

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07330

研究課題名（和文）Notchリガンド：DII4の結合特性を基盤とした選択的DII4阻害剤の探索

研究課題名（英文）The molecular analysis of the structural basis of Notch1/DII4 interaction for drug discovery.

研究代表者

穂積 勝人（Hozumi, Katsuto）

東海大学・医学部・教授

研究者番号：30246079

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）：Notchリガンドの結合特性を理解するため、Notchリガンド：DII4のNotchシグナル誘導機構について、DII1と比較し、検討した。DII4はMNNL領域に加えて、DSL領域とそこに隣接する特徴的な2アミノ酸によって、Notch1のEGF12および11領域と直接結合する。DII1とはMNNLの使用の有無およびDSL隣接アミノ酸の違いにより、結合様式が異なることが明確になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Notchシステムは、腫瘍化をはじめ様々な生命現象に寄与するが、すべてのNotch/NotchLの機能を抑制することにより強い副作用が生じ、治療への応用が困難である。本研究では、代表的なNotchLであるDII4の特徴的構造およびその機能に着目し、DII4の機能を特異的に抑制するための基礎となるNotch1との結合特性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To understand the characteristics of the binding between DII4 and Notch1, we investigate the structure and function of the swapping chimeras of DII1 and DII4. DII4 has unique two AA neighbored to DSL region, in addition to the use of MNNL region for its binding to Notch1. These must be main targets for the specific manipulation of DII4/Notch1 binding.

研究分野：医化学

キーワード：Notch DII4 DII1 胸腺

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Notch 系は、種を越えて広く保存され、様々な細胞の膜上に発現した Notch 分子 (哺乳類では Notch1-4) とそのリガンド (NotchL; 哺乳類では Dll1、Dll4、Jag1、Jag2) の結合により誘導されるシグナルが、種々の細胞の系列決定に寄与する、広く共有されたシステムである。Notch 系を構成する分子の欠失により、個体発生期のみならず、成熟個体においても、多くの細胞の系列決定が異常をきたすことから、各組織形成における Notch 系の重要性が強く示唆されている。

Notch 系の多彩な機能が明らかになるに伴い、これを修飾することによる利点が想定され、新たな薬剤標的として注目されるに至った。しかし Notch シグナル全般を抑制する一連の阻害剤 (γ -secretase inhibitor) は、腸管細胞の分化異常に起因する副作用が強く、薬剤開発が停滞している。この要因は、複数の Notch 受容体とそのリガンドの組合せの特異性を度外視していることにあり、それぞれの組合せの特性を考慮した特異的な阻害剤の開発が待たれている。

2. 研究の目的

そこで本研究では、Notch/NotchL の組合せの差異について、申請者が哺乳動物における生理的役割を検証してきた Dll14 と Dll11 に着目し、Notch1/Notch2 分子との組合せ特性について調べ、特異的阻害剤開発の一助とする。特に、Dll14 と Notch1 の相互作用において、申請者が機能的重要性を見出した MNNL (Dll14) と EGF12 (Notch1) 間の結合に加えて、DSL (Dll14) と EGF11 (Notch1) 間の結合動態ならびにその組合せ特異性について明らかにする。また、Dll14/Dll11 の機能的差異を、in vivo において検証することも併せて行う。

3. 研究の方法

(1) Dll14-MNNL 領域結合性小分子化合物の効果検証

Dll14-MNNL 領域の立体構造シミュレーションにより、同領域に特徴的なループ構造の空隙内に挿入される少分子化合物について、Dll14/Notch1 結合を介した Notch シグナル誘導能を、Luciferase レポーターアッセイ系にて、調べる。また、Dll14/Notch1 結合に対する影響について、可溶性 Notch1-hIgG 分子 (sNotch1) と Dll14 との結合をフローサイトメトリーにて検出し、調べる。

(2) Dll14-DSL 領域の構造と機能の相関解析

Dll14 と Dll11 の、各機能ドメインの相互置換体を作成し、sNotch1 との結合、Notch1 シグナル誘導能および抗 Dll14/Dll11 特異的 mAb (HDM4-1、HDM1-3) への反応性を調べ、Dll1 分子の機能発現に重要な領域とその構造について調べる。

(3) Dll14/Dll11 の胸腺内 T 細胞分化における役割の差異

Foxn1-cre/Dll14-floxed マウスと、独自に樹立した cre 依存的 Dll14 あるいは Dll11 発現マウス (Rosa26 遺伝子座に両遺伝子が 1 コピーのみ存在; iD4、iD1) を交配し、胸腺上皮細胞にて、Dll14、Dll11 を単独で発現させる。また、放射線照射した同マウスへ、Notch1 欠損あるいは Notch2 欠損マウス由来骨髄細胞 (CD45.1) を移植し、Dll14/Dll11 と Notch1/Notch2 それぞれの組合せにより発動する Notch シグナルの、T 細胞分化誘導能について検証する。

4. 研究成果

(1) Dll14/Notch1 結合に対する Dll14-MNNL 結合性小分子化合物の効果検証

我々は、T 細胞分化誘導における Dll11、Dll14 の機能を詳細に比較し、その違いについて調べてきた。その結果、両者の機能的差異は、Notch1 分子との結合様式の違いにあることを示し、そ

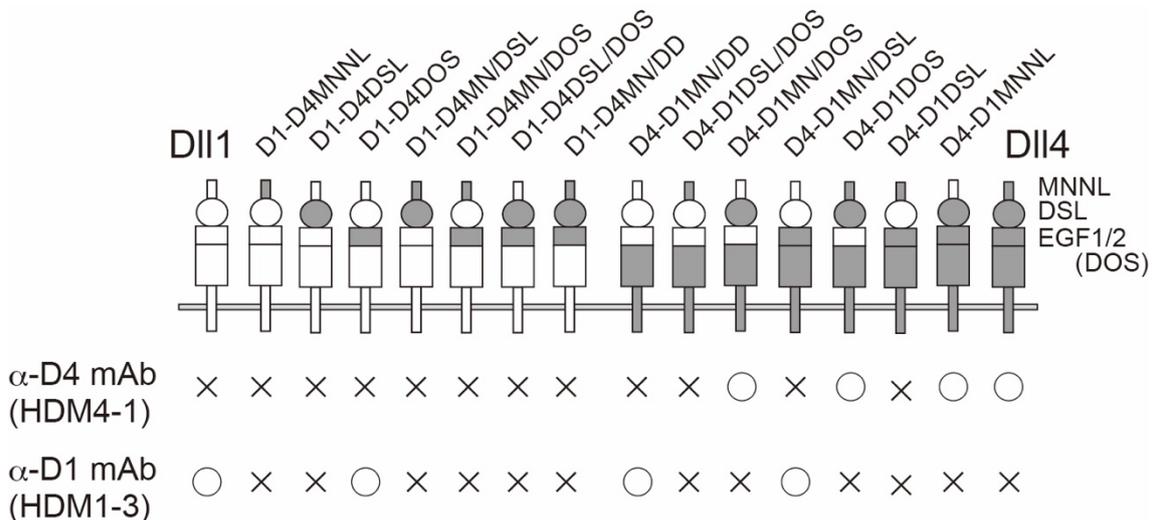


図1 抗 Dll14、Dll11 特異的 mAb のキメラ分子との反応性

の一部は、N 末 (MNNL) 領域の構造上の特性と特徴的な動きにあることを明確にした (Hirano et al., *eLife* 9:e50579, 2020)。そして、D114 の特徴的なループ構造に挿入され、その動きを阻害する小分子化合物を、三次元構造シミュレーションにより、6 種、選定した。その中の 1 化合物が、D114/Notch1 を介する Notch シグナル誘導を減少させたが、その活性は弱かった。また、D114/Notch の結合能への影響は検出できなかった。以上の結果から、D114-MNNL 領域のループ構造に挿入される化合物は、一定程度、D114 の機能に影響するが、それは D114/Notch1 結合の一部のみに影響し、全体としては大きな効果は認められなかった。一方で、D114/Notch1 の結合モデル解析から、MNNL (D114)~EGF12 (Notch1) 領域間に加えて、DSL (D114)~EGF11 (Notch1) 領域間の結合が推測されており、両方の結合を同時に阻害することが重要と考えられた。

(2) D114・DSL 領域の特異的構造

我々が独自に作出した抗マウス D111 (HDM1-3)、D114 (HDM4-1) mAb が認識する部位を明確にするため、D111/D114 分子の機能ドメインを相互置換した種々の変異体との反応性を調べた (図 1)。その結果、抗 D111 抗体は、D111 の MNNL と DSL の両者を特異的に認識することが明らかになった。一方で抗 D114 抗体は、D114 の DSL を認識したが、D111 を基本骨格としたキメラ分子では DLL4-DSL を認識せず、機能ドメイン以外の寄与が想定された。そこでより詳細に D114/D111 間の違いをキメラ分子を作成し解析した結果、抗 D114 抗体は、D114-DSL に加えて、DSL~EGF 間の 4 アミノ酸の DSL 側 2 アミノ酸が D114 型 (DQ、図 2) である場合に反応性を有することが判明した。一方で、上記した置換体による Notch1 シグナル誘導能の解析から、D114

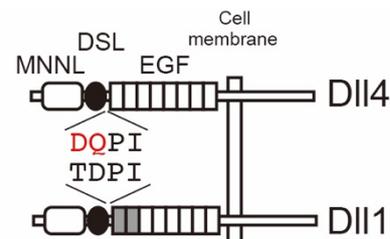


図 2 D114・DSL 隣接部のアミノ酸配列

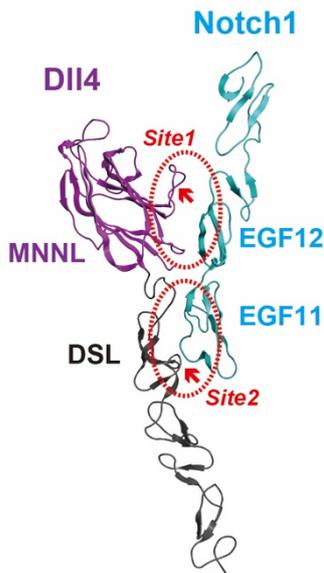


図 3 Notch1/D114 結合部

(3) Notch1/Notch2 の EGF11 における差異とその機能

上記した D114 に固有の DSL/EGF-2aa と Notch1 との結合は、結合シミュレーションより、Notch1 EGF11 の存在する Ser435 に修飾される糖鎖構造との相互作用によることが推測されている。一方で当該アミノ酸は、Notch2 には存在しない。そこで、同部位のアミノ酸を、Notch1、Notch2 間でそれぞれ置換した Notch1 S435A、Notch2 A439S 変異体を作成し、その機能について検証した。その結果、前者は細胞膜上に安定して発現するものの、Notch1 と比較し、D114 による活性化が著しく低下したことから、D114 DSL 領域 C 末側と Notch1 Ser435 (およびその修飾糖鎖) との結合は、機能的にきわめて重要であることが明らかになった。一方、後者と D111 による Notch シグナル誘導は、Notch2 と比較しやや低下するのに対し、D114 によるシグナル誘導は、ほとんど変化せず、Notch2 シグナル誘導能における D111 優位性に一定の変化を認めた。このことは、Notch2 EGF11 に新たに生じた糖鎖付加が、D111 との結合には負の影響があるのに対し、D114 との結合についてはそれを打ち消す正の効果があるものと理解された。以上のことから、D114/Notch1 結合における上記領域の重要性が明確になるとともに、D114/Notch2 との違いを説明する一因である可能性が示唆された。

(4) D114/D111 の胸腺内 T 細胞分化における役割の差異

胸腺上皮細胞上の D114 と、胸腺に移行してきた造血未分化細胞 (HPC) 上の Notch1 を介して誘導される Notch シグナルが、T 細胞系列決定に必須の役割を果たすことが知られている。一方で、Notch2 は、HPC にて発現が認められるものの、Notch1 を欠失した HPC は T 細胞に分化できない

の機能発現には、MNNL、DSL、EGF1/2 が D114 由来であることに加え、DSL-EGF1 間の 2 アミノ酸 (DSL/EGF-2aa) が、D114 型であることの重要性が示された。D114 の DSL/EGF-2aa は、Notch1 との結合シミュレーション (既報、*Science* 347:847, 2015) により、Notch1 との結合面にて、Notch1 EGF11 と直接結合することが推測されており、今回我々の得た結果と考え合わせると、①D114 の DSL/EGF-2aa (DQ) は、D114 DSL 領域の Notch1 との結合を特徴づける D114 特異的な構造に資すること、②HDM4-1 mAb は、その構造を特異的に認識すること、③その構造が、D114~Notch1 結合によるシグナル誘導に重要な役割をもつこと、が明らかになった。以上のことから、D114 による Notch1 を介したシグナル誘導には、MNNL (D114)~EGF12 (Notch1) (Site1) に加えて、DSL+DSL/EGF-2aa~EGF11 (Notch1) (Site2、図 3) を介する結合が重要であり、前者では D114 に固有のループ構造 (Hirano et al., *eLife* 9:e50579, 2020) が、後者では、DSL/EGF-2aa を中心とした特有の構造が、それぞれ寄与することが示された。今後、HDM4-1 mAb が認識する特異構造を NMR 等により解析することが、D114 固有の結合様式を理解するうえできわめて重要と考えられた。

ことから、機能的ではないと考えられている。しかし、Notch2 を介した Notch シグナルは十分に T 細胞分化を誘導することも我々がすでに報告しており (Hozumi et al., *J Immunol* 170:4973, 2003)、胸腺における D114 による Notch シグナル誘導の本質的な理解は不十分なままであった。

そこで、3 (3) 項に記した手法を用いて、胸腺上皮細胞に同条件で D114、D111 をそれぞれ発現するマウスと、Notch1、Notch2 いずれかを発現する HPC を用い、それぞれの Notch/NotchL の組合せが、T 細胞分化をどのように誘導するのか、検証を試みた。その結果、胸腺上皮細胞に D111 を発現する場合は、Notch1、Notch2 いずれの受容体でも十分な T 細胞分化を認めるのに対し、D114 を発現する場合は、Notch1 でのみ T 細胞が誘導され、Notch2 は機能的でないことが明らかになった (Hirano et al., *Front Immunol* 13:852427, 2022)。これらの結果は、D114/Notch1 の機能的優位性を示すとともに、D111 は Notch1/Notch2 の差異に影響されずに機能できるものと推測された。このことは、進化過程において、胸腺組織が出現する軟骨魚類においては、D111 遺伝子のみが存在すること、一方で Notch 遺伝子は、Notch2 様の配列を有することから、哺乳動物における D111/Notch2 の組合せに類似した形で機能していることが推察され、興味深い。

以上のことから、in vivo において、D114 と D111 の機能的差異が明確に示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Hirano Ken-ichi, Hosokawa Hiroyuki, Yahata Takashi, Ando Kiyoshi, Tanaka Masayuki, Imai Jin, Yazawa Masaki, Ohtsuka Masato, Negishi Naoko, Habu Sonoko, Sato Takehito, Hozumi Katsuto | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 DII1 Can Function as a Ligand of Notch1 and Notch2 in the Thymic Epithelium | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 6. 最初と最後の頁 852427 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2022.852427 | 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 Hirano Ken-ichi, Hosokawa Hiroyuki, Koizumi Maria, Endo Yusuke, Yahata Takashi, Ando Kiyoshi, Hozumi Katsuto | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 LMO2 is essential to maintain the ability of progenitors to differentiate into T-cell lineage in mice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 eLife | 6. 最初と最後の頁 e68227 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.68227 | 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 Yazawa Masaki, Hosokawa Hiroyuki, Koizumi Maria, Hirano Ken-ichi, Imai Jin, Hozumi Katsuto | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Notch signaling supports the appearance of follicular helper T cells in the Peyer's patches concomitantly with the reduction of regulatory T cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 International Immunology | 6. 最初と最後の頁 469 ~ 478 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/intimm/dxab032 | 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 1件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 穂積勝人 |
| 2. 発表標題 DII1 and DII4 differently require their extracellular domains for triggering Notch signaling in mice |
| 3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|