

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22790082

研究課題名（和文）脊椎動物ケミカルジェネティクスによる Wnt 経路阻害剤の作用機構解明

研究課題名（英文）Elucidation of the action mechanism of Wnt pathway inhibitors by vertebrate chemical genetics

研究代表者

西谷 直之 (NISHIYA NAOYUKI)

岩手医科大学・薬学部・講師

研究者番号：10286867

研究成果の概要（和文）：Wnt/ β -カテニン 経路は、大腸癌などで異常な活性化が観察されることに加え、正常な胚発生を制御するシグナル経路としても知られている。我々は、ゼブラフィッシュの胚発生を指標とした斬新な探索系によって、新規 Wnt/ β -カテニン経路阻害剤 IMU14 とその誘導体を同定してきた。本研究では、これらの化合物の作用機構の解明を試みた。IMU14 誘導体を固相化したアフィニティ担体を用いた結合実験によって、IMU 化合物が β -カテニンや GSK-3 β を含む複合体と物理的に相互作用することが示された。さらに、ケミカルジェネティクスの手法を用いて、IMU 化合物の標的分子と GSK-3 β との機能的相互作用の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：The evolutionarily conserved Wnt/ β -catenin pathway is crucial for normal embryogenesis as well as abnormal activation observed in tumors such as colorectal cancers. We identified a low molecular weight compound IMU14 and its derivatives as novel Wnt/ β -catenin pathway inhibitors through an unconventional vertebrate *in vivo* screening system, in which effects of test compounds on zebrafish embryogenesis was evaluated. In this study, we aimed to elucidate the action mechanism of the IMU compounds. An immobilized IMU compound co-precipitated a protein complex containing β -catenin and GSK-3 β . Furthermore, chemical genetics showed functional interaction between a target molecule of the IMU compounds and GSK-3 β .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

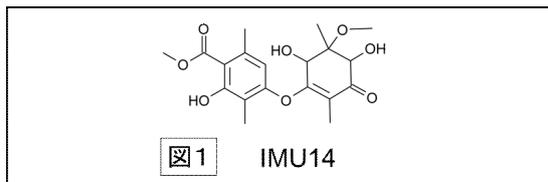
キーワード：癌、シグナル伝達、細胞・組織、発生・分化、薬学、分子生物学

1. 研究開始当初の背景

近年、グリベックなどのがん分子標的治療薬が特定のがんに奏効しており、国民の抗がん剤創薬への期待が高まっている。他方、抗がん剤開発では、副作用や個体レベルでの効果消失などの理由で開発を断念する確率が高く、抗がん剤開発の遅延やコスト引き上げの要因となっている。そこで、申請者は、抗がん剤の薬効評価と副作用予測を同時に行うために、ゼブラフィッシュ胚を用いた斬新な *in vivo* 抗がん剤評価系を構築してきた。

2. 研究の目的

我々は、ゼブラフィッシュ胚を用いた探索系によって、Wnt/ β -カテニン経路を抑制する新たな化合物 IMU14 (図1) とその誘導体を同定してきた。本研究では、「IMU14 誘導体は β -カテニンの核内機能を阻害することによって Wnt シグナルを抑制する。」という仮説の検証を行い、新たな抗がん剤シードの作用機構解明を試みた。IMU14 誘導体の作用機構解明は、ゼブラフィッシュを用いた斬新な薬効・副作用同時評価系を完成させる上で重要な位置を占める。



期間内に行ったこと

(1) IMU14 誘導体による β -カテニン核内機能阻害の分子機構を解析した。

(2) 核内への β -カテニンの相補実験を行い、IMU14 誘導体の作用機構が β -カテニンの核内蓄積の阻害によるものか解析した。

(3) IMU14 誘導体の標的分子の同定を試みた。得られた標的分子によって核内 β -カテニン量の低下が説明できるか検討した。

3. 研究の方法

(1) IMU 化合物による β -カテニン核内機能阻害の分子機構の解析

GSK-3 β 阻害剤 BIO を用いて β -カテニンを蓄積させた大腸癌細胞 DLD-1 と HEK293 細胞を用いて以下の実験を行った。量的変化の解析では、IMU 化合物処理細胞の細胞分画を行い、細胞質及び核内 β -カテニン量をウェスタンブロットによって比較した。また、プロテアソーム阻害剤 (MG132) 存在下で、IMU 化合物による β -カテニン Ser33, Ser37, Thr41

のリン酸化への影響を、リン酸化体特異抗体を用いたウェスタンブロットによって検討した。

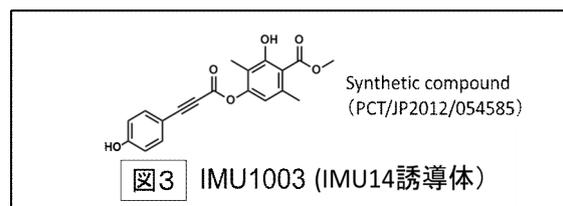
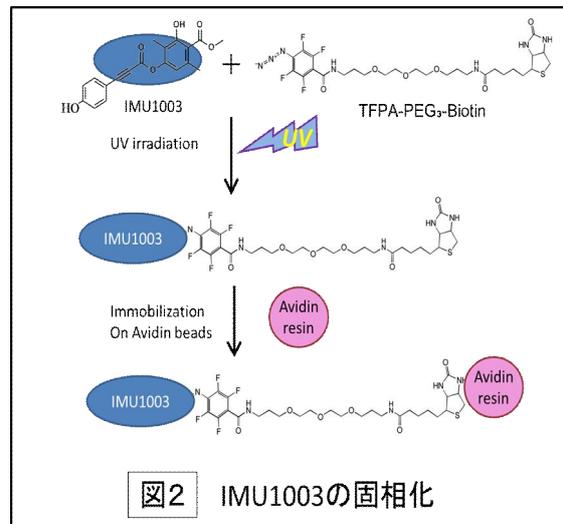
(2) 核内への β -カテニンの相補実験

SV40 に由来する核移行シグナル (NLS) を人工的に付加した β -カテニン (NLS- β -カテニン) を用いて、 β -カテニンの強制的核移行実験を行った。NLS- β -カテニンまたは野生型 β -カテニンの mRNA をゼブラフィッシュ受精卵にインジェクトし、IMU 化合物による背側化シグナルの抑制効果を評価した。

(3) IMU14 の標的分子の同定

① IMUレジンの作成 (図2)

IMU14の高活性誘導体IMU1003 (図3) を固相化してアフィニティーレジンを作成した。tetrafluorophenyl azide (TFPA) 基に紫外線を照射することによって生じるnitreneを利用して、ポリエチレングリコール3分子からなるリンカーをはさみ、IMU1003にビオチンを共有結合させIMU1003-PEG3-Biotinを作成した。次に、IMU1003-PEG3-Biotinをアビジンビーズ上に結合させ、IMU1003アフィニティーレジンを作成した。



② IMUレジンを用いた結合実験

上記のIMU1003アフィニティーレジンとHEK293細胞に由来するタンパク質との *in vitro* 結合反応を行い、結合画分をウェスタンブロットによって解析した。

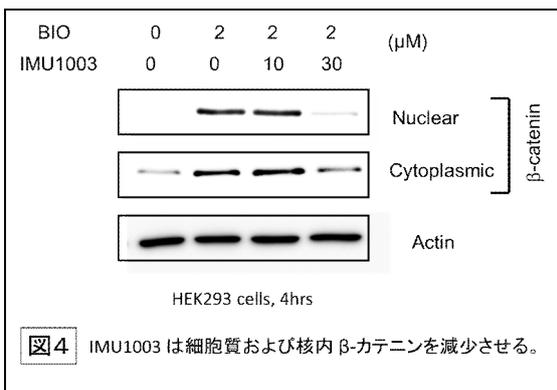
③ GSK-3 β キナーゼ活性の評価

IMU化合物の存在下または非存在下で、基質としてTauタンパク質を用い、GSK-3 β 組み換えタンパク質による *in vitro* キナーゼ反応を行った。リン酸化Tau特異抗体を用いたウェスタンブロットによって、キナーゼ活性を評価した。

4. 研究成果

(1) IMU化合物による β -カテニン核内機能阻害の分子機構の解析

IMU化合物の作用機構の基本情報を得るために、IMU化合物処理による β -カテニンの量的変化への解析を行った。IMU1003処理に続き細胞分画を行い、細胞質及び核内 β -カテニン量を比較した。その結果、IMU化合物は、細胞質及び核内の β -カテニン量を減少させることが明らかとなった(図4)。さらに、IMU1003による β -カテニンSer33, Ser37, Thr41のリン酸化への影響を解析した。しかし、IMU1003による β -カテニンリン酸化への際立った影響は観察されなかった。これらの結果から、IMU化合物は、 β -カテニンの「量的制御」によって抗Wnt作用を示すことが明らかとなった。



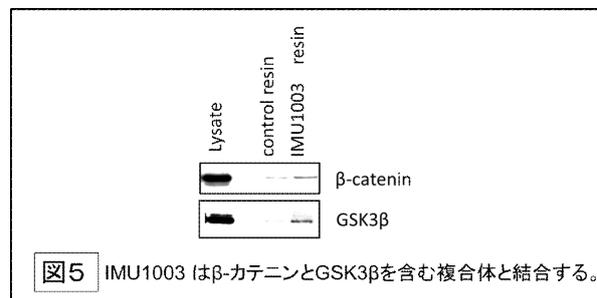
(2) 核内への β -カテニンの相補実験

核内 β -カテニンの減少がIMU化合物の薬理作用に重要な役割を果たしていることを検証するために、NLS- β -カテニンを用いて、 β -カテニンの強制的核移行実験を行った。NLS- β -カテニンまたは野生型 β -カテニンのmRNAをゼブラフィッシュ受精卵にインジェクトし、Wntによる背側化シグナルの抑制効果を評価した。IMU化合物は、野生型 β -カテニンによる背側化を部分的に抑制したが、NLS- β -カテニンによる背側化は抑制しなかった。したがって、IMU化合物による細胞質 β -カテニン量の減少に続き、 β -カテニンの核移行が抑制されることが示唆された。

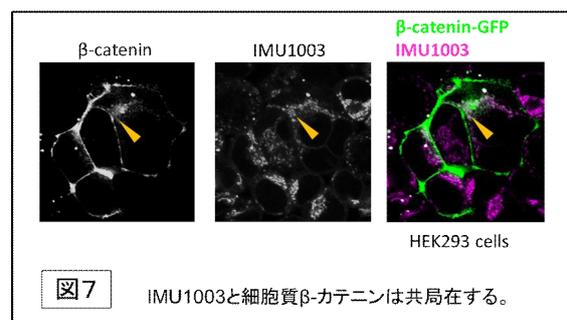
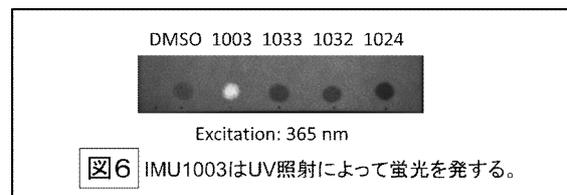
物、野生型 β -カテニンによる背側化を部分的に抑制したが、NLS- β -カテニンによる背側化は抑制しなかった。したがって、IMU化合物による細胞質 β -カテニン量の減少に続き、 β -カテニンの核移行が抑制されることが示唆された。

(3) IMU14誘導体の標的分子の同定

IMU化合物に物理的に結合する標的分子を同定するために、IMU1003アフィニティーレジンを用いた *in vitro* 結合反応を行った。その結果、結合画分には β -カテニンに加えてGSK-3 β が検出された(図5)。これらの結果から、IMU化合物の標的分子は、 β -カテニンやGSK-3 β 自身、または、これらが結合する因子である可能性が示された。

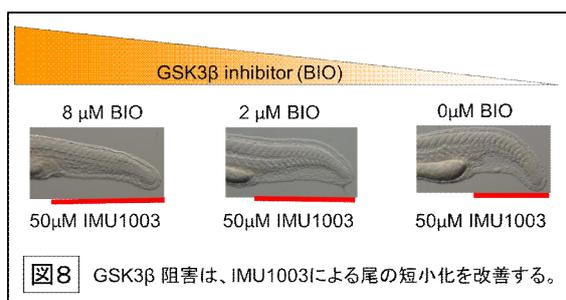


IMU1003が長波長UV(350~365 nm)によって励起され蛍光を発することを見出したため(図6)、IMU1003を用いた細胞染色を試みた。その結果、生細胞中でIMU1003と β -カテニンの共局在が観察された(図7)。細胞間接着部位に局在する β -カテニンはIMU1003とほとんど共存しないが、細胞質 β -カテニンの局在はIMU1003の局在部位と良く一致した。この興味深い知見は、IMU化合物の作用機構解明に有用な情報を与えると考えられる。



IMU1003結合タンパク質複合体中に、 β -カテニンの安定性を制御するセリンスレオニンキナーゼGSK-3 β が含まれることが明らかとなったため、IMU化合物によるGSK-3 β のキナーゼ活性への影響を解析した。しかし、現在のところ、IMU1003によるGSK-3 β キナーゼ活性への直接的影響は確認されていない。他の因子を介した間接的な制御も視野に入れ、作用の詳細を検討中である。

IMU化合物は、GSK-3 β 阻害による体軸の後方化を正常に回復させる化合物として同定された低分子化合物ある。逆に、IMU化合物によって引き起こされた尾の短小化が、GSK-3 β 機能阻害で正常に回復するかを観察した。その結果、GSK-3 β 阻害剤である BIO が IMU1003 の作用を打ち消すことが観察された(図8)。すなわち、GSK-3 β 阻害剤と IMU1003 の作用点は、シグナルの上流とも下流ともなり得る位置関係にあることが予想された。本結果も間接的に、IMU1003 の標的が、GSK-3 β か近傍の因子であることを示唆している。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① Tsuda K, Nishiya N, Umeyama T and Uehara Y. Identification of LY83583 as a specific inhibitor of *Candida albicans* MPS1 protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2011) 409:418-423. (査読あり)

[学会発表] (計8件)

- ① 大森紀和、阿部早織、岩岡ささの、大西亨美、佐々木朱里、庄司桃子、奥裕介、西谷直之、上原至雅 Wnt/ β -catenin 経路阻害活性をもつ GGTI-286 の作用機序の解析 日本薬学会 第133年会 2013年3月28日 横浜
- ② 上原至雅、奥裕介、西谷直之 がん細胞

と微小環境との相互作用の薬理的制御
日本農芸化学会 2013 年度大会シンポジウム「細胞骨格とシグナル伝達の理解からがんにつながる」 2013年3月27日 仙台

- ③ Nishiya, N., Kawano, T., Uehara, Y. IMU14 derivatives as novel Wnt/ β -catenin signaling inhibitors. 日本癌学会 第71回総会 2012年9月21日 札幌
- ④ 西谷直之、奥裕介、上原至雅 タンパク質の脂質修飾制御による選択的 Wnt/ β -catenin シグナル阻害 第16回日本がん分子標的治療学会学術集会 2012年6月29日 北九州
- ⑤ 小松豊徳、三田地沙織、河野富一、西谷直之、上原至雅 新規 Wnt/ β -catenin シグナル阻害剤 IMU1003 の同定 日本薬学会 第132年会 2012年3月29日 札幌
- ⑥ 山口英美、熊谷裕介、佐藤佑樹、西谷直之、上原至雅 ゼブラフィッシュ胚を用いた Wnt/ β -catenin 経路阻害剤探索系の構築 日本薬学会 第132年会 2012年3月29日 札幌
- ⑦ 西谷直之、河野富一、津田香代子、上原至雅 ゼブラフィッシュ胚を用いた Wnt/ β -カテニンシグナル阻害剤の探索 日本がん分子標的治療学会 第15回学術集会 2011年6月23日 台場
- ⑧ 西谷直之、津田香代子、上原至雅 ゲフィチニブ耐性 EGFR T790M 変異の克服を志向したキナーゼ阻害剤プロファイリング 日本がん分子標的治療学会 第14回学術集会 2010年7月8日 江戸川区船堀

[産業財産権]

○出願状況 (計2件)

名称: 胚の発生および/または分化を制御する方法

発明者: 西谷直之、河野富一、畠中稔、上原至雅

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2011-041262

出願年月日: 2011年2月28日

国内外の別: 国内

名称: 胚の発生および/または分化を制御する方法

発明者: 西谷直之、河野富一、畠中稔、

上原至雅
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2012/054585
出願年月日：2012年3月14日
国内外の別：国際PCT

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西谷 直之 (NISHIYA NAOYUKI)
岩手医科大学・薬学部・講師
研究者番号：10286867

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：