

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18457

研究課題名(和文) WNT-YAP/TAZ経路を阻害するドパミン受容体拮抗薬の大腸がん治療への応用

研究課題名(英文) Application of dopamine receptor antagonist inhibiting WNT-YAP/TAZ pathway for colon cancer treatment

研究代表者

奥 裕介 (Oku, Yusuke)

岩手医科大学・薬学部・講師

研究者番号：50626843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：WNT- カテニン経路阻害薬として独自に同定したドパミン受容体拮抗薬ピモジドを含む複数の化合物が、WNTによる転写活性化因子YAP/TAZの核移行を阻害することを見出した。YAP/TAZは、リソフォスファチン酸(LPA)などのGPCRリガンドによって各移行が促進されるが、ピモジド含むWNT- カテニン阻害剤は、LPAによるYAP/TAZの核移行を阻害しなかった。この結果は、同定したピモジドを含むWNT- カテニン阻害剤は、WNTに依存的なYAP/TAZの核移行を選択的に阻害することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：We originally identified WNT-beta catenin signal inhibitors including pimoziide, a dopamine receptor antagonist. In this study, we found that these WNT-beta catenin inhibitors inhibits the nuclear translocation of transcriptional co-activator YAP/TAZ by WNT. Nuclear translocation of YAP/TAZ is facilitated by lysophosphatidic acid (LAP). However, WNT-beta catenin inhibitors including pimoziide did not inhibit LAP-mediated nuclear translocation of YAP/TAZ. These results suggested that WNT-beta-catenin inhibitors which we identified preferentially inhibits WNT-mediated nuclear translocation of YAP/TAZ.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：YAP/TAZ がん分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

WNT 経路は体軸形成、幹細胞性の維持に必須の役割を果たすばかりでなく、大腸がんをはじめとするがんの増殖に寄与する。大腸がん治療薬として WNT 経路を阻害する化合物の同定が国内外でなされているが、臨床応用には至っていない。近年、国内外の研究グループにより、WNT 経路が転写活性化因子 YAP/TAZ を活性化し、がんの増殖を促進することが報告された。YAP/TAZ は、固形がんの増殖や、古典的な抗がん剤に対する耐性に関与する。近年では、YAP/TAZ は、分子標的薬耐性に関与することが知られている。

WNT 経路を活性化した大腸がんモデルマウスにおいて、YAP/TAZ の遺伝子欠損を誘導すると、腫瘍形成能が大きく低下することが明らかとなった。したがって、WNT 経路活性化型の大腸がんでは、下流で活性化する YAP/TAZ が、がんの増殖に重要な役割を果たしていると推測される。WNT 経路による YAP/TAZ の活性化 (以下、WNT-YAP/TAZ 経路) には、YAP/TAZ の制御系である Hippo 経路の構成因子である LATS1/2 キナーゼが関与することが報告されているが、 $\beta$ -カテニンの関与の有無など、分子機構については議論がある (図 1)。

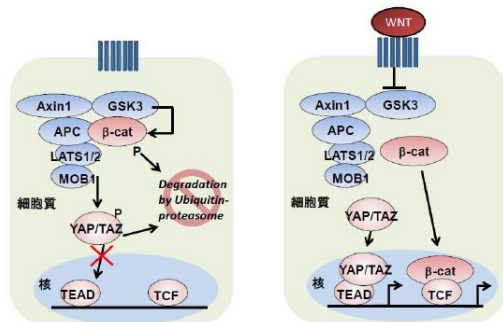


図 1. WNT による YAP/TAZ の活性化  
WNT が受容体に結合すると、GSK3 を含む複合体から YAP/TAZ が解離し、その核移行が促進される。これにより、YAP/TAZ に依存的な転写が活性化し、細胞増殖や薬剤耐性が誘導されると考えられている。

YAP/TAZ は大腸がんをはじめとするさまざまながんが高発現しており、治療標的として注目されつつある。申請者はこれまで YAP/TAZ の核移行を阻害する化合物を同定してきた。YAP/TAZ の核移行はアクチン細胞骨格の動態変化に強く影響を受けるため、得られた化合物はアクチン細胞骨格の変化を生じるものに限定されている。

申請者らの研究グループは、ゼブラフィッシュを用いた WNT 経路阻害剤のホールアニマルスクリーニング系を構築した。この系では、化合物の毒性と薬効を同時に評価可能である。本系を用いて、FDA 承認既存医薬品をス

クリーニングした結果、抗精神病薬に用いられるドパミン拮抗薬ピモジドが同定された。ピモジドは  $\beta$ -catenin 依存性の転写活性化を阻害し、大腸がん細胞の増殖を抑制した。申請者は、WNT 経路の活性化によって誘導される YAP/TAZ の蓄積と核移行を、ピモジドが阻害することを見出した。そこで申請者は、ピモジドが WNT-YAP/TAZ 経路の阻害を介して、WNT-YAP/TAZ 経路に依存するがんの増殖を抑制し、がんの治療薬候補として有用であるとの仮説に至った。

2. 研究の目的

本研究では、我々が独自に分離した WNT/カテニン経路阻害剤が、WNT に依存した YAP/TAZ の核移行を特異的に阻害するかを明らかにした。また、これら化合物の作用機序を探る目的で、遺伝子発現プロファイルを用いた作用機序予測を試みた。

さらに、本研究の過程で、YAP/TAZ が複数の細胞周期キナーゼ阻害剤に対する感受性に関与することを見出した。本研究では、YAP/TAZ の不活性化による細胞周期キナーゼ阻害剤に対する感受性化と、その応用の可能性を探った。

3. 研究の方法

HEK293A 細胞を、無血清下で一昼夜培養後、WNT/カテニン阻害剤を添加後、10 ng/ml Wnt3a または、10  $\mu$ M リゾフォスファチジン酸を添加し、western blot もしくは、YAP/TAZ 抗体を用いた免疫細胞染色を行い、YAP/TAZ の発現量及び核移行の阻害を評価した。

WNT/カテニン経路阻害剤の作用機序の予測のために、遺伝子発現プロファイルと、既存化合物処理時の遺伝子発現プロファイルと比較した。肺腺がん細胞株 PC-9 を、WNT/ベータカテニン経路阻害剤で処理し、total RNA を得た。RNA 量を、マイクロアレイを用いて相対定量し、がん研究所が作成した Connectivity scoring profile および、米国 Broad Institute が作成した Cmap を用いて、既知の化合物処理時の遺伝子発現プロファイルと、本研究で得られた遺伝子発現プロファイルと比較することで、WNT-カテニン経路阻害剤の作用機序予測を試みた。

YAP/TAZ の機能を明らかにする過程で、YAP/TAZ の機能不全が、細胞周期制御キナーゼ阻害剤に対する感受性に関与することを見出した YAP もしくは TAZ の siRNA により、YAP, TAZ の発現を抑制すると、WEE1 阻害剤 AZD1775 や Aurora-A 阻害剤 MLN8237 に対して、感受性化することを見出した。

4. 研究成果

当研究室ではゼブラフィッシュを用いた WNT 経路阻害剤のホールアニマルスクリーニング系を構築した。この系では、化合物の毒性と薬効を同時に評価可能である。本系を用いて同定されたピモジドを含む WNT- カテニン経路阻害活性を持つ複数の化合物が、WNT に依存的な YAP/TAZ の各移行を阻害することを明らかにした。この効果は、GPCR を介して YAP/TAZ の各移行を促進するリゾホスファチジン酸では見られなかった。したがって、WNT- カテニン経路阻害剤による YAP/TAZ の核移行の阻害は、WNT 選択的に生じることを明らかにした。

更に、これらの化合物の作用機序を予測する目的で、PC-9 細胞を、高濃度の化合物で処理し、マイクロアレイを用いて遺伝子発現プロファイルを得た。がん研究所が作成した Connectivity scoring profile および、米国 Broad Institute が作成した Cmap を用いて、既知の化合物処理時の遺伝子発現プロファイルと、本研究で得られた遺伝子発現プロファイルを比較することで、WNT- カテニン経路阻害剤の作用機序予測を試みた。その結果、WNT/ カテニン阻害剤で処理した細胞の遺伝子発現プロファイルと既知化合物処理時の遺伝子発現プロファイルの類似性は、WNT/ カテニン経路阻害剤間で共通していることがわかった。この結果は、WNT/ カテニン経路阻害剤群は、同様の作用機序を有することが示唆された。今後、本研究で得られた作用機序情報をもとに、我々が独自に同定した WNT/ カテニン経路阻害剤の作用機序およびこれらの薬剤による WNT 依存的な YAP/TAZ の機能阻害の機序を探る足がかりを得た。

YAP/TAZ は、大腸がんを始めとする様々な固形腫瘍の増殖だけでなく、殺細胞性抗がん剤耐性に関与することが報告されている。また、近年では、分子標的薬耐性に関与することが次々に報告されている。YAP/TAZ は、細胞周期制御に与る遺伝子の発現に関与することから、YAP/TAZ が細胞周期キナーゼを標的とする分子標的薬の感受性に関わる可能性を考えた。卵巣がん細胞株 OVCAR-8 で、YAP をノックダウンし、細胞周期制御キナーゼ阻害剤で処理して、コントロールと比較して増殖抑制が強く生じるものを探索した。その過程で、YAP/TAZ の不活性化が、オーロラ A キナーゼ阻害剤 MLN8237 や、WEE1 キナーゼ阻害剤 AZD1775 の感受性を導くことを見出した。YAP/TAZ をノックダウンすることにより、卵巣がん細胞株 OVCAR-8、乳がん細胞株 MDA-MB-231 が、これらの薬剤に感受性化した (図 2)。YAP/TAZ のノックダウンにより、これらの薬剤によるアポトーシスが増加することを見出した。

YAP または TAZ の不活性化は、オーロラ A の発現量を減少させること、MLN8237 は YAP の発現量を低下させることを見出した。また、YAP の不活性化は、DNA 損傷の蓄積と、DNA 修復に関わる FANCD2 や、その転写因子 E2F1 の

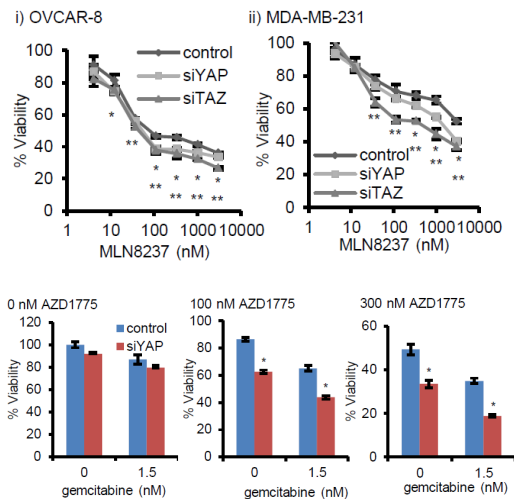


図 2. YAP/TAZ の不活性化は、オーロラ A キナーゼ阻害剤 MLN8237、WEE1 阻害剤 AZD1775 に対する感受性を導く。

OVCAR-8 細胞、MDA-MB-231 細胞において、YAP/TAZ を siRNA により MLN8237 または AZD1775 で 4 日間処理後、MIT アッセイにより生存率を調べた。AZD1775 は、ゲムシタピンと併用した。

YAP または TAZ のノックダウンにより、OVCAR-8 細胞、MDA-MB-231 細胞は、MLN8237 に感受性化し、YAP のノックダウンによって、OVCAR-8 細胞は、AZD1775 単剤、またはゲムシタピンとの併用に感受性化することを見出した。

(Oku et al *Anticancer Res* (2018), Oku et al. *FEBS Open Bio* (2018))

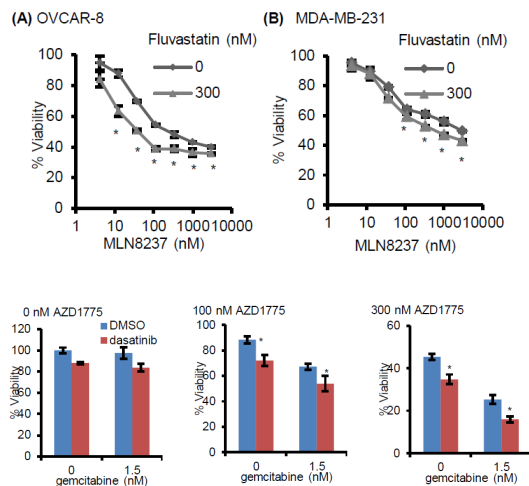


図 3. YAP/TAZ の不活性化を導くフルバスタチン及びダサチニブは、オーロラ A キナーゼ阻害剤 MLN8237、WEE1 阻害剤 AZD1775 に対する感受性を導く。

OVCAR-8 細胞、MDA-MB-231 細胞を、フルバスタチンと MLN8237、OVCAR-8 細胞をダサチニブと AZD1775-ゲムシタピンで 4 日間処理し、MIT アッセイによって生存率を調べた。

フルバスタチンは、YAP/TAZ のノックダウンと同様に、MLN8237 に対する感受性を高めた。また、ダサチニブは、YAP のノックダウンと同様に、AZD1775 単剤、またはゲムシタピンの併用に対して感受性を高めた。

(Oku et al *Anticancer Res* (2018), Oku et al. *FEBS Open Bio* (2018))

発現量を低下させた。  
また、YAP/TAZ の核移行を阻害するフルバスタチンや、ダサチニブは、MLN8237 や AZD1775 の効果を増強することを見出した。以上の結果は、YAP/TAZ の不活性化と、MLN8237 や AZD1775 を組み合わせることで、より治療効果が高まることを示唆している。また、フルバスタチン、ダサチニブとこれら薬剤との併用を新たなレジメンとして提唱できると考えられた(図3)。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Oku Y, Nishiya N, Sugiyama S, Sato H, Uehara Y. Sensitisation of Cancer Cells to MLN8237, an Aurora-A Inhibitor, by YAP/TAZ Inactivation. *Anticancer Res.* 2018 38(6):3471-3476.  
doi: 10.21873/anticancer.12617

Oku Y, Nishiya N, Tazawa T, Kobayashi T, Umezawa N, Sugawara Y, Uehara Y. Augmentation of the therapeutic efficacy of WEE1 kinase inhibitor AZD1775 by inhibiting the YAP-E2F1-DNA damage response pathway axis. *FEBS Open Bio.* 2018 8(6):1001-1012.  
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.12440>

奥裕介、西谷直之、上原至雅、がん遺伝子産物 YAP による Aurora-A kinase 阻害剤 MLN8237 (alisertib) 耐性の付与。第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会 (別府)、2016 年 5 月 31 日 ポスター発表

西谷直之、奥裕介、上原至雅。EGFR-TKI による副作用のモデル化と毒性緩和の分子戦略。第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会 (別府)、2016 年 5 月 31 日 ポスター発表。

奥裕介、西谷直之、上原至雅、がん遺伝子産物 YAP/TAZ の不活性化は、卵巣がん細胞を Aurora-A 阻害剤に感受性化する。第 75 回日本がん学会学術総会 (横浜)、2016 年 10 月 7 日、ポスター発表

奥裕介、西谷直之、上原至雅。がん遺伝子産物 YAP の不活性化は、Wee1 キナーゼ阻害剤 AZD1775 に対する感受性を導く。第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会。2017 年

西谷直之、奥裕介、上原至雅。EGFR-TKI の副作用を回避する化合物の表現型基盤探索。第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会。2017 年。

福田 勉、石橋 郁人、岩尾 正倫、奥 裕介、西谷 直之、上原 至雅、旦 慎吾、矢守 隆夫。L858R/T790M/C797S 変異に有効な EGFR チロシ

ンキナーゼ阻害剤。第 76 回日本癌学会学術総会。2017 年

Yusuke Oku, Naoyuki Nishiya, Yoshimasa Uehara. Inactivation of YAP sensitizes ovarian cancer cells to MLN8237, an Aurora-A inhibitor, through p73-dependent apoptosis. 第 76 回日本癌学会学術総会。2017 年

Naoyuki Nishiya, Yusuke Oku, Yoshimasa Uehara. Chemical suppression of adverse effects induced by EGFR tyrosine kinase inhibitors. 第 76 回日本癌学会学術総会。2017 年

[雑誌論文](計 2 件)

[学会発表](計 8 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥 裕介 (Yusuke Oku)

岩手医科大学・薬学部・講師

研究者番号: 50625843