317.
- [76] Buettner R, Corzano R, Rashid R, Lin JP, Senthil M, Hedvat M, et al. Alkylation of Cysteine 468 in Stat3 Defines a Novel Site for Therapeutic Development. *Acs Chem Biol.* 2011; 6(5):432-43.

- [77] Heidelberg S, Zinzalla G, Antonow D, Essex S, Basu BP, Palmer J, et al. Investigation of the protein alkylation sites of the STAT3 : STAT3 inhibitor Stattic by mass spectrometry. *Bioorg Med Chem Lett*. 2013; 23(16):4719-4722
- [78] Don-Doncow N, Escobar Z, Johansson M, KjellstroÈm S, Garcia V, Munoz E, et al. Galiellalactone is a direct inhibitor of the transcription factor STAT3 in prostate cancer cells. *J Biol Chem*. 2014; 289(23):15969-15978.
- [79] Siddiquee K, Zhang S, Guida W, Blaskovich M, Greedy B, Lawrence H, et al. Selective chemical probe inhibitor of Stat3, identified through structure-based virtual screening, induces antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(8):7391-7396.
- [80] Owen JS, Melhem M, Passarell JA, D'Andrea D, Darwish M, Kahl B. Bendamustine pharmacokinetic profile and exposure-response relationships in patients with indolent non-Hodgkin's lymphoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010; 66(6):1039-1049.
- [81] Taldone T, Rodina A, Dagama Gomes EM, Riolo M, Patel HJ, Alonso-Sabadell R. et al. Synthesis and evaluation of cell-permeable biotinylated PU-H71 derivatives as tumor Hsp90 probes. *Beilstein J Org Chem*. 2013; 9:544-556.
- [82] Konstantinov SM, Kostovski A, Topashka-Ancheva M, Genova M, Berger MR. Cytotoxic efficacy of bendamustine in human leukemia and breast cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2002; 128(5):271-8.
- [83] Beeharry N, Rattner JB, Bellacosa A, Smith MR, Yen TJ. Dose Dependent Effects on Cell Cycle Checkpoints and DNA Repair by Bendamustine. *PLoS One*. 2012; 7(6) :e40342.
- [84] Visscher M, Arkin MR, Dansen TB. Covalent targeting of acquired cysteines in cancer. *Curr Opin Chem Biol*. 2016; 30:61-7.
- [85] Liu Q, Sabnis Y, Zhao Z, Zhang T, Buhrlage SJ, Jones LH, Gray NS. Developing irreversible inhibitors of the protein kinase cysSteinome. *Chem Biol*. 2013; 20(2):146-159.
- [86] Shao D, Ma J, Zhou C, Zhao JN, Li LL, Zhao TJ, Ai XL, Jiao P. STAT3 down-regulation induces mitochondria-dependent G2/M cell cycle arrest and apoptosis in oesophageal carcinoma cells. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2017; 44(3):413-420.