

平成 30 年 5 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04806

研究課題名(和文)新規Wntシグナル制御系を標的とした抗癌剤の開発

研究課題名(英文)Development of anti-cancer agents targeting R-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 axis

研究代表者

藤城 光弘 (Fujishiro, Mitsuhiro)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：70396745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナル制御機構：R-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43系を標的とした抗癌剤としてのR-spondin活性阻害剤、腸管粘膜再生促進剤としてのR-spondin代替低分子化合物の同定を目指し、低分子化合物ライブラリーをスクリーニングした。その結果、再現性を持ってR-spondin阻害活性を有する化合物を60種類、R-spondin様活性を有する化合物を1種類同定した。その後の解析により、R-spondin様作用を有する化合物はZNRF3/RNF43を介して作用することが確認され、消化器疾患再生医療領域における有望な創薬シーズになりうることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Utilizing a novel assay system targeting R-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 axis, we first screened a small-molecule compound library to elucidate the R-spondin inhibitors as the anti-cancer agents and the R-spondin substitutes as the stimulating factors of intestinal stem cells. As the results, 60 compounds for inhibitor and one compound for stimulator became the candidates.

As the succeeding analysis, the stimulator was confirmed to act through R-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 axis, which indicated that the compound would be a promising seed of agents in the field of gastrointestinal regenerative medicine.

研究分野：消化器内科学、下部消化管

キーワード：Wntシグナル R-spondin 抗癌剤 低分子化合物ライブラリー 腸管幹細胞 R-spondin代替低分子化合物

### 1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル伝達系は個体発生をはじめとした様々な生理現象において重要な働きをしているが、近年、癌の発生にも深く関与することが明らかとなり、 $\beta$ -catenin をはじめとする細胞内 Wnt シグナル関連分子は抗癌剤の標的分子として注目されている。R-spondin は Wnt シグナルを増強する分泌タンパク質であり、その作用は Wnt 受容体の negative regulator である細胞膜型 E3 ligase : ZNRF3/RNF43 を介して発揮される。ZNRF3/RNF43 は、細胞内へと恒常的にリサイクルする 7 回膜貫通型細胞膜分子 LGR4/5/6 と R-spondin 依存的に会合することで細胞内へと取り込まれる。これにより Wnt 受容体の細胞膜上での発現が増加し、細胞内シグナル伝達が増強される(新規 Wnt シグナル制御機構 : R-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 系)。近年、RNF43 の遺伝子異常がヒト大腸癌由来の細胞株や膵臓癌、卵巣癌において報告され、このことは細胞膜レベルにおける新規 Wnt シグナル制御機構において、R-spondin 活性阻害剤が抗癌剤として作用しうることを示唆している。また一方で、R-spondin は Wnt シグナルを増強することで腸管幹細胞を刺激し、傷害された腸管粘膜の再生を促進することも知られている。このことは R-spondin 活性増強剤および R-spondin 代替低分子化合物が腸管粘膜再生促進剤として作用しうることを示唆している。

### 2. 研究の目的

$\beta$ -galactosidase による酵素断片コンプリメンテーション法を用いて樹立した R-spondin 依存的な ZNRF3/RNF43 と LGR4/5/6 のタンパク質間相互作用をモニターする独自のアッセイ系を用いて R-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 系を阻害もしくは増強する化合物を低分子化合物ライブラリーからスクリーニング・同定することにより新規抗癌剤もしくは新規腸管粘膜再生促進剤の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

酵素  $\beta$ -galactosidase は、N 末端側の 6kDa の断片と残りの C 末端側の断片の 2 つに分離すると酵素活性を失うが、両者が会合すると酵素活性が復活する。そこで R-spondin 依存的な ZNRF3/RNF43 と LGR4/5/6 のタンパク質間相互作用をモニターするため、二つの融合分子、すなわち LGR4 に  $\beta$ -galactosidase-断片を結合させた分子 (LGR4-) 及び ZNRF3 に  $\beta$ -galactosidase-断片を結合させた分子 (ZNRF3-) を作成し、このアッセイ系を用いて低分子化合物ライブラリー(本学薬学部所有)をスクリーニングする。

#### R-spondin 活性阻害剤の同定

R-spondin 活性増強剤もしくはそれ自体で R-spondin 様作用を有する R-spondin 代替低分子化合物の同定

### 4. 研究成果

#### R-spondin 活性阻害剤の同定

LGR4-、ZNRF3- の二つの融合分子を HEK293T 細胞に同時に一過性に発現させ、90% 効果濃度 (EC90) の R-spondin3 で刺激した。ここに低分子化合物を添加し、R-spondin3 刺激により惹起された  $\beta$ -galactosidase 活性を阻害するものをスクリーニングしたところ、再現性をもって阻害活性を有する候補化合物を 60 種類同定することができた。

#### R-spondin 活性増強剤もしくは R-spondin 代替低分子化合物の同定

LGR4-、ZNRF3- の二つの融合分子を HEK293T 細胞に同時に一過性に発現させ、10% 効果濃度 (EC10) の R-spondin3 で刺激した。ここに低分子化合物を添加し、R-spondin3 刺激により惹起された  $\beta$ -galactosidase 活性をさらに増強するものをスクリーニングしたところ、再現性をもって活性増強作用を有する候補化合物を 1 つ同定することができた。さらにこの化合物は R-spondin3 非存在下でも、 $\beta$ -galactosidase 活性を上昇させることができたため、それ自体で R-spondin 様作用を有する R-spondin 代替低分子化合物である可能性が示唆された。

予想以上に低分子化合物ライブラリーのスクリーニングに時間を要したため、分子標的抗癌剤として期待される R-spondin 活性阻害剤ではなく、化合物が 1 つに絞られている腸管粘膜再生促進剤として期待される R-spondin 代替低分子化合物に絞った研究を遂行することとし、Wnt シグナルの活性化状態を検定できるレポーターアッセイ系を HEK293T 細胞を用いて運用し、同定された R-spondin 様作用を有する化合物およびその類縁化合物を評価した。予想通りこの一連の化合物群は R-spondin と同様にそれ自体でレポーター活性を上昇させた。次にこの活性が ZNRF3/RNF43 依存的であることを示すため、CRISPR/Cas9 システムを用いて HEK293T 細胞において内在性に発現する ZNRF3/RNF43 をダブルでノックアウトした。このダブルノックアウト細胞においてレポーターアッセイを施行したところ、野生型細胞で認められた化合物のレポーター活性が完全に消失した。以上より、今回同定した低分子化合物は ZNRF3/RNF43 を介して Wnt シグナルを増強させる R-spondin 代替低分子化合物であり、消化器疾患再生医療領域における有望な創薬シーズになりうることが示唆された。

### 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 24 件)

1. Lee IT, Chang AS, Manandhar M, Shan Y, Fan J, Izumo M, Ikeda Y, Motoike T, Dixon S, Seinfeld JE, Takahashi JS, Yanagisawa M. Neuromedin s-producing neurons act as essential pacemakers in the suprachiasmatic nucleus to couple

- clock neurons and dictate circadian rhythms. *Neuron*. 査読有、2015、85、1086-102、doi: 10.1016/j.neuron.2015.02.006.
2. Kumagai H, Ikeda Y, Motozawa Y, Fujishiro M, Okamura T, Fujio K, Okazaki H, Nomura S, Takeda N, Harada M, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Suzuki J, Yamazaki T, Yamamoto K, Komuro I, Yanagisawa M. Quantitative Measurement of GPCR Endocytosis via Pulse-Chase Covalent Labeling. *PLoS One*. 査読有、2015、10、e0129394.doi:10.1371/journal.pone.0129394.
  3. Ikeda Y, Kumagai H, Okazaki H, Fujishiro M, Motozawa Y, Nomura S, Takeda N, Toko H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Suzuki J, Yamazaki T, Komuro I, Yanagisawa M. Monitoring -arrestin recruitment via -lactamase enzyme fragment complementation: purification of peptide E as a low-affinity ligand for mammalian bombesin receptors. *PLoS One*. 査読有、2015、10、e0127445. doi: 10.1371/journal.pone.0127445.
  4. Nakayama A, Morita H, Nakao T, Yamaguchi T, Sumida T, Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Takahashi T, Imaizumi A, Hashimoto T, Nagai R, Komuro I. A Food-Derived Flavonoid Luteolin Protects against Angiotensin II-Induced Cardiac Remodeling. *PLoS One*. 査読有、2015、10、e0137106. doi: 10.1371/journal.pone.0137106.
  5. Matsusaka K, Ishikawa S, Nakayama A, Ushiku T, Nishimoto A, Urabe M, Kaneko N, Kunita A, Kaneda A, Aburatani H, Fujishiro M, Seto Y, Fukayama M. Tumor Content Chart-Assisted HER2/CEP17 Digital PCR Analysis of Gastric Cancer Biopsy Specimens. *PLoS One*. 査読有、11、2016、e0154430, doi: 10.1371/journal.pone.0154430.
  6. Onoyama H, Kamiya M, Kuriki Y, Komatsu T, Abe H, Tsuji Y, Yagi K, Yamagata Y, Aikou S, Nishida M, Mori K, Yamashita H, Fujishiro M, Nomura S, Shimizu N, Fukayama M, Koike K, Urano Y, Seto Y. Rapid and sensitive detection of early esophageal squamous cell carcinoma with fluorescence probe targeting dipeptidylpeptidase IV. *Sci Rep.*, 査読有、6、2016、26399, doi: 10.1038/srep26399.
  7. Kobayashi N, Suzuki J, Aoyama N, Sato H, Akimoto S, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Izumi Y, Isobe M. Toll-like receptor 4 signaling has a critical role in *Porphyromonas gingivalis*-accelerated neointimal formation after arterial injury in mice. *Hypertens Res*. 査読有、2016、39、717-22. doi: 10.1038/hr.2016.58.
  8. Shiheido Y, Maejima Y, Suzuki JI, Aoyama N, Kaneko M, Watanabe R, Sakamaki Y, Wakayama K, Ikeda Y, Akazawa H, Ichinose S, Komuro I, Izumi Y, Isobe M. a periodontal pathogen, enhances myocardial vulnerability, thereby promoting post-infarct cardiac rupture. *J Mol Cell Cardiol*. 査読有、99、2016、123-137、doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.03.017..
  9. Ikeda Y, Kumagai H, Motozawa Y, Suzuki J. Growth Differentiation Factor 15 (GDF15) as a Reliable Biomarker for Cardiovascular Risk Assessment. *Int Heart J*. 査読有、57、2016、1-2、doi: 10.1536/ihj.15-324.
  10. Ichimura T, Abe H, Morikawa T, Yamashita H, Ishikawa S, Ushiku T, Seto Y, Fukayama M. Low density of CD204-positive M2-type tumor-associated macrophages in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: a clinicopathologic study with digital image analysis. *Hum Pathol*. 査読有、56、2016、74-80、doi: 10.1016/j.humpath.2016.06.002.
  11. Amiya E, Morita H, Hatano M, Nitta D, Hosoya Y, Maki H, Motozawa Y, Sato N, Ishiura H, Numakura S, Shintani Y, Kinugawa K, Takeda N, Shimizu J, Tsuji S, Komuro I. Fukutin gene mutations that cause left ventricular noncompaction. *Int J Cardiol*. 査読有、222、2016、727-729, doi: 10.1016/j.ijcard.2016.08.011.
  12. Morita H, Komuro I. A Strategy for Genomic Research on Common Cardiovascular Diseases Aiming at the Realization of Precision Medicine: Personal Insights and Perspectives. *Circ Res*. 査読有、119、2016、900-903, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309802.
  13. Ikenoue T, Terakado Y, Nakagawa H, Hikiba Y, Fujii T, Matsubara D, Noguchi R, Zhu C, Yamamoto K, Kudo Y, Asaoka Y, Yamaguchi K, Ijichi H, Tateishi K, Fukushima N, Maeda S, Koike K, Furukawa Y. A novel mouse model of intrahepatic cholangiocarcinoma induced by liver-specific Kras activation and Pten deletion. *Sci Rep*. 査読有、6、2016、23899, doi: 10.1038/srep23899.

14. Saito R, Abe H, Kunita A, Yamashita H, Seto Y, Fukayama M. Overexpression and gene amplification of PD-L1 in cancer cells and PD-L1+ immune cells in Epstein-Barr virus-associated gastric cancer: the prognostic implications. *Mod Pathol*. 査読有、2017、30、427-439. doi: 10.1038/modpathol.2016.202.
15. Mizutani H, Ono S, Ushiku T, Kudo Y, Ikemura M, Kageyama N, Yamamichi N, Fujishiro M, Someya T, Fukayama M, Koike K, Onodera H. Transparency-enhancing technology allows three-dimensional assessment of gastrointestinal mucosa: A porcine model. *Pathol Int*. 査読有、2018、102-108. doi: 10.1111/pin.12627.
16. Hara H, Takeda N, Morita H, Hatano M, Amiya E, Maki H, Minatsuki S, Taki M, Shiraishi Y, Fujiwara T, Maemura S, Komuro I. Three novel BMP2 mutations associated with advanced pulmonary arterial hypertension. *Hum Genome Var*. 査読有、2017、4、17010. doi: 10.1038/hgv.2017.10.
17. Oshima T, Hara H, Takeda N, Hasumi E, Kuroda Y, Taniguchi G, Inuzuka R, Nawata K, Morita H, Komuro I. A novel mutation of NFIX causes Sotos-like syndrome (Malan syndrome) complicated with thoracic aortic aneurysm and dissection. *Hum Genome Var*. 査読有、2017、4、17022. doi: 10.1038/hgv.2017.22.
18. Tobita T, Nomura S, Morita H, Ko T, Fujita T, Toko H, Uto K, Hagiwara N, Aburatani H, Komuro I. Identification of MYLK3 mutations in familial dilated cardiomyopathy. *Sci Rep*. 7, 17495. doi: 10.1038/s41598-017-17769-1.
19. Tobita T, Nomura S, Fujita T, Morita H, Asano Y, Onoue K, Ito M, Imai Y, Suzuki A, Ko T, Satoh M, Fujita K, Naito AT, Furutani Y, Toko H, Harada M, Amiya E, Hatano M, Takimoto E, Shiga T, Nakanishi T, Sakata Y, Ono M, Saito Y, Takashima S, Hagiwara I, Aburatani H, Komuro I. Genetic basis of cardiomyopathy and the genotypes involved in prognosis and left ventricular reverse remodeling. *Sci Rep*. 査読有、2018、8、1998. doi: 10.1038/s41598-018-20114-9.
20. Nagata N, Iwanari H, Kumagai H, Kusano-Arai O, Ikeda Y, Aritake K, Hamakubo T, Urade Y. Generation and characterization of an antagonistic monoclonal antibody against an extracellular domain of mouse DP2 (CRTH2/GPR44) receptors for prostaglandin D2. *PLoS One*. 査読有、12、e0175452. doi: 10.1371/journal.pone.0175452.
21. Kamo T, Akazawa H, Suda W, Saga-Kamo A, Shimizu Y, Yagi H, Liu Q, Nomura S, Naito AT, Takeda N, Harada M, Toko H, Kumagai H, Ikeda Y, Takimoto E, Suzuki JI, Honda K, Morita H, Hattori M, Komuro I. Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PLoS One*. 査読有、12、e0174099. doi: 10.1371/journal.pone.0174099.
22. Takanashi M, Taira Y, Okazaki S1, Takase S, Kimura T, Li CC, Xu P1, Noda A, Sakata I, Kumagai H, Ikeda Y, Iizuka Y, Yahagi N, Shimano H, Osuga JI, Ishibashi S, Kadowaki T, Okazaki H. Role of Hormone-sensitive Lipase in Leptin-Promoted Fat Loss and Glucose Lowering. *J Atheroscler Thromb*. 査読有、2017、24、1105-1116. doi: 10.5551/jat.39552.
23. Watanabe R, Suzuki JI, Wakayama K, Maejima Y, Shimamura M, Koriyama H, Nakagami H, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Morishita R, Komuro I, Isobe M. A peptide vaccine targeting angiotensin II attenuates the cardiac dysfunction induced by myocardial infarction. *Sci Rep*. 査読有、2017、7、43920. doi: 10.1038/srep43920.
24. Sato H, Suzuki JI, Aoyama N, Watanabe R, Kaneko M, Shiheido Y, Yoshida A, Wakayama K, Kumagai H, Ikeda Y, Akazawa H, Komuro I, Isobe M, Izumi Y. A Periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* deteriorates Isoproterenol-Induced myocardial remodeling in mice. *Hypertens Res*. 査読有、2017、40、35-40. doi: 10.1038/hr.2016.114.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特記事項なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤城 光弘 (FUJISHIRO, Mitsuhiro)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号： 7 0 3 9 6 7 4 5

### (2) 研究分担者

池田 祐一 (IKEDA, Yuichi)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号： 1 0 7 4 4 4 1 9

熊谷 英敏 (KUMAGAI, Hidetoshi)

東京大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号： 2 0 2 8 1 0 0 8  
山下 裕玄 (YAMASHITA, Hiroharu)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号： 5 0 5 9 9 3 9 7  
森田 啓行 (MORITA, Hiroyuki)  
東京大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号： 6 0 3 2 3 5 7 3  
浅岡 良成 (ASAOKA, Yoshinari)  
東京大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号： 9 0 4 3 1 8 5 8