

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08732

研究課題名(和文) 癌遺伝子WT1による造血器腫瘍の代謝制御

研究課題名(英文) WT1 controls metabolism in hematopoietic malignancies

研究代表者

尾路 祐介(Oji, Yusuke)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20294100

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)：WT1タンパクは代謝酵素Y1およびY2に直接結合してこれらの活性を増強する。本課題では、1) WT1タンパクの代謝酵素との結合領域配列のペプチド(WT1ペプチド)が白血病細胞に細胞死を誘導する、2) 代謝安定性の高いD体のWT1ペプチドは天然型ペプチドに比較してより強い抗腫瘍活性を示す、3) WT1ペプチドは白血病細胞のみならずWT1を発現する様々な固形悪性腫瘍においても細胞死を誘導することを示した。これらの結果はWT1と代謝酵素Y1、Y2のタンパク間相互作用(PP1)が白血病のみならず多くの癌種において生存に重要な役割を果たし、これが新規の分子標的治療のターゲットになりうることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題ではWT1と代謝酵素のPP1が白血病および膵がんや悪性神経膠腫において生存に重要な役割を果たしており、このWT1と代謝酵素のPP1が新たな分子標的のターゲットになりうることを示した。これはこれまで核タンパクとして転写やスプライシング調節に関与すると考えられてきたWT1タンパクの新たながん遺伝子機能を明らかにしたものである。さらにWT1タンパクと代謝酵素のPP1が分子標的治療の新たなターゲットとなりうることは、腫瘍特異的で広い癌種に対して適応可能な新規メカニズムの分子標的治療の可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：WT1 protein directly binds to metabolic enzymes and enhances their enzymatic activity. In this study, 1) WT1-derived peptide that has a sequence of the binding sequence to the metabolic enzymes induces cell death in leukemic cells, and 2) the metabolically stable D-form WT1 peptide, showed more potent antitumor effects than the native peptide. 3) WT1 peptide showed antitumor activity in leukemic cells and various solid malignant tumors expressing WT1. These results indicate that the PP1s between WT1 and metabolic enzymes play essential roles in the survival of leukemia and many other cancer types and that they can be targets for novel molecular-targeted therapies.

研究分野：がん生物学

キーワード：WT1

1. 研究開始当初の背景

WT1 遺伝子は様々な悪性腫瘍に高い頻度で腫瘍特異的に高発現する癌遺伝子である。急性骨髄性白血病において末梢血 WT1mRNA は鋭敏な腫瘍マーカーとして保険収載の検査となっている。WT1 タンパクは従来主に転写因子として機能する核タンパクと考えられてきたが、我々は多くの固形腫瘍細胞においては WT1 タンパクが主に細胞質に局在することを明らかにし、腫瘍細胞の細胞質における WT1 タンパク結合タンパクとしてエネルギー代謝経路の代謝酵素 Y1 および Y2 を同定した。酵素 Y1 および Y2 (特許申請のため非公開) は同じエネルギー代謝経路にかかわる。我々はこれまでに、WT1 を強制発現させた WT1 非発現細胞株の細胞質分画においてはこれらの酵素 Y1 および Y2 の活性が上昇していることを明らかにした。さらに、細胞膜透過配列を付加した WT1 ペプチド (WT1 タンパクの結合領域に該当) を WT1 高発現白血病細胞に導入すると効率よく細胞死を誘導することを示した。これらの結果は WT1 タンパクが標的とする分子と直接結合し、腫瘍細胞の代謝シフトに関与している可能性を示している。

2. 研究の目的

本研究課題では以下を研究目的とした。

- 1) PPI 阻害が代謝酵素 Y1 および Y2 の活性を抑制することを明確にする、
- 2) WT1 タンパク側の結合に関与する領域についての情報を得る、
- 3) WT1 代謝酵素 PPI が白血病以外の癌種において生存に重要な役割を果たすことを示す
- 4) WT1-代謝酵素の PPI をターゲットする抗腫瘍剤の開発

3. 研究の方法

生細胞中で WT1-代謝酵素の PPI 阻害が代謝酵素の活性を抑制することを示すために、PPI 阻害活性を有する WT1 ペプチドを WT1 を高発現する白血病細胞に導入し、その際の代謝変化をメタボローム解析により明らかにした。

WT1 タンパク側の結合に関与する領域についてのより詳細な情報を得るために、上記の WT1 ペ

ペプチドのダウンサイジングおよびアラニンスキャンを行い、WT1 と代謝酵素の PPI に重要な配列を明らかにした。

WT1-代謝酵素の PPI が白血病およびその他の癌種において生存に重要な役割を果たす可能性を検討するために、白血病以外に悪性リンパ腫、膵がん、悪性神経膠腫の細胞に WT1 ペプチドを導入して PPI を阻害し、細胞死の誘導および増殖抑制を評価した。

WT1-代謝酵素の PPI をターゲットする抗腫瘍剤の開発については、中分子であるペプチドおよび低分子化合物による WT1 と代謝酵素の PPI 阻害を進めた。

4. 研究成果

4-1. WT1 タンパクの代謝酵素との結合領域配列のペプチド(WT1 ペプチド)は白血病細胞に細胞死を誘導する

代謝酵素との結合領域配列のペプチドの N 末側に細胞膜透過配列であるポリアルギニン配列を付加した WT1 ペプチドで WT1 を発現する白血病細胞を処理して WT1-代謝酵素の PPI を阻害すると効率よく細胞死を誘導した。そこで WT1 の PPI に関する領域のアミノ酸配列を有する WT1 ペプチドのダウンサイジング(より短いペプチドによる WT1 と代謝酵素の PPI 阻害活性評価)およびアラニンスキャンニング(アミノ酸残基のアラニンへの置換による PPI 阻害活性低下)により、WT1 と代謝酵素の PPI に重要なアミノ酸配列を同定した。この短鎖ペプチドは効率よく PPI を阻害した。WT1 由来短鎖ペプチドを WT1 高発現白血病細胞に導入し、代謝状態の変化をメタボローム解析した。PPI を阻害された白血病細胞では WT1 が結合する代謝酵素の代謝産物量は顕著に低下していた。これより WT1 と代謝酵素の PPI が分子標的のターゲットとなることが確認された。WT1 とこれらの代謝酵素のタンパク-タンパク間相互作用(PPI)を阻害するペプチドが、生細胞内で WT1 と代謝酵素の PPI を阻害する(Nanobit システムによる検討)、代謝酵素 Y1 および Y2 の酵素活性を直接には阻害しない、白血病細胞を強く傷害する一方で、正常血球をほとんど傷害しないことを明らかにし、WT1 と代謝酵素 Y1 および Y2 の PPI が白血病細胞の治療標的として妥当であることを示した。

4-2. WT1-代謝酵素の PPI が白血病およびその他の癌種において生存に重要な役割を果たす白血病や悪性リンパ腫に加えて膵がんおよび悪性神経膠腫細胞を WT1-代謝酵素 Y1 および Y2 の PPI 阻害活性を有するペプチドで処理したところ、これらの細胞の増殖は強く抑制された。

4-3. WT1-代謝酵素の PPI をターゲットする抗腫瘍剤の開発

WT1-代謝酵素の PPI をターゲットとする抗腫瘍剤としては、中分子であるペプチドやさらに低分子化合物が考えられる。

本課題ではまず、WT1-代謝酵素の PPI 阻害活性を有するペプチドの代謝安定性を高めた非天然型の D 体ペプチドを作成し、これが PPI 阻害活性を維持し、天然型の L 体ペプチドに比べより優れた抗腫瘍効果を有することを示した。

WT1-代謝酵素の PPI 阻害活性を有する低分子化合物の開発については、WT1 と代謝酵素の PPI を阻害する短鎖ペプチドのアミノ酸配列の構造を参考に化合物を探索し、PPI 阻害活性を有する化合物を同定した。これをもとに化合物の構造展開を行っている。我々はこれまでにリード化合物から化合物の最適化を進め *in vitro* および *in vivo* で抗腫瘍効果を示す新規化合物を取得している。WT1-代謝酵素 Y1、Y2 の PPI を阻害する化合物は、新規メカニズムで作用し、従来の治療法に抵抗性となった腫瘍にも効果を示す可能性がある。

4-5 薬効評価のための簡便でありながら再現性の高い3次元培養システムの開発

本課題で WT と代謝酵素の PPI を標的とした化合物が造血系悪性腫瘍のみならず、様々な固形がんにも有効である可能性が示された。固形がん細胞に対する抗腫瘍効果の *in vitro* での評価として、より生体内の腫瘍を反映できるスフェロイド培養系が導入されつつある。我々は高い再現性で抗腫瘍効果を評価できる三次元培養システムを新たに開発し抗腫瘍効果を評価した。この培養システムは簡便な2ステップのスフェロイド形成法でありながら、幹細胞関連遺伝子の発現が増加するとともに抗がん剤抵抗性が増強し、抗がん剤の薬効評価に有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Oji Y, Kagawa N, Arita H, Naka N, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 WT1 Trio Peptide-Based Cancer Vaccine for Rare Cancers Expressing Shared Target WT1.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 393
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers15020393	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩出拓也 西井綾乃 加藤千晶 尾路祐介
2. 発表標題 薬効評価のための簡便な2ステップ-スフェロイド培養法
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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
---------	---------