

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07182

研究課題名(和文) mTORC構成因子Tel2を標的とする新規マクロライド系Wnt経路阻害薬の開発

研究課題名(英文) Development of a new macrolide derivative targeting mTORC

研究代表者

西谷 直之(Nishiya, Naoyuki)

岩手医科大学・薬学部・教授

研究者番号：10286867

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：最近、申請者らは、イベルメクチン(IVM)によるWntシグナル阻害作用が、mTOR複合体の構成因子の1つであるTEL02への結合を介することを見出した。これは、新たな機序で作用するがん治療戦略として魅力的であるが、IVMの過量投与は抑制性神経伝達物質受容体への結合を介して中枢神経抑制を起こす。本研究では「IVMの誘導体化によって、Wntシグナル阻害作用の増強と中枢神経抑制作用の軽減を両立できる。」という仮説をたて、TEL02を介したWntシグナル阻害薬のリード化合物の創成を試みた。その結果、IVMの中枢抑制作用に関わる構造を除去した新規Wnt阻害剤を創成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん分子標的治療ではキナーゼ阻害剤の躍進が著しいが、それに続く画期的な薬剤や新たな治療標的の同定が重要な課題である。様々ながんの病態に關与するWnt経路は抗がん剤の標的として魅力的であるが、同経路は多様な生理機能を有するため、その主要な構成因子を標的にした際にはオンターゲットの副作用を回避することは困難である。我々の研究は、一部の悪性腫瘍がその生存に必要とするWnt経路制御因子TEL02を標的とした創薬の基盤を形成する。さらに、TEL02阻害活性を有するイベルメクチンの構造改変を進めることで、長期にわたる繰り返し投与を可能とする低毒性のリード化合物を創成した。

研究成果の概要(英文)：In cancer molecular targeted therapy, the progress of kinase inhibitors has been remarkable, but the identifications of breakthrough drugs and new therapeutic targets remain as important issues. Recently, we have found that the Wnt signal inhibition by ivermectin (IVM) is mediated by binding to TEL02, one of the components of the mTOR complex. This is an attractive cancer treatment strategy with a new mechanism, but overdosing of IVM causes central nervous system depression through binding to inhibitory neurotransmitter receptors. In this study, we hypothesized that "both of enhancing the Wnt signal inhibitory activity and reducing central nervous system depression can be achieved by derivatizing IVM" and synthesized a lead compound for a Wnt signal inhibitor that acts through TEL02.

研究分野：創薬科学

キーワード：Wnt 阻害薬 mTOR 悪性腫瘍

1. 研究開始当初の背景

がん分子標的治療ではキナーゼ阻害剤の躍進が著しいが、それらに続く画期的な薬剤や新たな治療標的の同定が重要な課題である。Wnt/ β -catenin 経路 (以下 Wnt 経路と略す、図 1) が、様々ながんの病態に寄与することが知られており、同経路阻害薬の探索が世界中で進められている。しかし、今のところ医薬品として承認されたものはない。*in vitro* 評価系では副作用発現を予測できないことが一因とされ¹、近年は、モデル動物を用いた表現型スクリーニングが注目されている。実際我々は、ゼブラフィッシュ受精卵を用いた表現型スクリーニングによって Wnt 経路阻害剤として抗寄生虫薬イベルメクチン (IVM) を再発見した。

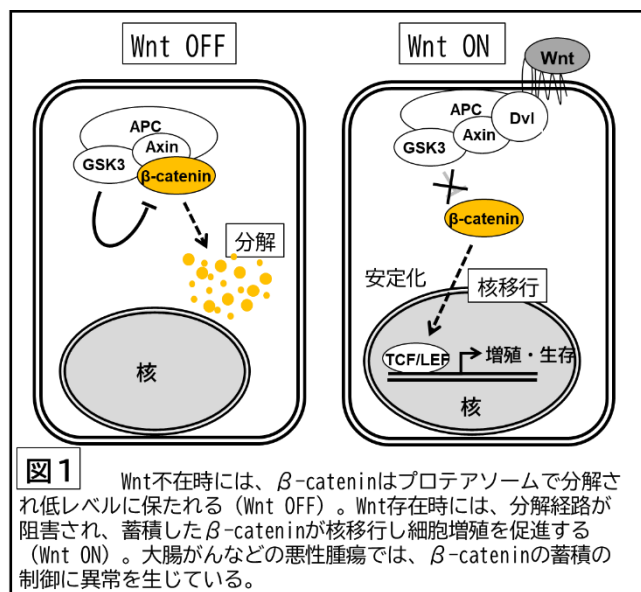


図 1 Wnt不在時には、 β -cateninはプロテアソームで分解され低レベルに保たれる (Wnt OFF)。Wnt存在時には、分解経路が阻害され、蓄積した β -cateninが核移行し細胞増殖を促進する (Wnt ON)。大腸がんなどの悪性腫瘍では、 β -cateninの蓄積の制御に異常を生じている。

さらに、我々は、IVMによる Wnt 経路阻害作用の標的分子として、Telomere length regulation protein 2 (TEL02) を同定した。TEL02 は mTOR 複合体の構成成分であり、mTOR の安定化や機能発現に必須の因子である²。加えて、mTOR と共に PI3K-related kinase ファミリーに属する ATM、ATR、DNA-dependent kinase といった DNA 修復に関与する非典型キナーゼの安定性も制御する因子である。我々は、TEL02 のノックダウンと IVM 非結合性 TEL02 変異体 K749T を用いた再構成実験から、IVM の抗 Wnt 作用は TEL02 への結合に依存することを明らかにしてきた。

様々ながんの病態に関与する Wnt 経路は抗がん剤の標的として魅力的である。一方で、同経路は多様な組織で恒常性維持機能を担っているため、シグナル伝達の主要な構成因子を標的にした薬物治療ではオンターゲットの副作用を回避することが困難である。TEL02 は Wnt 経路の軸心因子ではないため、その阻害が直に Wnt 経路の生理機能に影響を与えるわけではない。我々は TEL02 への依存度が特に高い悪性腫瘍を見出しており、これらの悪性腫瘍の薬物治療への IVM の応用は比較的副作用が少ない治療法の開発に結び付くと考えている。

IVM のように既に別疾患の治療薬として承認されている薬剤のドラッグリポジショニングは、ヒトへの投与実績があるため毒性情報や副作用回避のノウハウの観点では有利である。しかし、承認済みの用法・用量をそのまま悪性腫瘍の治療に応用できるとは限らず、むしろ増量や投与期間の延長が必要な事例が多いと思われる。総投与量の増加は、既知の保険適用の用法では問題にならなかった副作用を顕在化させる恐れがある。

IVM が抗寄生虫薬として処方される場合、1~2回の服用で治療が完結する。このような短期間では、重大な副作用の発現頻度は高くない。しかし、IVM の非臨床試験では、高用量で被験動物に運動失調や振戦などの中枢神経作用が報告されている。IVM の抗寄生虫作用は、寄生虫のグルタミン酸作動性クロライドチャンネル (GluCl) の開口による神経の過分極であるが、哺乳類の抑制性神経伝達物質受容体である γ -アミノ酪酸 (GABA) 受容体やグリシン (Gly) 受容体にも結合し過分極を起こすと考えられている。実際、脊椎動物 Gly 受容体と IVM の結合は、GluCl との結合様式に酷似しており、結合に必要なアミノ酸は良く保存されている³。IVM のベンゾフラン環 (図 2) の水酸基がクロライドチャンネルとの結合に重要と考えられている。

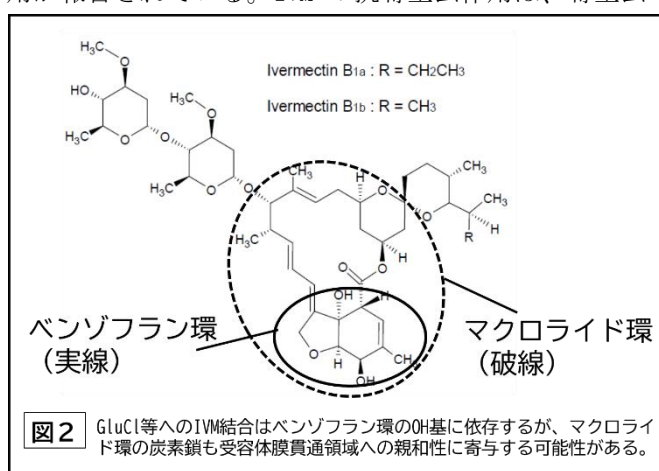


図 2 GluCl等へのIVM結合はベンゾフラン環のOH基に依存するが、マクロライド環の炭素鎖も受容体膜貫通領域への親和性に寄与する可能性がある。

2. 研究の目的

悪性腫瘍特異的に要求性の高い治療標的分子 TEL02 の機能制御やそれに続く Wnt 経路阻害を軸とした治療戦略を構築するために、同活性を有する IVM の中枢毒性のリスクを低下させることを目指した。本研究では「IVM の誘導体化によって、Wnt シグナル阻害作用の増強と中枢神経抑制作用の軽減を両立できる。」という仮説をたて、下記 (1) ~ (3) を評価して検証した。

- (1) IVM のベンゾフラン構造破壊時の Wnt 阻害効果の維持
- (2) IVM のベンゾフラン構造の破壊による中枢抑制作用の減弱
- (3) IVM のマクロライド構造変換時の Wnt 阻害効果の維持

3. 研究の方法

レポーターアッセイ

化合物による Wnt 経路阻害活性を評価するために、ルシフェラーゼアッセイを行った。β-catenin 依存的 TCF 転写活性化を TOPFlash レポータープラスミド (ホタルルシフェラーゼ) を用いて評価した。HEK293 細胞へのトランスフェクション効率の補正には、レニラルシフェラーゼ発現プラスミドを用いた。各発光試薬 (Dual-Luciferase Reporter Assay System、Promega) を加えたのち、プレートリーダーで発光を測定した。

中枢抑制作用の評価

GABA アンタゴニストであるピククリンを投与して誘発させたてんかん発作が抑制されるかを指標に中枢抑制作用を評価した。C57BL6 (雌) に被験化合物を 10 mg/kg 投与し、4 時間後に 7 mg/kg のピククリンを投与した。投与後 15 分以内に生じるてんかん発作を観察した。

ゼブラフィッシュ受精卵の表現型解析

Wnt 経路の負の制御因子である GSK3β を阻害することで、Wnt 経路の異常活性化に起因する眼の形成不全の表現型をゼブラフィッシュ胚に誘導できる。Wnt 経路阻害活性のある化合物は、眼の発生を回復させる。ゼブラフィッシュ RIKEN WT 系統の受精卵 (5.5 時間胚) の飼育バッファーに各化合物を添加した。受精後 6 時間に達したら 2 μM の GSK3 阻害薬 6-bromo-indirubin-3'-oxime (BIO) を追加し、一夜インキュベートした。30 時間胚の眼発生が回復したか観察した⁴。

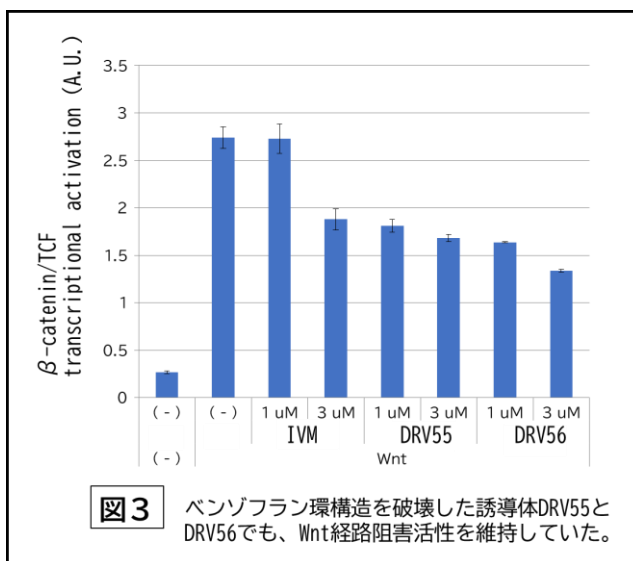
MTT アッセイ

化合物による細胞増殖阻害活性を評価するために MTT アッセイを行った。化合物処理 3 日後に MTT 試薬 (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide) を培地に加え、4 時間後に SDS を加えて反応を停止した。プレートリーダーで波長 570 nm の吸光度を測定した。

4. 研究成果

(1) IVM のベンゾフラン構造破壊時の Wnt 阻害効果の維持

前述の GABA や Gly といった抑制性神経伝達物質に対する受容体と IVM との結合はベンゾフラン環構造に依存すると考えられている。そこで、ベンゾフラン構造を破壊した IVM 誘導体 (図 2) に抗 Wnt 活性が見いだせれば、中枢抑制作用と Wnt 経路阻害活性を切り離せると考えた。ベンゾフラン構造を破壊した IVM 誘導体 DRV55 と DRV56 を合成し、それらの Wnt 阻害活性を TOPFlash を用いたレポーターアッセイで評価した。両誘導体とも IVM と同等以上に TCF/β-catenin 依存的転写活性化を低下させた (図 3)。したがって、ベンゾフラン構造は Wnt 経路阻害活性に必須ではないと考えられた。



(2) IVM のベンゾフラン構造の破壊による中枢抑制作用の減弱

次に、ベンゾフラン構造の破壊が、IVM の中枢抑制作用を消失させるか確認した。野生型マウス (C57BL6) に、DRV55 または IVM を前投与し、GABA 拮抗薬であるピククリンによって誘導されるてんかん発作を抑制するか検討した。IVM は有意にピククリンによる GABA 抑制効果をキャンセルした。一方、DRV55 では、溶媒投与群との比較で有意な差は見られなかった (図 4)。し

	生存	死亡	
溶媒投与群 (n = 8)	1	7	
10mg/kg IVM 投与群 (n = 10)	9	1	P < 0.01
10mg/kg DRV55 投与群 (n = 10)	5	5	P = 0.24

図4 ピククリン誘導性てんかん発作による死亡率の低下を指標に、イバルメクチン (IVM) と誘導体 DRV55 の中枢抑制作用を比較した。溶媒投与群に対する各薬剤投与群の独立性検定 (Yates の補正) を行った。有意水準 5% とした場合、IVM には有意な中枢抑制作用が観察されたが、ベンゾフラン構造が破壊された DRV55 では中枢抑制作用の低下が見られた。

たがって、ベンゾフラン構造の破壊によって、IVM の中枢抑制効果は低下すると考えられる。

(3) IVMのマクロライド構造変換時のWnt阻害効果の維持

ベンゾフラン環を破壊することで中枢抑制作用は明らかに減弱されたが、完全に除去されたわけではなく、一部残存する傾向が見られた(図4)。IVMのマクロライド構造の脂溶性は、クロライドチャンネルの膜貫通領域への親和性に寄与する可能性がある。そこで、中枢抑制効果の完全除去を目的とし、マクロライド構造に構造変換を施したDRV10やDRV62を合成した(図2)。

DRV10とDRV62は、ゼブラフィッシュ胚の表現型(図5)とレポーターアッセイ(図6)でWnt経路阻害活性を示した。ベンゾフラン環破壊かつマクロライド構造変換を施したDRV10は、マクロライド構造変換のみを施したDRV62に比較し、Wnt阻害効果の低下が見られた。そこで、さらに構造改変を進め、IVMと同等の阻害活性かつベンゾフラン環破壊とマクロライド構造変換を両立した誘導体DRV69やDRV32を合成した。これらは、レポーターアッセイでは、IVMと同等のWnt経路阻害活性を有していた(図7)。すなわち、本研究の目的である「IVMの誘導体化によって、Wntシグナル阻害作用の増強と中枢神経抑制作用の軽減を両立できる。」という仮説の妥当性が示された。

これらは、Wnt依存性大腸がん細胞株DLD-1(APC変異陽性)とHCT-116(β -catenin変異陽性)に対し、IVMと同等の増殖阻害活性を示した。今後、さらにDRV32を基にした誘導体化を進め、Wnt阻害活性の増強を図り、グラム単位の合成と動物実験による検証を進める。

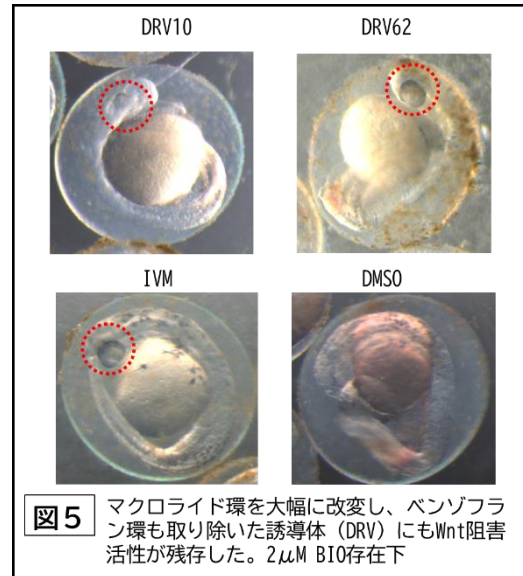


図5 マクロライド環を大幅に改変し、ベンゾフラン環も取り除いた誘導体(DRV)にもWnt阻害活性が残存した。2 μ M BIO存在下

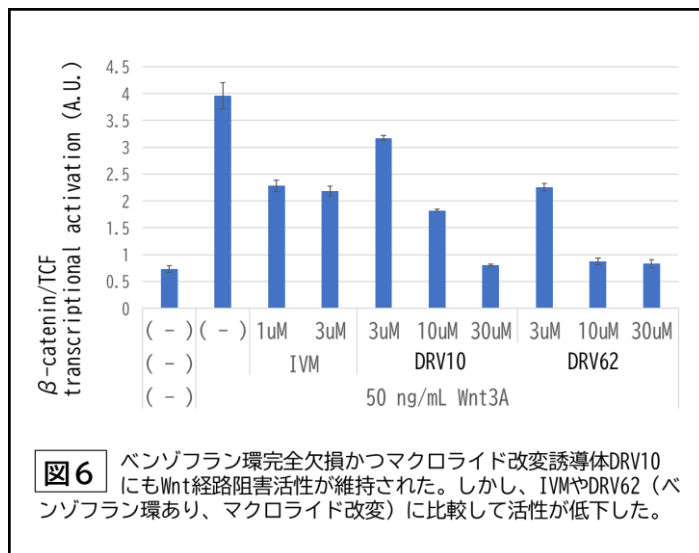


図6 ベンゾフラン環完全欠損かつマクロライド改変誘導体DRV10にもWnt経路阻害活性が維持された。しかし、IVMやDRV62(ベンゾフラン環あり、マクロライド改変)に比較して活性が低下した。

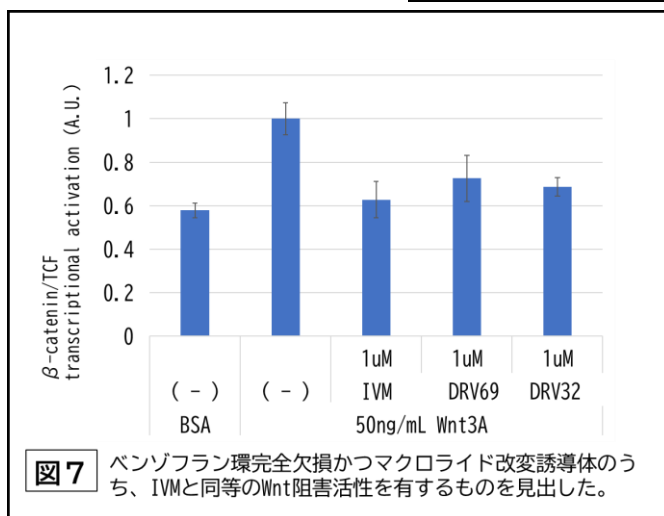


図7 ベンゾフラン環完全欠損かつマクロライド改変誘導体のうち、IVMと同等のWnt阻害活性を有するものを見出した。

<引用文献>

1. Kahn, Nat Rev Drug Discov. 2014;13(7):513-532.
2. Kaizuka et al. J Biol Chem. 2010;285(26):20109-20116.
3. Chen and Kubo, J Physiol. 2018;596(10):1833-1845.
4. Nishiya et al. Chem Biol. 2014 Apr 24;21(4):530-540.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Yonezawa Honami, Ikeda Akari, Takahashi Ryo, Endo Haruka, Sugawara Yasuyo, Goto Mikako, Kanno Mirute, Ogawa Sosuke, Nakamura Karin, Ujiie Haruki, Iwatsuki Masato, Hirose Tomoyasu, Sunazuka Toshiaki, Uehara Yoshimasa, Nishiya Naoyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 Ivermectin represses Wnt/ β -catenin signaling by binding to TEL02, a regulator of phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 103912 ~ 103912
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.103912	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 西谷 直之、米澤 穂波	4. 巻 59
2. 論文標題 中分子化合物の新たな標的分子：PI3K関連キナーゼのco-chaperone成分TEL02	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ファルマシア	6. 最初と最後の頁 1096 ~ 1100
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14894/faruawpsj.59.12_1096	査読の有無 無
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14件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 西谷直之
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ胚の表現型ダイバーシティを利用したケミカルバイオロジー
3. 学会等名 新学術領域「細胞ダイバース」公開シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米澤穂波、上原至雅、西谷直之
2. 発表標題 IvBP mediates Wnt/ β -catenin signaling inhibitory activities of ivermectin
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米澤穂波、氏家悠貴、上原至雅、西谷直之
2. 発表標題 新規創薬標的分子TEL02を介したイベルメクチンによるWnt/ β -catenin経路阻害作用の解析
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西谷直之、米澤穂波、氏家悠貴、上原至雅
2. 発表標題 TEL02へのイベルメクチンの結合はPI3K関連キナーゼ機能を制御する
3. 学会等名 第26回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西谷直之、米澤穂波、氏家悠貴、上原至雅
2. 発表標題 Targeting of TEL02 suppresses functions of PI3K-related kinases and the Wnt/ β -catenin pathway.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米澤穂波、氏家悠貴、上原至雅、西谷直之
2. 発表標題 Ivermectin-binding to TEL02 mediates the Wnt/ β -catenin signaling suppression by ivermectin.
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 米澤穂波、池田朱里、高橋 亮、廣瀬友靖、岩月正人、砂塚敏明、上原至雅、西谷直之
2. 発表標題 PIKKs安定化因子TEL02はイベルメクチンによるWnt/ β -catenin経路阻害作用を仲介する
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米澤 穂波、上原 至雅、西谷直之
2. 発表標題 PIKKs安定化因子TEL02の機能制御による悪性ラブドイド腫瘍細胞の増殖抑制
3. 学会等名 第27回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoyuki Nishiya, Haruki Ujiie, Honami Yonezawa.
2. 発表標題 Trans-scale Pharmacology Identified TEL02 as a Target Molecule for a Wnt/ β -catenin Pathway Inhibitor.
3. 学会等名 EMBO-COB Workshop "Trans-Scale Biology using exotic non-model organisms" (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米澤穂波、氏家悠貴、上原至雅、西谷直之
2. 発表標題 TEL02の制御は悪性ラブドイド腫瘍細胞の生存を阻害する
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoyuki Nishiya, Honami Yonezawa.
2. 発表標題 A chemical suppressor screening in zebrafish identifies Wnt/ β -catenin pathway inhibitors improving anticancer drug response.
3. 学会等名 EACR conference Cellular Bases for Patient Response to Cancer Therapies (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Honami Yonezawa, Haruki Ujiie, Yoshimasa Uehara, Naoyuki Nishiya.
2. 発表標題 TEL02, a regulator of phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases, is a druggable target for an inhibitor of the Wnt/ β -catenin and the mTOR signaling.
3. 学会等名 EACR conference Cellular Bases for Patient Response to Cancer Therapies, (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西谷直之
2. 発表標題 ゼブラフィッシュ胚の表現型解析を起点としたドラッグアブル分子の同定
3. 学会等名 日本薬学会東北支部 第 45 回東北薬学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米澤穂波、大森紀和、池田朱里、廣瀬友靖、岩月正人、砂塚敏明、上原至雅、西谷直之
2. 発表標題 イベルメクチン結合因子の同定とWnt/ β -catenin経路制御機能の解析
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

抗寄生虫薬イベルメクチンによる抗がん作用を仲介するヒト細胞内標的分子の発見
<https://www.iwate-med.ac.jp/news/n5-research/22030801-soumu/>
抗寄生虫薬イベルメクチンによる抗がん作用を仲介するヒト細胞内標的分子の発見
<https://www.iwate-med.ac.jp/news/n5-research/22030801-soumu/>
【プレスリリース】抗寄生虫薬イベルメクチンによる抗がん作用を仲介するヒト細胞内標的分子の発見
<https://www.imu-pharm.jp/information/>

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
---------	---------