

氏名 (生年月日) わか ぼやし りょう すけ
若 林 亮 介 (1987年9月15日)

学位の種類 博士 (薬学)

学位記番号 博薬 第208号

学位授与の日付 2021年3月20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 Wnt/ β -catenin 経路を標的とした新規ジペプチド型阻害薬の開発および
その抗腫瘍効果の検証

論文審査委員 (主査) 准教授 細木 誠之

(副査) 教授 加藤 伸一

(副査) 教授 古田 巧

論文内容の要旨

序章

がんは本邦における2019年1年間での死亡数は37万人以上であり、全死亡数の約3割を占める。がん治療は近年グリベック (イマチニブ) などの分子標的薬や、免疫チェックポイント阻害剤オプジーボ (ニボルマブ) などの登場により飛躍的な治療成績の向上を遂げている。しかし未だにがん種や臨床病期によっては予後が悪いものもある。また治療困難な再発性のがんや抗がん剤に対する耐性化など多くの問題が残されており、さらなる治療薬の開発が待ち望まれている。胚発生、幹細胞分化調節、骨形成、細胞増殖などに関与するシグナル伝達経路である Wnt/ β -catenin 経路の異常な活性化は、さまざまながん種の発がんやがん幹細胞の発生・維持に寄与することが報告されている。そのため本経路は、がんの再発や耐性化の問題を解決につながる魅力的ながん治療の標的として治療薬の開発が行われてきた。しかし、Wnt/ β -catenin 経路を特異的に標的とする、承認済みの治療薬は未だに存在しない。

本研究では、臨床における治療抵抗性や再発などの問題を解決可能とする、新たな Wnt/ β -catenin 経路阻害薬の開発を目指し、京都薬科大学薬品化学分野が創製した化合物を用いて新規阻害薬の探索研究を行い、がん細胞における抗腫瘍効果を検討した。

第1章 Wnt/ β -catenin 経路阻害薬候補化合物の探索

Wnt/ β -catenin 経路阻害薬を探索するため、ヒト胎児腎細胞 HEK293 細胞に Super TOP flash プラスミドを導入した TOP 細胞を作製し、T-cell factor (TCF) ルシフェラーゼレポーターアッセイでの TCF 活性を指標としたスクリーニングを可能とした。まず、京都薬科大学薬品化学分野が創製した化合物より Wnt/ β -catenin 経路阻害活性を有する化合物のスクリーニングを行った。既存の同阻害薬である ICG001 と構造類似性を有する SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤合成中間体 (23 化合物) を評価した。その結果、12 化合物が ICG001 を上回る活性を示したが、これらの中間体は合成に多くの工程を要し、化合物供給の面での課題がある。そのため、合成が簡便であり多様な原料を容易に利用可能なジペプチド型化合物を新たに設計し、合成と評価を行った (8 化合物)。結果、ICG001 よりも強い TCF 阻害活性を示す compound 31 (Comp. 31) を見出した。

第2章 がん細胞における抗腫瘍効果の評価

第1節 急性骨髄性白血病細胞に対する抗腫瘍効果

前章で開発した Comp. 31 を用いて、Wnt/ β -catenin 経路の異常が数多く報告されている急性骨髄性白血病 (AML: acute myelogenous leukemia) に対する抗腫瘍効果を検討した。実験には、ヒト AML 細胞株 (U937, KG1a, HL-60) を用いた。Comp. 31 は、各細胞の増殖を用量依存的に抑制した。さらに、細胞周期を G₁ 期で停止し、アポトーシスを強く誘導した。次に細胞死メカニズムの解析にあたり、Wnt/ β -catenin 経路阻害による細胞死との関連が報告されている ROS (Reactive Oxygen Species) に着目した。フローサイトメトリー法により ROS 検出試薬 (CM-H2DCFDA) を用いて ROS 産生を評価したところ、control 群および Wnt/ β -catenin 経路阻害薬 ICG001 処置群と比して Comp. 31 処置群において ROS 産生が亢進していることを見出した。また抗酸化剤である N-acetyl cysteine (NAC) との併用により細胞増殖抑制および死細胞の増加が一部解除された。これらの結果より、Comp. 31 による AML 細胞株の細胞増殖抑制および細胞死誘導に、ROS が部分的に関与していることが示唆された。次に、Comp. 31 による Wnt/ β -catenin 経路関連遺伝子の発現変化を、qRT-PCR 法およびウエスタンブロッティング法によって確認したところ、CTNBI (β -catenin)、C-MYC、SURVIVIN などのタンパク質および mRNA 発現が低下していた。さらに、AML の治療で広く用いられているアントラサイクリン系抗がん剤であるイダルビシンと Comp. 31 との併用効果を検討した。2 剤併用処置により相乗的に増殖を阻害した。以上の結果より Comp. 31 は CTNBI mRNA の発現を抑制し、Wnt/ β -catenin 経路を阻害することで、細胞増殖抑制・細胞周期停止・アポトーシス誘導をもたらすことを明らかにした。

第2節 大腸がん細胞に対する抗腫瘍効果

大腸がん患者のうち約 8 割に APC (adenomatous polyposis coli) の変異が認められ、Wnt/ β -catenin 経路の異常な活性化の関与が多く報告されている。そこで Wnt/ β -catenin 経路への依存性が高い大腸がん細胞に対して Comp. 31 における抗腫瘍効果を検討した。まず、Super TOP flash プラスミドを導入したヒト大腸がん細胞株を用いて TCF ルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ、Comp. 31 は濃度依存的な TCF 活性阻害効果を有していた。次に、細胞増殖抑制効果を検討した。Wnt/ β -catenin 経路依存性のヒト大腸がん細胞株 HT29 に対し、濃度依存的な増殖抑制を示した。一方、Wnt/ β -catenin 経路非依存性のヒト大腸がん細胞株 RKO に対しては、HT29 細胞に比して低い細胞増殖抑制効果を示した。以上の結果より、Comp. 31 は Wnt/ β -catenin 経路を特異的に抑制している可能性が示唆された。さらに、CTNBI mRNA の発現を抑制し、Wnt/ β -catenin 経路関連遺伝子の発現を抑制していることを明らかとした。以上より、Comp. 31 は大腸がん細胞に対して Wnt/ β -catenin 経路を抑制し、抗腫瘍効果を発揮することを明らかとした。

総括

本研究では京都薬科大学薬品化学分野が創製した化合物から既存の ICG001 よりも強い TCF 阻害活性を示したジペプチド型 Wnt/ β -catenin 経路阻害薬 Comp. 31 を見出した。本化合物は AML 細胞株と大腸がん細胞株に対する細胞増殖抑制効果とアポトーシス誘導効果を示し、さらに Wnt/ β -catenin 経路関連遺伝子の発現を抑制した。本研究の研究成果はこれまで難治性腫瘍とされてきた Wnt/ β -catenin 経路活性化腫瘍に対して、治療効果を期待できる治療薬創出につながる知見である。

審査の結果の要旨

《緒言》

がんは本邦における全死亡数の約3割を占める。近年の分子標的薬や、免疫チェックポイント阻害剤などの登場により飛躍的な治療成績の向上を遂げている。しかし、再発や、耐性化といった問題が認められる。再発や、薬剤耐性には癌幹細胞の存在が明らかとなり、その生物学的機構の解析により、胚発生・幹細胞分化調節・細胞増殖などに関与するシグナル伝達経路である Wnt/ β -catenin 経路の異常な活性化が報告されている。今回、Wnt/ β -catenin 経路を特異的に標的とする、新たな Wnt/ β -catenin 経路阻害薬の開発を目指し、京都薬科大学所有の薬品化学分野が創製した化合物を用いて新規阻害薬の探索研究を行い、がん細胞に対する抗腫瘍効果を検討した。

《審査結果の要旨》

第1章 Wnt/ β -catenin 経路阻害薬候補化合物の探索

Wnt/ β -catenin 経路阻害薬の探索を目的として、ヒト胎児腎細胞を用い β -catenin の標的遺伝子：T-cell factor (TCF) ルシフェラーゼレポーターアッセイスクリーニングを確立した。まず、既存の同阻害薬である ICG001 と構造類似性を有する SARS 3CL プロテアーゼ阻害剤合成中間体 (23 化合物) を評価した。その結果、12 化合物が ICG001 を上回る活性を示したが、これらの中間体は合成に多くの工程を要し、化合物供給の面での課題がある。次に、上記結果と構造活性相関を検討し、合成が簡便であり多様な原料を容易に利用可能なジペプチド型化合物を新たに設計し、合成と評価を行った (8 化合物)。結果、ピペリジンアミド構造を有し、ICG001 よりも強い TCF 阻害活性を示す compound 31 (Comp. 31) を見出した。

第2章 がん細胞に対する抗腫瘍効果の評価

第1節 急性骨髄性白血病細胞に対する抗腫瘍効果の検討

第2節 大腸がん細胞に対する抗腫瘍効果の検討

前章で開発した Comp. 31 を用いて、Wnt/ β -catenin 経路の異常が数多く報告されている急性骨髄性白血病 (AML: acute myelogenous leukemia) 細胞株 (U937 細胞、KG1a 細胞、HL-60 細胞) および大腸癌細胞株 (HT29 細胞) に対しての抗腫瘍効果を検討した。Comp. 31 は、 β -catenin (*CTNNB1*) mRNA の発現を抑制し、C-MYC、SURVIVIN をはじめとする関連遺伝子およびタンパク質の発現を抑制することで、細胞増殖を抑制し、アポトーシスの誘導をもたらすことを明らかとし、そのアポトーシス誘導には ROS 産生の増加が関与していることを明らかとした。さらに既存の AML 治療であるイダルビシンとの併用による相乗効果を有することを明らかとした。

なお、副査と主査からのコメントと質疑に対して、本申請者は本論文に追加の記述や考察を加える、表現の訂正、詳細な条件の追記をする等により本論文を適切に修正した。

《審査の結論》

申請者は、本研究において既存の Wnt/ β -catenin 経路阻害薬である ICG001 よりも細胞増殖抑制効果の強いジペプチド型 Wnt/ β -catenin 経路阻害剤 Comp. 31 を新たに創製し AML 細胞株と大腸がん細胞株に対する抗腫瘍効果メカニズムを明らかとした。以上の結果は今後 *in vivo* での検討が必要ではあるが、Wnt/ β -catenin 経路阻害薬のさらなる開発において重要な礎となる意義のある研究成果と言える。

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）の学位論文として価値を有するものと判断する。