

氏名 (生年月日) きたがわ たかひろ
北川 翔大 (1995年3月17日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 博薬 第233号

学位授与の日付 2024年3月16日

学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 Linderapyrone およびその関連化合物の importin7 を介した Wnt/ β -catenin 経路阻害作用

論文審査委員 (主査) 教授 渡辺 徹志

(副査) 教授 西口 工司

(副査) 教授 藤室 雅弘

論文内容の要旨

序章

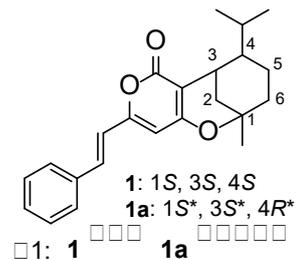
近年、シングルセル遺伝子解析技術の進歩により、がん組織は発現遺伝子の異なる不均一な細胞集団により構成されていることが明らかとなった。がん組織が不均一性をもつことは、既存の抗がん剤治療後に一部のがん細胞が残存し、がんの再発を引き起こす原因となる。がん細胞の発現遺伝子を多様化させる原因の一つとして、多分化能をもつがん幹細胞 (CSC) の存在が挙げられる。CSC は多様な遺伝子を発現する非がん幹細胞 (non-CSC) へと分化するとともに、non-CSC より可逆的に産み出されると考えられている。そのため、抗がん剤治療後の再発を予防するためには、non-CSC および CSC の駆逐に加え、CSC の発生を抑制する必要がある。CSC の幹細胞性発現を担う細胞内シグナル伝達経路として、Wnt/ β -catenin 経路が知られている。このことから、本経路の阻害剤は CSC を駆逐するとともに、発生を防ぐことで、がん治療および再発予防に貢献することが期待される。

そこで本研究では、がんの治療および再発予防に寄与することを目的とし、Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を持つ化合物の探索を行った。また、見出した活性化合物の標的分子を明らかにするとともに、標的分子の機能抑制が Wnt/ β -catenin 経路関連遺伝子の発現に与える影響を評価した。

第1章 新規 Wnt/ β -catenin 経路阻害物質の探索

新規 Wnt/ β -catenin 経路阻害物質を得ることを目的とし、多様な生物活性を示すフラボノイドおよびカルコンの含有が報告されているクロモジ (*Lindera umbellata*) 地上部について、含有成分の探索を行った。その結果、1種の新規化合物 linderapyrone (**1**) を含む2種の化合物を得た。次に、ヒト胎児腎細胞株 HEK293 に 8x super TOP-flash プラスミドを安定導入し

た STF/293 細胞を使用し、得られた 2 種の化合物の Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を評価した。すなわち、本細胞に化合物を処理した時のルシフェラーゼ活性をもとに、Wnt/ β -catenin 経路最下流における T-cell factor (TCF)/ β -catenin 転写活性に対する阻害作用を評価した。その結果、**1** が既存の阻害剤である ICG-001 と同程度の有意な阻害作用を示したことから、その機序および構造活性相関について検討するため、**1** および LPD-01 (**1a**) を含む各種類縁体を合成した。これら類縁体についても同様に TCF/ β -catenin 転写活性に対する阻害作用を評価し、構造活性相関について検討した。その結果、構造中に含まれるピロン環およびモノテルペンの部分骨格の両方が活性発現に必要であり、フェニル基が活性増強に寄与することが明らかになった。



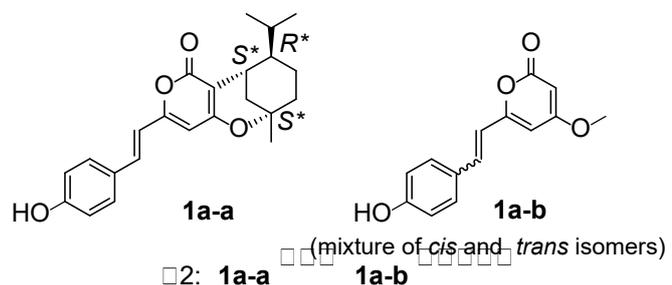
第 2 章 大腸がん細胞増殖抑制作用の評価および LPD-01 (**1a**) の標的分子探索

Wnt/ β -catenin 経路は大腸がんの 9 割以上の症例で異常亢進が見られ、その増殖に関わっている。そこで、**1** および類縁体のヒト大腸がん細胞株 HT-29 に対する増殖抑制作用を評価した。その結果、**1** および **1a** は有意に増殖を抑制した。

そこで、より強い作用を示した **1a** について、Wnt/ β -catenin 経路に対する阻害作用を評価するとともに、標的分子に関する知見を得るため、HT-29 細胞における Wnt/ β -catenin 経路関連因子に与える影響をウェスタンブロット法および RT-qPCR 法で評価した。その結果、**1a** 処理時において、転写調節因子である β -catenin は減少しなかったが、本経路により転写が促進される c-Myc および Survivin は存在量および mRNA 発現量がともに減少していた。このことから、**1a** は β -catenin の存在量に影響を与えずに Wnt/ β -catenin 経路を阻害することが示唆された。

そこで、**1a** の標的分子を見出すため、HT-29 細胞において **1a** と親和性を示すタンパク質を探索した。前章で述べた構造活性相関をもとに、**1a** と同程度の HT-29 細胞増殖抑制作用を示す活性化化合物 **1a-a** (IC_{50} : $9.32 \pm 1.48 \mu M$) に加え、非活性化化合物 **1a-b** ($IC_{50} > 100 \mu M$) を合成した。それぞれの水酸基に磁気ビーズ

を固定し、HT-29 細胞において親和性を示すタンパク質のアフィニティ精製を行った。その後、精製したタンパク質を比較し、**1a-a** のみと親和性を示したタンパク質を LC-MS/MS で解析した。その結果、各種タンパク質や RNA 等の細胞質核内輸送に関わる 2 種のタンパク質 exportin5 および importin7 を同定した。



第 3 章 LPD-01 (**1a**) が importin7 の機能に与える影響および importin7 と Wnt/ β -catenin 経路の関係性の評価

TCF/ β -catenin 転写活性に寄与する因子として Smad2 および Smad3 が報告されている。

Importin7 は TGF- β 1 刺激下で各種 Smads の核内移行を担うことから、TGF- β 1 刺激時の HT-29 細胞において、**1a** が Smads および importin7 の核内移行に与える影響をウェスタンブロット法で評価した。その結果、**1a** は核内の Smad2 および Smad3 を減少させ、importin7 の核内量を増加させた。Importin は細胞質で基質と結合した後、核膜を介して核内に移動し、核内に存在する RanGTP と結合することで基質と解離する。その後、importin は細胞質に移行し、再び基質の核内移行を担う。このことから **1a** は、importin7/RanGTP 相互作用を阻害することで importin7 を核内に蓄積させ、その基質である Smads の核内移行を阻害していると考えられた。

Importin7 が各種 Smads の核内移行を担うことに加え、Smads が TCF/ β -catenin 転写活性に寄与することが報告されていることから、importin7 が Wnt/ β -catenin 経路の活性化に関わっているのではないかと考えた。そこで、importin7 発現抑制が Wnt/ β -catenin 経路の標的遺伝子発現に与える影響を RT-qPCR 法で評価した。その結果、importin7 をノックダウンした HT-29 細胞において、c-Myc および Survivin の mRNA 発現量が減少していた。このことから、importin7 は Wnt/ β -catenin 経路における標的遺伝子の転写活性化に寄与することが明らかになった。以上の結果から、**1a** は importin7 の機能抑制を介して Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を示すことが示唆された。

総括 (結論)

本研究では新規 Wnt/ β -catenin 経路阻害物質として LPD-01 (**1a**) を見出すとともに、その作用機序が importin7 の機能抑制であることを示唆する結果を得た。Importin7 は大腸がんや前立腺がん等、種々のがんで高発現しており、そのノックダウンが腫瘍の増殖を抑制することが明らかになっているが、importin7 阻害作用を持つ化合物は未だ報告されていない。そのため、本研究で見出した **1a** は importin7 阻害作用を示す化合物として、がん治療およびがん再発予防への貢献が期待される。

審査の結果の要旨

《緒言》

がん組織は、発現遺伝子の異なる不均一な細胞集団であり、抗がん剤治療後も残存した一部のがん細胞が、がんの再発の原因となっていると考えられている。がん幹細胞 (CSC) は、多分化能をもち、多様な遺伝子を発現する非がん幹細胞 (non-CSC) へと分化するとともに、non-CSC より可逆的に産み出されると考えられており、がんの再発を予防するためには、non-CSC および CSC の駆逐に加え、CSC の発生を抑制することが有効であると考えられる。CSC の幹細胞性発現を担う細胞内シグナル伝達経路として、Wnt/ β -catenin 経路が知られており、本経路の阻害剤は CSC を駆逐するとともに、発生を防ぐことで、がん治療および再発予防に有用であると考えられる。本研究では、Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を持つ化合物の探索を行

うとともに、見出した活性化合物の標的分子を明らかにし、標的分子の機能抑制が Wnt/ β -catenin 経路関連遺伝子の発現に与える影響を評価した。

《審査結果の要旨》

第1章では、クロモジ (*Lindera umbellata*) 地上部より新規化合物 linderapyrone (**1**) および既知化合物 1 種を得るとともに、それらの Wnt/ β -catenin 経路阻害作用をヒト胎児腎細胞 HEK293 に 8x super TOP-flash プラスミドを安定導入した TOP 細胞を用いて評価し、**1** が有意な阻害作用を示すことを明らかにした。また、**1** およびそのジアステオマーである LPD-01 (**1a**) を含む 8 種の類縁体を合成し、活性を評価することで、活性発現に必要な部分構造を明らかにした。

第2章では、化合物 **1** および **1a** がヒト大腸がん細胞 HT-29 の増殖を有意に抑制することを明らかにし、**1a** 処理時に転写調節因子である β -catenin は減少せず、本経路により転写が促進される c-Myc および Survivin の存在量および mRNA 発現量が減少することを明らかにした。さらに、**1a** の標的タンパク質を見出すため、**1a** および **1a** の類縁体で HT-29 細胞増殖抑制作用を示さない物質を固定した 2 種類の磁気ビーズを作製し、HT-29 細胞中のタンパク質についてアフィニティ精製を行った。その結果、各種タンパク質等の細胞質核内輸送に関わる exportin5 および importin7 を **1a** に親和性を示すタンパク質として同定した。

第3章では、TGF- β 1 刺激時の HT-29 細胞において、**1a** が核内の Smad2 および Smad3 を減少させ、importin7 の核内量を増加させることを明らかにした。また、importin7 をノックダウンした HT-29 細胞では、c-Myc および Survivin の mRNA 発現量が減少することを明らかにした。このことから、importin7 は Wnt/ β -catenin 経路における標的遺伝子の転写活性化に寄与することが明らかになった。以上の結果から、**1a** は importin7 の機能抑制を介して Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を示すことが示唆された。

《審査の結論》

本研究では、CSC の幹細胞性発現を担う Wnt/ β -catenin 経路阻害活性化合物として、LPD-01 (**1a**)を見出した。さらに、**1a** の Wnt/ β -catenin 経路阻害作用は、これまでに阻害剤が報告されていない importin7 の機能抑制を介したものである可能性を示した。本研究成果は、これまでに報告されていない機序により、がんの再発に関わる CSC の駆逐および発生を抑制できる医薬品シーズを提案するものであり、がん治療および再発予防薬の創出に貢献できる知見である。

学位論文とその基礎となる報文の内容を審査した結果、本論文は博士（薬学）の学位論文としての価値を有するものと判断する。