

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 25 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510287

研究課題名(和文)ケミカルアレイによるヘッジホッグ伝達経路の阻害剤探索

研究課題名(英文)Screening of inhibitors for hedgehog signaling pathway by using chemical array

研究代表者

近藤 恭光(KONDOH, Yasumitsu)

独立行政法人理化学研究所・長田抗生物質研究室・専任研究員

研究者番号：80333342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：ケミカルアレイを用いてソニックヘッジホッグ(Shh)に結合しShhシグナル伝達経路を阻害する化合物の探索を目的とした。ShhNタンパク質を用いたケミカルアレイスクリーニングによりShhNに結合する化合物の探索を行い、約3万化合物の中から322種のShhN結合候補化合物を見いだした。次にSPRイメージングによりShhNとの物理化学的相互作用解析を行った結果、9化合物においてShhNとの強い結合が確認された。マウス未分化間葉細胞C3H10T1/2細胞を用いてShhNによる骨芽細胞への分化誘導活性に与える影響を調べたところ、5化合物においてShhN阻害活性を有していることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this research was investigation of the inhibitor that binds directly to sonic hedgehog (Shh) and inhibits Shh signaling pathway by chemical array screening. By chemical array screening using ShhN protein, 322 candidates among about 30 thousands of library compounds were identified. The interaction of ShhN and candidates were measured by surface plasmon resonance (SPR) imaging and 9 compounds had strong binding activities to ShhN with K_d of 60 nM. It is known that mouse undifferentiated mesenchymal cell C3H10T1/2 differentiates into osteoblast by treatment of ShhN. Among 9 compounds, 5 compounds inhibited the differentiation-inducing activity of ShhN dose-dependently.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：医薬品探索 生理活性 シグナル伝達 マイクロアレイ ケミカルアレイ ソニックヘッジホッグ Shh SPRイメージング

1. 研究開始当初の背景

(1)ケミカルアレイは、タンパク質結合化合物(リガンド)のハイスループットスクリーニングのための有用なプラットフォームとして開発された。当研究室で独自に開発した官能基非依存型の化合物固定化方法は、光親和型反応を利用し、特定の官能基に限定されることなく、化合物を様々な向きで基板に固定することができる(図1)。この方法で基板に固定された化合物は、様々な部位で蛋白質と相互作用することができるため、真の蛋白質-化合物相互作用を観測することができる。研究代表者は、これまでに構造多様性に富む3万種の天然物及び天然物誘導体を搭載させたケミカルアレイを開発しており、すでにタンパク質リガンドのハイスループットスクリーニングに利用している(図1)。

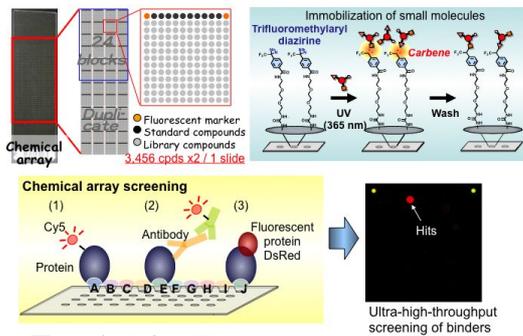


図1. ケミカルアレイ

(2)分泌タンパク質であるソニックヘッジホッグ(Shh)は、正常な胚発生に必要なタンパク質であるが、基底細胞腫、骨芽細胞腫、膵臓癌などの癌細胞において Shh シグナル伝達経路の異常な活性化が報告されており、抗がん剤の標的タンパク質として非常に注目されている。Shh は、45kDa の Shh から活性型の 20 kDa の N 末端断片 (ShhN) への自己切断、C 末端へのコレステロール修飾、N 末端へのパルミテート修飾が起こり(図2)、細胞外に分泌される。

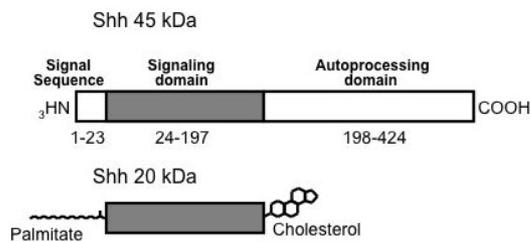


図2. Shh

分泌された活性型の ShhN は、12 回膜貫通型受容体 Ptc1(Patched)に結合し、Ptc1 による Smo(Smoothened)の抑制が解除されると、細胞内にシグナルが伝わり、微小管上で複合体を形成している Cos-2 (kinesin-like protein costal-2)、Fu (serine/threonine kinase fused)、Su(Fu) (suppressor of fused)、Gli (zinc finger transcriptional glioblastoma)から転写因子 Gli が解離して核内に移行し、Gli1, Gli2 を含む標的遺伝子の転写を活性化する。腫瘍細胞から分泌され

た ShhN が、腫瘍細胞の周囲に存在する間質細胞の Shh シグナル伝達経路を活性化させ、腫瘍の成長を誘導する。

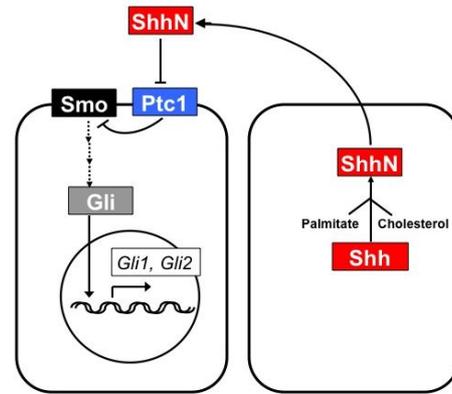


図3. Shh シグナル伝達経路

そのため、Shh シグナル伝達経路は、抗がん剤の魅力的な標的であり、実際に、Smo のアンタゴニスト GDC-0449、IPI-926 を用いた基底細胞種と前立腺癌に対するフェーズ1 臨床試験が現在進行している。しかし、Shh タンパク質そのものを標的としたシグナル伝達経路阻害剤はこれまで見つかっていなかった。2009 年に初めて、ハーバード大学の Schreiber のグループが、多様性志向型合成(DOS)による1万の化合物の中から、ShhN に直接結合しシグナル伝達経路を阻害するロボットニキニン(Robotnikinin)を見つけた。しかし、このロボットニキニンの ShhN との結合能は解離定数(Kd)が 3µM 程度であり、とりわけ強い結合を示す阻害剤ではなかった。

2. 研究の目的

分泌タンパク質である Shh は、正常な胚発生に必要なタンパク質であるが、基底細胞腫、骨芽細胞腫、膵臓癌などの癌細胞において Shh シグナル伝達経路の異常な活性化が報告されており、抗がん剤の標的タンパク質として非常に注目されている。研究代表者は、独自に開発したケミカルアレイを用いて、Shh に直接結合する小分子化合物を約3万種の天然物及び天然物誘導体から探索を行い、Shh シグナル伝達経路阻害剤の創出を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1)3 万種の天然化合物および天然化合物誘導体を光親和型固定化法により固定化したケミカルアレイを作製する。1枚のスライドガラスに、それぞれ約3千種の化合物を2スポットずつ(約6千スポット)固定化したケミカルアレイを10種類作製し、合計で3万種の化合物が固定化されたケミカルアレイのシリーズを作製し、アレイスクリーニングに使用する。タンパク質サンプルとしては、ShhN を GST 又は His タグ融合タンパク質として大腸菌で発現させ、アフィニティークラムにより精製したタンパク質を利用する。

ShhN リコンビナントタンパク質を用いて、最適なケミカルアレイのアッセイ条件を検討しながら、スクリーニングを進める。また、ヘッジホッグファミリータンパク質である desert hedgehog (Dhh), Indian hedgehog (Ihh) も同様にスクリーニングし、ShhN タンパク質に特異的に結合するヒット化合物を明らかにする。

(2) ケミカルアレイスクリーニングから得られたヒット化合物と Shh タンパク質との物理化学的相互作用を解析するために、SPR イメージングを利用する。これは、ケミカルアレイと同様の手法で、金チップ上に小分子化合物を固定化し、非標識のタンパク質と金チップ上の小分子化合物との結合を表面プラズモン共鳴 (SPR) により検出する方法である。アレイヒット化合物及びその類縁体を固定化した SPR チップを作製し、Shh の各ドメインとヒット化合物の相互作用を解析し、ヒット化合物の結合の強さを明らかにする。

(3) SPR イメージングのデータを基に小分子化合物の絞り込みを行った後、細胞を用いて Shh パスウェイに与える影響を解析する。解析には、ShhN 処理により骨芽細胞への分化が誘導されるマウス未分化間葉細胞 C3H10T1/2 細胞を用いて、骨芽細胞の分化のマーカーであるアルカリホスファターゼ活性により、小分子化合物の阻害活性を評価する。

4. 研究成果

(1) 理研天然化合物バンク (NPDepo) に収蔵されている天然化合物、天然化合物誘導体ならびに合成化合物、計 29,893 化合物を 11 枚のスライドガラスに固定化したケミカルアレイシリーズ「NPDepoArray ver. 2A-K」を作製した。次に作製したケミカルアレイを用いて、Shh に結合する化合物のスクリーニングを行った。リコンビナントタンパク質として、His タグを融合したヒト ShhN タンパク質および His タグを融合したマウス ShhN タンパク質を用い、アレイ上に結合したこれらタンパク質の検出は、抗 His 抗体または 2 種類の抗 ShhN 抗体、ならびに蛍光色素 Cy5 標識二次抗体を用いて行った。その結果、29,893 化合物の中で、トータルで 322 種の化合物がヒットした。その内、2 つ以上の抗体で検出された化合物が 48 化合物あった (図 4)。

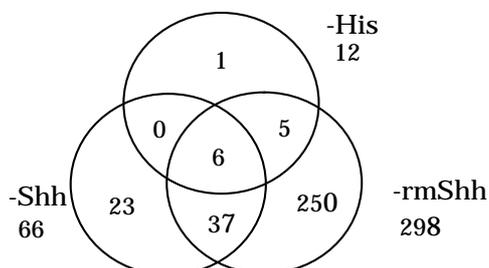


図 4. それぞれの抗体で検出された ShhN 結合ヒット化合物数

2 つ以上の抗体で検出されたこれら 48 化合物

が再現性も見られていると考え、次に SPR イメージングにより ShhN との相互作用解析を行うこととした。

(2) 次に SPR イメージングにより ShhN との相互作用解析を行った。この解析には、プレクセラ社の SPR イメージング装置である PlexArray HT system を使用した。金薄膜を蒸着したチップにチオール基を介して光親和型リンカーを導入し、このチップ上に 48 化合物を 3 点ずつスポットとして固定化した。アナライトとして 25-200 nM のマウス ShhN を用いてこれら 48 化合物との物理化学的相互作用を解析し、結合速度、解離速度、解離定数、結合定数を求めた。その結果、48 化合物中、9 化合物 (A01, A04, A05, A09, A11, B04, B06, C02, C10) においてマウス ShhN との結合が見られた。これらの結合が確認された 9 化合物の解離定数は、6-60 nM の範囲であった。その内、化合物 A09, B06 のセンサーグラムを図 5 に示す。この 2 化合物は、

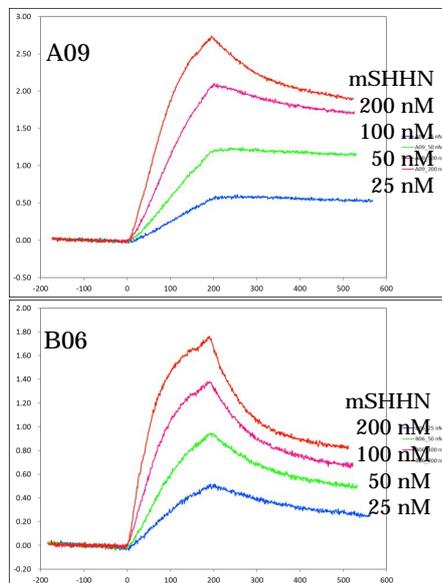


図 5. mShhN と化合物との相互作用のセンサーグラム。化合物 A09 と B06。

どちらも解離定数が 60 nM 程度であるが、結合速度、解離速度において違いが見られた。同様に、マウス DhhN、マウス IhhN においても 48 化合物との相互作用を SPR イメージングにより解析を行った。マウス ShhN との結合が確認された 9 化合物は、DhhN, IhhN に対しては、ShhN よりも弱く結合することが確認された。

(3) マウス未分化間葉細胞 C3H10T1/2 に ShhN を処理すると骨芽細胞への分化が誘導され、マーカータンパク質であるアルカリホスファターゼ (ALP) の発現が誘導される。そこで、C3H10T1/2 細胞に ShhN を 96 時間処理した際に誘導される ALP 活性上昇をこれら 9 化合物が抑制するのかを蛍光基質を用いて評価した。その結果、9 化合物中、5 化合物 (A01, A05, A09, A11, B06) においても Shh 阻害活性を確認した (図 6)。これら 5 化合物は、いずれも細胞毒性を示さない濃度域において、ShhN が

誘導する C3H10T1/2 細胞の ALP 活性上昇を濃度依存的に抑制した。5 化合物の阻害活性の強さは IC₅₀: 3.2 - 15 μM であり、2009 年に Schreiber らが報告した Shh 阻害剤ロボトニキニン (IC₅₀: 2.5 μM) とほぼ同程度であった (図 6)。

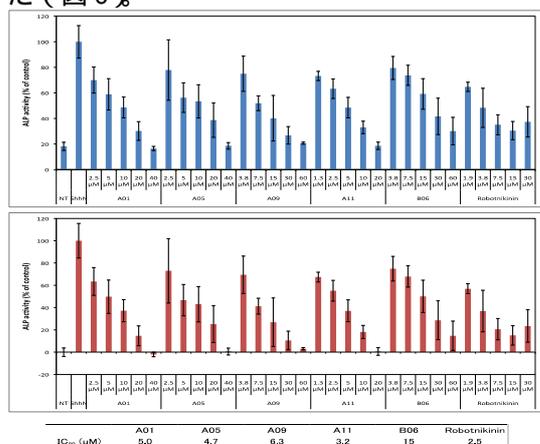


図 6. C3H10T1/2 細胞における ShhN の分化誘導活性に対する化合物の阻害効果

(4)まとめ

ケミカルアレイを用いたスクリーニングにより、Shh に結合する化合物を探索し、見いだされた化合物の中から、Shh の機能を阻害する化合物を取得することに成功した。見いだされた 5 化合物は、いずれもロボトニキニンとは異なる構造を有する化合物であり、これらをシード化合物として構造展開することによりさらに阻害活性の高い化合物の創出が期待できる。

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 9 件)

Yao R, Kondoh Y, Natsume Y, Yamanaka H, Inoue M, Toki H, Takagi R, Shimizu T, Yamori T, Osada H, Noda T. A small compound targeting TACC3 revealed its spatiotemporally different contributions to the spindle assembly in cancer cells. *Oncogene, in press* (2014). 査読有. DOI: 10.1038/onc.2013.382

Hirohama M, Kumar A, Fukuda I, Matsuoka S, Igarashi Y, Saitoh H, Takagi M, Shin-ya K, Honda K, Kondoh Y, Saito T, Nakao Y, Osada H, Zhang K, Yoshida M, Ito A. Spectomycin B1 as a novel SUMOylation inhibitor that directly binds to SUMO E2. *ACS Chem. Biol.* **8**, 2635-2642 (2013). 査読有. DOI: 10.1021/cb400630z

Nakajima Y, Kawamura T, Maeda K, Ichikawa H, Motoyama T, Kondoh Y, Saito T, Kobayashi T, Yoshida M, Osada H, Kimura M. Identification and

characterization of an inhibitor of trichothecene 3-O-acetyltransferase, TR1101, by the chemical array approach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **77**, 1958-1960 (2013). 査読有. DOI: 10.1271/bbb.130153

Noguchi T, Oishi S, Honda K, Kondoh Y, Saito T, Kubo T, Kaneda M, Ohno H, Osada H, Fujii N. Affinity-based screening of MDM2/MDMX-p53 interaction inhibitors by chemical array: identification of novel peptidomimetic inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 3802-3805 (2013). 査読有. DOI: 10.1016/j.bmcl.2013.04.094

長田 裕之、二村 友史、渡辺 信元、近藤 恭光 「新たな抗がん剤探索を加速する新スクリーニング技術」、細胞工学 vol. 32、No. 6、秀潤社、p655-659、(2013) 査読無

<http://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901436.html>

Kondoh Y, Osada H. High-throughput screening identifies small molecule inhibitors of molecular chaperones. *Curr. Pharm. Design* **19**, 473-492 (2013). 査読有. DOI: 10.2174/1381612811306030473

Zimmermann TJ, Burger M, Tashiro E, Kondoh Y, Martinez NE, Gormer K, Rosin-steiner S, Shimizu T, Ozaki S, Mikoshiba K, Watanabe N, Hall D, Vetter IR, Osada H, Hedberg C, Waldmann H. Boronic acid inhibitors of acyl protein thioesterase 1 and 2. *ChemBioChem* **14**, 115-122 (2013) 査読有. DOI: 10.1002/cbic.201200571

Sasazawa Y, Kanagaki S, Tashiro E, Nogawa T, Muroi M, Kondoh Y, Osada H, Imoto M. Xanthohumol Impairs Autophagosome Maturation through Direct Inhibition of Valosin-Containing Protein. *ACS Chem. Biol.* **7**, 892-900 (2012). 査読有. DOI: 10.1021/cb200492h

Burger M, Zimmermann TJ, Kondoh Y, Stege P, Watanabe N, Osada H, Waldmann H, & Vetter IR. Crystal structure of the predicted phospholipase LYPLAL1 reveals unexpected functional plasticity in spite of close relationship to acyl protein thioesterases. *J. Lipid Res.* **53**, 43-50 (2012). 査読有. DOI: 10.1194/jlr.M019851

[学会発表](計 32 件)

近藤 恭光、須藤 龍彦、本田 香織、林 輝雄、長田 裕之、化合物アレイによる p38

および p38 MAP キナーゼ特異的阻害剤の探索、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 27-30 日、明治大学生田キャンパス（神奈川県川崎市）

河村 達郎、近藤 恭光、室井 誠、川谷 誠、長田 裕之、がん細胞に ROS 産生を介した細胞死を誘導する -chloroacetamide の作用機序と効果、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 27-30 日、明治大学生田キャンパス（神奈川県川崎市）

前田 一行、中嶋 佑一、河村 達郎、近藤 恭光、齋藤 臣雄、本山 高幸、長田 裕之、金丸 京子、小林 哲夫、木村 真、化合物アレイを用いたトリコジエンシクターゼ阻害剤の探索、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 27-30 日、明治大学生田キャンパス（神奈川県川崎市）

八尾 良司、矢守 隆夫、近藤 恭光、長田 裕之、野田 哲生、新規 TACC3 阻害剤を用いた紡錘体制御機構解析とがん治療への応用、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

齋藤 尚吾、川口 紘平、本田 香織、近藤 恭光、齋藤 臣雄、長田 裕之、駒田 雅之、脱コピキチン化酵素 USP36 の核小体局在を阻害する化合物の同定と解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

山本 由佳、坂田 幸太郎、原 詳子、本田 香織、結城 瑞恵、近藤 恭光、平野 秀典、武藤 裕、白水 美香子、齋藤 臣雄、長田 裕之、小嶋 聡一、LAP 結合 TGF- 活性化反応阻害物質の探索と活性評価、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

齋藤 臣雄、近藤 恭光、長田 裕之、理化学研究所天然化合物バンク・NPDepo が提供する創薬研究支援、第 5 回食品薬学シンポジウム、2013 年 11 月 1-2 日、京都大学薬学部記念講堂（京都府京都市）

田中 敦史、近藤 恭光、清水 史郎、齋藤 臣雄、長田 裕之、野田 健司、吉森 保、オートファジーを制御する新規化合物の探索、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013 年 6 月 19-21 日、第 65 回日本細胞生物学会大会、ウインクあいち（愛知県名古屋）

Kondoh Y, Sudo T, Honda K, Hayashi T, Osada H. Chemical array screening for specific inhibitor of amino-acid substitution variant. RIKEN-MAXPLANCK JOINTRESEARCH CENTER 2nd Symposium, 2013.4.16-17, RIKEN (Wako, Saitama) Kawamura T, Kondoh Y, Muroi M, Kawatani M, Osada H. Identification of a novel inhibitor of glutathione S-transferase P1-1. RIKEN-MAXPLANCK JOINTRESEARCH CENTER 2nd Symposium,

2013.4.16-17, RIKEN (Wako, Saitama) Tran TTN, Scholermann B, Kondoh Y, Lopez-Alberca MP, Watanabe N, Ziegler S, Osada H, Waldmann H. Application of the chemical array approach in the quest for inhibitors of the mitotic kinesin HSET. RIKEN-MAXPLANCK JOINTRESEARCH CENTER 2nd Symposium,

2013.4.16-17, RIKEN (Wako, Saitama) 近藤 恭光、河村 達郎、本田 香織、関根 朋美、長田 裕之、化合物アレイによるヘッジホッグ伝達経路の阻害剤の探索、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 24-28 日、東北大学川内北キャンパス（宮城県仙台市）

伊藤 卓也、近藤 恭光、梅澤 泰史、清水 猛、篠崎 一雄、長田 裕之、植物ホルモン・アブシジン酸の新規アゴニスト・アンタゴニスト探索、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 24-28 日、東北大学川内北キャンパス（宮城県仙台市）

河村 達郎、近藤 恭光、本田 香織、関根 朋美、室井 誠、近藤 久恵、川谷 誠、長田 裕之、がん細胞にアポトーシスを誘導するアセトアミド誘導体の活性評価と作用機序解析、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 24-28 日、東北大学川内北キャンパス（宮城県仙台市）

上杉 祥太、室井 誠、近藤 恭光、塩野 義人、長田 裕之、木村 賢一、Pyrrocidine A によるミトコンドリアを介したアポトーシス誘導機構、日本農芸化学会 2013 年度大会、2013 年 3 月 24-28 日、東北大学川内北キャンパス（宮城県仙台市）

近藤 恭光、須藤 龍彦、本田 香織、林 輝雄、長田 裕之、化合物アレイによるアミノ酸置換変異体特異的阻害剤の探索手法の開発、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡（福岡県福岡市）

須藤 龍彦、近藤 恭光、長田 裕之、p38 のゲートキーパーの多様性を標的とした特異的阻害剤探索、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡（福岡県福岡市）

三好 良幣、田端 桂介、近藤 恭光、清水 史郎、齋藤 臣雄、長田 裕之、吉森 保、オートファジーを制御する低分子化合物の探索、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡（福岡県福岡市）

近藤 恭光、須藤 龍彦、本田 香織、内田 素子、林 輝雄、長田 裕之、p38 および p38 特異的阻害剤探索のための化合物アレイの改良、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 22-26 日、京都女子大学（京都府京都市）

高木 隆吉、清水 猛、川谷 誠、青野 晴美、近藤 恭光、本田 香織、柴 隆一、長

田 裕之、細胞周期 G2/M 期に作用する小分子化合物の構造活性相関研究、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 22-26 日、京都女子大学（京都府京都市）

〔図書〕（計 0 件）

なし

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 恭光 (KONDOH, Yasumi tsu)
独立行政法人理化学研究所・長田抗生物質
研究室・専任研究員
研究者番号：80333342

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし