

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04824

研究課題名(和文) 組織再構築転写因子KLFのin vivo蛋白複合体の解析とその阻害物質の探索

研究課題名(英文) Protein complex analysis of transcriptional factor KLF, and development of a low molecular weight compound that inhibits KLF5 transcriptional activity.

研究代表者

永井 良三 (Nagai, Ryoza)

自治医科大学・医学部・学長

研究者番号：60207975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：我々はKLF5が心不全、動脈硬化、肥満、癌等の炎症性病態において重要な役割を果たすことを解明してきた。ここからKLF5阻害薬が心血管系疾患等の治療に有効と予想された。しかしKLF5は明確な立体構造をとらない天然変性蛋白であるため、立体構造に基づく阻害薬開発は困難だった。そこで我々はKLF5の蛋白間相互作用すると予想される部位の構造に類似する低分子化合物を合成したところ、これがKLF5阻害薬として機能することを見出した。本化合物は大腸癌細胞と平滑筋細胞の増殖を抑制し、大動脈縮窄による心不全を改善した。本化合物は、癌と組織再構築の関与する循環器疾患に対する新たな薬剤として期待できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：From our previous studies, KLF5 is a potential therapeutic target for cardiovascular disease and cancer. However, structure-based drug design of KLF5 inhibitors has not been successful because KLF5 is an intrinsically disordered protein. Therefore, we have analyzed the structure of KLF5 in silico and synthesized several low molecular weight compounds which mimic the α -helical region of KLF5 which is suggested to be involved in protein-protein interactions. We have found several compounds to inhibit KLF5 function as shown by inhibition of cell growth of smooth muscle cells and colorectal cancer cells. The compounds were found to reduce protein levels of KLF5 without altering KLF5 mRNA levels, suggesting degradation of KLF5 was accelerated in the presence of the compounds. We further found that the compounds can improve heart failure caused by aortic constriction. We conclude these compounds to be promising new therapeutic drugs for cardiovascular diseases as well as cancers.

研究分野：循環器内科学

キーワード：KLF5 蛋白間相互作用阻害薬 分子創薬 心不全 癌

1. 研究の背景

心血管疾患と各種の癌は異なるシステムの疾患であるが、内的及び外的ストレスによって生ずる点では共通している。さらに両者は同一の遺伝子転写系が活性化することが知られている。したがって心血管細胞と癌細胞のストレスシグナルを分析することにより、新しい病態の理解や治療法を見出すことが可能である。こうした発想に基づく疾患研究は数少ない。

我々は動脈硬化の発症に重要な現象である血管平滑筋の形質転換を研究する過程で、胎児型平滑筋ミオシンを見出し、その転写因子として KLF5 を同定、その後長年にわたり KLF5 の分子機能を解析してきた。

その結果、転写因子 KLF5 が平滑筋および間葉系細胞の活性化・増殖、脂肪細胞分化、骨格筋の脂肪酸代謝、摂食調節、異物に対する肉芽形成、大腸癌の発生と増殖、さらに iPS/ES 細胞の維持・誘導等における意義が明らかとなった。

さらに最近、我々は腎臓の集合管上皮細胞に発現する KLF5 が、心臓—脳—腎臓の連関を介して、圧負荷が加えられた心臓に対する保護作用を示すことを報告した (*Nat Med* 2017) (図 1)。

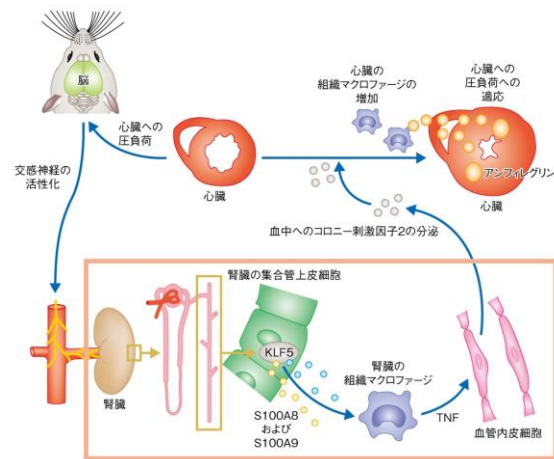


図 1: 組織マクロファージによる心臓における恒常性の維持。心臓に対する圧負荷に対して腎集合管上皮細胞の KLF5 が活性化し、腎臓から G-CSF を分泌、これが心臓の炎症性 M2 マクロファージを増加させ心筋を保護する。

これらの心血管系のストレス応答や臓器連関に加えて、KLF5 は消化管上皮細胞の分化と消化管癌の発症にも重要な役割を担っている。

KLF5 は、正常状態の体内では腸上皮細胞において高い発現を示す。とくに腸上皮幹細胞の存在する陰窩で発現が高く、分化

が進むにつれ発現は低下する。また KLF5 は、ヒト大腸癌で発現が上昇し、大腸癌など腸上皮細胞由来の癌は、腸上皮の幹細胞を発生母地とする。さらに一部のヒト大腸癌では KLF5 を含む遺伝子座の局所的な増幅が認められる。これらの知見から、KLF5 は腸上皮幹細胞由来の腫瘍形成に極めて重要と考えられた。

そこで 95% 以上のヒト大腸癌で変異を認める Wnt シグナルを、薬剤誘導法によりマウス腸上皮幹細胞特異的に活性化させたところ、全例で腸腫瘍が形成された。しかしながら、同時に上皮幹細胞特異的に KLF5 遺伝子を誘導的にノックアウトすると腫瘍化が完全に抑制された (*Cancer Res* 2014) (図 2)。

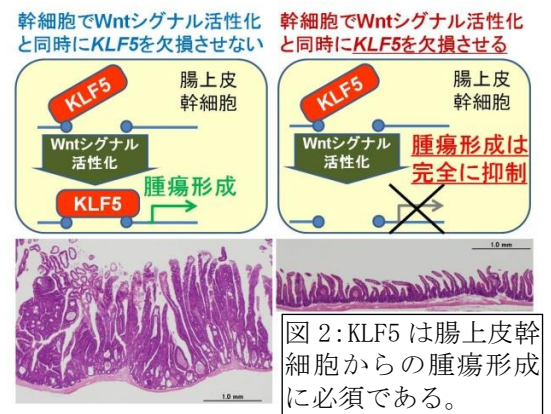


図 2: KLF5 は腸上皮幹細胞からの腫瘍形成に必須である。

なお Wnt シグナルの活性化は心不全の増悪因子としても知られており、KLF5 を阻害することにより心血管疾患と癌の双方に有効な治療薬の開発が可能になると期待される。

一般に分子創薬を行うには標的蛋白を結晶化して構造を決める必要がある。しかしながら KLF5 は天然変性蛋白であるため結晶化ができず、いまだに蛋白の立体構造が解かれていない。このため立体構造に基づく KLF5 阻害薬の開発は断念せざるを得なかった。

そこで我々は KLF5 の構造を詳細に分析し、KLF5 のなかでも硬い構造をとると推定される α -ヘリックス領域に注目し、この構造を模倣する低分子化合物をスクリーニングすることとした。

2. 研究の目的

転写因子 KLF5 が心血管疾患と癌の病態形成のいずれにも重要であることから、本研究では心血管疾患及び癌に対して、KLF5

依存的 Wnt- β カテニン系のシグナルを抑制する薬剤の開発を目的とした。

Wnt- β カテニン系は生存に重要なシグナルであり、これを一律に抑制すれば重大な副作用が生ずる。しかしながら KLF5 の転写複合体は増殖状態によって変化し、腫瘍細胞や心不全心筋においてそれぞれ固有の KLF5 複合体を形成すると考えられる。こうした発想で転写因子の阻害薬を開発した例はこれまでになく、これが実現すれば副作用の少ない抗癌剤と心不全薬が期待される。

3. 研究の方法

この課題を解決するため、我々は KLF5 の蛋白間相互作用に注目した。KLF5 は天然変性蛋白であり、確定した構造をとらない。しかしながら Kahn らがすでに示したように、変性蛋白のなかの比較的硬い部分を見出せば、これが転写複合体における蛋白間相互作用の結合部である可能性が高い。この場合、該当部分の構造に類似した低分子化合物は蛋白間阻害作用を示すと考えられる。

3-1. KLF5 阻害薬の分子設計と合成

KLF5 の中で比較的硬い構造を取ると予想されるのは α ヘリックスである。そこで KLF5 の構造を *in silico* にて解析し、該当部分を 2 カ所見出した。いずれも連続する 4 アミノ酸で、これらのペプチド構造に類似する化合物を、Prism 社との共同研究により同社のライブラリーから選択した (NC 化合物群)。

3-2. NC 化合物の構造活性相関に基づく改良

NC 化合物は 4 カ所で側鎖を変更することが可能である。そこでこれらの化学構造を系統的に変更し、36 種類の化合物を合成した。これらの化合物すべてについて、正常細胞に対する傷害性及び癌細胞の増殖抑制能を、培養大腸癌細胞と正常大腸上皮細胞を用いて検証した。

3-3. NC 化合物 (KLF5 阻害薬) の血管平滑筋細胞及び癌細胞の増殖に対する *in vitro* での薬効評価

ウサギ大動脈由来の合成型平滑筋細胞 (C2/2 細胞)、ヒト大腸癌細胞 (SW480 など)、ヒト正常大腸上皮細胞 (CCD841 細胞) に NC 化合物群を投与して、細胞生存抑制を評価

した。この検討から、正常細胞を傷害せず、癌細胞を選択的に抑制する化合物を選択した。

さらに 39 種のヒト癌細胞株で、NC 化合物の増殖抑制を検証し、増殖抑制パターンを他の抗癌剤とのを比較した (がん研究会 且博士に依頼)。

3-4. NC 化合物の心不全モデルに対する *in vivo* での薬効評価

マウス大動脈弓部の縮窄により、心臓に圧負荷を加えることが出来るが、縮窄の程度が強い場合は約 2 週間後から左室駆出率が低下し、やがて心不全に陥る。この心不全モデルマウスに NC 化合物 (毎回 25 mg/kg、1 日 2 回) を腹腔投与し、心エコーで左室駆出率を経時的に計測した。

3-5. NC 化合物の体内動態

マウス腹腔内に NC 化合物を投与したときの血中における薬物動態を明らかにするために、質量分析法により血中濃度の変化を分析した。マウスに NC 化合物 (25 mg/kg) を単回腹腔投与し、経時的に頸静脈から 30 μ L 採血した。QuEChERS 法を用いて抽出し、液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS) で定量した。

3-6. NC 化合物の移植癌に対する *in vivo* での薬効評価

ヌードマウス皮下にヒト大腸癌細胞を移植、4 日後に成着したマウスを 2 群に分類し NC 化合物を腹腔内投与し (3 mg/回、1 日一回)、腫瘍増殖に対する抑制効果を評価した。

3-7. KLF5 転写複合体の蛋白発現に対する NC 化合物の効果

ヒト大腸癌細胞及びヒト大腸正常細胞を用いて、NC 化合物がいずれの蛋白の量を抑制するのか、とくに KLF5 と転写複合体を構成する蛋白について重点的に Western Blotting により検討した。また、これらの蛋白の転写レベルでの変化について RT-PCR を用いて解析した。

3-8. NC 化合物による KLF5 転写複合体に対する効果

抗 KLF5 抗体を用いて KLF5 蛋白複合体を免疫沈降し、NC 投与により結合蛋白の結合がどのように阻害されるかを解析した。

さらにFLAG-HA KLF5をレトロウイルスベクターで発現させたヒト大腸癌細胞を作製し、抗FLAG抗体及び抗HA抗体を用いた免疫沈降を行い、高純度のKLF5蛋白複合体を精製した。

このシステムを用いて、KLF5蛋白複合体中に含まれるKLF5結合蛋白が、NC化合物によりどのように変化するかを検討した。

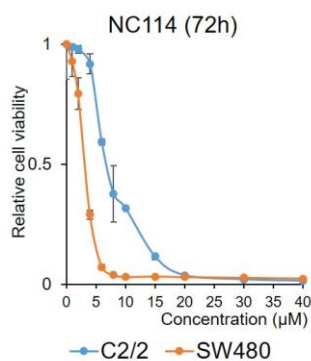
4. 研究成果

4-1. KLF5阻害作用をもつNC化合物の分子設計と合成。

KLF5の中の2か所の α ヘリックスのペプチド構造に類似する化合物をPrism社のケミカルライブラリーより同定し、そのなかで*in vitro*において大腸癌細胞に対する増殖抑制効果が強い化合物を選択した。さらに上流側の α ヘリックス構造のアミノ酸配列にできるだけ類似するように側鎖の構造を変化させた38種類の化合物を設計、*in vitro*実験用に合成した。その中で癌細胞の増殖抑制効果が最も強く、正常大腸細胞を傷害しない一つの化合物を同定し、*in vivo*の実験用にこれを大量合成した(NC114)。

4-2. NC化合物は合成型血管平滑筋細胞の増殖を*in vitro*で抑制する。

歴史的にKLF5はウサギ由来の合成型平滑筋細胞C2/2より、胎児型ミオシン重鎖遺伝子のCisエレメント結合蛋白として単離された。実際にC2/2細胞では大量にKLF5



た(図3)。

図3(未発表データ):NC化合物(NC-114)は、ヒト大腸癌細胞(SW480)のみならず、ウサギ大動脈由来の合成型平滑筋細胞(C2/2細胞)の生存を濃度依存的に抑制する(投与72h後)。

4-3. NC化合物は*in vitro*で、ヒト大腸細胞を抑制せずヒト大腸癌細胞の増殖を

選択的に抑制する。

ヒト大腸癌細胞(SW480等)及びヒト大腸正常細胞(CCD841)にNC化合物を投与した。その結果、NC化合物は、正常ヒト大腸細胞の生存に影響を与えることなく、ヒト大腸癌細胞の増殖を選択的に抑制し、IC50は約2 μ Mだった(図4)。

ヒト大腸癌細胞に、KLF5阻害薬を加えると、KLF5とWntシグナルで誘導される抗アポトーシス因子survivinなどの蛋白量を抑制することを明らかにした。しかし、ヒト正常細胞に同一濃度のKLF5阻害薬を投与してもKLF5やsurvivinなどの蛋白量の減少を認めなかった(図4)。なお同一試料におけるKLF5 mRNAの低下は認めなかったことから、NC化合物は、KLF5蛋白の分解を亢進すると考えられた。

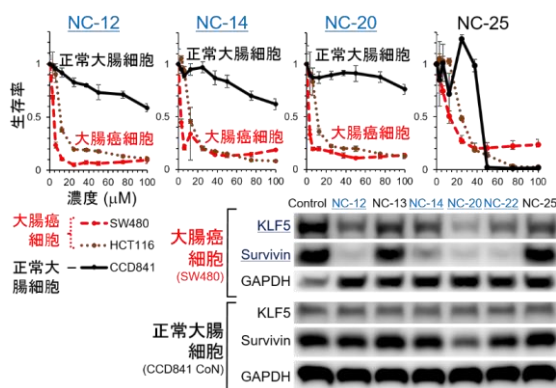


図4(未発表データ):NC化合物(NC-12, 14, 20)は、ヒト大腸癌細胞を選択的に死滅させる一方、ヒト正常大腸細胞を傷害しない(72h)。また、大腸癌細胞でKLF5、survivinの蛋白量を抑制した(24h, 10 μ M)。一方、大腸癌細胞を抑制しない化合物(NC-13, 25)はKLF5とsurvivinの蛋白量を抑制しない。なお正常大腸細胞ではNC化合物群はKLF5とsurvivinの蛋白量を抑制しなかった(24h, 10 μ M)。

また、癌細胞パネルを用いて39種類の癌に対する増殖抑制効果を検討したところ、NC化合物はヒト大腸癌細胞株のみならず、肺癌細胞などにも増殖抑制効果を示すこと、その抑制パターンは既存の抗癌剤とは異なることが明らかとなった。

4-4. NC化合物はKLF5とKLF5結合蛋白の間の結合を抑制する。

KLF5及びFLAG-HA KLF5の免疫沈降により、NC化合物が、 β Catenin、PARP、BAP1、YAPなどのKLF5結合蛋白とKLF5との間の結合を抑制した。

4-5. NC化合物は明確な構造活性相関を示す。

当初ライブラリーから選んだNC化合物群の中から、まず低濃度で癌細胞の増殖を選択的に抑制する化合物に焦点を絞り、その側鎖を系統的に変更した36種類の化合物を新たに合成した。これらについて癌細胞増殖抑制効果を検討したところ、化学構造と癌細胞抑制効果の間に、明確な構造活性相関が存在した。

この解析により最も活性の高かった化合物を基に、新たに化学構造を改変した化合物NC114を *in vivo* 実験用に合成した。

4-6. NC化合物は *in vivo* 心不全モデルマウスの心機能を改善する。

マウス大動脈弓部を *in vivo* で縮窄し、術後1日目よりNC化合物25 mg/kgを10日間、腹腔内投与したところ、左室駆出率の低下を防止することができた。また大動脈縮窄8週後、すでに心不全発症を発症した後に投与した場合も、左室駆出率の改善が認められた(図5)。

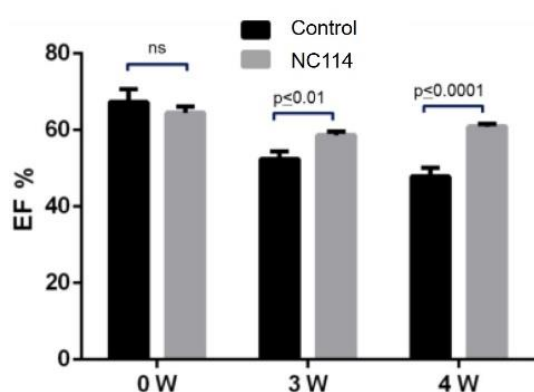


図5(未発表データ):NC化合物の腹腔内投与により、心不全モデルマウスにおける左室駆出率(EF)を有意に改善する(術後1日目より連続10日間の投与)。

なおNC114の血中薬物動態は、Two compartment modelに従い、血中濃度半減期は約26分だった。

4-7. NC化合物は *in vivo* 移植大腸癌の増殖を抑制する。

ヒト大腸癌細胞(SW480)をヌードマウス皮下に移植後、NC114を3 mg、1日一回連続7日間、腹腔内投与したところ、対照群に比べて投与群の腫瘍容量が低下した。この実験は投与方法をさらに工夫して検討を続

けている。

まとめ

本研究により、転写因子KLF5のなかの α ヘリックスを模倣する低分子化合物(NC化合物)は、増殖型平滑筋細胞のみならず大腸癌細胞の増殖を抑制し、しかも正常上皮細胞に対する障害が軽微であることが明らかとなった。NC化合物には構造活性相関が認められ、かつ *in vivo* における心不全モデル及び移植癌に対しても一定の効果を示した。

今回の研究は天然変性蛋白の蛋白間相互作用を抑制することによって、新たな創薬の展開が期待できることを示した点でも意義が大きい。従来のケミカルライブラリーからのスクリーニングだけでなく、蛋白間相互作用の抑制薬を *in silico* から見出す研究の重要性が明らかになったといえる。

しかしながらNC化合物がKLF5といかなる蛋白の間の相互作用を抑制するのか、またKLF5依存的に細胞増殖作用を示すのかはまだ解明されていない。今後、下流側の α ヘリックスを模倣する化合物の検討とともに、標的蛋白の同定、*in vitro* でのアッセイ系の確立、新たな化合物の同定などを進める予定である。

なお本化合物は現在、特許申請を控えているため、構造については明示できないことを申し添える。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

1. Klf5 maintains the balance of primitive endoderm versus epiblast specification during mouse embryonic development by suppression of Fgf4. Azami T, Waku T, Matsumoto K, Jeon H, Muratani M, Kawashima A, Yanagisawa J, Manabe I, Nagai R, Kunath T, Nakamura T, Kurimoto K, Saitou M, Takahashi S, Ema M. Development. 2017 Oct 15;144(20):3706-3718.

2. A heart-brain-kidney network controls adaptation to cardiac stress through tissue macrophage activation. Fujiu K, Shibata M, Nakayama Y, Ogata F, Matsumoto S, Noshita K, Iwami S,

Nakae S, Komuro I, Nagai R, Manabe I.
Nat Med. 2017 May;23(5):611-622.

3. Influence of periostin-positive cell-specific Klf5 deletion on aortic thickening in DOCA-salt hypertensive mice.

Zempo H, Suzuki JI, Ogawa M, Watanabe R, Fujiu K, Manabe I, Conway SJ, Taniyama Y, Morishita R, Hirata Y, Isobe M, Nagai R.
Hypertens Res. 2016 Nov;39(11):764-768.

4. Excess Lymphangiogenesis Cooperatively Induced by Macrophages and CD4(+) T Cells Drives the Pathogenesis of Lymphedema.

Ogata F, Fujiu K, Matsumoto S, Nakayama Y, Shibata M, Oike Y, Koshima I, Watabe T, Nagai R, Manabe I.
J Invest Dermatol. 2016 Mar;136(3):706-14.

5. Ataxia telangiectasia mutated in cardiac fibroblasts regulates doxorubicin-induced cardiotoxicity.

Zhan H, Aizawa K, Sun J, Tomida S, Otsu K, Conway SJ, Mckinnon PJ, Manabe I, Komuro I, Miyagawa K, Nagai R, Suzuki T.
Cardiovasc Res. 2016 May 1;110(1):85-95.

6. Modulation of cardiac fibrosis by Krüppel-like factor 6 through transcriptional control of thrombospondin 4 in cardiomyocytes.

Sawaki D, Hou L, Tomida S, Sun J, Zhan H, Aizawa K, Son BK, Kariya T, Takimoto E, Otsu K, Conway SJ, Manabe I, Komuro I, Friedman SL, Nagai R, Suzuki T.
Cardiovasc Res. 2015 Sep 1;107(4):420-30.

7. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is required for aortic dissection/intramural haematoma.

Son BK, Sawaki D, Tomida S, Fujita D, Aizawa K, Aoki H, Akishita M, Manabe I,

Komuro I, Friedman SL, Nagai R, Suzuki T.
Nat Commun. 2015 Apr 29;6:6994.

[学会発表] (計4件)

2015年10月29日
第56回日本脈管学会総会 西丸記念講演
永井良三
「システム医学としての循環器病学」

2017年8月3日
永井良三
第32回日本下垂体研究会 学術集会
特別講演
「細胞・臓器連関による心血管系の負荷応答機構」

2017年9月18日
心臓血管麻酔学会 特別講演
永井良三
「システム科学と医学研究」

2018年1月27日
日本成人先天性心疾患学会 特別講演
永井良三
「情報化時代の医学研究」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 良三 (NAGAI, Ryozo)
自治医科大学 学長
研究者番号: 60207975

(2) 研究分担者

相澤 健一 (AIZAWA, Kenichi)
自治医科大学 医学部 准教授
研究者番号: 70436484

仲矢 丈雄 (NAKAYA, Takeo)
自治医科大学 医学部 講師
研究者番号: 80512277