

令和 2 年 7 月 14 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08718

研究課題名(和文) 腸組織のKLF蛋白複合体の解明と蛋白間相互作用を抑制する新規大腸癌治療薬の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the KLF protein complex in intestinal tissues and development of new drugs to suppress protein-protein interactions for the treatment of colorectal cancer

研究代表者

仲矢 丈雄 (Nakaya, Takeo)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：80512277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、KLF5が腸上皮幹細胞からの腫瘍形成に必須で、癌治療の有望な分子標的であることを示した。しかし、KLFは立体構造が解明できず阻害薬開発が困難であった。私達は、KLF5の蛋白間相互作用を阻害すると予想される低分子化合物による新しい抗癌薬の分子創薬を試みた。その結果、化合物が、ヒト正常細胞を傷害せずヒト大腸癌細胞を選択的に抑制し、マウスに移植した大腸癌の腫瘍を抑制すること、癌細胞ではKLF5等の蛋白量を抑制するが正常細胞ではこれらを抑制しないことを見出した。化学構造と腫瘍細胞抑制能の構造活性相関を見出し、腫瘍抑制能の高い化合物を創製した。化合物の結合蛋白を同定し分子作用機構を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんゲノム解析に基づきゲノム異常に応じた分子標的薬を用いるがんprecision medicineが求められている。しかし、がん原因因子の多くは、立体構造を解明できない天然変性蛋白であり、立体構造に基づく分子標的薬の開発が難しい。また、がん原因因子の多くは、低分子化合物でないと到達し作用できない核内因子である。このため、がん原因因子の多くに対し分子標的薬が開発されておらず、がんゲノム解析を行っても新たに有効な治療薬が見出される率は低いままである。本研究は、よい分子標的薬のなかった天然変性蛋白、核内因子に対しがん分子創薬を可能にし、進行がん患者の予後改善に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that KLF5 is essential for tumorigenesis from intestinal epithelial stem cells, and is a promising molecular target for cancer treatment. However, it has been difficult to develop inhibitors of KLF due to the lack of clarification of their 3D structure. We have developed new anticancer drugs, small molecule compounds that are expected to inhibit the protein-protein interactions of KLF5. The results showed that the compounds selectively suppressed human colon cancer cells without damaging normal human cell, and suppressed transplanted human colorectal cancer cell tumors in mice. The compounds suppressed the quantities of KLF5 and other proteins in cancer cells, but not in normal cells. We have discovered a structure-activity relationship between chemical structure and tumor cell suppression, and have created compounds with high tumor suppression potential. We identified the binding proteins of the compounds and elucidated the molecular mechanism of action.

研究分野：病理学、がん分子創薬、腫瘍生物学

キーワード：KLF5 蛋白間相互作用 大腸癌 癌分子創薬 天然変性蛋白 転写因子 心不全 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

私達は、腸上皮幹細胞での Wnt シグナル活性化による腸の腫瘍形成が、腸上皮幹細胞で同時に KLF5 を欠損させると、完全に抑制されることを明らかにした。ここから、転写因子 KLF5 が腸上皮幹細胞からの腫瘍形成に必須であることを証明した。また、ヒト大腸癌で KLF5 の発現増加を認める。

ここから、KLF5 阻害薬は、大腸癌の抑制の治療薬として期待された。

しかし、KLF5 の阻害薬の開発を阻む困難があった。一つは、KLF5 が立体構造を解明でき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ができない。また、KLF5 は主に核内に存在する転写因子であるため、KLF5 阻害薬は、細胞膜と核膜の両方を通過して核内で作用する低分子化合物でなければならない。このため、KLF5 阻害薬はよいものが開発されてこなかった。

私達は、独自の新しい方法で、KLF5 阻害薬の開発を行った。

その結果、本化合物群が、ヒト大腸癌細胞を抑制するが、ヒト正常細胞を抑制しないという興味深い結果を得た。

2. 研究の目的

- 1) 私達の新たに開発した KLF5 阻害薬の分子作用機構を解明する。
- 2) 本 KLF5 阻害薬の化学構造を改良し、正常細胞を傷害せず、より低濃度で癌細胞を選択的に抑制する化合物を開発する。それにより化合物の化学構造と薬効の間の構造活性相関を調べる。
- 3) 化合物の *in vivo* での腫瘍抑制能を評価し、副作用を検証する。

3. 研究の方法

- 1) 本化合物により、KLF5 などの蛋白量、あるいは Wnt シグナルの活性化がどのように変化するかを解明する。さらに、化合物結合蛋白を同定し、それを手掛かりに化合物の分子作用機構を解明する。
- 2) 本化合物の側鎖を系統的に変化させた化合物を合成し、それらの中で癌細胞抑制能を比較し、化合物の構造活性相関を解明する。それに基づき、正常細胞を傷害せず、癌細胞を低濃度で選択

的に抑制する化合物を開発する。

3) 大腸癌細胞を皮下に移植したヌードマウスに、化合物を腹腔投与し、腫瘍の容量の変化を Control と経時的に比較する。また、化合物の *in vivo* 投与により副作用が起きないかについて検証を行う。

4 . 研究成果

1) 本化合物を投与することで、KLF5 の蛋白量が抑制されることを見出した。化合物結合蛋白の結果から、化合物が、KLF5 と蛋白 X の相互作用を阻害することにより、KLF5 の蛋白量を抑制することを明らかにした。このように化合物の分子作用機構の一部を解明した。さらに、本化合物が大腸癌の最大の原因である Wnt シグナルの活性化を抑制することも明らかにした。

2) 化合物の側鎖を系統的に変えた化合物を合成し、化合物の側鎖の化学構造と、癌細胞抑制能の間に明確な構造活性相関を見出した。ここから、アミノ酸配列からの予測のみで設計した化合物が実際にその部位での蛋白間相互作用を阻害することで作用している可能性が高いと考えられた。

3) 大腸癌細胞を皮下に移植したヌードマウスに、化合物を腹腔投与すると、Control に比べ、腫瘍の容量が抑制されることを明らかにした。また、化合物の *in vivo* 投与により明らかな副作用は見出せなかった。

現在、次世代シーケンサーにより大量のゲノム解析が容易となり、がんゲノム医療が広まりつつある。しかし、多くのがん原因因子は、天然変性蛋白や核内因子であるために、それらに対する有効な分子標的薬は開発が進んでいない。このため、折角がんのゲノム解析を行っても新たに治療に使える分子標的薬を見出すことができない場合がほとんどである。

我々の研究は、この現在のがん研究の最大の課題を克服し、今まで undruggable であったがん促進因子に対する阻害薬、分子標的薬の開発を可能にしていくものである。今後研究を進め、がんの precision medicine の促進、進行がん患者の予後改善につなげていけたらと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Nakaya Michio, Watari Kenji, Tajima Mitsuru, Nakaya Takeo, et. al, Tanaka Akira, Kuroda Masahiko, Nagata Shigekazu, Kurose Hitoshi	4. 巻 127
2. 論文標題 Cardiac myofibroblast engulfment of dead cells facilitates recovery after myocardial infarction	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 383 ~ 401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI83822	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 Kawata Hirotooshi, Kamiakito Tomoko, Nakaya Takeo, Komatsubara Maiko, Komatsu Kenji, Morita Tatsuo, Nagao Yasumitsu, Tanaka Akira	4. 巻 165
2. 論文標題 Stimulation of cellular senescent processes, including secretory phenotypes and anti-oxidant responses, after androgen deprivation therapy in human prostate cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 219 ~ 227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2016.06.007	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 -
1. 著者名 Nakaya Takeo, Oshiro Hisashi, Takigami Ayako, Kanai Yoshihiko, Tetsuka Kenji, Hagiwara Koichi, Fujii Hirofumi, Endo Shunsuke, Tanaka Akira	4. 巻 96
2. 論文標題 Giant solitary fibrous tumor of the pleura with high-grade sarcomatous overgrowth accompanied by lipid-rich, rhabdomyosarcomatous, and pleomorphic components	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e8926 ~ e8926
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000008926	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 Nakaya Takeo, Hyuga Taiju, Tanaka Yukichi, Kawai Shina, Nakai Hideo, Niki Toshiro, Tanaka Akira	4. 巻 96
2. 論文標題 Renal dysplasia characterized by prominent cartilaginous metaplasia lesions in VACTERL association	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e6499 ~ e6499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000006499	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 Nakano Naomi, Nakaya Takeo, Kamiya Koji, Komine Mayumi, Murata Satoru, Kawata Hirotooshi, Yokoyama Shigeo, Tanaka Akira, Ohtsuki Mamitaro	4. 巻 44
2. 論文標題 Ectopic respiratory mucosa in the skin which showed the repetitive distribution of ciliated bronchogenic epithelia and squamous metaplasia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 1327 ~ 1328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.13697	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 -

1. 著者名 Nakaya M, Watari K, Tajima M, Nakaya T, Matsuda S, Ohara H, Nishihara H, Yamaguchi H, Hashimoto A, Nishida M, Nagasaka A, Horii Y, Ono H, Iribe G, Inoue R, Tsuda M, Inoue K, Tanaka A, Kuroda M, Nagata S, Kurose H	4. 巻 127
2. 論文標題 Cardiac myofibroblast engulfment of dead cells facilitates recovery after myocardial infarction.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 383-401
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/JCI83822	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 Kawata H, Kamiakito T, Nakaya T, Komatsubara M, Komatsu K, Morita T, Nagao Y, Tanaka A	4. 巻 165
2. 論文標題 Stimulation of cellular senescent processes, including secretory phenotypes and anti-oxidant responses, after androgen deprivation therapy in human prostate cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 219-227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jsbmb.2016.06.007	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Nakaya T, Tsuji K, Tanaka A, Nagai R.
2. 発表標題 Small molecules mimicking KLF5 structure suppresses cancer cells in both in vivo and vitro without damaging normal cells.
3. 学会等名 6th International Conference on Biology and Pathobiology of KLF/Sp Transcription Factors (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takeo Nakaya, Hirofumi Nakano, Masaji Kasai, Atsushi Yoshimori, Akira Tanaka, Ryozo Nagai
2. 発表標題 The protein interaction inhibitors of KLF5 suppress Wnt signal activation selectively in colorectal cancer cells
3. 学会等名 FASEB Science Research Conference "KLF and Sp Transcription Factors in Disease and Regenerative Medicine" (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 仲矢丈雄、中野洋文、河西政次、吉森篤史、田中亨、小路弘行、永井良三
2. 発表標題 Small molecular mimics of KLF5 selectively suppress the survival and Wnt-KLF5 signaling of colorectal cancer cells.
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----