

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07329

研究課題名(和文)mTORC構成因子Tel2を標的とした創薬の基盤構築

研究課題名(英文)Drug discovery for targeting an mTORC component

研究代表者

西谷 直之(Nishiya, Naoyuki)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：10286867

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):がん分子標的治療ではATP競合型キナーゼ阻害剤の躍進が著しいが、それに続く画期的な創薬のためには新たな治療標的の同定が重要な課題である。本研究開始時に、我々が同定したWnt/ β -cateninシグナル阻害剤(WSI)が、mTOR複合体(mTORC)構成因子の一つであるTel2に結合することを見出していた。Tel2はmTORCの安定化因子であり、その機能制御は新たな治療戦略になり得ると考えた。本研究では「WSIのTel2への結合が、mTORC機能を阻害し、Wnt/ β -cateninシグナル依存性細胞増殖を抑制する。」という作業仮説の検証を行い、新規治療標的としてのTel2の有用性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、画期的な新規創薬標的を提供するものであり、新たな創薬フロンティアを開拓する糸口となる。進行性腎細胞がんや神経内分泌腫瘍などのmTOR阻害薬が有効なアンメットメディカルニーズの高い疾患のための新たな治療選択の礎を築く。

研究成果の概要(英文):ATP competitive kinase inhibitors have shown remarkable progress in the molecular targeting therapy for cancers. However, the identification of the new therapeutic target has been an important issue for the epoch-making drug discovery. We found that our Wnt/ β -catenin signaling inhibitor (WSI) bound to a component of mTOR complex (mTORC), which is essential for mTORC functions. Therefore, we thought that pharmacological control of its function could become a new therapeutic strategy. In this study, we showed that WSI inhibited mTORC functions and controlled proliferation of cancer cells, and suggested usefulness of the component of mTORC as a new therapeutic target. This new target molecule may open up a next-generation drug discovery field.

研究分野：創薬科学

キーワード：mTOR Wnt 化合物 阻害薬

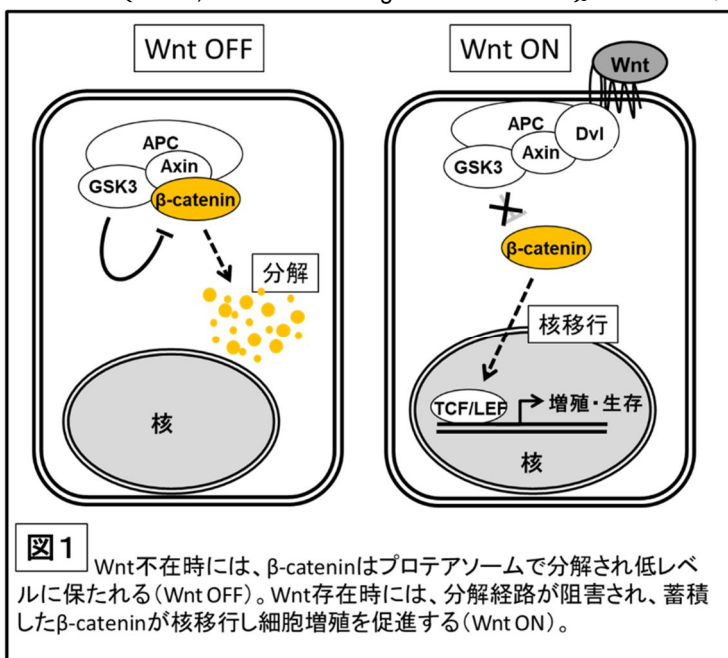
1. 研究開始当初の背景

Wnt/ β -catenin 経路阻害薬の魅力と課題

Wnt/ β -catenin 経路が、様々ながんの病態に寄与することが広く知られている (図 1)。抗悪性腫瘍活性を期待して、Wnt/ β -catenin 阻害剤の探索が世界中で行われていたが、研究開始当初は医薬品として承認されたものはなかった。また、現在もない。これまでの *in vitro* screening では、Wnt/ β -catenin 経路の多様な生体機能を加味することができず、思いもよらない副作用の発現が開発失敗の一因と考えられていた (Kahn, Nat. Rev. Drug Discov. 2014)。それらの失敗を受けて、モデル動物を用いた第二世代スクリーニングが注目されていた (Lu *et al.* Cancers 2016)。

独自のゼブラフィッシュ胚を用いた Wnt/ β -catenin 経路阻害剤スクリーニング

我々は、ゼブラフィッシュ胚を用いたユニークな探索系を用いて、継続的に胚発生に低毒性な Wnt/ β -catenin 経路阻害剤を多数同定してきた (Nishiya *et al.* Chem. Biol. 2014)。これらは、アゾール系抗真菌薬や合成化合物 IMU1003 などを含む多様な化合物群であり、マウス大腸がんモデルでは目立った毒性を示さずに抗腫瘍効果を示した。



mTORC 構成成分 Tel2 と Wnt/ β -catenin signaling inhibitor (WSI) の物理的相互作用

WSI 結合分子の質量分析によって、Telomere length regulation protein 2 (Tel2) \ Tel2-interacting protein 1/2 (Tti1/2) が同定された。Tel2 が WSI と特異的に結合することも示した。Tel2 は、Tti1/2 とともに mTORC1 および mTORC2 の構成成分となり、mTORC1/2 の安定化や機能発現に必須の因子である。(Laplante & Sabatini, Cell 2012, Kaizuka *et al.* J. Biol. Chem. 2010)。

2. 研究の目的

がん分子標的治療では ATP 競合型キナーゼ阻害薬の躍進が著しいが、それに続く画期的な創薬のためには新たな治療標的の同定が重要な課題である。最近、申請者らが Wnt/ β -catenin シグナル阻害剤として同定した WSI が、mTORC 構成因子の 1 つである Tel2 に結合することを見出した。Tel2 は mTORC の安定化因子であり、その機能制御は新たな治療戦略になり得る。FKBP12 を介したラパマイシン誘導体の mTOR 阻害と双璧をなす治療戦略になり得る。

本研究では「化合物による Tel2 の機能修飾が、mTORC 機能を阻害し、Wnt/ β -catenin シグナル依存性がん細胞の増殖を抑制する。」という作業仮説の検証を行い、新規治療標的としての Tel2 の有用性を明らかにすることを目的とする。本研究で例示する druggable な新規標的分子が、次代の創薬領域を開拓する糸口になると期待できる。

3. 研究の方法

下記の方法で、「化合物による Tel2 の機能修飾が、mTORC 機能を阻害し、Wnt/ β -catenin シグナル依存性がん細胞の増殖を抑制する。」という作業仮説を検証した。

低 WSI 親和性 Tel2 変異体の作成

以降の実験に用いる薬剤耐性 Tel2 変異体等のツールを作成した。まず、Tel2 の欠失変異体の発現系を構築し、WSI を共有結合させた磁性ビーズを用いて *in vitro* 結合実験を行った。結合活性に必要な領域を狭めて結合に必要な最小断片を同定し、WSI への親和性が低下した点変異体 (耐性 Tel2) を作成した。

変異体を用いた WSI 作用の検証

化合物による Wnt/ β -catenin 経路阻害が Tel2 との結合を介するかを明らかにするために、siRNA による Tel2 遺伝子ノックダウン、変異型 Tel2 の強制発現や再構成系を用いた。再構成系は、Tel2 ノックダウン細胞への耐性 Tel2 の再導入によって構築した。WSI の Wnt/ β -catenin 経路阻害作用への変異体の影響は、 β -catenin タンパク質レベル、 β -catenin/TCF 依存的転写活性、mTORC 下流因子である S6 キナーゼと AKT のリン酸化状態の変化を指標に評価した。転写活性はルシフェラーゼアッセイを用いて、リン酸化状態の評価はリン酸化体特異抗体を用いたウェスタンブロットを用いて評価した。

4. 研究成果

本研究開始当時、WSI 結合因子として Tel2 が同定されていたが、Tel2 の Wnt/ β -catenin シグナルへの機能的な関与についての情報が不足していた。そこで、まず、Wnt/ β -catenin シグナルへの関与を明らかにするために、siRNA による Tel2 遺伝子のノックダウンを行った。Tel2 タンパク質の生細胞中の半減期が長いこと、十分なタンパク質発現低下が観察されるのは siRNA トランスフェクション後 4 日程度を要することが明らかとなった。十分にノックダウンされる条件下で、 β -catenin タンパク質レベルをウェスタンブロットで評価したところ、細胞質画分の β -catenin タンパク質レベルが低下した。また、TCF 結合配列を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、siRNA によって Wnt 依存的な β -catenin/TCF 転写活性化能が低下した。

Tel2 の欠失変異体の哺乳類細胞発現系を構築し、WSI への結合活性に必要な領域を狭めて、C 末端側の α ヘリックス構造が重要であることを突き止めた。さらに、大腸菌の GST 融合タンパク質発現系を構築し、詳細に結合様式を解析した。上記の α ヘリックス内の極性アミノ酸残基を中心に site directed mutagenesis を行い、複数の点変異体を作成した。これらの WSI 磁性ビーズへの結合活性を *in vitro* 結合反応で評価した。 α ヘリックス内のリジン残基に変異を導入した変異体 (K 変異体) では、WSI への結合活性が著しく低下していた。

in vitro での結合活性評価に加えて、生細胞中の Tel2 と WSI の結合特異性について検討した。WSI にユビキチンリガーゼのリガンドであるレナリドミドまたはウベニメクスを共有結合して複数の PROTAC-WSI または SNIPER-WSI を作成した。これらは、WSI 結合タンパク質近傍にユビキチンリガーゼを引き寄せ、ユビキチン-プロテアソーム系による分解を引き起こす。したがって、PROTAC-WSI または SNIPER-WSI が Tel2 の分解を誘導するかを評価することによって、生細胞中の WSI と Tel2 間の結合を確認できる。今回作成したいずれの PROTAC-WSI も野生型 Tel2 の分解を誘導しなかった。一方、ウベニメクスを結合した 2 種類の SNIPER-WSI は、濃度依存的に野生型 Tel2 の分解を誘導した。その一方で、*in vitro* での WSI 結合親和性の低下した K 変異型 Tel2 は、SNIPER-WSI による分解を回避した。したがって、WSI は生細胞中で特異的に Tel2 に結合すると考えられる。

この K 変異体の強制発現が WSI 耐性化を引き起こすか、 β -catenin/TCF 転写活性化能の低下を指標に評価した。予想に反して、コントロールとして用いた野生型 Tel2 の強制発現が耐性化傾向を示したが、K 変異型 Tel2 は感受性にほとんど影響を与えなかった。この結果から、細胞内で Tel2 と協調して機能する因子との stoichiometry の重要性を予想した。すなわち、単純に強制発現しただけでは Tel2 の機能発現には不十分であり、強制発現された外来タンパク質はデコイフラグメントのように振る舞うと考えた。今回得られた結果は、野生型 Tel2 はデコイとして WSI の効果を低下させたが、WSI への親和性の低下した K 変異体はデコイの効果を示さなかったと解釈することができる。したがって、目的とする評価を行うためには、内在性 Tel2 をノックダウンし、外来の Tel2 で再構成する必要があると考えた。

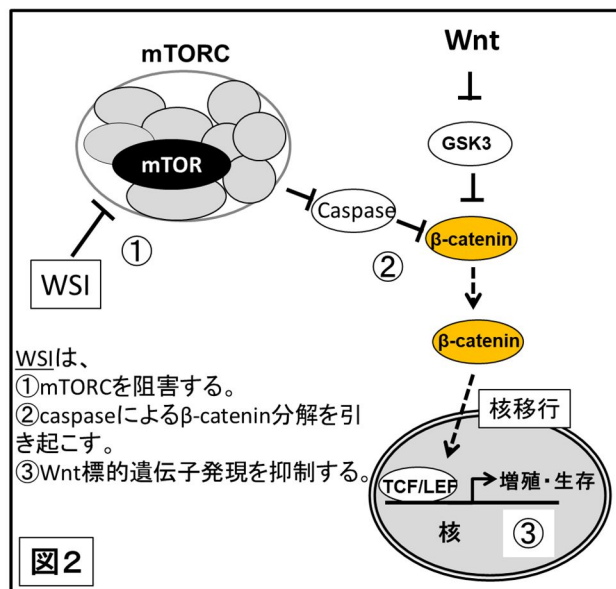
siRNA による内在性 Tel2 のノックダウンの後、siRNA 耐性変異を導入した Flag-tag 付加 Tel2 の発現ベクターをトランスフェクトすることで再構成系を構築した。再構成系の健全性は、内在性 Tel2 タンパク質レベルの低下と Flag-Tel2 の発現によって確認した。野生型 Tel2 再構成細胞では、WSI による細胞質 β -catenin タンパク質レベルや β -catenin/TCF 転写活性化能の低下が観察された。一方、WSI への親和性が低下した K 変異型 Tel2 再構成細胞では、WSI による β -catenin タンパク質レベルや β -catenin/TCF 転写活性化能の低下が観察されなくなった。すなわち、K 変異型 Tel2 再構成細胞は WSI に耐性を獲得し、WSI の生物活性は Tel2 への結合を介することが示された。

通常の Wnt/ β -catenin 経路の負の制御では、プロテアソームによる β -catenin の恒常的分解の貢献が大きい。一方、WSI の β -catenin レベル低下作用は、プロテアソーム阻害剤 MG132 存在下でも観察されることから、プロテアソーム非依存的であると考えられる。この点を、再確認するために、プロテアソームによる分解に耐性を示す変異体 β -catenin S33Y を発現させた細胞を

用いて WSI の効果を解析した。その結果、WSI によって、 β -catenin S33Y 変異体も内在性 β -catenin と同様に低下した。したがって、薬理学的方法に加えて、WSI のプロテアソーム非依存性が遺伝学的方法によっても再確認された。

mTORC はオートファジーやアポトーシスを制御するため、これらの経路に関連するプロテアーゼが β -catenin レベルの低下に関わる可能性を考えた。オートファジー阻害剤である E-64d や paclitaxel は WSI によって低下した β -catenin レベルを回復させることはなかった。しかし、複数の Caspase 阻害剤は β -catenin レベルを回復させた。この結果から、WSI は、caspase を介して β -catenin レベルを低下させることが示唆された。また、この減弱は、WSI によるアポトーシス誘導の 6 時間以上前に観察されるため、WSI は caspase の非アポトーシス機能を介して β -catenin レベルを低下し、Wnt/ β -catenin 経路を阻害すると考えられる。さらに、WSI 処理や Tel2 遺伝子ノックダウンによって、mTORC の下流因子である AKT と S6 kinase のリン酸化レベルが低下した。

以上の結果から、WSI は Tel2 への結合を介して mTOR 機能を阻害し、caspase による β -catenin の分解を引き起こすことによって Wnt/ β -catenin 経路を抑制すると考えられる。また、Tel2 は、WSI 等の化合物によって機能制御可能な新たな治療標的分子と考えられる。



引用文献

1. Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014, 13(7):513-532.
2. Lu B, Green BA, Farr JM, Lopes FC, Van Raay TJ. Wnt Drug Discovery: Weaving Through the Screens, Patents and Clinical Trials. *Cancers (Basel).* 2016, 8(9):82.
3. 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/ β -catenin pathway. *Chem Biol.* 2014, 21(4):530-540.
4. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell.* 2012, 149(2):274-293.
5. Kaizuka T, Hara T, Oshiro N, Kikkawa U, Yonezawa K, Takehana K, Iemura S, Natsume T, Mizushima N. Tti1 and Tel2 are critical factors in mammalian target of rapamycin complex assembly. *J Biol Chem.* 2010, 285(26):20109-20116.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Honami Yonezawa, Mami Ogawa, Sota Katayama, Yui Shimizu, Norikazu Omori, Yusuke Oku, Tomoko Sakyo, Yoshimasa Uehara, Naoyuki Nishiya	4. 巻 506
2. 論文標題 Clotrimazole inhibits the Wnt/ β -catenin pathway by activating two eIF2 kinases: The heme-regulated translational inhibitor and the double-stranded RNA-induced protein kinase	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 183 ~ 188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.10.053	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yonezawa Honami, Sugawara Aoi, Sakyo Tomoko, Uehara Yoshimasa, Kawano Tomikazu, Nishiya Naoyuki	4. 巻 532
2. 論文標題 IMU1003, an atrarate derivative, inhibits Wnt/ β -catenin signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 440 ~ 445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.08.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 米澤穂波、上原至雅、西谷直之
2. 発表標題 新規治療標的分子イベルメクチン結合タンパク質 (IvBP) を介したWnt/ β -catenin経路の阻害
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米澤 穂波、上原 至雅、西谷 直之
2. 発表標題 イベルメクチンは新規治療標的分子IvBPを介してWnt/ β -catenin経路を阻害する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米澤 穂波、池田 朱里、高橋 亮、廣瀬 友靖、岩月 正人、大村 智、砂塚 敏明、上原 至雅、西谷 直之
2. 発表標題 イベルメクチンのWnt経路阻害作用を仲介する新規治療標的: IvBP
3. 学会等名 第59回 日本薬学会東北支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米澤穂波、上原至雅、西谷直之
2. 発表標題 イベルメクチン結合タンパク質の同定とそのWnt/beta-catenin経路への関与
3. 学会等名 第23回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西谷直之
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ表現型解析によるがん分子標的治療における諸問題への挑戦
3. 学会等名 愛媛大学医学研究科 プロテオセミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米澤穂波、上原至雅、西谷直之
2. 発表標題 イベルメクチン結合タンパク質(IvBP)のWnt/beta-catenin経路阻害剤イベルメクチンへの結合様式の解析
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西谷直之
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ表現型を利用した化合物スクリーニングと毒性評価
3. 学会等名 日本学術振興会 アカデミアとインダストリーをつなぐ委員会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西谷直之
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ表現型を利用したケミカルサプレッサー探索系
3. 学会等名 第10回スクリーニング学研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西谷直之、米澤穂波、池田朱里、高橋 亮、廣瀬友靖、砂塚敏明、大村 智、上原至雅
2. 発表標題 A zebrafish phenotypic screening re-discovered ivermectin as a Wnt pathway inhibitor.
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米澤 穂波、池田 朱里、高橋 亮、廣瀬 友靖、岩月 正人、大村 智、砂塚 敏明、上原 至雅、西谷 直之
2. 発表標題 イベルメクチン結合タンパク質(IvBP)はdruggableなWnt/ -catenin経路仲介因子である
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 米澤穂波、大森紀和、小川真実、片山綜太、清水優依、西谷直之
2. 発表標題 アゾール系抗真菌薬によるWnt/beta-catenin経路阻害と抗腫瘍作用
3. 学会等名 日本生化学会東北支部 第84回例会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoyuki Nishiya
2. 発表標題 Identifying chemical suppressors of the Wnt/ β -catenin signaling pathway.
3. 学会等名 Yonsei Biomedical Dialogue 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Naoyuki Nishiya, Honami Yonezawa, Tomoko Sakyo
2. 発表標題 Chemical suppressors of the Wnt/ β -catenin signaling pathway and their molecular targets
3. 学会等名 2018 The 6th Tripartite Conference on Tooth and Bone in Development & Regeneration (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Honami Yonezawa, Yoshimasa Uehara, Naoyuki Nishiya
2. 発表標題 Ivermectin suppresses the Wnt/beta-catenin pathway and specifically binds to target proteins.
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米澤穂波、上原至雅、西谷直之
2. 発表標題 イベルメクチン結合タンパク質によるWnt/beta-catenin経路の制御
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大津 圭史 (Otsu Keishi) (60509066)	岩手医科大学・歯学部・准教授 (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------