

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：32680

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07038

研究課題名(和文) 上衣腫発症機構解明と治療標的探索

研究課題名(英文) Elucidation of ependymoma pathogenesis mechanism and search for therapeutic targets

研究代表者

大畑 慎也 (Ohata, Shinya)

武蔵野大学・薬学部・准教授

研究者番号：00442939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脳腫瘍の一種である上衣腫の一部は予後が悪く、化学療法や放射線治療法に耐性で外科手術も困難な小児希少疾患です。上衣腫のうち予後の悪いサブクラスの一つでは、発がんに関わるタンパク質が他のタンパク質と融合して発現することによって過剰に活性化し、上衣腫の原因となることが報告されています。本研究課題では、この融合タンパク質が過剰に活性化する分子機構を解明し、融合タンパク質のどの部分が治療の標的となり得るのかを探索しました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上衣腫は治療が困難であることから、その発症機序の解明による治療標的の探索が求められていました。本研究によって、上衣腫の中で予後の悪いサブクラスの一つの原因となる融合タンパク質が過剰に活性化し、上衣腫を発症させる分子機構の一端が明らかになりました。今回の研究では、上衣腫原因融合タンパク質の活性化に関わる分子を同定し、両者の相互作用機序を明らかにしたことから、今後はこの部分を標的として上衣腫治療薬を開発できることが期待できます。

研究成果の概要(英文)：Some ependymomas, a type of brain tumor, are a rare pediatric disease with a poor prognosis, resistant to chemotherapy and radiotherapy methods, and difficult to treat surgically. In one of the poorer prognosis subclasses of ependymomas, a protein involved in carcinogenesis has been reported to be hyper-activated by fusion with other proteins, leading to ependymoma. In this research project, we sought to elucidate the molecular mechanism by which this fusion protein is over-activated and to explore which parts of the fusion protein could be targeted for therapy.

研究分野：薬系衛生および生物化学関連

キーワード：上衣腫 細胞内局在制御 創薬

### 1. 研究開始当初の背景

脳室の壁を構成する上皮細胞の腫瘍である上皮腫は、100万人中3-5人に発症する希少な脳腫瘍であり、すべての神経系原発性新生物の2-3%を占める。小児および成人では、安全かつ最大限の外科的切除が主な治療法であり、患者の年齢、切除範囲、特定の診断によっては外科的切除後に原体照射法による放射線治療を行う場合もある。これまでのところ、上皮腫に対する化学療法の効果は限られており、有効な化学療法を求めて現在臨床試験が進行中であるものの未だ確立はされていない。このように、上皮腫は化学療法に耐性であり、脳腫瘍であることから外科手術による完全な除去も困難であるという治療困難性から、アンメットメディカルニーズ (unmet medical needs, いまだに治療法が見つからない疾患に対する医療ニーズ) が存在し、アカデミア主導で上皮腫形成機構を分子レベルで理解することによって新たな治療標的を探索することが求められている。近年になって、テント膜 (大脳と小脳間の硬膜) よりも上方で形成される上皮腫 (テント上上皮腫) の約 2/3 では、機能未知遺伝子 *Zinc Finger, Translocation Associated (ZFTA, 申請時の名称は Chromosome 11 open reading frame 95, C11orf95)* と、炎症反応に関与する NF- $\kappa$ B 経路の主要なエフェクター転写因子 RELA の遺伝子が隣りあい、融合タンパク質 (以下、ZFTA-RELA) として発現していることが報告された。NF- $\kappa$ B 経路は、炎症性サイトカインなどによって活性化され、細胞のがん化とがん細胞増殖を促進する。NF- $\kappa$ B 経路が不活性な状態では、RELA は抑制性相互作用因子 I $\kappa$ B と複合体を形成して細胞質中に局在するが、炎症性サイトカイン等の刺激により I $\kappa$ B が分解されると核内へ移行し下流遺伝子の発現を活性化させる。したがって、RELA の核内移行は NF- $\kappa$ B 経路の活性化の鍵となるステップである。融合タンパク質 ZFTA-RELA は、サイトカイン刺激非依存的に核へ移行して下流遺伝子の発現を上昇させることから、この恒常的な核移行による NF- $\kappa$ B 経路の活性化が上皮腫形成の原因であると考えられている。しかし、ZFTA-RELA の恒常的な核移行や発現制御の詳細な分子機構は明らかになっていなかった。また、ZFTA-RELA の発現による NF- $\kappa$ B 経路の恒常的な活性化を抑制する戦略は上皮腫の治療法開発につながることを期待されるが、未だそのような化合物は探索されていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究計画では、以下に記す3つの目的(A)~(C)を設定し、上皮腫形成の分子機構の理解拡大と上皮腫治療薬開発を目指した。上皮腫発症の原因は、ZFTA-RELA が未分化な上皮細胞の核に局在し、NF- $\kappa$ B 経路を恒常的に活性化することであるとされている。そこで、(A) ZFTA-RELA が核に局在する分子機構を解明することを第一の目標とした。ZFTA-RELA の発現阻害戦略は上皮腫治療薬の開発につながることを期待されるが、その転写制御機構は一切不明であった。そこで、(B) ZFTA-RELA が未分化な上皮細胞で発現する転写制御機構を解明することを第二の目標とした。ZFTA-RELA の発現による NF- $\kappa$ B 経路の恒常的な活性化を抑制する戦略は、上皮腫治療法の革新的な開発につながることを期待された。本研究では、レポーター細胞を用いた化合物スクリーニングにより、(C) ZFTA-RELA の発現による NF- $\kappa$ B 経路活性化阻害剤の同定を第三の目標とした。

### 3. 研究の方法

#### プラスミド作製とルシフェラーゼ試験

各種 DNA 断片は、Primer STAR GXL (TaKaRa) あるいは Tks Glex (TaKaRa) を用いた PCR により増幅し、In-Fusion Snap Assembly Master Mix (Clontech) を用いて各種プラスミドに挿入した。哺乳細胞発現用、大腸菌発現用、ルシフェラーゼ試験用の各 DNA 配列は、それぞれ pCS2+ベクター (RZPD)、pGEX ベクター (Amersham)、pGL4.26 (luc2/minP/Hygro) ベクター (Promega) へクローニングし、一連の点・欠失変異体は PCR によって生成した。哺乳細胞への遺伝子導入は、HiLyMax (同仁堂) を用いた。

#### 定量的 PCR

Total RNA と cDNA はそれぞれ Nucleo Spin RNA (MN) および Thunderbird SYBR qPCR Mix (東洋紡) を用いて調製した。qPCR は StepOne システム (Roche) または Light Cycler 96 (日本ジェネティクス) 上で実施した。相対的な mRNA 発現量は、Tbp を内因性コントロールとして使い、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法により決定した。

#### 動物実験

すべての動物実験は、東京大学および武蔵野大学の動物実験委員会の承認を得て、各施設のガイドラインに従って実施された。

#### 細胞培養、トランスフェクション、免疫細胞化学 (ICC)、イムノプロット法

細胞は、10%ウシ胎児血清 (Biowest) および抗生物質-抗真菌液 (Nacalai Tesque) を添

加したダルベッコ変法イーグル培地 (Nacalai Tesque) で、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。

ICC は、細胞を PBS で洗浄し、100 mM リン酸緩衝液 (PB, pH7.4) に溶解した 4% パラホルムアルデヒド (PFA) で室温 (RT) で 10 分間固定し、PBS で洗い、インキュベートして 10% 正常ヤギ血清 (EMD Millipore) と 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS (以下、ブロッキングバッファー)、ブロッキングバッファーで希釈した一次抗体 (「抗体」の項に記載) と 4 °C で一晩または RT で 1 時間インキュベート、PBS で洗浄、蛍光色素 (Abcam) および DRAQ5 (Biostatus) と結合した二次抗体とブロッキングバッファーで RT で 1 時間インキュベート、PBS で洗浄、アクアポリ/マウント (ポリサイエンス) でマウントした。共焦点顕微鏡の画像は、FV1000 (Olympus) または 710META (Zeiss)、AX (Nikon) を用いて取得した。

イムノプロットは、各種サンプルを Laemmli サンプルバッファーで溶解・超音波処理し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、Immobilon-P 膜 (0.45 μm, Millipore) に転写した。Blocking One (Nacalai Tesque) で非特異的結合部位をブロックした後、膜を一次抗体とインキュベートし、0.2% (v/v) Tween-20 (wash buffer) を含む PBS で洗浄し、二次抗体とインキュベートし、洗浄バッファで洗浄した。Chemi-Lumi One (Nacalai Tesque) または Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore) を用いて免疫シグナルを可視化し、Fusion SL (Vilber-Lourmat) で撮影した。

#### 免疫組織化学およびホールマウント染色

ホールマウント染色では、成体および胎仔の脳から側脳室の壁を摘出し、4% PFA で 4 °C、一晩固定した後に、PBS で洗浄した。切片染色では、Neo-LinearSlicer NLS-MT (Dosaka EM) および CN3050S (Leica) を用いて、それぞれ Vibratome 切片 (厚さ 50 μm) および凍結切片 (厚さ 12 μm) を作成した。蛍光画像は、BZ-X710 オールインワン蛍光顕微鏡 (キーエンス)、LSM710 (ツァイス) または FV1000 (オリンパス) を用いて観察した。

## 4. 研究成果

### (A) ZFTA-RELA の核局在機構

ZFTA は核に局在するタンパク質であることから (Herranz-Pérez et al., 2022)、RELA と融合して発現する ZFTA の exon1 と 2 にコードされるペプチド配列に核移行シグナルが存在する可能性が考えられた。30 kDa 以上のタンパク質は単純拡散によっては核膜孔を通過できず、核移行シグナルを介してインポーチンなどの核移行受容体と結合し、核へ輸送される (Oka and Yoneda, 2018)。ZFTA (全長) は、一次構造上 4 つのコイルドコイルドメイン、1 つの Zn フィンガードメイン、3 つの古典的核移行シグナル (NLS) を持つことが予測されている (Huang et al., 2010)。しかし、ZFTA-RELA を構成する ZFTA の exon1-2 は、コイルドコイルドメインと Zn フィンガードメインをそれぞれ 1 つずつ持つが、配列上から予測される古典的 NLS はもたない。そこで、ZFTA は exon1-2 にコードされる部分に非古典的 NLS をもち、恒常的に核へ輸送されているのではないかと仮説を立て、その配列を同定することを試みた。ZFTA の exon1-2 (ZFTA<sup>exon1-2</sup>) を EYFP 蛍光タンパク質 (NLS を持たないため細胞質と核の両方に局在する) と融合させ HeLa 細胞で細胞内局在を観察したところ、ZFTA<sup>exon1-2</sup>-EYFP は核にのみ局在した (未発表)。一方、ZFTA<sup>exon1-2</sup> の各種欠失変異体を作製したところ、60 アミノ酸が核局在に重要であることを見出した。この 60 アミノ酸中には非古典的インポーチンファミリーによる共通認識配列 (ncNLS) に類似した配列を見出した。この核輸送体全長と ZFTA<sup>exon1-2</sup> の核移行に必要な 60 アミノ酸を含む部分断片の精製リコンビナントタンパク質を調製し、混ぜあわせてからゲル濾過カラムかけたところ、それぞれ単独の場合よりも高分子量側にピークがシフトし、両者が直接結合することが示唆された。また、この核移行受容体の発現を siRNA によって抑制したところ、ZFTA<sup>exon1-2</sup>-EYFP の核局在が阻害されるだけでなく、ZFTA-RELA の発現による NF-κB 経路の活性化が顕著に低下した。以上の結果から、ZFTA-RELA は、この核移行受容体はよって核に運ばれ、NF-κB 経路を活性化していることが示唆された。

奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科分子複合系科学研究室の藤間祥子准教授との共同研究によって、ZFTA の ncNLS に結合する核輸送担体と ZFTA 断片の共結晶構造解析を行った結果、両者の結合に重要なアミノ酸を複数同定した (Toma-Fukai et al., in revision)。これらのアミノ酸をアラニンに置換したところ、試験管内での核輸送担体との共沈降量、ZFTA-RELA の核移行率、NF-κB 活性、ST-EPN-RELA 形性能 (国立精神・神経医療研究センター病態生化学研究部細胞生化学研究室川内大輔室長との共同研究) が顕著に低下した。以上の結果から、ZFTA-RELA と核輸送担体の相互作用を阻害することによって ST-EPN-RELA の発症が抑制されることが期待された。

### (B) ZFTA-RELA の発現制御機構

ZFTA-RELA は ZFTA 遺伝子発現制御領域によって発現が制御されていることが期待されることから、ZFTA の発現プロファイルと遺伝子発現制御機構の解明は上衣腫発症機序の理解に繋がることが期待される。しかし、上衣細胞の発生過程における ZFTA の発現プロファイルは不明であった。マウス側脳室 (LV) では、胚性 15.5 日 (E15.5) 頃に神経幹細胞である放射状グリア細胞が上衣細胞へと運命決定される。運命決定された幼若な上衣細胞 (pre-E1 細胞) は出生時まで放射状グリア細胞と同様の細胞形態を保ち、生後 5 日 (P5) までに形態的に成熟な上衣細胞

胞 (E1 細胞) へと分化する。LV 壁におけるマウス *Zfta* mRNA の発現プロファイルを明らかにすべく、E14.5, E17.5, P0, P2, P5, P9, P15 の LV 壁から合成した cDNA を用いて定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) を行った。興味深いことに、*Zfta* mRNA の相対的な発現レベルは E17.5 でピークに達しており、これは放射状グリア細胞から pre-E1 細胞への運命決定 (E15.5 頃) と、pre-E1 細胞から E1 細胞への形態的分化 (P0 以降) の間に位置していた。免疫組織化学的手法により、ヒト ZFTA とマウス *Zfta* の両方を特異的に認識する抗ヒト C11orf95/ZFTA 抗体を用いて E18.5 胚脳における *Zfta* の発現を調べたところ、LV 壁を覆う Forkhead box protein J1 (FoxJ1, E1 細胞を含む運動性繊毛保持細胞に発現する転写因子) 陽性細胞が *Zfta* を発現していた。これらの結果は、*Zfta* がマウス pre-E1 細胞の分化時に発現することを示唆している。E1 細胞を含む運動性繊毛保持細胞の分化を促進するいくつかの転写因子が報告されており、繊毛転写因子 (ciliary transcription factors) と呼ばれている。例えば、MCIDAS がコードする Multicilin はマウス胎仔の FoxJ1 陽性前 E1 細胞で、Myb は新生児マウスの未熟な E1 細胞でそれぞれ発現し、E1 細胞の分化を促進させる。繊毛転写因子群が ZFTA の発現を促進するかどうかを調べるために、ヒト ZFTA の上流配列を単離してルシフェラーゼレポータープラスミドに挿入し、様々な繊毛転写因子をコードするプラスミドと共にトランスフェクトしてルシフェラーゼ試験を実施した。その結果、GMNC, MCIDAS, MYB, RFX1, RFX2, RFX3 がルシフェラーゼ活性を顕著に上昇させることが明らかになり、繊毛転写因子群が ZFTA の発現を促進することが示唆された。MCIDAS は他の繊毛転写因子の発現を促進するため、一連の欠失コンストラクトを作製し MCIDAS 応答性エレメントを探索した。その結果、ZFTA の約 250 塩基上流付近に 2 つの MCIDAS 応答性配列が存在することを見出した。

293T 細胞を用いた以前の報告と同様に、ZFTA-RELA の過剰発現は、HEK293 細胞から樹立したドキシサイクリン誘導性 ZFTA-RELA 発現細胞 (6E8 細胞) において内在性の ZFTA mRNA の発現を促進した。しかし、ZFTA-RELA は RELA mRNA の発現に影響を与えなかった。前述の ZFTA 上流配列をもつプラスミドを用いたルシフェラーゼアッセイでは、ZFTA-RELA はルシフェラーゼ活性を増加させたが、ZFTA または RELA は増加させなかった。これらの結果は、ZFTA-RELA が ZFTA の 5' 上流配列に存在する独自の応答性エレメントを通じてその発現を促進している可能性を示唆している。前述の一連の欠失コンストラクトと既報の ZFTA-RELA 結合配列の情報を用いて、ZFTA-RELA 応答性エレメントの候補を絞りこんだところ、ZFTA の約 600 塩基上流に ZFTA-RELA 応答性配列を見出した。これらの MCIDAS および ZFTA-RELA 応答配列は、E1 細胞の発生における ZFTA 発現だけでなく、ST-EPN-RELA の発症における ZFTA-RELA 発現促進に寄与することが期待された。

ZFTA は一次構造から亜鉛フィンガー部位を複数もつことが予測されており、かつ核に局在することから、DNA 結合タンパク質として機能することが期待された。しかしながら、ZFTA の機能解析はこれまで検討されていなかったことから、マウス *Zfta* の一部が -ガラクトシダーゼで置換された *Zfta*<sup>tm1/tm1</sup> ノックインマウスの表現型を解析することにより、*Zfta* の機能を解明することを試みた。*Zfta*<sup>tm1/+</sup> の交配ペアから得られた *Zfta*<sup>tm1/tm1</sup> マウスは、期待されたメンデル比で観察され、少なくとも 1 年間生存でき、繁殖力もあつた。P31-34 において、体重は野生型 (WT) マウスと *Zftatm1/tm1* マウスとで同程度であった。父方/接合体および母方/接合体の *Zfta*<sup>tm1/tm1</sup> マウスも期待されたメンデル比で観察された。また、*Zfta*<sup>tm1/+</sup> と *Zfta*<sup>tm1/tm1</sup> の繁殖ペアの間で、一腹あたりの仔の数は同程度であった。これらの結果から、ZFTA の欠損がマウスの発生、成長、生殖に大きな障害をもたらさないことが示唆された。

E1 細胞の発生に対する *Zfta* 遺伝子破壊の影響について、コントロール (WT および *Zfta*<sup>tm1/+</sup>) と *Zfta*<sup>tm1/tm1</sup> の E1 細胞の形態、遺伝子発現、繊毛運動頻度、上衣細胞が作り出す液流の方向と速度を検討したが、これらに異常は見られなかった。これらの結果から、*Zfta*<sup>tm1/tm1</sup> マウスでは E1 細胞が正常に分化していることが明らかになった。これらの結果から、ZFTA-RELA の ZFTA 部分の機能阻害は上衣腫治療戦略なりうることを示唆された。*Zfta* の欠損が上衣細胞の発生や機能に大きな影響を与えないことを考慮すると、ZFTA-RELA の ZFTA 部分の機能を阻害することは、ST-EPN-RELA に対する副作用の少ない治療戦略となることが期待された。

### (C) ZFTA-RELA の発現による NF- $\kappa$ B 経路活性化阻害剤の同定

ZFTA-RELA の発現により誘導される NF- $\kappa$ B 活性の阻害剤は、ST-EPN-RELA の治療薬となることが期待される。NF- $\kappa$ B 阻害剤スクリーニングのためのアッセイ系を得るために、市販の HEK293 由来 NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼレポーター細胞株に、ドキシサイクリン (DOX) 誘導性 ZFTA-RELA-FLAG カセットを導入した。最も高いルシフェラーゼ活性比 (100 ng/mL の DOX で培養したクローンのルシフェラーゼ活性 / DOX なしで培養したクローンのルシフェラーゼ活性) を示したクローンを選択し、6E8 と命名した。この細胞株は、扁平な形態を示し、DOX 非存在下および存在下で単層に増殖した。6E8 は、DOX の用量依存的に ZFTA-RELA-FLAG の発現とルシフェラーゼ活性を示した。

糸状菌は、様々な二次代謝産物を生産することから、医薬品開発において有用な生物資源である。真菌の二次代謝産物から発見された臨床的に重要な薬剤には、*Penicillium sp.* から得られたペニシリンや *Aspergillus terreus* から得られたロバスタチンがある。千葉大学真菌医学研究センターバイオリソース管理室矢口貴志准教授にご提供いただいた各種真菌株の菌体および培地から抽出物を得て、6E8 細胞を用いて ZFTA-RELA によって誘導される NF- $\kappa$ B 応答性

ルシフェラーゼ活性の阻害剤をスクリーニングした（武蔵野大学薬学部生薬化学研究室市瀬浩志教授，石川和樹助教との共同研究。本学共同研究ユニット「アンメットメディカルニーズを満たす新薬創生プロジェクト」による研究成果）。その結果、*Aspergillus lentulus* 抽出物から BV2 および初代ミクログリア細胞で NF- $\kappa$ B 経路を阻害することが報告されている terrein を同定した。これらの結果は、6E8 を用いたルシフェラーゼアッセイが ZFTA-RELA 融合タンパク質の発現によって誘導される NF- $\kappa$ B 活性に対する阻害剤をスクリーニングするための信頼できるアッセイ系であることを示している。

*A. lentulus* 以外で NF- $\kappa$ B 阻害活性を示した *A. novofumigatus* IFM 60866 の抽出物を分画し、ZFTA-RELA によって誘導される NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼ活性に対するこれらの画分の影響を評価した。オクタデシル C18 カラムを用いた LPLC のフラクション 5 は統計的に有意な阻害を示し、Aszonalenin を含んでいた。6E8 を用いた NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼ活性の阻害は、細胞生存，細胞増殖，ルシフェラーゼ反応の阻害など、非特異的な阻害によるものも含むと考えられる。HeLa/CMV-luc 細胞株はサイトメガロウイルス (CMV) のエンハンサー/プロモーターの制御下でルシフェラーゼを恒常的に発現するため、この株を用いたルシフェラーゼ活性の阻害（以下、カウンターアッセイ）は、非特異的な阻害を反映する。本研究で用いたすべての濃度において、Aszonalenin はカウンターアッセイのルシフェラーゼ活性よりも ZFTA-RELA による NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼ活性を強く阻害した。これらの結果は、Aszonalenin による NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼ活性の阻害が、少なくとも部分的にはルシフェラーゼ反応の非特異的な阻害に起因しないことを示唆するものである。

菌類は構造的に類似した二次代謝産物を生産しており、その活性を測定することで、より活性が高く細胞毒性の低い化合物の同定に役立てることができる。我々は、*A. novofumigatus* IFM 60866 から Acetylazszonalenin および *epi-aszonalenin* B と C を *A. novofumigatus* IFM 55215 から単離し、NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼアッセイとカウンターアッセイで評価した。acetylazszonalenin は、NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼ活性だけでなく、カウンターアッセイのルシフェラーゼ活性も強く阻害したことから、acetylazszonalenin が非特異的な阻害作用を持つことが示唆された。*epi-aszonalenin* C は、低濃度（ $3\mu\text{g/mL}$ ）ではこれらのルシフェラーゼ活性を同程度に阻害したが、高濃度（ $10\mu\text{g/mL}$ ）では NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼ活性をカウンターアッセイのルシフェラーゼ活性よりも強く阻害した（Fig. 5D）。しかし、これらの高濃度では、*epi-aszonalenin* C はカウンターアッセイのルシフェラーゼ活性を 50%以上阻害した。一方、ZFTA-RELA の発現により誘導される NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼ活性に対する *epi-aszonalenin* B の阻害効果は、カウンターアッセイに対する阻害効果が小さい低濃度（ $3\mu\text{g/mL}$ ）においても統計的に有意に大きかった。これらの結果は、*epi-aszonalenin* B が ZFTA-RELA 誘導型 NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼ活性を阻害することを示唆している。

6E8 細胞では、内因性 NF- $\kappa$ B 応答性遺伝子である *CCND1*、*ICAM*、*L1CAM* の 3 種の発現が DOX 濃度依存的に増加した。次に、これらの遺伝子の発現に及ぼす aszonalenin および *epi-aszonalenin* B の影響を定量的 PCR にて検討した。6E8 を  $300\text{ ng/mL}$  DOX 存在下で培養した場合、*CCND1* の発現量は DOX 非存在下に比べて有意に増加した。この *CCND1* の発現量の増加は、*epi-aszonalenin* B の添加により有意に抑制されたが、aszonalenin によっては抑制されなかった。同様に、*epi-aszonalenin* B は、DOX 投与により誘導される *ICAM1* および *L1CAM* の発現を抑制したが、aszonalenin は抑制しなかった。これらの結果は、*epi-aszonalenin* B が ZFTA-RELA 発現によって誘導される NF- $\kappa$ B 活性化を抑制することを示唆している。

本研究では、6E8 細胞における ZFTA-RELA 誘発 NF- $\kappa$ B 反応性ルシフェラーゼレポーター活性に対する阻害剤を同定するためのスクリーニング系を構築し、*A. novofumigatus* IFM 60866 および 55215 からそれぞれ aszonalenin および *epi-aszonalenin* B を同定した。aszonalenin は、ウニ胚で異常な二次卵割を誘発することと、 $\beta$ -グルコシダーゼ活性を阻害することが報告されているが、aszonalenin および *epi-aszonalenin* B が NF- $\kappa$ B 応答性ルシフェラーゼレポーター活性を阻害することは報告されていなかった。本研究では、aszonalenin は NF- $\kappa$ B 反応性ルシフェラーゼ活性を阻害したが、内在性 NF- $\kappa$ B 反応性遺伝子の発現は阻害しなかった。これは、それらの応答性エレメントの配列の違いによるものと考えられる。6E8 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイは簡便かつ定量的であるため一次スクリーニングに適しているが、その後のスクリーニングでは内在性応答遺伝子の発現を考慮した多角的な検討が必要と考えられる。本研究により、*epi-aszonalenin* B が ST-EPN-RELA 治療薬開発のためのリード化合物となることが判明した。今後は、より広い安全性範囲と高い NF- $\kappa$ B 阻害活性を持つ化合物を同定するための合成開発研究が必要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishikawa Kazuki, Ishii Masaki, Yaguchi Takashi, Katada Toshiaki, Ichinose Koji, Ohata Shinya	4. 巻 596
2. 論文標題 epi-Aszonalenin B from <i>Aspergillus novofumigatus</i> inhibits NF- $\kappa$ B activity induced by ZFTA-RELA fusion protein that drives ependymoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 104 ~ 110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.01.076	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 Herranz-Perez Vicente, Nakatani Jin, Ishii Masaki, Katada Toshiaki, Garcia-Verdugo Jose Manuel, Ohata Shinya	4. 巻 12
2. 論文標題 Ependymoma associated protein Zfta is expressed in immature ependymal cells but is not essential for ependymal development in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1493
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-05526-y	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 該当する
1. 著者名 Herranz-Perez Vicente, Nakatani Jin, Ishii Masaki, Katada Toshiaki, Garcia-Verdugo Jose Manuel, Ohata Shinya	4. 巻 NA
2. 論文標題 Ependymoma associated protein Zfta is expressed in immature ependymal cells but is not essential for ependymal development in mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Research Square (preprint server)	6. 最初と最後の頁 NA
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21203/rs.3.rs-948030/v1	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 大畑慎也	4. 巻 21
2. 論文標題 上衣腫発症に関わる機能未知遺伝子C11orf95の機能解析と上衣腫治療薬の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 加藤記念バイオサイエンス振興財団2019年度年報	6. 最初と最後の頁 36-37
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大畑 慎也	4. 巻 39
2. 論文標題 上衣細胞分化の異常による上衣腫発症機構の解明	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 薬学研究所の進歩	6. 最初と最後の頁 17-28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 澤田 悠佳, 石川 和樹, 石井 雅樹, 大畑 慎也, 矢口 貴志, 堅田 利明, 市瀬 浩志
2. 発表標題 Aspergillus属真菌由来の抗Rhizopus oryzae活性物質の探索 (第1報)
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤間 祥子, 中村 雄太郎, 寺谷 俊昭, 川本 晃大, 清水 光, 廣瀬 未果, 端山 浩輝, 大畑 慎也, 林 有吾, 山崎 洋一, 岩崎 憲治, 加藤 貴之, 上久保 裕生, 伊藤 俊将, 富田 謙吾, 清水 敏之
2. 発表標題 PPAR $\gamma$ 核内輸送機構の構造生物学的研究
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤間 祥子, 大畑 慎也, 松浦 滉明, 坂井 直樹, 平田 邦生, 松谷 優輝, 清水 光, 端山 浩輝, 鈴木 雄登, 米澤 健人, 林 有吾, 山崎 洋一, 堅田 利明, 清水 敏之, 上久保 裕生
2. 発表標題 階層的クラスタリングによって明らかになった脳上衣腫原因遺伝子ZFTA-RELAの核内輸送機構
3. 学会等名 日本結晶学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Ishikawa, Shinya Ohata, Masaki Ishii, Takashi Yaguchi, Toshiaki Katada, Koji Ichinose
2. 発表標題 Exploratory research of bioactive compounds from Fungi Aspergillus species to address unmet medical needs
3. 学会等名 The 11th JSP, CSP, KSP Joint Symposium on Pharmacognosy (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小島 瑠莉, 石井 雅樹, 堅田 利明, 大畑 慎也
2. 発表標題 上衣腫原因融合タンパク質ZFTA-RELAFUS2の核輸送機構
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 内田有紀、栄祐美、松谷優輝、石井雅樹、藤間祥子、清水敏之、堅田利明、大畑慎也
2. 発表標題 上衣腫原因融合タンパク質 C11orf95-ReIA の核移行機構
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村知晃、中村匠、宇賀英子、堅田利明、大畑慎也
2. 発表標題 上衣腫原因融合遺伝子 C11orf95-ReIA の発現制御機構
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 松原理佳、石井雅樹、高橋沙由美、堀越えみり、宇賀英子、大畑慎也、堅田利明
2. 発表標題 皮膚糸状菌 Rac 及び CDC42 の菌糸成長における機能解析
3. 学会等名 第64回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤間 祥子, 松浦 滉明, 坂井 直樹, 平田 邦生, 松谷 優輝, 清水 光, 端山 浩輝, 今村 尚真, 小島 瑠璃, 清水 敏之, 上久保 裕生, 川内 大輔, 大畑 慎也
2. 発表標題 脳上衣腫原因融合タンパク質ZFTA-RelAの核内輸送機構の構造生物研究
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小島 瑠莉, 石井 雅樹, 大畑 慎也
2. 発表標題 上衣腫原因タンパク質ZFTA-RELAの核移行機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 mTOR及びトポイソメラーゼ 阻害はテント上上衣腫原因タンパク質によるNF- $\kappa$ B経路活性化を抑制する
2. 発表標題 中尾 英嘉, 石井 雅樹, 大畑 慎也
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上衣細胞の運動性繊毛に局在するG <sub>i</sub> 共役型受容体の探索
2. 発表標題 細谷 拓郎, 石井 雅樹, 大畑 慎也
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大畑慎也, 石川和樹, 石井雅樹, 矢口貴志, 市瀬浩志
2. 発表標題 発がん性NF- $\kappa$ Bシグナルを阻害する真菌代謝物の探索
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大畑慎也
2. 発表標題 上衣腫原因融合タンパク質ZFTA-RELAの核移行機構
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中尾 英嘉, 石井 雅樹, 堅田 利明, 大畑 慎也
2. 発表標題 mTOR及びトポイソメラーゼ 阻害はテント上上衣腫原因タンパク質 によるNF- $\kappa$ B経路活性化を抑制する
3. 学会等名 第66回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井 雅樹, 大畑 慎也, 山田 剛, 宇賀 英子, 堅田 利明
2. 発表標題 皮膚糸状菌p21-activated kinase PAKは菌糸形態に寄与する
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石井 雅樹, 山田 剛, 宇賀 英子, 堅田 利明, 大畑 慎也
2. 発表標題 皮膚糸状菌Rhoファミリータンパク質及びそのGEFは菌糸成長に寄与する
3. 学会等名 第103回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石井 雅樹, 大畑 慎也, 山田 剛, 宇賀 英子, 堅田 利明
2. 発表標題 低分子量Gタンパク質Rac GEF抑制による皮膚糸状菌菌糸成長の阻害
3. 学会等名 第93回細菌学会総会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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			
スペイン	University of Valencia			