

令和元年9月2日現在

機関番号：82609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14636

研究課題名(和文) ESCRT-0を分子標的とする腫瘍増殖抑制低分子化合物の探索

研究課題名(英文) Search for Tumor Growth Inhibitory Low Molecular Compounds Targeting ESCRT-0 as Molecular Target

研究代表者

小倉 潔 (OGURA, Kiyoshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主任研究員

研究者番号：70233492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においてESCRT-0を分子標的としたハイスループット-Wntシグナル伝達阻害アッセイシステムを開発した。本アッセイシステムを用いて既存薬ライブラリーのスクリーニングを行い、候補化合物を得た。候補化合物には既知のWntシグナル伝達阻害剤や既存の抗腫瘍剤も含まれていた。この知見は本アッセイシステムがWntシグナル伝達阻害型抗腫瘍剤のスクリーニングに適応していることを示唆している。得られたその他の化合物は新規抗腫瘍剤としてリポジショニングの可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Wntシグナル伝達は“がん”の根幹を司っている。がん撲滅をめざして、Wntシグナル伝達を阻害する抗腫瘍剤の開発が切望されている。本研究においてハイスループット-Wntシグナル伝達阻害アッセイシステムを開発した。本アッセイシステムを用いて既存薬ライブラリーのスクリーニングを行い、候補化合物を得た。候補化合物には既知のWntシグナル伝達阻害剤や既存の抗腫瘍剤も含まれていた。得られたその他の化合物は新規抗腫瘍剤としてリポジショニングの可能性が示唆された。さらに大型スクリーニングを行うことにより、ESCRT-0を分子標的とした新規のWntシグナル伝達阻害型抗腫瘍剤が開発できると考える。

研究成果の概要(英文)：We developed a high throughput Wnt signaling inhibition assay system targeting ESCRT-0 as a molecular target in this study. The existing medicine library was screened using this assay system to obtain candidate compounds. Candidate compounds also included known inhibitors of Wnt signaling and existing antineoplastic agents. This finding suggests that this assay system is adapted to screening for Wnt signaling inhibitory antineoplastic agents. It was suggested that the obtained other compounds could be repositioned as novel antitumor agents.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：Wntシグナル 抗腫瘍剤 ハイスループット スクリーニング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

足場非依存的増殖能はがん細胞の特性であり、正常細胞には認められない。足場非依存的増殖能を抑制できる抗がん剤はたいへん有用である。そのため足場非依存的増殖能に参与している Wnt- $\beta$ -catenin 情報伝達阻害剤の探索が進められている。

ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport machinery) は ESCRT-0, -I, -II, -III から構成され、ユビキチン化タンパク質を細胞質から小胞体内へ輸送する多小胞体形成を担っている。HGS (Hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate, O14964) は、STAM (Q92783) とそれぞれのコイルドコイル領域 (HGS/C と STAM/C) を介して結合することにより、ESCRT-0 を形成し、ESCRT を構成する。ESCRT の多小胞体形成能は、Wnt-シグナル伝達や Exosome の形成・放出を担っている。Wnt は、がん特性である足場非依存的増殖能を担保しているプロトオンコジーンである。また、がん細胞が分泌する Exosome は、がんの増殖・転移において重要な役割を果たしている。

代表者は、HGS 高発現が Wnt シグナル伝達を亢進し、がん化やがん特性の増悪化を誘導することを見出している、逆に、HGS 発現抑制、または HGS/C やその構成オリゴペプチドの投与により、がん細胞の Wnt シグナル伝達やがん特性が抑制され、がん細胞を正常細胞様に誘導できることも見出している。特に、その知見を元に HGS 構成ペプチドから、抗腫瘍性オリゴペプチド-A を選出している。この HGS/C 構成オリゴペプチド-A は、HGS/C と STAM/C に対して高い結合能を有し (SPR 分析)、HGS/C と STAM/C の相互作用を阻害した (分割蛍光蛋白システム分析)。in vitro 系におけるがん細胞への HGS/C 構成オリゴペプチド-A 投与は、がん細胞の ESCRT-0 形成を阻害し、ESCRT による Wnt シグナル伝達を顕著に抑制し、がん細胞の足場非依存的増殖能のみを抑制した。この HGS/C 構成オリゴペプチド-A は尾静脈投与により、マウス皮下でのヒト大腸癌由来 COLO205 細胞の腫瘍増殖を完全に抑制できる足場非依存的腫瘍増殖抑制能力を有していた。一方、HGS/C 構成オリゴペプチド-A はオリゴペプチドのためマウスの血中安定性が低い。そこで、本研究ではこれらの知見を基に ESCRT-0 を分子標的とし、(1) HGS/C と STAM/C の相互作用を阻害する低分子化合物を探索する方法を樹立し、(2) 低分子化合物ライブラリーをスクリーニングし、Wnt シグナル伝達を阻害して足場非依存的腫瘍増殖のみを抑制できる、血中安定性の高い低分子化合物の探索を行った。

### 2. 研究の目的

HGS/C 構成オリゴペプチド-A は HGS/C と STAM/C の相互作用を阻害し、ESCRT-0 形成を阻害することにより、Wnt-シグナル伝達を阻害し、がん細胞の in vivo での腫瘍増殖を抑制した。本研究では、ESCRT-0 を分子標的として、HGS 構成ペプチド抗腫瘍剤よりもさらに血中安定性の高い、Wnt シグナル伝達-足場非依存的増殖を阻害する低分子化合物を探索し、新規腫瘍増殖抑制剤の発見に至るヒット化合物を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) HGS/C-STAM/C 分割 mKG 蛍光アッセイシステムの開発

ESCRT-0 を分子標的として、ESCRT 活性-Wnt シグナル伝達-足場非依存的増殖を阻害する低分子化合物を探索するために、HGS/C と STAM/C の結合阻害を指標とする分割蛍光タンパク質システムを作製した。HGS/C と蛍光タンパク質 mKG の N 末端側タンパク質 (mKGn) の融合タンパク質、および STAM/C と蛍光タンパク質 mKG の C 末端側タンパク質 (mKGc) の融合タンパク質はそれぞれコムギ胚芽タンパク質合成系を用いて合成した。HGS/C-mKGn と STAM/C-mKGc を混合すると時間経過に比例して蛍光タンパク質 mKG が再構成され、蛍光量が増加する (図-1, 2)。この反応系において、HGS/C または STAM/C に結合する低分子化合物が存在すると、蛍光タンパク質 mKG の再構成が阻害され、蛍光量は増加しない (図-2)。



図-1 分割 mKG 蛍光アッセイの模式図

## HGS/C-STAM/C 分割 mKG アッセイ

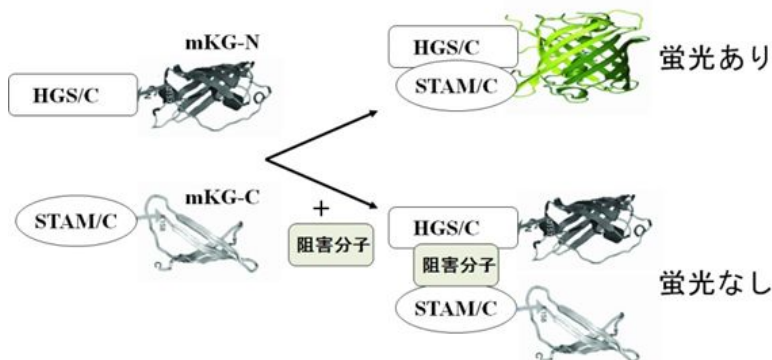


図-2 HGS/C-STAM/C 分割 mKG 蛍光アッセイシステムの模式図

### (2) HGS/C-STAM/C 分割 mKG 蛍光アッセイシステムによる既存薬ライブラリーのスクリーニング

Prestwick ケミカルライブラリー(1200 化合物)のスクリーニングを行った。96 ウェルプレートにおいて化合物 1 $\mu$ L と HGS/C-mKGn 44.5 $\mu$ L と STAM/C-mKGc 44.5 $\mu$ L を混合し、室温か 16 時間インキュベートした。384 ウェルプレートにおいては、化合物 0.2 $\mu$ L と HGS/C-mKGn 9.9 $\mu$ L と STAM/C-mKGc 9.9 $\mu$ L を混合し、16 時間後に蛍光量を測定した。化合物の代わりに DMSO を添加した反応蛍光量を 100% 活性値、阻害率 0% とした。

### (3) ヒット化合物の足場非依存的増殖抑制能

Ultra Low Attachment surface plate を用いてヒット化合物のがん細胞に対する足場非依存的増殖抑制能を検討した。がん細胞としてヒト大腸癌由来 COLO205 細胞、ヒト肺癌由来 A427 細胞を用いた。Ultra Low Attachment surface plate においてがん細胞増殖を抑制する活性を測定した。対象として、ノーマルプレートを用いて足場依存的増殖抑制能を同時に測定した。

## 4. 研究成果

### (1) HGS/C-STAM/C 分割 mKG 蛍光アッセイシステムの開発

単量体蛍光タンパク質 (mKG) をレポーター分子として利用し、HGS/C 領域と STAM/C 領域の相互作用を測定する分割 mKG 蛍光ハイスループットアッセイシステムを構築した (S/B 比 >7, Z' 係数 >0.7)。レポーター分子である HGS/C-mKGn-融合タンパク質、および STAM/C-mKGc-融合タンパク質はコムギ胚芽タンパク質合成系を用いて生合成した。大腸菌、カイコ系タンパク質合成系に比較してコムギ胚芽タンパク質合成系は、合成されたタンパク質は可溶性や低バックグラウンド性、蛍光強度において優れていた。本アッセイシステムでは、96 ウェルプレート、および 384 ウェルプレートにおいてハイスループットアッセイが可能であった。今回は手動分注を行ったが、分注機を用いることにより、1536 ウェルプレートにおいてもハイスループットアッセイが可能と考える。

### (2) HGS/C-STAM/C 分割 mKG 蛍光アッセイシステムによる既存薬ライブラリーのスクリーニング

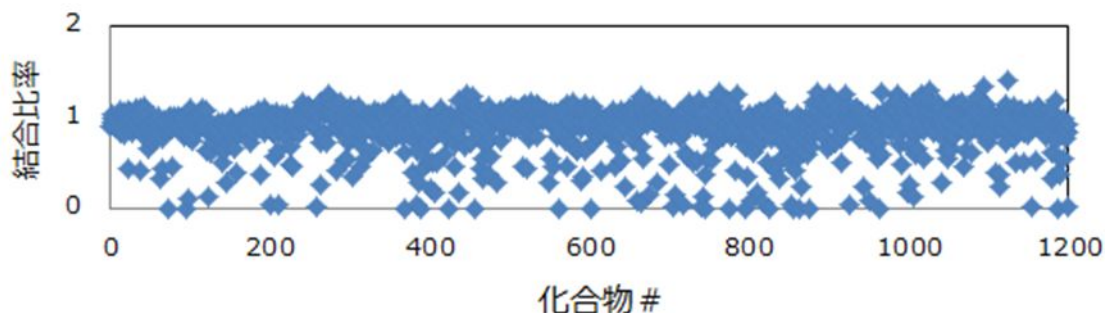


図-3 HGS/C-STAM/C 分割 mKG 蛍光アッセイシステムによる Prestwick ケミカルライブラリー一次スクリーニング結果

本ハイスループットアッセイシステムを用いて、既存薬ライブラリーである - Prestwick ケミカルライブラリー(1200 化合物)をスクリーニングした。化合物濃度 100  $\mu$ M での一次スクリーニングでのヒット化合物として、20 化合物が選出された (図-3)。その中で、6 化合物は抗腫

瘍剤、また、6化合物は抗菌性剤であった。さらに化合物濃度 10  $\mu$ M での二次スクリーニングでのヒット化合物として、3化合物は抗腫瘍剤、2化合物は抗菌性剤、他3化合物の合計8化合物が選出された。

### (3) ヒット化合物の足場非依存的増殖抑制能

ヒット化合物の足場非依存的増殖抑制能を調べた結果、Pyrvinium pamoate が最も低い IC50 を示した。COLO205 細胞において足場非依存的増殖 IC50=0.08  $\mu$ M・足場依存的増殖 IC50=0.2  $\mu$ M、A427 において足場非依存的増殖 IC50=0.07  $\mu$ M・足場依存的増殖 IC50=0.4  $\mu$ M であった。Pyrvinium pamoate は駆虫薬であるが、選択的 Wnt 情報伝達阻害剤としても、また高い抗腫瘍効果も報告されている。Prestwick ケミカルライブラリーを用いた本スクリーニングにおいて、Wnt シグナル伝達-足場非依存的増殖を阻害する低分子化合物として Pyrvinium pamoate が最適ヒット化合物と考えられた。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者は下線)

[雑誌論文](計 0件)

[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)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。