

令和 6 年 6 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：2019～2023

課題番号：19K07512

研究課題名(和文) 癌を選択的に抑制しかつ心機能を改善するKLF5阻害薬の開発とその分子作用機序解明

研究課題名(英文) Development of KLF5 inhibitors that selectively inhibit cancer and improve cardiac function and elucidation of their molecular mechanisms of action

研究代表者

仲矢 丈雄 (Nakaya, Takeo)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80512277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子KLF5は大腸癌、心不全等の治療標的である。しかし、立体構造が解明できないため、分子標的薬創製が困難であった。私達は、蛋白間相互作用を行うαヘリックス構造をとり、相互作用の場となるinduced helical motifをアミノ酸配列から予測してその部位のヘリックス構造を模倣する低分子化合物を開発した。この化合物はKLF5蛋白とその脱ユビキチン化酵素USP3の蛋白複合体形成を阻害しKLF5蛋白量を減少させる。また正常細胞を傷害せず大腸癌細胞を抑制死滅させ、マウスに移植した大腸癌細胞の腫瘍を副作用少なく抑制した。心不全に対する薬効は現在研究中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん原因因子、心疾患を悪化させる因子の多くが立体構造を解明できない天然変性蛋白、あるいは標的薬が核膜と細胞膜の両方を通過する低分子薬でなければならない核内因子である。このためがんゲノム解析等ががん原因因子の同定が進む中、その結果が必ずしも進行がん患者に適した分子標的薬の提供、予後改善に結び付いていない。本研究成果は、今まで創薬困難であった、多くの天然変性蛋白や核内因子を標的に、副作用少なく効果の高い分子標的薬を創製する方法の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Transcription factor KLF5 is a therapeutic target for colorectal cancer, heart failure, and other diseases. However, it has been difficult to create molecular-targeted drugs because the steric structure of KLF5 has not been elucidated. We have developed a small molecule compound that mimics the α -helix structure of the induced helical motif, which is the site of protein-protein interaction and is predicted from the amino acid sequence. This compound inhibits the formation of a protein complex between KLF5 protein and its deubiquitinating enzyme USP3, thereby reducing the amount of KLF5 protein. It also inhibits and kills colon cancer cells without damaging normal cells, and suppresses tumors of transplanted colon cancer cells in mice with minimal side effects. The efficacy of the drug for heart failure is currently under study.

研究分野：病理学、がん治療開発

キーワード：KLF5 天然変性蛋白 分子標的薬 がん分子創薬 核内因子

1. 研究開始当初の背景

私達は、iPS/ES 細胞の誘導、維持に必要な転写因子 KLF5 が、腸上皮幹細胞からの腫瘍形成に必須であることを解明した。KLF5 がヒト大腸癌で発現が上昇しており、一部ヒト大腸癌で KLF5 遺伝子座を含むゲノム領域の増幅を認めることと合わせ、KLF5 は大腸癌の重要な治療標的であることを私達は明らかにした。(*Cancer Res* 2014)

ここから、私達は、この発見を自らの手で新たな創薬、治療法開発につなげたいと考えた。しかし、KLF5 は、solid な立体構造を取らず結晶化ができず X 線や NMR で 3 次元立体構造の解明ができない天然変性蛋白である。また、KLF5 は、類似の蛋白も立体構造解明がなされていないことから、最近普及の進む蛋白立体構造予測の人工知能(AI)でも立体構造予測が困難である。このため、KLF5 蛋白のどの部位をどのように阻害したらいいのかわからないため、KLF5 を標的とする分子標的薬の創製は困難であった。そこで、天然変性蛋白に対して新しい創薬を試みた。

2. 研究の目的

私達は、立体構造不明な天然変性蛋白である KLF5 に対し、アミノ酸配列のみから、蛋白間相互作用を行うとヘリックス構造をとり蛋白間相互作用の場となる induced helical motif を予測した。予測部位のヘリックス構造を模倣する低分子化合物を開発するという方法で創薬を試みた。この開発化合物は、KLF5 のその部位での蛋白間相互作用阻害を期待したものである。本研究は、本法による開発化合物の薬効、標的、分子作用機序の解明を行うこと、これにより、広く創薬困難な天然変性蛋白に対する創薬を可能にする基盤を形成することを目的とする(*ACS Med Chem Lett* 2022)。

3. 研究の方法

A) KLF5 の予測 induced helical motif の模倣化合物の開発

KLF5 のアミノ酸配列のみから、induced helical motif を予測した。VAIF と類似の側鎖構造を有し、ヘリックスの立体構造を模倣した低分子化合物を開発合成した。

B) KLF5 予測 induced helical motif の模倣化合物の抗腫瘍能の評価

正常細胞とヒト大腸癌細胞に対し、濃度を変えて各細胞に投薬を行い、各細胞の生存率を評価した。これにより、KLF5 予測 induced helical motif の模倣化合物の抗腫瘍能、正常細胞への影響を評価した。また、KLF5 予測 induced helical motif の模倣化合物およびその周辺化合物をヒト大腸癌細胞のスフェロイドに投与し、大きさの経時的測定によりヒト大腸癌細胞への影響を解明した。

C) KLF5 予測 induced helical motif の模倣化合物の Wnt-KLF5 系への作用の解明

KLF5 予測 induced helical motif の模倣化合物およびその周辺化合物をヒト大腸癌細胞およびヒト正常細胞に投与し、KLF5 蛋白、KLF5 の誘導蛋白である Cyclin D1 と Survivin、Wnt シグナルの活性化をみるカテニンのリン酸化、TCF4 蛋白などの Western blotting による計測を行った。また、細胞への化合物投与の有無による KLF5 の mRNA 量の計測も行った。

D) KLF5 予測 induced helical motif 模倣化合物の結合蛋白の同定と蛋白複合体への作用の解明

KLF5 予測 induced helical motif 模倣化合物の結合ピーズと質量分析により、化合物の結合蛋白を網羅的に同定した。Myc タグ付き USP3 と FLAG/HA タグ付き KLF5 を HEK293T 細胞に過剰発現させた細胞に化合物を投与し、USP3 と KLF5 の蛋白複合体形成にどのように影響するかについて免疫沈降により解析を行った。

E) KLF5 予測 induced helical motif の模倣化合物の in vivo での抗腫瘍能の評価

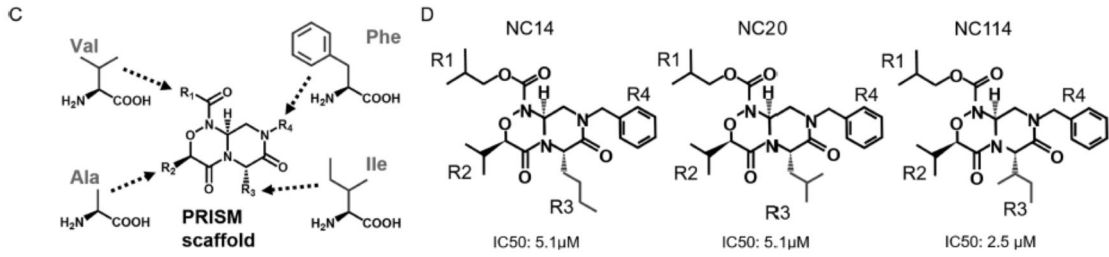
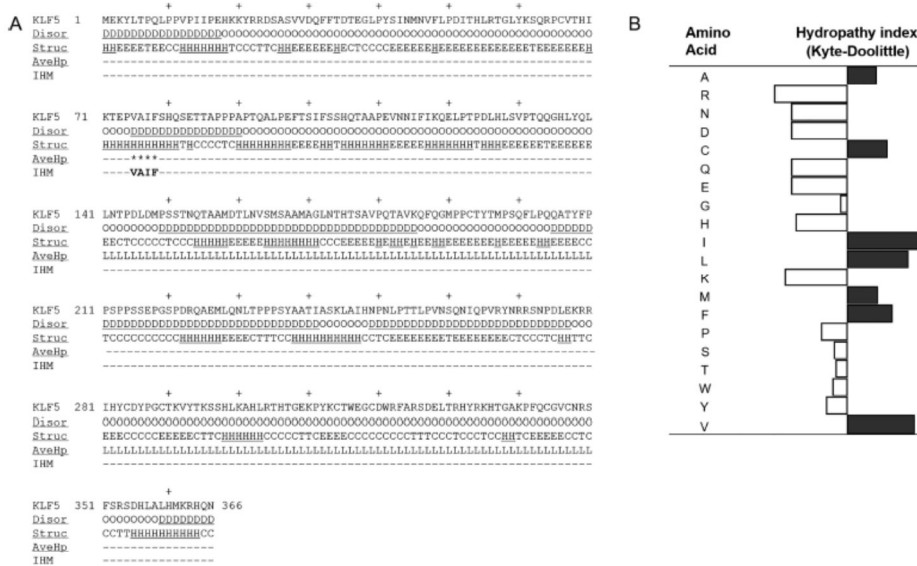
ヌードマウスの皮下にヒト大腸癌細胞を移植し、腫瘍を形成させた。そこに、化合物を腹腔投与し、腫瘍の大きさを定量的に評価した。これにより、in vivo での化合物の腫瘍抑制能の評価を行った。

4. 研究成果

A) KLF5 の予測 induced helical motif の模倣化合物の開発

KLF5 蛋白中で、アミノ酸配列のみから、普段 disordered である、ヘリックス構造をとる、疎水性であるの 3 つの基準を満たす領域である、VAIF を予測 induced helical motif とした(図 1A,B)。VAIF のアミノ酸側鎖と類似の化学構造を有する側鎖を持ち、bicyclic pyrazinooxadiazine-4,7-dione の中心二員環を有するヘリックスの立体構造を模倣した低分子化合物を開発合成した(図 1C)。

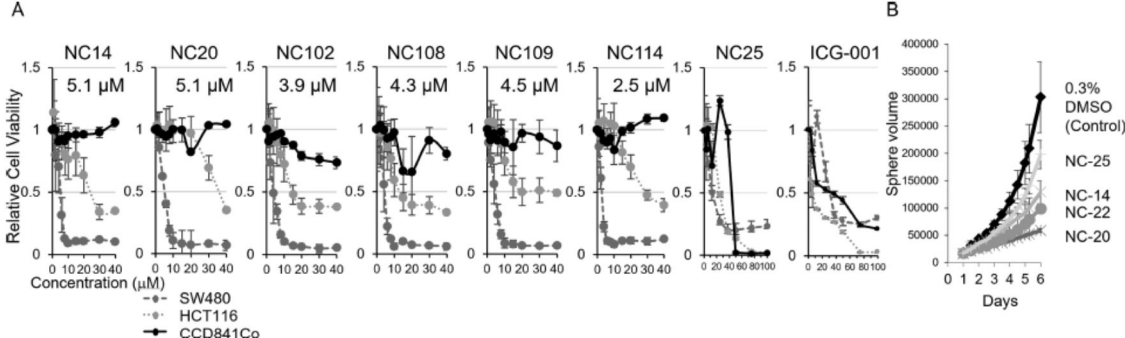
図 1



B) KLF5 予測 induced helical motif の模倣化合物の抗腫瘍能の評価

KLF5 予測 induced helical motif の模倣化合物が、ヒト正常細胞 CCD841 を傷害せず、SW480 などヒト大腸癌細胞を選択的に抑制することを見出した(図 2A)。また、化合物がヒト大腸癌細胞のスフェロイドの増大を効果的に抑制することを明らかにした(図 2B)。VAIF と異なる側鎖構造を有し類似の中心環を有する化合物はそのような薬効を示さないことも明らかにした(図 2A, B)。

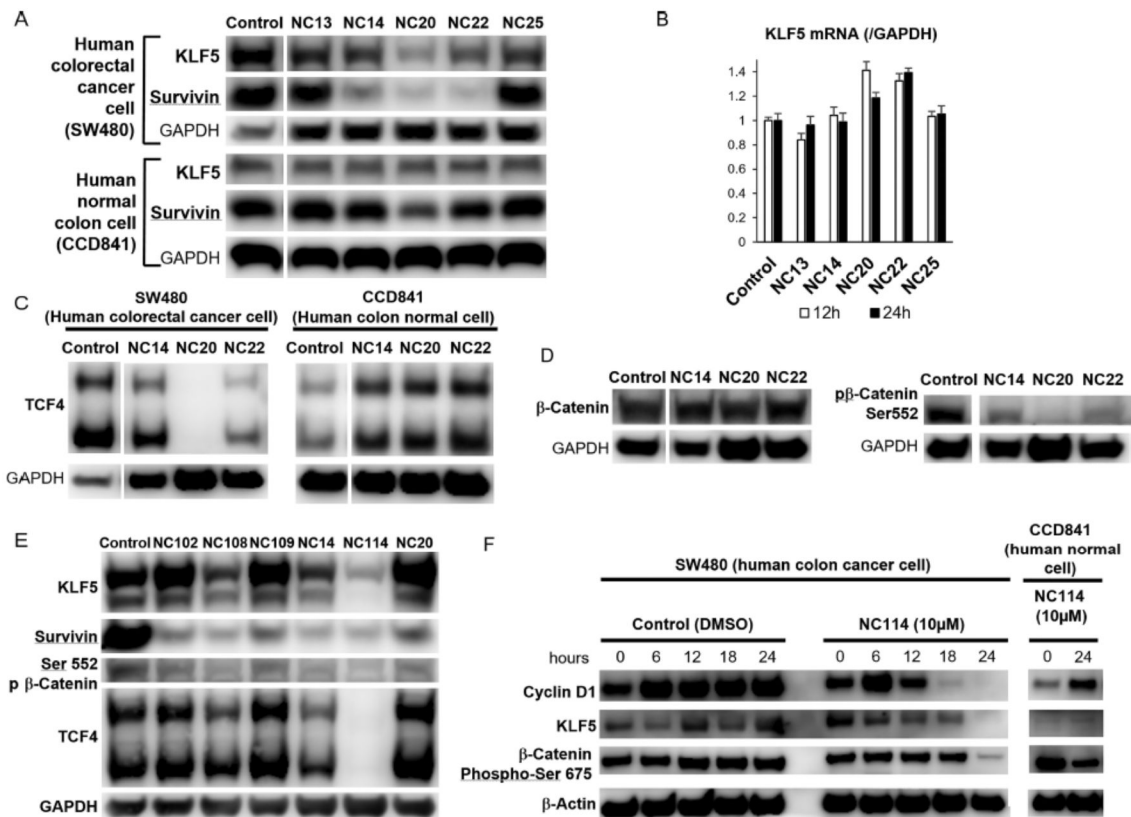
図 2



C) KLF5 予測 induced helical motif の模倣化合物の Wnt-KLF5 系への作用の解明

KLF5 予測 induced helical motif の模倣化合物およびその周辺化合物をヒト大腸癌細胞に投与し、KLF5、Cyclin D1、Survivin、TCF4 の蛋白量、および、Wnt シグナルの活性化を示す カテンインのリン酸化 (Ser552、Ser675 のリン酸化) を抑制することを見出した(図 3A, C, D, E, F)。ヒト正常細胞への投与ではそのような変化を認めなかった(図 3A, C, F)。化合物投与は、KLF5 の mRNA 量は減少させなかった(図 3B)。ここから、化合物がヒト大腸癌細胞で選択的に KLF5-Wnt 系を抑制すること、化合物が KLF5 の転写抑制ではなく KLF5 蛋白量の減少をもたらすことを明らかにした。

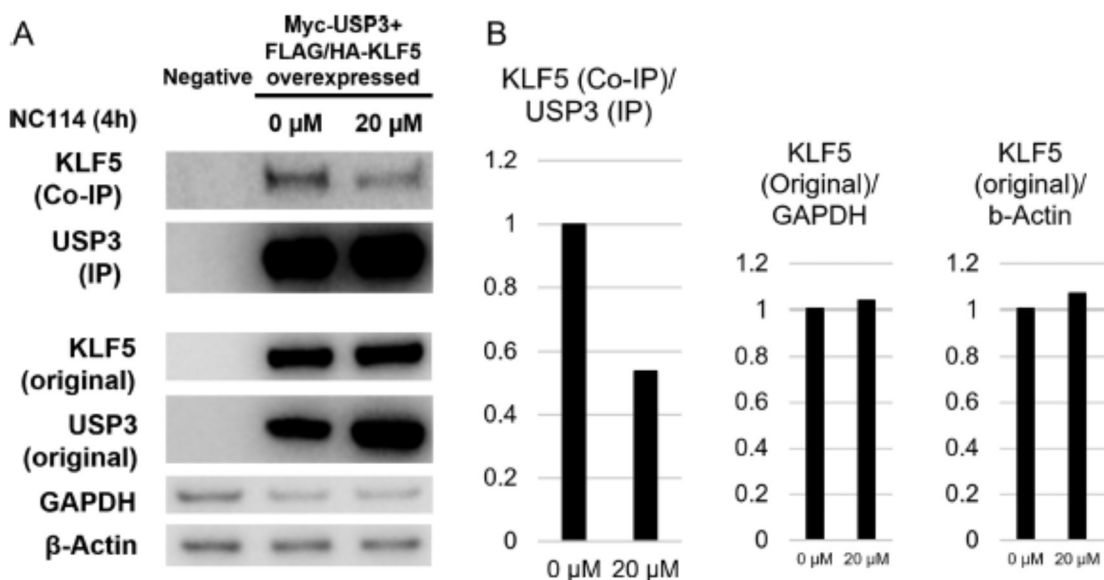
図 3



D) KLF5 予測 induced helical motif 模倣化合物の結合蛋白の同定と蛋白複合体への作用の解明

KLF5 予測 induced helical motif 模倣化合物の結合ピーズと質量分析により、化合物結合蛋白を質量分析で網羅的に同定した。化合物結合蛋白の中に、KLF5 蛋白の脱ユビキチン化酵素で KLF5 蛋白を安定化させる USP3 が含まれていることを見出した。USP3 と KLF5 を HEK293T 細胞に過剰発現させた細胞に化合物を投与することにより、化合物非投与に比べ USP3 と KLF5 が結合した形で免疫沈降されてくる蛋白量が減少することを明らかにした(図 4A,B)。ここから、化合物が KLF5 と USP3 の蛋白複合体形成を阻害すること、その結果 KLF5 蛋白量を減少させることを明らかにした。

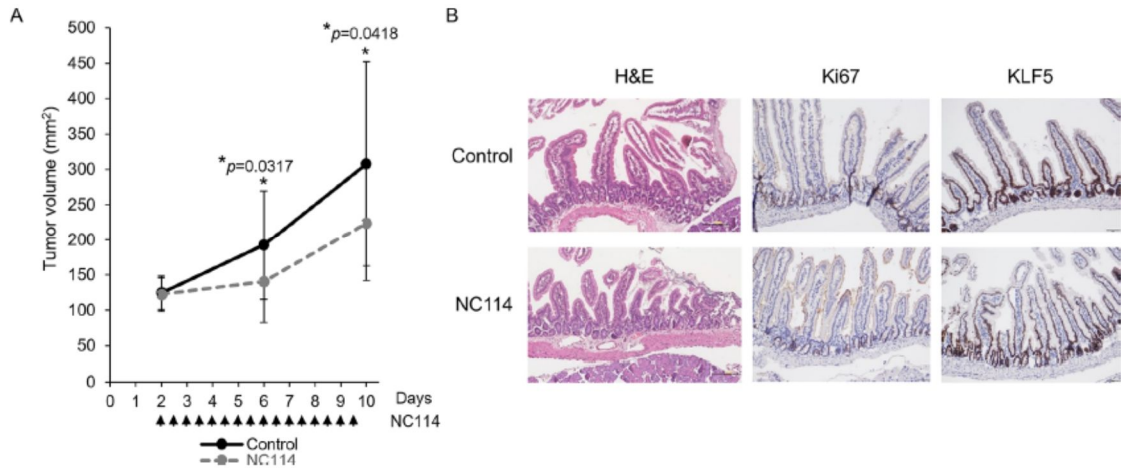
図 4



E) KLF5 予測 induced helical motif の模倣化合物の in vivo での抗腫瘍能の評価

化合物の腹腔投与により、化合物非投与群に比べ、ヌードマウスの皮下に移植したヒト大腸癌細胞の腫瘍の増大が抑制されることを見出した(図 5A)。腸上皮をはじめ明らかな副作用を見出さなかった(図 5B)。

5



立体構造不明な天然変性蛋白は、がんなどの疾患の原因、治療標的の多くを占める。しかし、これらの天然変性蛋白は、立体構造が不明であるため、分子標的薬の創製が進んでいなかった。予測 induced helical motif の模倣化合物という新しい方法は、創薬が困難であった天然変性蛋白に対する創薬を可能にし、精密医療の実現に貢献すると期待される。KLF5 の予測 induced helical motif の模倣化合物は、がんのみならず心疾患などにも有用であると期待されるが、その研究は現在進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takeo Nakaya, Kenichi Aizawa, Yuki Taguchi, Kentaro Tsuji, Sachi Sekine, Kazuhiro Murakami, Masaji Kasai, Hirofumi Nakano, Yasumitsu Kondoh, Shingo Dan, Atsushi Yoshimori, Hiroyuki Kouji, Dai Takehara, Toru Suzuki, Hiroyuki Osada, Masayuki Murata, Akira Tanaka, and Ryozo Nagai	4. 巻 13
2. 論文標題 Development of Low-Molecular-Weight Compounds Targeting the Cancer-Associated KLF5 Transcription Factor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Med. Chem. Lett.	6. 最初と最後の頁 687 - 694
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acsmchemlett.1c00721	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 仲矢丈雄
2. 発表標題 Development of Low-Molecular-Weight Compounds Targeting the Cancer-Associated KLF5 Transcription Factor
3. 学会等名 日本癌学会 学術総会 シンポジウム
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 心機能改善剤	発明者 学校法人自治医科大学、株式会社PRISM BioLab	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-187420	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	永井 良三 (Nagai Ryoza) (60207975)	自治医科大学・医学部・学長 (32202)	

6. 研究組織（つづき）

	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	相澤 健一 (Aizawa Ken-ichi) (70436484)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	

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