

令和 3 年 8 月 20 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06694

研究課題名（和文）シグナル伝達病治療標的としてのERK-MAPキナーゼ経路下流因子の探索

研究課題名（英文）Identification of downstream factors of the ERK-MAP kinase pathway as a putative target for treatment of signal transduction disorders.

研究代表者

尾崎 恵一（Kei-ichi, Ozaki）

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：50252466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：これまで、ERK経路の恒常的活性化を伴うがん細胞や肥大化脂肪細胞に対する、ERK経路の特異的遮断剤MEK阻害剤を用いた効果的な薬物治療の可能性を明らかにしてきた。

本研究では、新たな治療標的として、ERK経路下流のキナーゼ MNKや、ERK経路の標的遺伝子であることを見出したNLRP3というインフラマソーム構成分子に注目した。

その結果、MNK-11というMNK阻害剤とHDAC阻害剤との併用が、BRAF活性変異を有するがん細胞等に対して顕著な細胞死誘導効果を示すことが分かった。さらに、TNF 刺激による3T3-L1脂肪細胞でのNLRP3誘導を抑制するMEK阻害剤に匹敵する薬剤が見つかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1) BRAFやRASという分子の活性変異を有することでERK経路という細胞内シグナルが恒常的に活性化している、がんの薬物治療に対して新たな知見が得られた。すなわち、現在は固形がんへの使用が未承認であるHDAC阻害剤という抗がん剤を、今回明らかにしたMNKという酵素阻害剤と併用することで新たな固形がん治療法につながる可能性がある。

2) 脂肪細胞において、炎症にかかわるNLRP3という分子の発現誘導を抑制することのできる新しい薬物ソースを発見したことから、糖尿病などの肥満関連疾患の新たな治療薬の候補に繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We have clarified the possibility of effective drug treatment using MEK inhibitors, which are specific blockers of the ERK pathway, for cancer cells and hypertrophic adipocytes with constitutive activation of the ERK pathway.

In this study, we focused on the MNK kinase downstream of the ERK pathway and the NLRP3 molecule forming inflammasome, which was found to be the target gene of the ERK pathway, as new therapeutic targets. Finally, we found that the combination treatment of an MNK inhibitor called MNK-11 and an HDAC inhibitor shows a remarkable cell death-inducing effect on some cancer cells having BRAF active mutations. In addition, we found a new drug comparable to a MEK inhibitor that suppresses NLRP3 induction in 3T3-L1 adipocytes stimulated by TNF .

研究分野：生物系薬学

キーワード：ERK1/2 MNK1/2 がん 糖尿病 脂肪細胞 NLRP3

1. 研究開始当初の背景

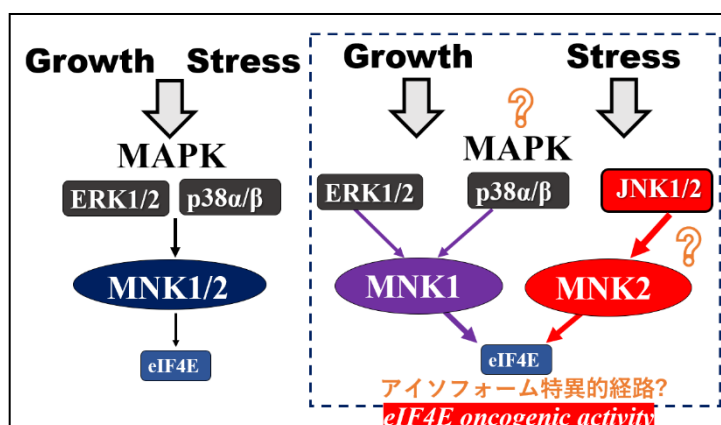
これまでに、我々はERK1/2-MAPキナーゼ(ERK-MAPK)経路の恒常的活性化を伴うがん細胞や肥満・肥大化脂肪細胞に対する、ERK経路の特異的遮断剤MEK阻害剤を用いた効果的な薬物治療の可能性を上図のように報告してきた。本研究では、新たな治療標的として、より有害事象の可能性が低いと考えられるERK経路下流のキナーゼ(1)



MNKや、ERK経路の標的遺伝子であることを見出した(2) NLRP3という炎症マシーナリーであるインフラマソーム構成分子に注目した。

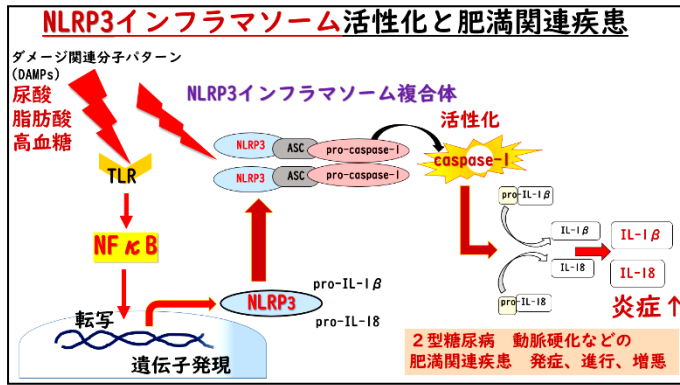
1) ERK経路下流のキナーゼでタンパク質合成翻訳開始の制御中心であるMNK1/2は、MAPキナーゼ(ERK/p38)制御下で発がん・がん細胞の増殖に関与する分子と考えられ、MNKを分子標的とし、これまでの申請者らの研究成果を生かしてMNK阻害剤とHDAC阻害剤との併用効果について検討した。

ERK経路の恒常的活性化を伴うヒトがん細胞において、ERK経路遮断薬であるMEK阻害剤とHDAC阻害剤との併用効果に近い相乗効果を、下流のMNK1/2キナーゼ阻害剤(CGP57380)とHDAC阻害剤との併用によっても確認した。一方、構造の異なるMNK1/2阻害剤(ETP-45835)とHDAC阻害剤との併用効果はほとんど見られなかった(3.研究の方法の図を参照)。さらに、ERK経路下流のキナーゼであるMNKは、ERKおよびp38の制御下で調節されると報告されているが、各種MAPK阻害剤(MEK阻害剤PD184352、p38-MAPK阻害剤SB203580、JNK阻害剤SP600125)を用いて再検討した結果、三つ目のMAPKであるJNKもMNK上流MAPKとして働く可能性を見出した。しかも、MNK1とMNK2アイソフォームでそれぞれ固有のシグナル経路を有していると考えられた(下図)。

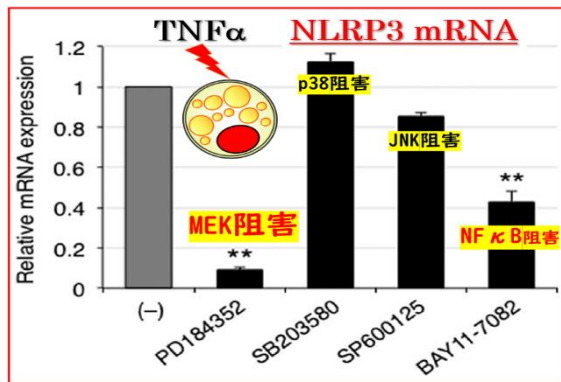


このことは、MNK1とMNK2に対する阻害効果の特異性が微妙に異なる二種類のMNK阻害剤(CGP57380およびETP-45835)とHDAC阻害剤との併用効果の違い(一貫性のない結果)を反映している可能性もある。そこで、詳細にMNK1/2各アイソフォーム特異的シグナル経路明らかにするとともに、ERK経路下流のがん治療標的としての可能性を、いくつかのMNK阻害剤を用いて、さらに検討していくこととした。

2) 肥満・肥大化脂肪細胞に対し、MEK 阻害剤を用い、糖尿病治療効果を見出したことから、近年肥満関連疾患の悪化との関連が注目される **NLRP3** に注目した (下図)。



3T3-L1 脂肪細胞における TNF α による NLRP3 の誘導が、他の薬剤に比べて MEK 阻害剤により顕著に抑制された (下図)。

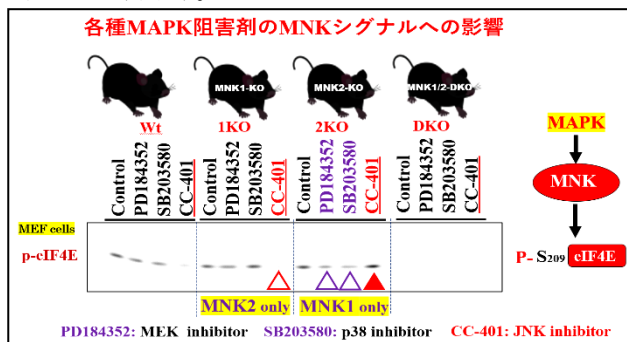


2. 研究の目的

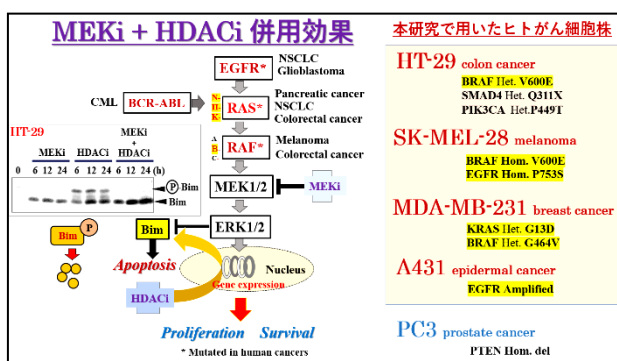
上述の研究背景に基づき、ERK 下流のキナーゼ(1) MNK および標的遺伝子(2) NLRP3 の難治性疾患に対する治療標的としての可能性を検証する。

3. 研究の方法

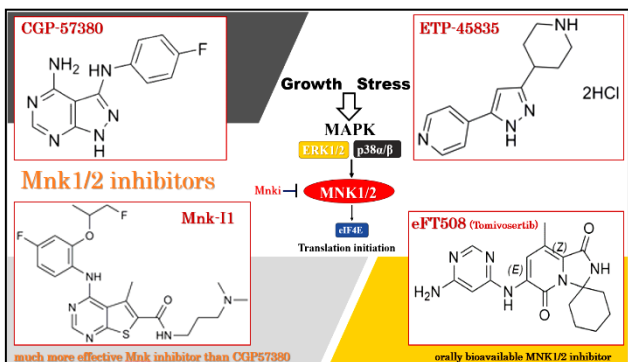
1) a) MNK1、MNK2 のシングル、ダブルノックアウトマウス (共同研究者福永ら作製) より調整した MEF 細胞を用いて、基質である eIF-4E のリン酸化を指標に、MNK シグナルの解析を行った (下図)。



b) 次の様な各種ヒトがん細胞株を用いて



次の新たな阻害剤も加えた 4 種類の MNK 阻害剤と HDAC 阻害剤 (HC-toxin、TSA) との併用効果を検討した



2) a) 3T3-L1 脂肪細胞株に対して、炎症反応 (=LPS+TNFα+IL-1β) 刺激 3 時間による NLRP3 発現誘導をモニターし、MEK 阻害剤 PD184352 による抑制をポジティブ・コントロールとして、その他のキナーゼ阻害剤などの効果を調べた。

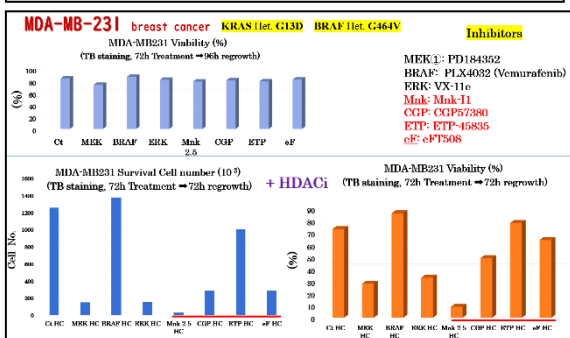
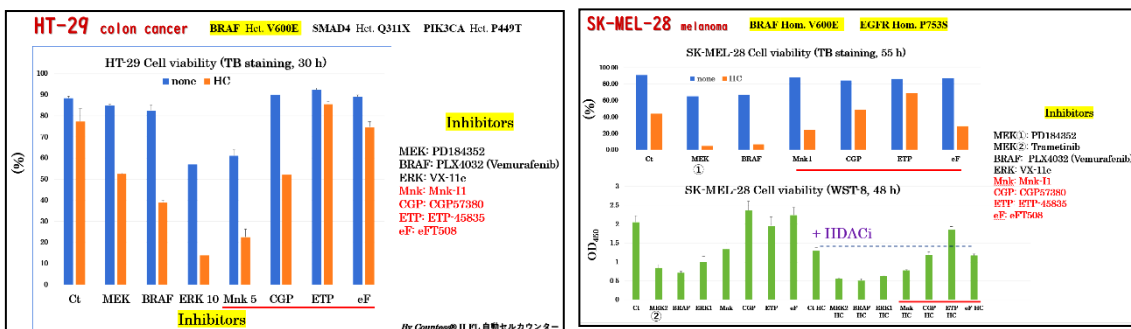
b) 動物モデル実験用に NLRP3 遺伝子を CRISPR/CAS9 システムによって破壊した (CRISPR-out) マウスの作製を試みた

4. 研究成果

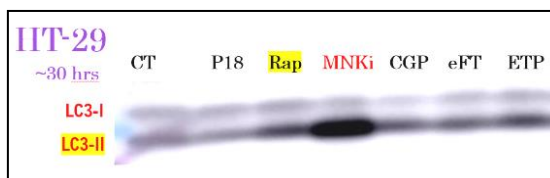
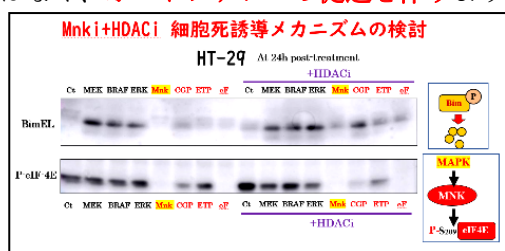
1)

a) アイソフォーム・シングルノックアウト MEF 細胞を用いて調べることで、MNK1 と MNK2 で MAPK 阻害剤感受性が異なり、MNK1 は ERK および p38 阻害剤感受性、MNK2 は JNK 阻害剤感受性が高かった。しかし、MNK は MNK1/2 ヘテロダイマーで機能している可能性もあり、その役割はさらなる検討を要する。

b) BRAF、KRAS 変異がん細胞株で、いくつかの MNK 阻害剤は MEK、ERK 阻害剤と同レベルに HDAC 阻害剤感受性を上昇させた。特に、**MNK-I1** の効果は 4 種類の MNK 阻害剤の中で最強、そのメカニズムを MEK 阻害剤との併用の場合と比較した (下図)。

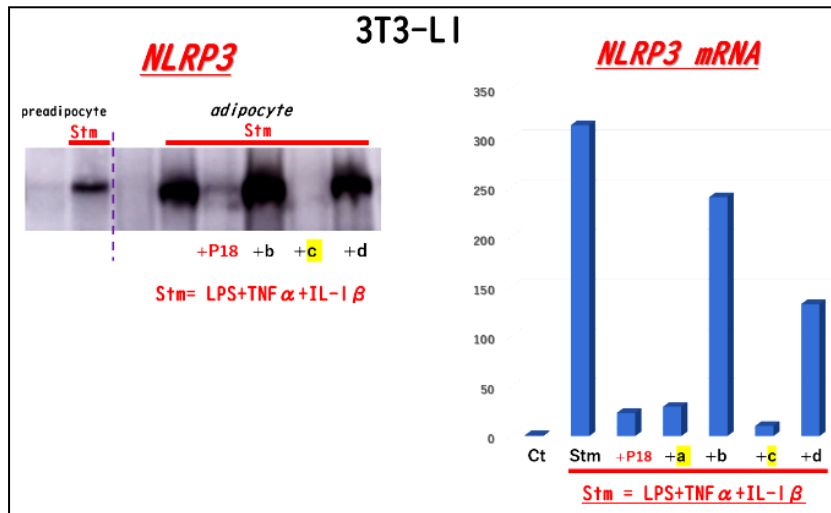


メカニズムとして、MEK や ERK 阻害剤では BimEL の亢進を伴ったが、**MNK-I1** ではそうではなく、**オートファジーの促進を伴う**ようであった (LC3-II の上昇)。

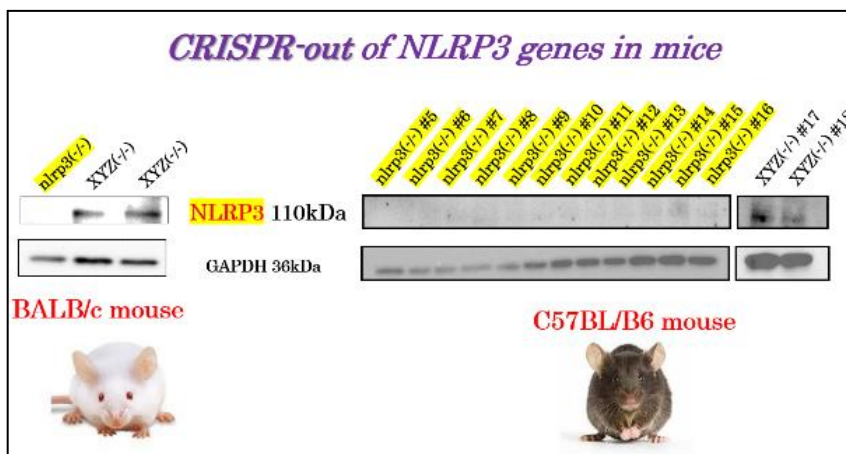


2)

a) 3T3-L1 脂肪細胞株に対して、LPS+TNF α +IL-1 β 刺激 3 時間による NLRP3 発現誘導を、下図のようにタンパク質、mRNA レベルでモニターすることができ、いくつかのキナーゼ阻害剤などをスクリーニングすることで、MEK 阻害剤(P18)以上にその発現を抑制できる薬物 C を発見した。



b) 下図のように **NLRP3 遺伝子の CRISPR-out** マウスの作製に成功した。今後、このモデルマウスを有効利用したい。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Y.Hattori, N.Shimizu, K.Ozaki, H.Onishi.	4. 巻 11
2. 論文標題 Effect of cationic lipid type in folate-PEG-modified cationic liposomes on folate receptor-mediated siRNA transfection in tumor cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/pharmaceutics11040181.	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 Hattori Y, Nakamura M, Takeuchi N, Tamaki K, Shimizu S, Yoshiike, Y, Taguchi M, Ohno H, Ozaki K, Onishi H.	4. 巻 27
2. 論文標題 Effect of cationic lipid in cationic liposomes on siRNA delivery into the lung by intravenous injection of cationic lipoplex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Drug Target.	6. 最初と最後の頁 217-227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1061186X.2018.1502775	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 Hattori Y, Tamaki K, Ozaki K, Kawano K, Onishi H.	4. 巻 52
2. 論文標題 Optimized combination of cationic lipids and neutral helper lipids in cationic liposomes for siRNA delivery into the lung by intravenous injection of siRNA lipoplexes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Drug Deliv. Sci. Tec.	6. 最初と最後の頁 1042-1050
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jddst.2019.06.016	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 A. Kumagai, K. Shimizu, R. Kurata, X. Cui, T. Isagawa, M. Harada, J. Nagai, Y. Yoshida, K. Ozaki, N. Takeda, H. Semba, T Yonezawa.	4. 巻 20
2. 論文標題 Establishment of Novel Cells Stably Secreting Various Human IL-18 Recombinant Proteins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Curr Pharm Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 47-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1389201020666190206203640	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 Hattori Y, Nakamura M, Takeuchi N, Tamaki K, Ozaki K, Onishi H.	4. 巻 1
2. 論文標題 Effect of cationic lipid type in PEGylated liposomes on siRNA delivery after intravenous injection of siRNA lipoplexes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Wrld. Acd. Sci.	6. 最初と最後の頁 74-85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/wasj.2019.8	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 Hattori Y, Takeuchi N, Nakamura M, Yoshiki Y, Taguchi M, Ohno H, Ozaki K, Onishi H	4. 巻 48
2. 論文標題 Effect of cationic lipid type in cationic liposomes for siRNA delivery into the liver by sequential injection of chondroitin sulfate and cationic lipoplex.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Drug Deliv. Sci. Tec.	6. 最初と最後の頁 235-244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jddst.2018.09.022	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 Kurata R, Kumagai A, Cui X, Harada M, Nagai J, Yoshida Y, Ozaki K, Tanaka Y, Yonezawa T	4. 巻 19
2. 論文標題 Establishment of novel reporter cells stably maintaining transcription factor-driven human secreted alkaline phosphatase expression.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Curr Pharm Biotechnol.	6. 最初と最後の頁 224-231
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24489/jjphe.2018-004	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 Hattori Y, Tamaki K, Sasaki S, Ozaki K, Onishi H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Effect of PEG-anchor in PEGylated siRNA lipoplexes on in vitro gene silencing effects and siRNA biodistribution in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Med. Rep.	6. 最初と最後の頁 4183-4196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/mmr.2020.11525.	査読の有無 有
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6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 倉田里穂 福永理己郎 尾崎恵一
2. 発表標題 ERK1/2-MAPK下流キナーゼMnk1/2のがん分子標的としての可能性
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 木津美里, 水野和史, 藤井俊裕, 藤井忍, 尾崎恵一, 福永理己郎
2. 発表標題 JNK阻害剤CC-401による翻訳開始因子4E (eIF4E) リン酸化の抑制作用について- JNK1/2ノックアウトHeLa細胞を用いた解析
3. 学会等名 第69回 日本薬学会関西支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 T.Shima, K.Taniguchi, K.Ozaki, M.Shibata, K.Uchiyama.
2. 発表標題 The effects of combination therapy by MEK and HDAC inhibitor in mouse mammary cancer cells.
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 尾崎恵一
2. 発表標題 ERK-MAPキナーゼ経路を標的としたシグナル伝達病治療の可能性～MEK阻害剤は二刀流！？
3. 学会等名 第13回 医工薬連携の会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎 恵一
2. 発表標題 HDAC (ヒストン脱アセチル化酵素) 阻害剤は、併用療法により制がん効果を最大限に発揮する!
3. 学会等名 探索医療薬物研究会 第6回合同シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 服部 喜之, 玉置 響子, 逆井 勝, 尾崎 恵一, 大西 啓
2. 発表標題 PEG修飾siRNAリポプレックスのPEGアンカー部の違いが及ぼすin vitro遺伝子発現抑制効果とマウス生体内分布の影響
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
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
研究分担者	福永 理己郎 (Fukunaga Rikiro) (40189965)	大阪薬科大学・薬学部・教授 (34413)	

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
---------	---------