

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460069

研究課題名(和文) 非プロテアソーム系  $\beta$ -catenin分解を誘導する化合物群の分子標的基盤研究

研究課題名(英文) Molecular action mechanisms of chemical compounds that induce non-proteasomal degradation of beta-catenin

研究代表者

西谷 直之(Nishiya, Naoyuki)

岩手医科大学・薬学部・講師

研究者番号：10286867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt/ $\beta$ -カテニン経路は、多くの悪性腫瘍で活性化するシグナルで創薬標的として魅力的な経路である。本研究では、申請者らが同定したIMU14とその誘導体によるWnt経路阻害機構の解明を試みた。主に、「IMU化合物は、本来のプロテアソーム系による $\beta$ -カテニンの分解を、リソソーム系にスイッチしてWntシグナルを抑制する。」という仮説の検証をおこなった。また、APCMin/+マウスのデキストラン硫酸誘導性大腸腫瘍モデルを用い、IMU誘導体による抗腫瘍作用を解析した。

研究成果の概要(英文)：Abnormal activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway observed in malignant tumors has been an attractive target pathway for anticancer therapeutics. In the present study, we studied action mechanism of IMU14 derivatives that we identified as inhibitors of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. We hypothesized that IMU compounds switch proteasomal  $\beta$ -catenin degradation to lysosomal proteolysis, and verified the hypothesis. In addition to in vitro studies, antitumor activity of an IMU compound was analyzed in a dextran sulfate-induced colorectal tumor model in APCMin/+ mice.

研究分野：生物系薬学

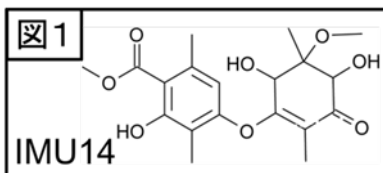
キーワード：がん シグナル伝達 分子標的薬

1. 研究開始当初の背景

分子標的治療薬が特定のがんに奏効しており、国民の抗がん剤開発への期待が高まっている。他方、抗がん剤開発では、副作用や個体レベルでの効果消失などの理由で開発を断念する確率が高く、抗がん剤開発の遅延やコスト引き上げの要因となっている。そこで、申請者は、抗がん剤の薬効評価と毒性予測を同時に行えるゼブラフィッシュ胚を用いた新規の *in vivo* 抗がん剤評価系を構築し、複数の Wnt/  $\beta$ -カテニン経路の阻害剤を同定してきた。

胚発生に重要なシグナル伝達系が、正常制御から逸脱して機能すると成体でがん化に寄与する。Wnt/  $\beta$ -カテニン経路はその典型である。モデル生物ゼブラフィッシュの胚で Wnt/  $\beta$ -カテニン経路が異常活性化されると、「眼の形成不全」などの表現型が観察される。そこで、(1)「眼の形成不全が正常に回復するか (Wnt/  $\beta$ -カテニン経路の阻害)」と(2)「化合物による新たな表現型 (副作用) が観察されないか」を指標に微生物由来の化合物をスクリーニングした結果、糸状菌由来の化合物 IMU14 (C19H24O8、分子量 380.4) が得られた (図1)。IMU14 とその誘導体は、眼の形成不全を正常に回復させることに加え、 $\beta$ -カテニン依存性のヒト大腸がん細胞の増殖も阻害した。

Wnt/  $\beta$ -カテニン経路を標的にした低分子化合物は複数報告されているが、非臨床試験を通過し臨床開発にまで到達しているものは2化合物のみである。その理由の一端は毒性発現によると考えられる。一方、我々の IMU14 誘導体は、既知の Wnt 阻害剤に比して低毒性かつ強力な活性を有するユニークな化合物である。



2. 研究の目的

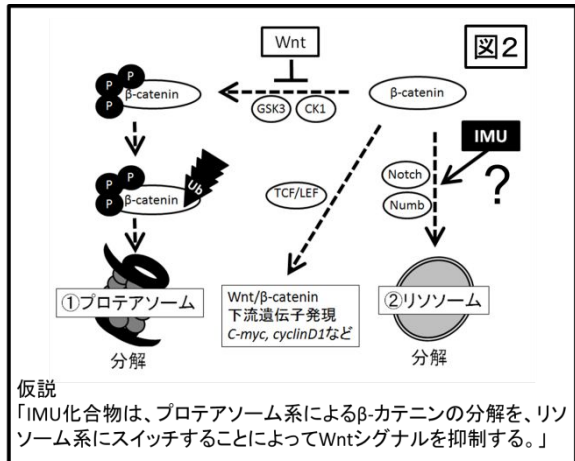
細胞質画分の  $\beta$ -カテニン量は、GSK3 などによるリン酸化に続くプロテアソーム系による分解によって制御されている (図2)。しかし、申請者は、プロテアソーム阻害剤存在下でも、IMU14 誘導体が非リン酸化  $\beta$ -カテニン量を減少させることを見出した。また、 $\beta$ -カテニンのリソソームによる分解を仲介する Notch と IMU14 誘導体が物理的に相互作用することも示した。さらに、自家蛍光性 IMU 誘導体は、細胞内小胞様構造に蓄積することも見出した。そこで、「IMU 化合物は、プロテアソーム系による  $\beta$ -カテニンの分解を、リソソーム系にスイッチすることによって Wnt シグナルを抑制する。」という仮説をたてた (図2)。本研究はこの仮説の検証を目的と

した。IMU 化合物の作用機構解明は、ゼブラフィッシュを用いた独自の薬効・副作用同時評価系を完成させる上でも重要な位置を占める。

【1】IMU 化合物誘導性  $\beta$ -カテニン分解系を同定する。

【2】  $\beta$ -カテニン分解誘導の分子機構を解析する。

【3】薬効と毒性について *in vivo* 検証実験を行う。



3. 研究の方法

【1】IMU 化合物誘導性  $\beta$ -カテニン分解系の同定

V 型プロトンポンプ阻害剤 concanamycin A によるリソソームの酸性化阻害が、IMU 化合物による Wnt/  $\beta$ -カテニン経路阻害活性に与える影響について検討した。プロテアソームやリソソーム以外の  $\beta$ -カテニン分解酵素として Caspase-3, 6, 8 などが知られている。これらの阻害剤も併せて用いた。薬剤処理した HEK293 細胞から細胞溶解液を調製し、ウェスタンブロットを行った。各種薬剤処理による  $\beta$ -カテニンレベルの変動を相対値として示した。

【2】  $\beta$ -カテニン分解誘導の分子機構の解析

$\beta$ -セクレターゼによるプロセッシングを受けない Notch が  $\beta$ -カテニンと直接結合し、エンドサイトーシスを介したリソソームによる  $\beta$ -カテニンの分解を誘導する経路が知られている。Notch の関与を明らかにするために、siRNA による Notch1/2 のノックダウンが、IMU 化合物誘導性  $\beta$ -カテニン分解を抑制するかを検討した。

Notch と  $\beta$ -カテニンの物理的相互作用の検討には、免疫沈降法を用いた。Notch1 deletion mutant 発現ベクターをトランスフェクトした HEK293 細胞を、IMU 化合物処理し、細胞溶解液を調製した。発現ベクター由来の Notch1 には、Myc タグが付加してあるため、

Myc に対する特異抗体を用いて免疫沈降を行った。沈降したタンパク質をウェスタンブロットによって解析した。

### 【3】薬効と低毒性についての *in vivo* 検証実験

正常な  $\beta$ -カテニン分解に必要な APC (adenomatous polyposis coli) 遺伝子に変異を有する APCMin/+マウスを用いた。このマウスは小腸腫瘍を自然発生するが、ヒトに見られる大腸腫瘍は生じない。しかし、2%デキストラン硫酸ナトリウムを1週間飲水投与すると、約1か月で大腸腫瘍を生じる。このモデルを用いて、IMU 化合物の薬効と毒性を評価した。

#### 4. 研究成果

##### 【1】IMU 化合物誘導性 $\beta$ -カテニン分解系の同定

IMU 誘導体由来する自家蛍光と蛍光性オルガネラマーカーとの2重染色を行った。IMU 化合物が蓄積するオルガネラは、少なくとも部分的にはリソソームマーカーの分布と一致していた。さらに、IMU 化合物処理によって、オルガネラの量やサイズに変化が見られるかについても検討したが、現在のところ際立った変化は認めていない。

V 型 ATPase 阻害剤である concanamycin A を用い、IMU 化合物の作用発現へのリソソーム系の関与を検討した。コントロールとして用いたプロテアソーム阻害剤 MG132 や pan-caspase 阻害剤 Z-VAD 存在化では、IMU 化合物による  $\beta$ -カテニンの分解が観察された。その一方で、concanamycin A 存在化では、

$\beta$ -カテニンの分解が観察されなくなった。したがって、IMU 化合物による  $\beta$ -カテニンの分解が、リソソームに依存することが示唆された (図3)。

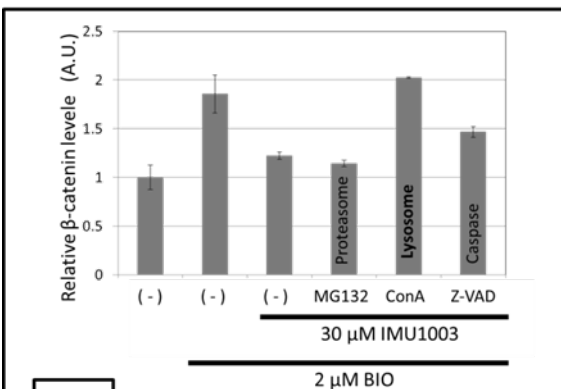


図3

Lysosome機能阻害によって、IMU1003の作用が打ち消された。MG132: proteasome阻害剤、Concanamycin A (ConA): lysosome阻害剤、Z-VAD: caspase阻害剤

##### 【2】 $\beta$ -カテニン分解誘導の分子機構の解析

膜タンパク質 Notch のエンドサイトーシス時に、 $\beta$ -カテニンのリソソームによる分解を誘導することが知られている (Kwon et al. Nat. Cell Bio. 2011)。これに加え、我々は、IMU 化合物が  $\beta$ -カテニンや Notch と物理的に相互作用すること明らかにしている。そこで、IMU 化合物による Wnt/ $\beta$ -カテニン経路の阻害への Notch の関与を想定し、siRNA による Notch のノックダウンによる IMU 化合物の薬効への影響を解析した。Notch1/2 ダブルノックダウンを行ったところ、IMU 化合物による  $\beta$ -カテニン/TCF 依存的転写活性化の抑制作用が減弱された (図4)。すなわち、IMU 化合物による Wnt/ $\beta$ -カテニン経路阻害は、Notch1/2 に依存することが示された。

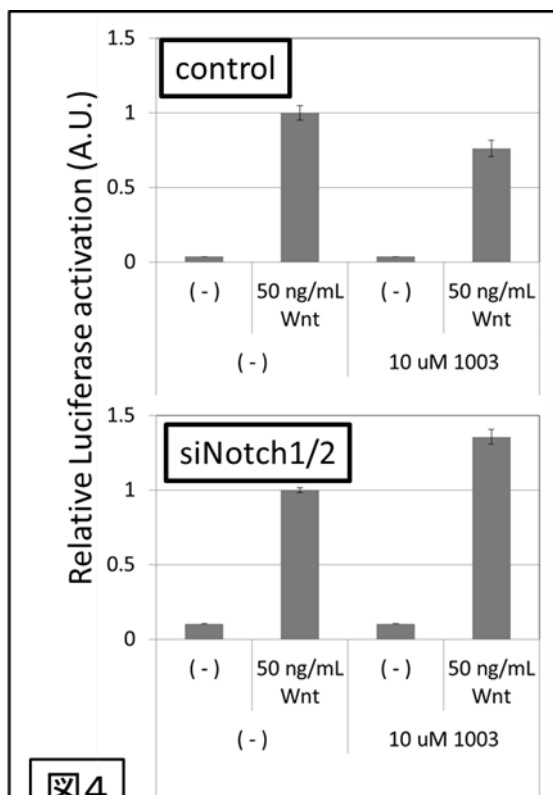


図4

Notch1/2ダブルノックダウンによって、IMU1003の作用が打ち消された。

IMU 化合物による  $\beta$ -カテニンと Notch1 との物理的相互作用への影響について検討した。Myc タグ付加 Notch1 変異体発現ベクターを用い、抗 Myc 抗体による免疫沈降を行った。共沈する  $\beta$ -カテニンをウェスタンブロットによって解析したところ、Notch1 細胞質領域と共沈する  $\beta$ -カテニン量が、IMU 化合物処理によって増加した (図5)。したがって、IMU 化合物は、 $\beta$ -カテニンと Notch1 間の結合を誘導し、Notch とリソソーム依存的に  $\beta$ -カテニンを分解すると考えられる。

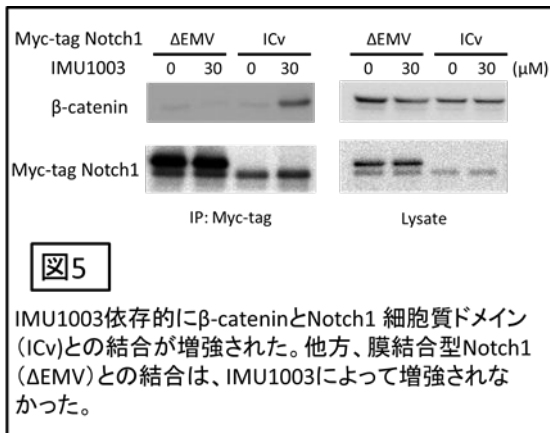


図5

IMU1003依存的にβ-cateninとNotch1細胞質ドメイン(ICv)との結合が増強された。他方、膜結合型Notch1(ΔEMV)との結合は、IMU1003によって増強されなかった。

### 【3】薬効と低毒性についての *in vivo* 検証実験

IMU14誘導体54化合物を創成し構造活性相関解析を行った。これらの誘導体のうち、IMU1003をはじめとする8誘導体が比較的高いWnt/-カテニン経路阻害活性を維持していた。

ApcMin/+マウスを用いたデキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸腫瘍モデルへ、IMU1003を30 mg/kgで連日腹腔内投与した。その結果、コントロールに比較してIMU1003投与群では、発生腫瘍数や腫瘍サイズが有意に減少した(図6)。また、体重減少や主要臓器への目立った毒性は観察されなかった。したがって、IMU1003は、低毒性で、-カテニン依存性腫瘍に対して抗腫瘍効果が期待できるリード化合物と考えられる。本研究を通して、独自のゼブラフィッシュを用いた評価系が、低毒性なWnt/-カテニン経路阻害剤探索系として有用であることが示された。

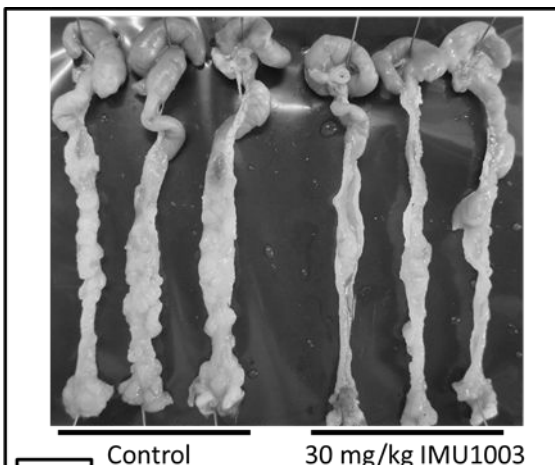


図6

IMU1003腹腔投与によって、ApcMin/+マウスにおけるデキストラン硫酸ナトリウム誘導性大腸腫瘍の発生が抑制された。

## 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)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Oku, Y., Nishiya, N., Shito, T., Yamamoto, R., Yamamoto, Y., Oyama, C., Uehara, Y. Small molecules inhibiting the nuclear localization of YAP/TAZ for chemotherapeutics and chemosensitizers against breast cancers. *FEBS Open Bio.*, 5, 542-549 (2015) DOI: 10.1016/j.fob.2015.06.007. 査読有

Nishiya, N. Chemical modifier screenings as methods for identifying pathway-targeting compounds and for predicting drug-drug interactions. *Organic Chem. Curr. Res.*, 3:128. (2014) DOI:10.4172/2161-0401.1000128. 査読有

Nishiya, N., Oku, Y., Kumagai, Y., Sato, Y., Yamaguchi, E., Sasaki, A., Shoji, M., Ohnishi, Y., Okamoto, H., Uehara, Y. A Zebrafish Chemical Suppressor Screening Identifies Small Molecule Inhibitors of the Wnt/-catenin Pathway. *Chem. Biol.*, 査読有, 21, 530-540 (2014) DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.02.015. 査読有

Oku, Y., Tareyanagi, C., Takaya, S., Osaka, S., Ujiie, H., Yoshida, K., Nishiya, N., Uehara, Y. Multimodal Effects of Small Molecule ROCK and LIMK Inhibitors on Mitosis, and Their Implication as Anti-Leukemia Agents., *PLoS One*, 9(3):e92402. (2014) DOI: 10.1371/journal.pone.0092402. 査読有

〔学会発表〕(計 21 件)

西谷直之「Wnt/-catenin経路に対するケミカルサプレッサーの探索」第136年会日本薬学会、横浜(2016年3月27日、会期:2016年3月26日~29日)招待講演

Uehara, Y., Oku, Y., Tsuda, K., Shibasaki, M., Maesawa, C., Nishiya, N. Self-floating cell populations express breast cancer stem cell markers and show resistance to anticancer drugs. AACR-JCA Joint Conference, Maui, Hawaii (2016年2月19日、会期 2016年2月16~20日)

河野富一, 西谷直之「Wntシグナル阻害活性を有するアリアルプロピン酸誘導体の合成と構造活性相関」第33回メディスナルケミストリーシンポジウム 幕張(2015年11月25日、会期2015年11月25~27日)

Oku, Y., Nishiya, N., Uehara, Y. Self-floating cell populations express cancer stem markers and show resistance to anticancer drugs. 2015日本癌学会 第74回総会 名古屋(2015年10月10日、会期:10月8-10日)

Nishiya, N., Oku, Y., Uehara, Y. An antiparasitic ivermectin inhibits Wnt/beta-catenin signaling and blocks proliferation of colorectal cancer cells. 2015日本癌学会 第74回総会 名古屋(2015年10月8日、会期:10月8-10日)

工藤紫乃、堀籠宏稀、奥 裕介、上原至雅、西谷直之「イベルメクチンによるWnt/beta-catenin経路の阻害とその作用機序の解析」第54回日本薬学会東北支部大会 矢巾(2015年9月26日、会期:9月26日)

小川真実、片山綜太、清水優依、奥 裕介、上原至雅、西谷直之「アゾール系抗真菌薬によるWnt/beta-catenin経路阻害の作用機序の解析」第54回日本薬学会東北支部大会 矢巾(2015年9月26日、会期:9月26日)

奥 裕介、西谷直之、上原至雅「がん幹細胞様細胞集団を濃縮する自発的浮遊培養法」第54回日本薬学会東北支部大会 矢巾(2015年9月26日、会期:9月26日)

Nishiya, N., Oku, Y., Uehara, Y. Self-floating breast cancer cells elevate aldehyde dehydrogenase activity and show drug resistance. 2015 Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Stockholm, Sweden. (2015年6月25日、会期2015年6月24~27日)

Otsu, K., Oku, Y., Nishiya, N., Fujiwara, N., Harada, H. Regulation of stemness of dental epithelial stem cells by Rho signaling. 2015 Annual Meeting of the International Society for Stem Cell Research, Stockholm, Sweden. (2015年6月25日、会期2015年6月24~27日)

西谷直之、奥 裕介、上原至雅「アゾール系抗真菌薬によるWnt/beta-catenin経路阻害を介した抗腫瘍活性」第19回日本がん分子標的治療学会学術集会 松山(2015年6月11日、会期:6月10~12日)

西谷直之「ゼブラフィッシュの化学遺伝学を利用した抗がん剤シード探索と毒性予測」日本農芸化学会2015年度大会 シンポジウム 「異分野融合による天然物創薬~生理活性物質から医薬品シーズへ~」岡山

(2015年3月29日、会期:2015年3月26日~29日)招待講演

西谷直之、片山綜太、清水優依、小川真実、工藤紫乃、堀籠宏稀、奥 裕介、上原至雅「アゾール系抗真菌薬によるWnt/-catenin経路阻害作用」第135年会日本薬学会 神戸(2015年3月26日、会期:3月25~28日)

Nishiya, N., Oku, Y., Uehara, Y. A zebrafish chemical suppressor screening identifies antifungal azoles as inhibitors of the Wnt/beta-catenin pathway. 日本癌学会 第73回総会 横浜(2014年9月25日、会期:9月25-27日)

西谷直之「ゼブラフィッシュを用いた化学遺伝学と毒性予測」第46回日本臨床検査医学会東北支部総会・第25回日本臨床化学会東北支部総会(合同開催) 盛岡(2014年8月9日)招待講演

西谷直之、奥 裕介、上原至雅「アゾール系抗真菌薬によるWnt/-catenin経路への阻害効果」第18回日本がん分子標的治療学会学術集会 仙台(2014年6月26日、会期:6月25-27日)

西谷直之、奥 裕介、上原至雅「タンパク質脂質修飾酵素によるWnt/-cateninシグナルの制御」化学療法基盤支援活動第3回シンポジウム 名護(2014年5月12日、会期:5月12日)

Nishiya, N., Kawano, T., and Uehara, Y. 「A phenotype-based screening for chemical suppressors of the Wnt/beta-catenin pathway in zebrafish」The 18th Japanese Foundation for Cancer Research-International Symposium on Cancer Chemotherapy, Tokyo(2013年12月4-5日)招待講演

西谷直之、河野富一、上原至雅「ゼブラフィッシュ胚を用いたWnt/-catenin経路ケミカルスクリーニングの探索」日本薬学会生薬天然物部会主催・第5回食品薬学シンポジウム 京都大学(2013年11月2日)招待講演

Nishiya, N., Oku, Y., Uehara, Y. Geranylgeranyltransferase as a potential molecular target for Wnt/beta-catenin pathway inhibitors. 日本癌学会 第72回総会 横浜(2013年10月3日)

② 西谷直之、奥 裕介、上原至雅「ゲラニルゲラニルトランスフェラーゼ阻害剤によ

る -catenin核移行の阻害」第17回日本がん分子標的治療学会学術集会 京都（2013年6月13日）

〔図書〕（計 1件）

**西谷直之**「日本がん分子標的治療学会ボスター賞」JAMTTC News Letter 17 (2): 75 (2013)

〔産業財産権〕

出願状況（計 1件）

名称：Wntシグナル阻害  
発明者：**西谷直之**、上原至雅  
権利者：同上  
種類：特許  
番号：PCT/JP2014/067898  
出願年月日：2014年7月4日  
国内外の別：PCT

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西谷 直之（NISHIYA, Naoyuki）  
岩手医科大学・薬学部・講師  
研究者番号：10286867

##### (3) 連携研究者

河野 富一（KAWANO, Tomikazu）  
岩手医科大学・薬学部・教授  
研究者番号：30283807