

博士論文

ジメトキシキナゾリン骨格を有する
新規 Wnt/ β -catenin 経路阻害剤に関する研究

**Studies on a novel Wnt/ β -catenin-pathway inhibitor
with dimethoxyquinoxaline scaffold**

本論文は、静岡県立大学大学院薬食生命科学総合学府博士論文である

2016 年 9 月

September, 2016

静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府 博士後期課程

薬科学専攻 創薬探索センター

岩崎 良子

Ryoko Iwasaki

目次

目次.....	1
序論.....	6
本論.....	12
第1章 Wnt/ β -catenin 経路阻害剤探索を目的としたスクリーニング系の構築.....	12
1.1 実験材料及び実験方法.....	12
1.1.1 実験材料.....	12
1.1.2 細胞培養.....	12
1.1.3 TCF-Luc レポーターベクターの作製.....	13
1.1.4 レポーターベクターpGL4.27/TCF-Luc 一過的導入時のルシフェラーゼ レポーターアッセイ.....	13
1.1.5 DLD-1/TCF-Luc 及び DLD-1/mtTCF-Luc 安定発現株の選抜およびシング ルセルクローニング.....	13
1.1.6 <i>CTNNB1</i> siRNA の導入とノックダウン効果の検証.....	14
1.1.7 TCF レポーターアッセイ.....	15
1.1.8 TCF レポーター活性の算出.....	15
1.2 実験結果.....	16
1.2.1 pGL4.27/TCF-Luc 及び pGL4.27/mtTCF-Luc ベクターの作製.....	16
1.2.2 DLD-1 細胞における TCF レポーター活性.....	17
1.2.3 <i>CTNNB1</i> siRNA による <i>CTNNB1</i> ノックダウン効果及び TCF レポーター 阻害活性.....	18
1.3 考察.....	21
1.4 小括.....	22
第2章 Wnt/ β -catenin 経路阻害剤の探索と K-756 の発見.....	23
2.1 実験材料及び実験方法.....	23
2.1.1 実験材料.....	23
2.1.2 細胞培養.....	24
2.1.3 Wnt/ β -catenin 経路レポーターアッセイ.....	24
2.1.4 <i>CTNNB1</i> siRNA の導入及び siRNA によるノックダウン効果の検証.....	24
2.1.5 Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子発現解析.....	24
2.1.6 Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子発現プロファイルの相関解析.....	25
2.1.7 Axin1/2 及び活性化型 β -catenin のウェスタンブロッティング.....	25
2.2 実験結果.....	27
2.2.1 Wnt/ β -catenin 経路レポーターアッセイを用いた低分子化合物スクリー ニング.....	27
2.2.2 Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子発現解析.....	28

2.2.3	Wnt/ β -catenin 経路関連タンパク質の発現解析	31
2.3.	考察	33
2.4.	小括	35
第3章	K-756 の標的同定	36
3.1	実験材料と実験方法	36
3.1.1	実験材料	36
3.1.2	細胞培養	37
3.1.3	Tankyrase 及び PARP 酵素阻害活性評価	37
3.1.4	Wnt/ β -catenin 経路レポーター阻害活性評価	38
3.1.5	Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子発現変動解析及び遺伝子発現プロファイ ルの相関解析	38
3.1.6	Axin1/2 のウェスタンブロッティング	38
3.1.7	TNKS1-K-756 の X 線複合体解析	38
3.2	実験結果	39
3.2.1	K-756 の Tankyrase 酵素阻害活性	39
3.2.2	Tankyrase 阻害剤 XAV939、IWR-1、IWR-3 の DLD-1/TCF-Luc 細胞にお ける Wnt/ β -catenin 経路レポーター阻害活性	41
3.2.3	Tankyrase 阻害剤 XAV939、IWR-1、IWR-3 の DLD-1/TCF-Luc 細胞にお ける Wnt/ β -catenin 下流遺伝子発現阻害作用評価	42
3.2.4	Tankyrase 阻害剤 XAV939 の Axin1/2 安定化作用	42
3.2.5	K-756 の PARP ファミリー酵素阻害評価	43
3.2.6	K-756 と Tankyrase1 の複合体構造解析	44
3.4	考察	46
3.5	小括	47
第4章	K-756 の大腸がん細胞に対する増殖阻害活性	48
4.1	実験材料と実験方法	48
4.1.1	実験材料	48
4.1.2	細胞培養	49
4.1.3	CTNNB1 siRNA による細胞増殖阻害作用評価	49
4.1.4	化合物による細胞増殖阻害作用評価	49
4.1.5	Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子発現阻害作用評価	49
4.1.6	Axin1/2 及び活性化型 β -catenin ウェスタンブロッティング	50
4.2	実験結果	51
4.2.1	CTNNB1 siRNA を用いた Wnt/ β -catenin 経路依存的細胞の探索	51
4.2.2	COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞における K-756 の Wnt/ β -catenin 経 路阻害作用	53
4.2.3	COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞における K-756 の細胞増殖阻害作 用	54

4.4	考察.....	57
4.5	小括.....	58
第5章	K-756の非小細胞肺癌細胞に対するEGFR阻害剤との併用効果.....	59
5.1	実験材料と実験方法.....	59
5.1.1	実験材料.....	59
5.1.2	細胞培養.....	60
5.1.3	Wnt/ β -catenin経路下流遺伝子変動評価.....	60
5.1.4	Axin1のウェスタンブロッティング.....	60
5.1.5	細胞増殖阻害作用評価.....	60
5.1.6	併用効果の解析.....	60
5.2	実験結果.....	61
5.2.1	K-756のPC-9細胞におけるTankyrase阻害作用.....	61
5.2.2	K-756とEGFR阻害剤gefitinibの併用効果.....	61
5.4	考察.....	63
5.5	小括.....	64
第6章	K-756の <i>in vivo</i> におけるWnt/ β -catenin経路阻害作用.....	65
6.1	実験材料と実験方法.....	65
6.1.1	実験材料.....	65
6.1.2	細胞培養.....	65
6.1.3	投与試験.....	65
6.1.4	腫瘍中のWnt/ β -catenin経路下流遺伝子発現阻害評価.....	66
6.1.5	腫瘍中のWnt/ β -catenin経路レポーター阻害活性評価.....	66
6.1.6	統計解析.....	67
6.2	実験結果.....	68
6.2.1	K-756による <i>in vivo</i> Wnt/ β -catenin経路レポーター阻害活性.....	68
6.2.2	K-756による <i>in vivo</i> Wnt/ β -catenin経路下流遺伝子発現阻害.....	68
6.3	考察.....	70
6.4	小括.....	71
総括.....		72
謝辞.....		74
参考文献.....		75

略語

ANK: ankyrin

ASCL2 : achaete-scute family bHLH transcription factor 2

APC: adenomatous polyposis coli

BIRC5: baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5

β -NAD⁺: beta -nicotinamide adenine dinucleotide

β -TrCP: beta-transducin repeat containing protein

CCND1: cyclin D1

CD: catalytic domain

cDNA : complementary deoxyribonucleic acid

CEMIP : cell migration inducing protein

CK: casein kinase

Ct : threshold cycle

DHRS9 : dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9

DMEM : Dulbecco' s modified Eagle medium

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EGFR : epidermal growth factor receptor

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

EMP1: epithelial membrane protein 1

FBS : fetal bovine serum

FGF20 : fibroblast growth factor 20

FRZD: frizzled

GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

GSK3 β : glycogen synthase kinase 3 β

HEPES : 2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid

HRP : horseradish peroxidase

MAPK: mitogen-activated protein kinase

MC400 : methyl cellulose 400

mRNA : messenger ribonucleic acid

PARP: poly (ADP-ribose) polymerase

PBS : phosphate buffered saline

PBST : phosphate buffered saline with Tween 20

PCR : polymerase chain reaction

PEG MME 5000 : polyethylene glycol 5000 monomethyl ether

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PRCN: porcupine

PVDF : polyvinylidene fluoride

qPCR : quantitative polymerase chain reaction

RNF146 : RING finger protein 146
RPMI1640 : Roswell Park Memorial Institute 1640
RT-PCR : reverse transcription polymerase chain reaction
SAM: sterile alpha module
S.E. : standard error
SCID : severe combined immunodeficiency
SDS-PAGE : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
SFRP : secreted frizzled-related protein
shRNA : small hairpin ribonucleic acid
siRNA : small interfering ribonucleic acid
TBS : tris buffered saline
TNKS: tankyrase
TNNC1 : troponin C type 1
TRF: telomeric repeat binding factor
VEGF : vascular endothelial growth factor
WIF : Wnt inhibitory factor

序論

Wnt/ β -catenin 経路は細胞増殖及び幹細胞の自己複製並びに組織の発生を制御するシグナル経路である(1)。Wnt/ β -catenin 経路は、ショウジョウバエの発生研究とマウスの自然発症がんの研究から発見された。1973年にショウジョウバエの発生研究において、羽のないショウジョウバエ ("Wingless")が発見された(2)。また、1982年にマウス乳がんウイルス(mouse mammary tumor virus; MMTV)の感染によって乳がんを自然発症するマウスが発見され、この原因がん遺伝子が *int1* と名付けられた(3)。この *int1* の機能欠損変異がショウジョウバエ "Wingless" の原因遺伝子であった。そして、"Wingless" と *int1* を合わせ、この遺伝子は *wnt* と命名された(4)。その後、1990年代初頭に Wnt/ β -catenin 経路がヒトのがんにおいても重要な経路であることが発見された(5, 6)。その発見とは、家族性大腸がん(familial adenomatous polyposis; FAP)患者(6)及び大腸がん患者(5)において、Wnt/ β -catenin 経路の抑制因子 Adenomatous Polyposis Coli (APC)が欠損していることを示す報告であった。以降、今日まで Wnt/ β -catenin 経路はがんにおける重要な経路として注目されている(7)。

Wnt/ β -catenin 経路は Wnt リガンドが Frizzled (Frzd)受容体に結合することで、活性化される。活性化した Wnt/ β -catenin 経路では、 β -catenin が脱リン酸化されると核内に移行し、転写因子である T-cell factor (TCF)と複合体を形成する(8)。 β -catenin/TCF 転写複合体は *CMYC*、*BIRC5* (*SURVIVIN*)、*FGF20*、*ASCL2*、*CEMIP* (*KIAA1199*)、*VEGFA*、*DHRS9*、*CCND1*、*TNNC1*、*AXIN2* などの遺伝子を転写する (9-16)。Wnt/ β -catenin 経路が不活性化すると β -catenin は APC、glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β)、Casein Kinase 1 α (CK1 α)、Axin1/2 による分解複合体と結合し、 β -TrCP によってユビキチン化が促進されプロテアソームで分解される (17) (Figure 1)。

Wnt/ β -catenin 経路の変異は大腸がん、胃がん、肝臓がん、乳がんなど多くのがんで報告されている(18, 19)。これらのがんでは、 β -catenin の分解を担う APC の欠損変異、Wnt や β -catenin の過剰発現、SFRP や WIF などの Wnt/ β -catenin 経路抑制因子などの発現抑制によって Wnt/ β -catenin 経路が恒常的に活性化している(18, 19)。特に APC 変異は大腸がん患者の 85% が保有することが報告されている(19)。APC 変異は核内 β -catenin の蓄積を促進し、下流遺伝子の転写を促進することで細胞の異常な増殖を誘導する (Figure 2)。

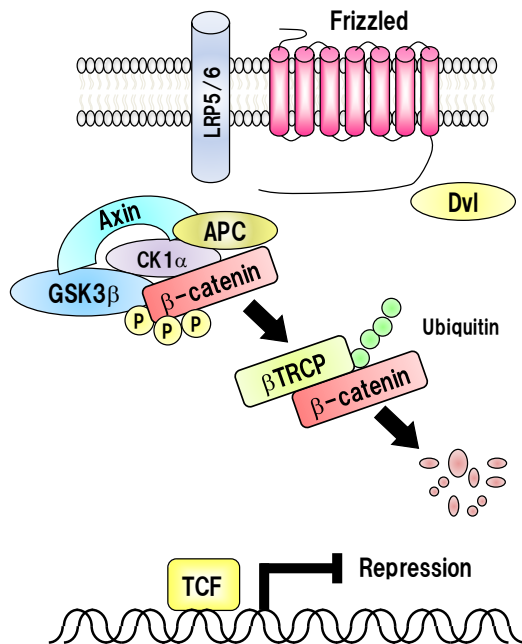
Wnt/ β -catenin 経路が異常になったがんに対して、有効な治療法を開発するために Wnt/ β -catenin 経路を阻害する低分子化合物や抗体が数多く研究されてきた。例えば、抗 Frizzled (FRZD) 抗体や porcupine (PRCN) 阻害剤はすでに臨床試験が進められている(20, 21) (Figure 2)。これらの阻害剤は、Wnt リガンド過剰発現のように Wnt/ β -catenin 経路の上流が異常になったがんに対して有効と考えられるが、APC 変異のがんには効果を示さない可能性が高い。なぜなら、APC 変異のがん細胞は Wnt リガンドの有無に関わらず、恒常的に Wnt/ β -catenin 経路が活性化しているためである。一方、Tankyrase (TNKS) 阻害剤は APC 変異のがん細胞においても Wnt/ β -catenin 経路を阻害できる化合物として報告された(22) (Figure 2)。以来、Tankyrase は Wnt/ β -catenin 経路を阻害できる魅力的な標的として、複数の低分子阻害剤 (XAV939, IWR-1, IWR-3, JW74, G007-LK) が報告されている(22-24, 44) (Figure 3)。

Tankyrase1 及び 2 は poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)ファミリーに属し、 β -

nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD⁺) を基質として標的タンパク質に複数の ADP リボースを付加する(25)。Tankyrase は telomeric repeat binding factor 1 (TRF1) をポリ ADP リボシル化し、TRF1 とテロメラーゼの結合を制御するテロメア制御因子として発見された(25, 26)。Tankyrase は catalytic PARP ドメイン、ankyrin (ANK) ドメイン、sterile alpha module (SAM) ドメインから構成され、ANK ドメインと SAM ドメインは PARP ファミリー酵素の中でも Tankyrase 特異的である。Wnt/ β -catenin 経路において、Tankyrase は Axin1/2 をポリ ADP リボシル化し、Axin1/2 が E3 ユビキチンキラーである RNF146 にポリユビキチン化されることを促す。そして、ポリユビキチン化された Axin1/2 はプロテアソーム経路で分解される(22, 27) (Figure 4)。

本研究ではケミカルライブラリーを用いた Wnt/ β -catenin 経路阻害剤のスクリーニングによって K-756 を見出し、作用機構解析及び標的同定の結果から K-756 が新規の選択的 Tankyrase 阻害剤であることを発見した。K-756 の大腸がん及び非小細胞肺癌に対する抗がん作用についても検証し、K-756 が新規抗がん剤開発のリード化合物となる可能性を提示した。また K-756 が *in vivo* 投与によって腫瘍内の Wnt/ β -catenin 経路を阻害することを見出した。これらの結果より K-756 は抗がん剤のリード化合物として有望であることが明らかとなった。さらに K-756 は Tankyrase のがんにおける機能解明を可能にする有効な実験ツールになることが期待される。

Wnt Off



Wnt On

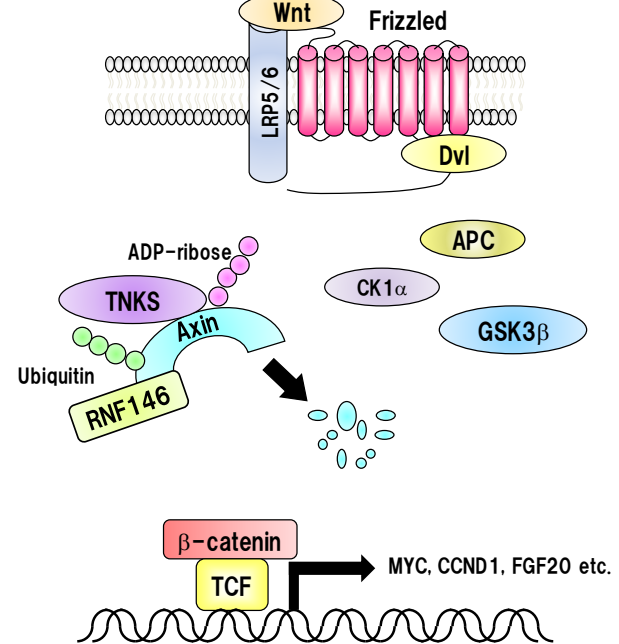


Figure 1 Wnt/β-catenin pathway signal.

When the signal is off, β-catenin is degraded by the destruction complex composed of APC, Axin, GSK3β, CK1α. Upon Wnt-binding to Frizzled and LRP5/6, β-catenin translocates to the nucleus and forms transcription complex with TCF and transcribes downstream genes such as *MYC*, *CCND1* and *FGF20*. Tankyrase poly-ADP ribosylates Axin and promotes Axin degradation at proteasome.

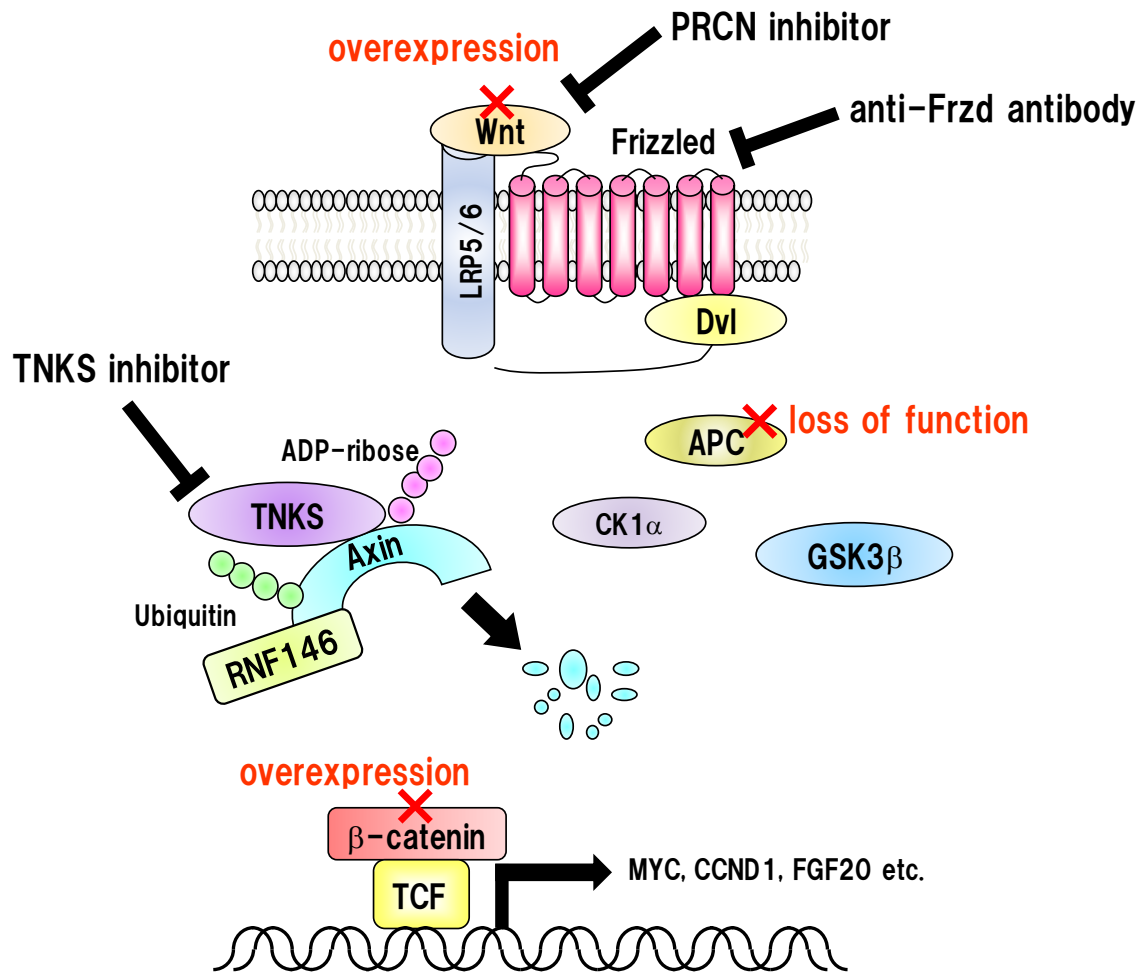
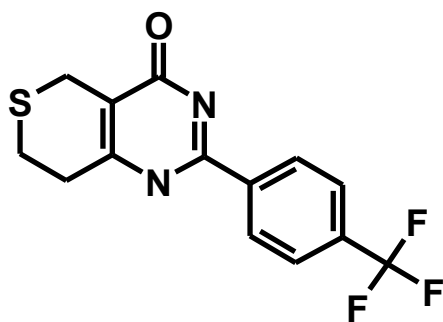
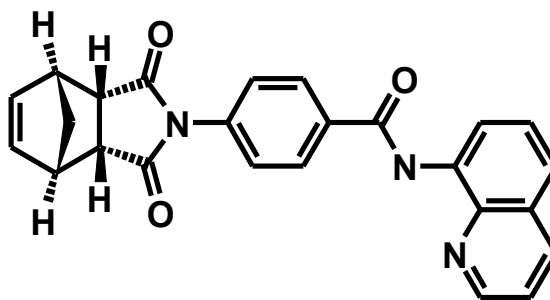


Figure 2 Mutations of Wnt/β-catenin pathway and Wnt/β-catenin pathway inhibitors.

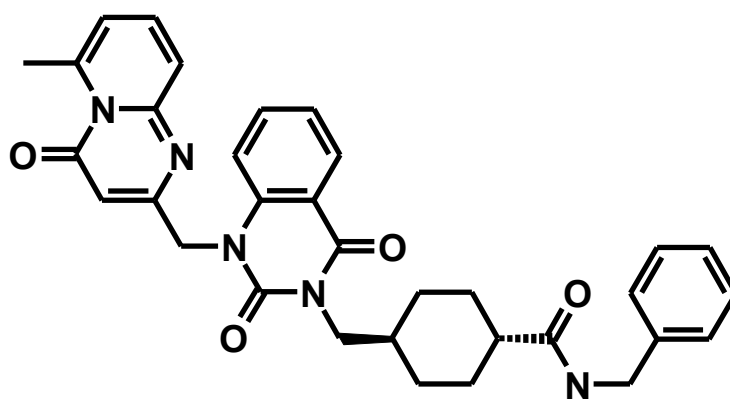
Mutations of Wnt/β-catenin pathway signal are known in several types of cancer. Wnt/β-catenin pathway inhibitors such as PRCN inhibitor, anti-Frzd antibody and tankyrase inhibitor are developed for anti-cancer therapeutics.



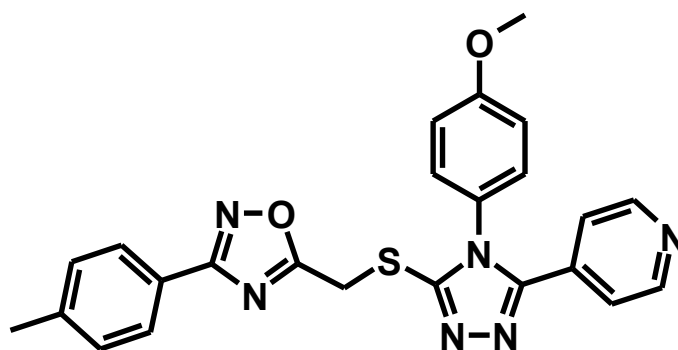
XAV939



IWR-1



IWR-3



JW74

Figure 3 Molecular structures of tankyrase inhibitors.

Molecular structures of tankyrase inhibitors, XAV939, IWR-1, IWR-3 and JW74.

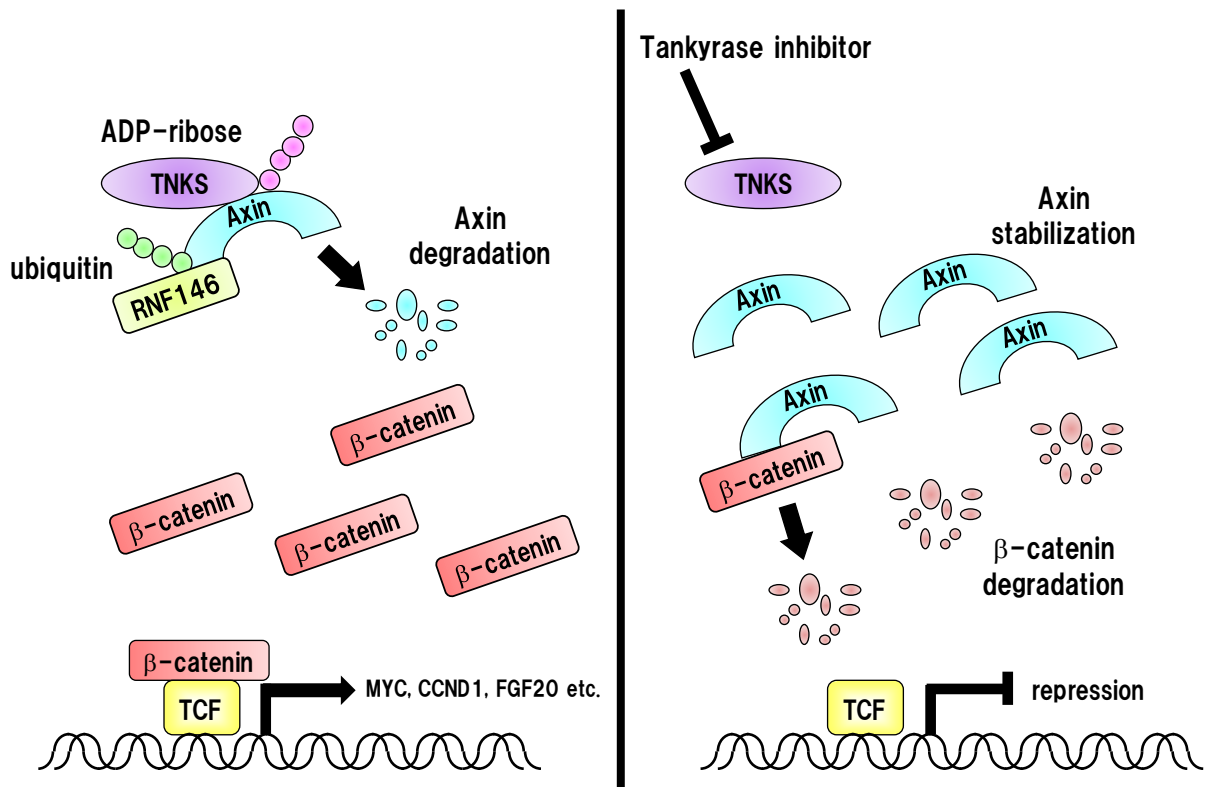


Figure 4 Tankyrase inhibitor stabilizes Axin and promotes β-catenin degradation

Tankyrase inhibitor stabilizes Axin by inhibiting its poly-ADP ribosylation. When Axin is stabilized in the cytosol, β-catenin degradation is promoted and the expressions of Wnt/β-catenin downstream genes are suppressed.

本論

第1章 Wnt/ β -catenin 経路阻害剤探索を目的としたスクリーニング系の構築

本研究では APC 変異によって過剰に活性化した Wnt リガンド非依存的な Wnt/ β -catenin 経路を阻害する低分子化合物を探索するため、APC 変異大腸がん細胞 DLD-1 と Wnt/ β -catenin 経路応答配列である TCF 結合配列を含むレポーターベクターを用いたレポーターアッセイ系の構築を試みた。

1.1 実験材料及び実験方法

1.1.1 実験材料

- RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific)
- Fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)
- HEPES (1M), pH7.2-7.5 (Thermo Fisher Scientific)
- Pyruvate Solution (Thermo Fisher Scientific)
- D-(+)-Glucose Solution (45%) (Sigma-Aldrich)
- Penicillin-Streptomycin (PS) (Thermo Fisher Scientific)
- PBS (Thermo Fisher Scientific)
- Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific)
- pGL4.27 (Promega)
- TOPflash reporter plasmid (Millipore)
- FOPflash reporter plasmid (Millipore)
- illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE healthcare)
- Pyrobest PCR enzyme (Takara)
- Xho I (Takara)
- Hind III (Takara)
- DNA ligation kit (Takara)
- Attractene (QIAGEN)
- Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific)
- RNAiMax (Thermo Fisher Scientific)
- Hygromycin B (Wako Pure Chemical)
- Steady-Glo Luciferase Assay System (Promega)
- RNeasy plus kit (QIAGEN)
- QIA shredder (QIAGEN)
- SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit and Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Thermo Fisher Scientific)

1.1.2 細胞培養

ヒト大腸がん細胞株 DLD-1 は医薬基盤研究所 JCRB 細胞バンク (Osaka, Japan) にて購入した。DLD-1 細胞は、56°C で 30 min 処理し非働化した 10% FBS、10 mmol/L HEPES (pH7.2-

7.5)、1 mmol/L Pyruvate Solution、4.5 mmol/L D-(+)-Glucose Solution (45%)と 1% Penicillin-Streptomycin (PS)を含む RPMI1640 培地を用い、37°C 5% CO₂ 存在下で培養した。細胞は 0.05% trypsin/EDTA を用いて継代した。DLD-1 細胞は PowerPlex 16 STR System を用いて医薬基盤研究所にて認証された。

1.1.3 TCF-Luc レポーターベクターの作製

T cell factor (TCF)結合配列は TOPflash reporter plasmid 及び FOPflash reporter plasmid を鋳型として、Pyrobest PCR enzyme を用いて PCR 法により増幅した。プライマー配列は以下に記した。

フォワードプライマー：

5'-ATATATCTCGAGCGGCATCAGAGCAGATTGTA-3'

リバースプライマー：

5'-TATATAAGCTTGCCGGATCCTCTAGAGTCGA-3'

PCR 産物をアガロースゲルに泳動し、illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit を用いて単離し、精製した。Xho I 及び Hind III 制限酵素を用いて pGL4.27 レポーターベクターと PCR 産物を切断し、DNA ligation kit を用いてベクターに PCR 産物を挿入した。変異 T cell factor (mtTCF)結合配列は FOPflash reporter plasmid を鋳型として同様の方法で pGL4.27 レポーターベクターに挿入した。

1.1.4 レポーターベクターpGL4.27/TCF-Luc 一過的導入時のルシフェラーゼレポーターアッセイ

DLD-1 細胞を 90 µL の培地で 8000 cells/well になるように 96 ウェルプレートに播種し、24 h 後に TOPflash ベクター、FOPflash ベクター、pGL4.27-TCF ベクター、pGL4.27-mtTCF ベクターを、それぞれ Attractene を用いて細胞に導入した。各ウェルあたり DNA 0.2 µg、Attractene 0.1 µL になるように、DNA と Attractene を Opti-MEM 中で混合し、室温に 15 min 静置した。この混合溶液を 10 µL ずつ各ウェルに添加した。翌日にルシフェラーゼの基質が含まれる Steady-Glo Assay Reagent 25 µL を各ウェルに添加し、発光を Top count NXT (Perkin Elmer) を用いて測定した。

1.1.5 DLD-1/TCF-Luc 及び DLD-1/mtTCF-Luc 安定発現株の選抜およびシングルセルクローニング

DLD-1 細胞を 10 ml の培地で 5×10^5 cells/well になるように 10 cm シャーレに播種し、翌日 pGL4.27-TCF ベクター及び pGL4.27-mtTCF ベクターを DLD-1 細胞に導入した。Opti-MEM 500 µL に懸濁したベクター 5 µg に Attractene 10 µL を添加し、混合し、室温に 15 min 静置した。この混合溶液を細胞に添加した。翌日 hygromycin B 100 µg/ml を含む培地で培養した。Hygromycin B 耐性を示すコロニーの増殖が認められた後、各コロニーを 96 ウェルプレートに播種し、シングルセルクローニングを実施した。以後、増殖が認められたウェルの細胞を 24 ウェルプレートに植え継いだ。細胞がコンフルエントになった時点で細胞を 0.05% trypsin/EDTA で剥離し、培地を添加した細胞懸濁液を作製し、その一部を 96 ウェルプレート

に 100 μ L 播種した。翌日に 25 μ L のルシフェラーゼの基質が含まれる Steady-Glo Assay Reagent を添加し、発光を Top count NXT (Perkin Elmer) を用いて測定した。高いレポーター活性を示したクローンを 6 ウェルプレートに植え継ぎ、その後 10 cm シャーレで継代培養した。

1.1.6 *CTNMB1* siRNA の導入とノックダウン効果の検証

CTNMB1 (β -catenin の遺伝子名) siRNA#1 及びランダム配列を有する non-targeting siRNA はジーンデザインで合成した。配列は以下に示した。

non-targeting siRNA:

sense: 5'- AUCCGCGCGAUAGUACGUAdTdT-3'

antisense: 5'- UACGUACUAUCGCGCGGAUdTdT-3'

CTNMB1 siRNA #1:

sense: 5'- CAGUUGUGGUUAAGCUCUAdC-3'

antisense: 5'- AAGAGCUUAACCAACACUGdTdT-3'

DLD-1 細胞を 24 ウェルプレートに 2×10^4 cells/well になるように 900 μ L の培地で播種した。*CTNMB1* siRNA#1 もしくは non-targeting siRNA を、RNAiMax を用いて細胞に導入した。Opti-MEM に懸濁した siRNA 100 nM の溶液 100 μ L と RNAiMax 1.5 μ L を混合し、室温に 15 min 静置した。この混合溶液 100 μ L を各ウェルに添加した。24、48、72 h 後に細胞を回収した。細胞からの RNA 抽出は RNeasy plus kit を用いて実施した。24 h 後に培地を除去し、RNeasy plus mini kit を用いて RNA を精製した。培地を除去した細胞に 350 μ L RLT buffer を添加し、よくピペッティングした後、QIAshredder スピンカラムに全量添加した。遠心後 (13000 rpm、2 min)、通過画分を gDNA Eliminator スピンカラムに全量添加し、ゲノム DNA を除去した。遠心後 (13000 rpm、30 sec) で、通過画分を回収し、350 μ L 70%エタノールを添加した。全量を RNeasy スピンカラムに添加し、遠心 (13000 rpm、15 sec) し、通過画分を廃棄した。700 μ L RW1 buffer を RNeasy スピンカラムに添加し、遠心 (13000 rpm、15 sec) し、通過画分を廃棄した。500 μ L buffer RPE を RNeasy スピンカラムに添加し、遠心 (13000 rpm、15 sec) し、通過画分を廃棄した。さらに 500 μ L buffer RPE を RNeasy スピンカラムに添加し、遠心 (13000 rpm、2 min) し、通過画分を廃棄した。RNeasy スピンカラムを 2 ml チューブにセットし、遠心 (13000 rpm、1 min) し、スピンカラムに残った buffer RPE を除去した。RNeasy スピンカラムを 1.5 ml エッペンチューブにセットし、50 μ L 滅菌精製水 (desterilized distilled water; DDW) を添加し、1 min 室温で静置後、スピンカラムを遠心 (13000 rpm、1 min) し、RNA を溶出した。RNA 濃度を nano drop を用いて測定した。

次に、Super Script VILO cDNA synthesis reagent を用いて RNA から cDNA を逆転写した。逆転写反応のため、5 \times VILO Reaction Mix 4 μ L、10 \times SuperScript Enzyme Mix 2 μ L と 1 μ g の RNA 溶液を混合し、20 μ L になるように DDW でメスアップした。Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems) を用いて、25°C 10 min、42°C 60 min、80°C 5 min の逆転写反応を実施した。リアルタイム RT-PCR の鋳型サンプルには逆転写反応溶液を 10 倍希釈した溶液を用いた。検量線は逆転写反応液を 1 倍、10 倍、100 倍、1000 倍希釈した溶液を用いた。リアル

タイム RT-PCR は Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG を用いて実施した。Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG 25 μ L、Forward primer 10 μ M 1 μ L、Reverse primer 10 μ M 1 μ L、鋳型サンプル 10 μ L と DDW 23 μ L を混合し、以下の反応でリアルタイム RT-PCR を実施し、cDNA 量は ABI PRISM (Thermo Fisher Scientific)を用いて定量した。

PCR 反応

50°C 2 min
95°C 2 min
95°C 15 sec } 40 cycles
60°C 30 sec

サンプルの cDNA 量は測定された Ct 値から検量線を用いて算出した。すべての遺伝子の cDNA 量は *GAPDH* の cDNA 量で補正した。リアルタイム RT-PCR に用いたプライマーは以下に記した。

CTNNB1:

sense primer: 5'-GAAACGGCTTTCAGTTGAGC-3'

anti-sense primer: 5'-CTGGCCATATCCACCAGAGT-3'

GAPDH:

sense primer: 5'-ACTTTGTCAAGCTCATTTCCTG-3'

anti-sense primer: 5'-CTCTCTTCCTCTTGCTCTTG-3'

1.1.7 TCF レポーターアッセイ

pGL4.27-TCF ベクターもしくは pGL4.27-mtTCF ベクターを安定発現したシングルクロン細胞 DLD-1/TCF-Luc 及び DLD-1/mTTCF-Luc を 5000 cells/well になるように 384 ウェルプレートに 45 μ L 播種し、*CTNNB1* siRNA#1 及び non-targeting siRNA を導入した。Opti-MEM に懸濁した siRNA 0.3、1、3、10、30、100、300 nM の溶液 5 μ L と RNAiMax 0.05 μ L を混合し、室温に 15 min 静置した。この混合溶液 5 μ L を各ウェルに添加した。48 h 後にルシフェラーゼの基質が含まれる Steady-Glo Assay reagent を 12.5 μ L 添加し、Top Count NXT (Perkin Elmer) を用いて発光を測定した。

1.1.8 TCF レポーター活性の算出

DLD-1/TCF-Luc 細胞及び DLD-1/mTTCF-Luc 細胞におけるレポーター阻害活性は以下の計算式を用いて算出した。

レポーター阻害活性 (%) = $100 - (\text{DLD-1/TCF-Luc 細胞におけるルシフェラーゼ活性} \div \text{DLD-1/mTTCF-Luc 細胞におけるルシフェラーゼ活性} \times 100)$

1.2 実験結果

1.2.1 pGL4.27/TCF-Luc 及び pGL4.27/mtTCF-Luc ベクターの作製

転写因子 TCF は β -catenin と複合体を形成し、遺伝子プロモーター上に存在する TCF 結合配列に結合し RNA を転写する。すなわち、TCF の転写活性は Wnt/ β -catenin 経路の活性の指標となる。TCF の転写活性を測定するために考案されたベクターが TOPflash ベクターである(28)。TOPflash ベクターは TCF 結合配列を 6 回繰り返した配列を有するレポーターベクターである。一方、非特異的な結合を除外するために考案されたベクターが FOPflash ベクターであり、変異を有した TCF 結合配列を 6 回繰り返した配列を有するレポーターベクターである(28)。したがって、FOPflash ベクターのレポーター活性は阻害せず TOPflash ベクターのレポーター活性を選択的に阻害する化合物が Wnt/ β -catenin 経路選択的な化合物といえる。どちらのベクターにも薬剤耐性遺伝子が含まれていないことから、本研究ではレポーター応答配列を pGL4.27 ルシフェラーゼ発現レポーターベクターに組み換えることにした。TCF 結合配列の 6 回繰り返し配列はパリンδροーム構造をしており、PCR 増幅が困難であった。そこで、目的とする配列の上流 103 bp から、下流 34 bp までを増幅することにした。増幅した配列を Figure 5 に示した。

A. pGL4.27-TCF

5' -

CGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAAT
ACCGCATCAGGCGCCATTGCGCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTAT
TACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
GTTGTAAACGACGGCCAGTGCCAAGTTAAGATCAAAGGGGGTAAGATCAAAGGGGGTAAAATCAAAGGGGGCCC
CCTTTGATCTTACCCCCTTTGATCTTA

GC-3'

B. pGL4.27-mtTCF

5' -

CGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAAT
ACCGCATCAGGCGCCATTGCGCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTAT
TACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
GTTGTAAACGACGGCCAGTGCCAAAGGGGGTAAGGCCAAAGGGGGGCCAAAGGGGGCCCCCTTTGGCCCTT
ACCCCCTTTGGCCTTACCCCCTTTGGCCTTA

CGGC-3'

Figure 5 Insert sequences of pGL4.27-TCF and pGL4.27-mtTCF.

Insert sequence of **A**, pGL4.27-TCF and **B**, pGL4.27-mtTCF. These sequences were amplified from TOPflash reporter vector and FOPflash reporter vector and cloned into pGL4.27 luciferase reporter vector. The sequences boxed are **A**, the 6×TCF binding sites and **B**, the 6×mtTCF binding sites. The sequences shown in bold are the mutated sites.

1.2.2 DLD-1 細胞における TCF レポーター活性

購入した TOPflash ベクター、FOPflash ベクターと作製した pGL4.27-TCF ベクター、pGL4.27-mtTCF ベクターを DLD-1 細胞にそれぞれ導入し、TOPflash ベクターと FOPflash ベクターのシグナル活性の比率と pGL4.27-TCF ベクターと pGL4.27-mtTCF ベクターのシグナル活性の比率を算出した。その結果、pGL4.27-TCF ベクターと pGL4.27-mtTCF ベクターのシグナル活性の比率の方が大きく、こちらのベクターの組み合わせの方がより高感度に Wnt/ β -catenin 経路の活性を検出できることが判明した (Figure 6)。

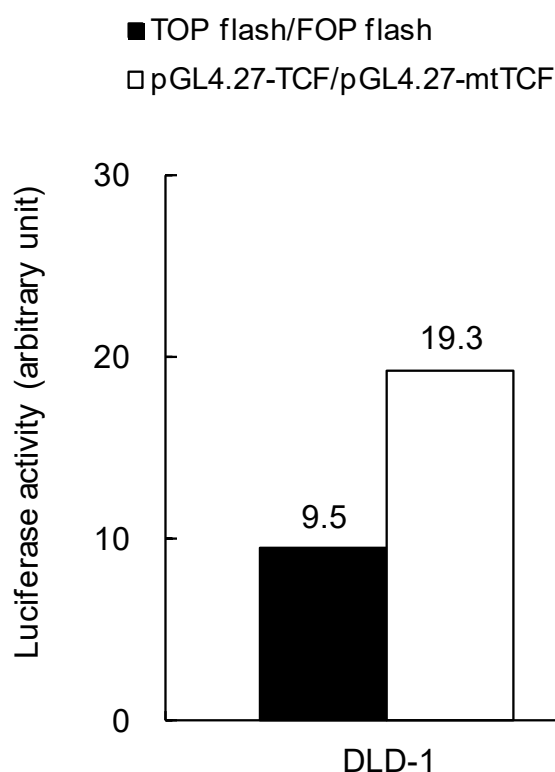


Figure 6 Reporter activity by pGL4.27-TCF/pGL4.27-mtTCF vector and TOPflash/FOPflash vector.

pGL4.27-TCF and pGL4.27-mtTCF vectors show higher luciferase activity signal ratio than TOPflash and FOPflash vectors. Each of the pGL4.27-TCF, pGL4.27-mtTCF, TOPflash and FOPflash vector was transfected to DLD-1 cells. The next day, luciferase activity was measured. pGL4.27-TCF signal was normalized to pGL4.27-mtTCF signal. TOP flash signal was normalized to FOP flash signal.

1.2.3 *CTNNB1* siRNAによる *CTNNB1* ノックダウン効果及び TCF レポーター阻害活性

作製した pGL4.27/TCF-Luc ベクター及び pGL4.27/mTTCF-Luc ベクターを DLD-1 細胞に導入し、hygromycin B を用いて安定発現細胞株を樹立した。これらのレポーター細胞の応答を *CTNNB1* siRNA#1 を用いて評価した。レポーター活性を評価する前に、使用する *CTNNB1* siRNA#1 のノックダウン効果をリアルタイム RT-PCR を用いて評価した。その結果、DLD-1 細胞において *CTNNB1* mRNA のノックダウンが認められた (Figure 7)。

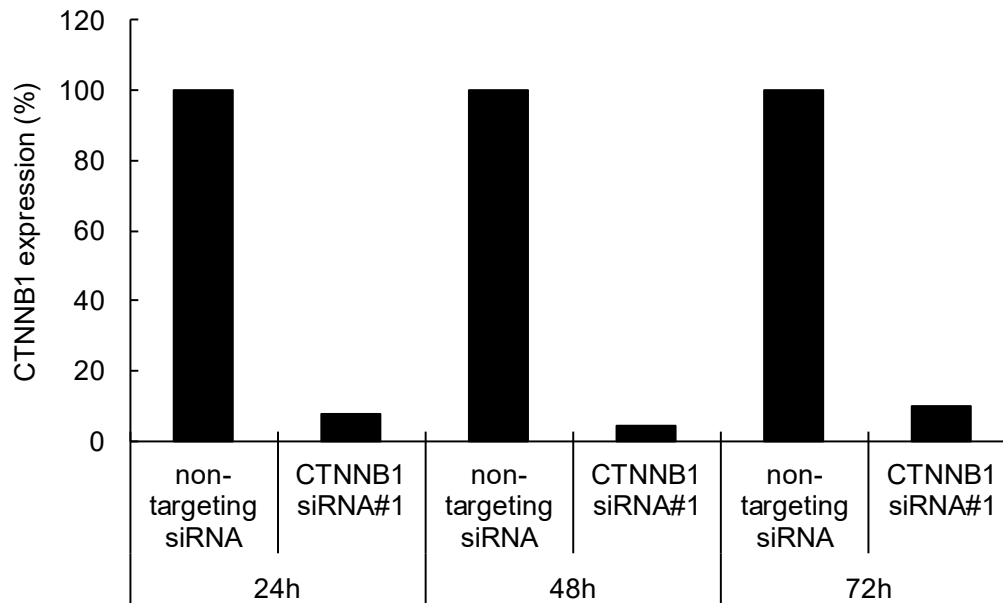


Figure 7 Target gene knockdown by *CTNNB1* siRNA.

CTNNB1 is knocked down by *CTNNB1* siRNA#1 from 24 h treatment. DLD-1 cells were transfected with *CTNNB1* siRNA#1 or non-targeting siRNA. After indicated times, mRNA was collected and the expression level of *CTNNB1* was measured by an RT-PCR. Gene expression of *CTNNB1* was normalized to *GAPDH*.

次に、DLD-1/TCF-Luc 細胞に *CTNNB1* siRNA#1 を導入しレポーター活性を評価した結果、レポーター活性が阻害された。同様に DLD-1/mtTCF-Luc 細胞に *CTNNB1* siRNA を導入した結果、レポーター活性は阻害されなかった (Figure 8)。したがって、DLD-1/TCF-Luc 細胞は Wnt/ β -catenin 経路依存的にレポーター活性を示すことが明らかとなった。一方、DLD-1/mtTCF-Luc 細胞は Wnt/ β -catenin 経路非依存的なレポーター活性を示すことが明らかとなった。以上の結果から、DLD-1/TCF-Luc 細胞及び DLD-1/mtTCF-Luc 細胞のレポーター活性を評価することで、Wnt/ β -catenin 経路選択的な阻害剤が取得できることが示唆された。

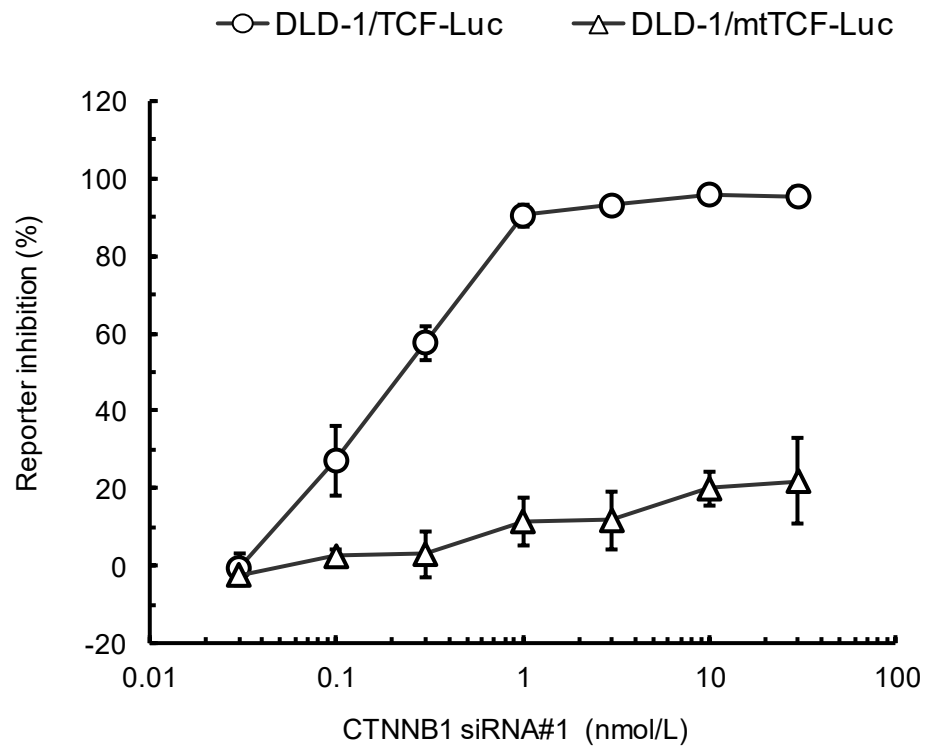


Figure 8 Reporter inhibition in DLD-1/TCF-luc and DLD-1/mtTCF-luc cells by *CTNNB1* siRNA.

CTNNB1 siRNA#1 inhibits the reporter activity in DLD-1/TCF-luc cells but it does not inhibit the reporter activity of DLD-1/mtTCF-luc cells. *CTNNB1* siRNA#1 was transfected to DLD-1/TCF-luc and DLD-1/mtTCF-luc cells. After 48 h, luciferase activity was measured. Each point represents the mean \pm S.D. (triplicate).

1.3 考察

構築した DLD-1/TCF-Luc 細胞が効率的に Wnt/ β -catenin 経路の活性を検出できた理由について考察する。TOPflash ベクター及び FOPflash ベクターは 1997 年に Korinek らによって作製され(28)、広く Wnt/ β -catenin 経路活性を評価する実験材料として使用されてきた。これは TCF 結合配列が 6 回繰り返されることにより、内在性の TCF 転写活性を効率的に検出することが可能であったためである。これらの応答配列を新たに pGL4.27 ベクターに組み換えた pGL4.27-TCF ベクターと pGL4.27-mtTCF ベクターでは、TOPflash ベクターと FOPflash ベクターよりもレポーター活性比を高く検出できた。この理由を以下に挙げた。まず、レポーター遺伝子である synthetic firefly luc2 (*Photinus pyralis*)は哺乳類細胞における発現効率が高くなるようにコドンが改変されており、元の TOPflash ベクターよりも効率的に応答配列の転写活性を評価することができる点が挙げられる。次に、pGL4.27 ベクターが転写するルシフェラーゼは従来のルシフェラーゼよりも半減期が短くなるように分解配列が付加されており、内在性の転写活性に対してレポーター活性がより迅速に応答する点が挙げられる。さらに pGL4.27 ベクターは非特異的な転写因子の結合が抑制されるように配列が改変されており、応答配列非依存的なレポーター活性が抑制されている点が挙げられる。以上の理由により pGL4.27/TCF-Luc ベクターと pGL4.27/mTTCF-Luc ベクターは、TOPflash ベクターと FOPflash ベクターよりも改良されたベクターであるため、DLD-1 細胞におけるレポーター活性比が上昇したと考えられる。

本研究では構築したレポーター系を用いて、Wnt/ β -catenin 経路を阻害する化合物のスクリーニングを目指している。そこで、Wnt/ β -catenin 経路を選択的に阻害する化合物を模倣できる β -catenin siRNA を DLD-1/TCF-Luc 細胞及び DLD-1/mTTCF-Luc 細胞に導入した結果、DLD-1/TCF-Luc 細胞のレポーター活性のみが選択的に阻害された。今回の結果から、目的とするスクリーニング系のポジティブコントロールになる低分子化合物が見出されていない場合、スクリーニング系を検証する上で siRNA は有力なツールになることが示された。

1.4 小括

第 1 章では Wnt/ β -catenin 経路阻害剤を取得するために Wnt/ β -catenin 経路レポーター系を構築した。Wnt/ β -catenin 経路の活性を検出するために、 β -catenin と複合体を形成する転写因子 TCF の DNA 結合配列をルシフェラーゼ遺伝子のプロモーター領域に挿入したレポーターベクター pGL4.27-TCF を作製した。非特異的なレポーター活性阻害剤を除外するために、TCF 結合配列に変異を挿入したレポーターベクター pGL4.27-mtTCF も同時に作製した。次に大腸がん患者の病態を想定し、APC 変異を有する大腸がん細胞 DLD-1 に pGL4.27-TCF ベクター及び pGL4.27-mtTCF ベクターを導入し、hygromycin B を用いて、ベクターを安定発現する細胞を取得した。複数取得したシングルクローンの中から、レポーター活性が高く、*CTNNB1* siRNA によってレポーター活性が阻害される DLD-1/TCF-Luc 細胞のクローンを選抜した。さらに *CTNNB1* siRNA によってレポーター活性が阻害されない DLD-1/mTTCF-Luc 細胞のクローンも同様に選抜した。DLD-1/TCF-Luc 細胞を一次スクリーニングに用い、DLD-1/mTTCF-Luc 細胞をカウンタースクリーニングに用いることで、Wnt/ β -catenin 経路選択的な阻害剤の取得を目指す。

第2章 Wnt/ β -catenin 経路阻害剤の探索と K-756 の発見

本章では DLD-1/TCF-Luc 細胞及び DLD-1/mtTCF-Luc 細胞を用いたレポーターアッセイにより、Wnt/ β -catenin 経路を選択的に阻害する低分子化合物のスクリーニングを試みた。さらにレポーター系で選択性を示した化合物について、内在性の Wnt/ β -catenin 下流遺伝子発現プロファイル解析を実施し、真に Wnt/ β -catenin 経路選択的な阻害剤であるか検証した。

2.1 実験材料及び実験方法

2.1.1 実験材料

- RPMI 1640(Thermo Fisher Scientific)
- Fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)
- HEPES (1M), pH7.2-7.5 (Thermo Fisher Scientific)
- Pyruvate Solution (Thermo Fisher Scientific)
- D-(+)-Glucose Solution (45%) (Sigma-Aldrich)
- Penicillin-Streptomycin (Thermo Fisher Scientific)
- PBS (Thermo Fisher Scientific)
- Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific)
- Hygromycin B (Wako Pure Chemical)
- Steady-Glo Assay System (Promega)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Wako Pure Chemical)
- Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific)
- RNAiMax (Thermo Fisher Scientific)
- Stealth non-targeting siRNA (#12935-113、Thermo Fisher Scientific)
- *CTNNB1* siRNA #2 (#HSS102461、Thermo Fisher Scientific)
- *CTNNB1* siRNA #3 (#HSS102462、Thermo Fisher Scientific)
- RNeasy plus kit (QIAGEN)
- QIA shredder (QIAGEN)
- SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit and Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Thermo Fisher Scientific)
- TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- NP40 Cell Lysis Buffer (Sigma-Aldrich)
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)
- Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories)
- Lane Marker Reducing Sample Buffer (5×) (Thermo Fisher Scientific)
- Running Buffer Solution (10×) for SDS-PAGE, Tris - Glycine (Nacalai Tesque)
- 20× TBS Tween-20 Buffer (Thermo Fisher Scientific)
- Supersep ACE 10% 13well (Wako Pure Chemical)
- Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad Laboratories)
- Immobilon-P PVDF Membrane (Merck Millipore)

- Skim Milk (Nacalai Tesque)
- Anti-Axin1 antibody (Cell Signaling Technology)
- Anti-Axin2 antibody (Cell Signaling Technology)
- Anti-unphospho- β -catenin antibody (Millipore)
- Anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich)
- Anti-Mouse IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment Sheep (GE Healthcare)
- Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment Donkey (GE Healthcare)
- SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)

2.1.2 細胞培養

ヒト大腸がん細胞株 DLD-1 のレポーター細胞 DLD-1/TCF-Luc 及び DLD-1/TCF-mtLuc は 1.1.5 に記載した方法で作製した。細胞は、56°C で 30 min 処理し、非働化した 10% FBS、10 mmol/L HEPES、1 mmol/L Pyruvate Solution、4.5 mmol/L D-(+)-Glucose Solution (45%)、1% Penicillin-Streptomycin (PS) と 100 μ g/ml hygromycin B を含む RPMI1640 培地を用い、37°C 5% CO₂ 存在下で培養した。細胞は 0.05% trypsin/EDTA を用いて継代した。

2.1.3 Wnt/ β -catenin 経路レポーターアッセイ

DLD-1/TCF-Luc 細胞もしくは DLD-1/mTTCF-Luc 細胞をそれぞれ 2000 cells/well 及び 8000 cells/well になるように 384 ウェルプレートに 30 μ L 播種し、翌日 20 μ L の化合物希釈液を添加した。化合物希釈液は DMSO の最終濃度が 0.1% になるように RPMI 培地を用いて調製した。18 h 後にルシフェラーゼの基質が含まれる Steady-Glo Luciferase Assay Reagent 12.5 μ L を添加し、Top Count NXT (Perkin Elmer) を用いて発光を測定した。

2.1.4 CTNNB1 siRNA の導入及び siRNA によるノックダウン効果の検証

CTNNB1 siRNA #1 及び non-targeting siRNA はジーンデザインで合成した。配列は 1.1.6 に記載した。ランダム配列を有する Stealth non-targeting siRNA、CTNNB1 siRNA #2 及び CTNNB1 siRNA #3 は Thermo Fisher Scientific から購入した。CTNNB1 siRNA の導入及び siRNA のノックダウン効果の検証は 1.1.6 に記載した方法で実施した。

2.1.5 Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子発現解析

DLD-1/TCF-Luc 細胞を 24 ウェルプレートに 2×10^4 cells/well で播種し、翌日化合物を添加した。24 h 後に培地を除去し、RNeasy plus mini kit を用いて RNA を精製した。RNA 精製方法及び cDNA への逆転写法は 1.1.6 に記載した。siRNA を導入した細胞の下流遺伝子発現解析には 2.1.3 で作製した cDNA を用いた。リアルタイム RT-PCR の鋳型サンプルには逆転写反応溶液を 10 倍希釈した溶液を用いた。検量線は逆転写反応液を 1 倍、10 倍、100 倍、1000 倍希釈した溶液を用いた。リアルタイム RT-PCR は Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG もしくは TaqMan Universal PCR Master Mix を用いて実施した。cDNA 量は ABI PRISM もしくは Applied Biosystems 7500 fast real time PCR system (Thermo Scientific) を用いて定量した。Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG を用いたリアルタイム RT-PCR は 1.1.6 に記載した

方法で実施した。TaqMan Universal PCR Master Mix を用いたリアルタイム RT-PCR は、TaqMan Universal PCR Master Mix 10 μ L、Taqman gene expression assay primer 1 μ L、鋳型サンプル 5 μ L と DDW 4 μ L を混合し、以下の反応で実施した。

PCR 反応

95°C 10 min

95°C 15 sec
60°C 1 min } 40 cycles

サンプルの cDNA 量は測定された Ct 値から検量線を用いて算出した。それぞれの遺伝子の cDNA 量は検出に用いた試薬 (Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG もしくは TaqMan Universal PCR Master Mix) で測定した *GAPDH* の mRNA 量で補正した。リアルタイム RT-PCR に用いたプライマーは以下に記した。

GAPDH :

sense primer: 5'-ACTTTGTCAAGCTCATTTCTTG-3'

anti-sense primer: 5'-CTCTCTTCCTCTTGCTCTTG-3'

MYC :

sense primer: 5'-TTCGGGTAGTGGAAAACCAG-3'

anti-sense primer: 5'-CAGCAGCTCGAATTTCTTCC-3'

BIRC5 (SURVIVIN) :

sense primer: 5'- GTTGCCTTTCTCTTCTGTC-3'

anti-sense primer: 5'- GCACTTTCTTCGCAGTTTCC-3'

FGF20 : TaqMan Gene Expression Assays, Assay ID: Hs00173929_m1

ASCL2 : TaqMan Gene Expression Assays, Assay ID: Hs00270888_s1

CEMIP (KIAA1199): TaqMan Gene Expression Assays, Assay ID: Hs00378530_m1

VEGFA : TaqMan Gene Expression Assays, Assay ID: Hs00900055_m1

DHRS9 : TaqMan Gene Expression Assays, Assay ID: Hs00608375_m1

CCND1 : TaqMan Gene Expression Assays, Assay ID: Hs00765553_m1

TNNC1 : TaqMan Gene Expression Assays, Assay ID: Hs00896999_g1

AXIN2 : TaqMan Gene Expression Assays, Assay ID: Hs00610344_m1

GAPDH : TaqMan Gene Expression Assays, Assay ID: Hs02758991_g1

2.1.6 Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子発現プロファイルの相関解析

CTNNB1 siRNA もしくは化合物を添加した DLD-1 細胞の Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子 (*MYC*、*DHRS9*、*SURVIVIN*、*VEGFA*、*ASCL2*、*FGF20*、*CEMIP*) の発現を一つのプロファイルとみなし、それぞれの細胞の発現プロファイルの相関解析を Excel 2003 ソフトウェアを用いて実施した。

2.1.7 Axin1/2 及び活性化型 β -catenin のウェスタンブロッティング

DLD-1/TCF-Luc 細胞を 10 cm シャーレに 5×10^5 cells/well になるように 10 ml で播種し、翌日化合物を添加した。24 h 後に培地を除去し、PBS を添加しスクレイパーで細胞を剥

離した。遠心（1000 rpm、5 min）後、PBSを除去し、細胞ペレットを回収した。細胞ペレットに protease inhibitor cocktail を含有した NP40 lysis buffer 100 μ L を添加し、ピペッティングした。氷上に 30 min 静置し、細胞を溶解した。遠心（13000 rpm、15 min）後、上清を回収し、Bradford プロテインアッセイ法を用いてタンパク質濃度を定量した。すべてのサンプルのタンパク質濃度を同一にした。Lane Marker Reducing Sample Buffer (5 \times)を 5 倍希釈になるように添加し、95°C 2 min 加熱した。氷上で静置後、SuperSep Ace, 10% ゲルを用いてタンパク質を泳動分離した。ランニングバッファーが入った泳動槽にゲルを設置し、スタンダード及びサンプルをチャージした。ゲル一枚あたり、15 mA で泳動した。セミドライ方式で PDVF 膜にタンパク質を転写した。一枚あたり 100 mA で転写後、PDVF 膜を 3% skim milk/TBS に浸し、ブロッキングした。30 min 後に 500 倍希釈した一次抗体を含む 3% skim milk/TBS に PDVF 膜を浸し、4°C で一晩振盪した。翌日、PDVF 膜を TBS with 0.1% Tween-20 で洗浄し、5000 倍希釈した二次抗体を含む 3% skim milk/TBS に PDVF 膜を浸した。1 h 後に TBS with 0.1% Tween-20 で洗浄し、Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate を用いて発色した。シグナルは LAS4000（Fuji Film）を用いて検出した。使用した抗体は 2.1.1 に記載した。

2.2 実験結果

2.2.1 Wnt/ β -catenin 経路レポーターアッセイを用いた低分子化合物スクリーニング

DLD-1/TCF-Luc 細胞のレポーター活性は阻害するが、DLD-1/mtTCF-Luc 細胞のレポーター活性は阻害しない化合物を Wnt/ β -catenin 経路選択的な阻害剤と定義し、スクリーニングを実施した。DLD-1/TCF-Luc 細胞のレポーター活性の IC_{50} 値と DLD-1/mtTCF-Luc 細胞の IC_{50} 値に 10 倍以上差があることを選択性の判断基準とした。K-756 (Figure 9A) は DLD-1/TCF-Luc 細胞のレポーター活性を IC_{50} 値 110 nmol/L で阻害したが、DLD-1/mtTCF-Luc 細胞のレポーター活性は 10 μ mol/L においても阻害しなかった (Figure 9C)。したがって、K-756 を選択的な Wnt/ β -catenin 経路阻害剤とした。K-756 は昇圧剤の探索研究において合成された誘導体(29)であるが、その Wnt/ β -catenin 経路阻害活性は本研究において初めて見出された。一方、K-756 の構造類似体である K-050 (Figure 9B) (30)は DLD-1/TCF-Luc 細胞及び DLD-1/mtTCF-Luc 細胞のレポーター活性を 10 μ mol/L においても阻害しなかった (Figure 9D)。

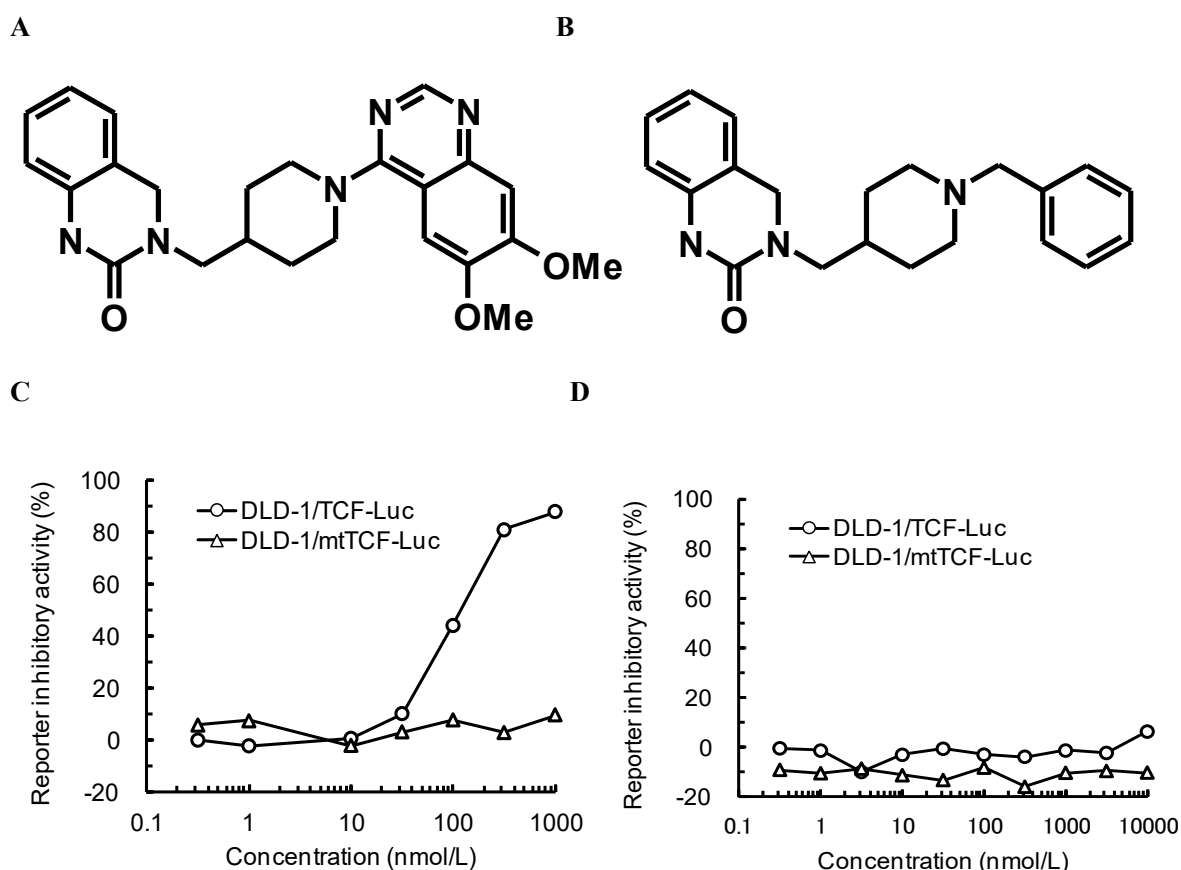


Figure 9 Chemical structure and Wnt/ β -catenin pathway reporter inhibition by K-756.

A, Chemical structures of K-756 and **B**, an inactive analogue K-050 are shown in the figure. **C**, K-756 inhibited reporter activity of DLD-1/TCF-Luc cells but not that of DLD-1/mtTCF-Luc cells. DLD-1/TCF-Luc cells or DLD-1/mtTCF-Luc cells were treated with the compound and after 18 h, luciferase activity was measured. Each point represents the mean (triplicate). **D**, K-050 does not inhibit reporter activity of DLD-1/TCF-Luc cells nor that of DLD-1/mtTCF-Luc cells. Each point represents the mean (triplicate).

2.2.2 Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子発現解析

K-756はDLD-1/TCF-Luc細胞のレポーター活性を選択的に阻害することが見出された。そこで、K-756が内在性のWnt/ β -catenin経路についても選択的に阻害するか検証した。検証は遺伝子発現プロファイルの相関解析を用いて実施した。遺伝子発現プロファイル解析とは、siRNAや化合物を添加した細胞における複数の遺伝子発現変化を一つのパターン、すなわち遺伝子発現プロファイルとして捉え、それらのプロファイルを比較する手法である。相関係数(r)が $1 \geq r \geq 0.5$ のときに相関があるとみなし、 $0.5 > r$ は相関がないとみなす。はじめに3種類の異なる配列を標的としたCTNNB1 siRNA#1, #2, #3をDLD-1/TCF-Luc細胞に導入した。いずれのCTNNB1 siRNAもCTNNB1の発現を阻害した(Figure 10)。さらに7種類のWnt/ β -catenin経路下流遺伝子の発現量についても解析をした結果、すべての遺伝子で変動

が認められた (Figure 11)。なお、DHRS9は β -cateninによって負に制御されている遺伝子のため、*CTNNB1* siRNAによって遺伝子発現が亢進した。*CTNNB1* siRNA#1, #2, #3をそれぞれ導入した DLD-1/TCF-Luc 細胞における遺伝子発現プロファイル同士の r を算出した結果、いずれも $r=0.92$ 以上であり、高い相関が認められた (Table 1)。

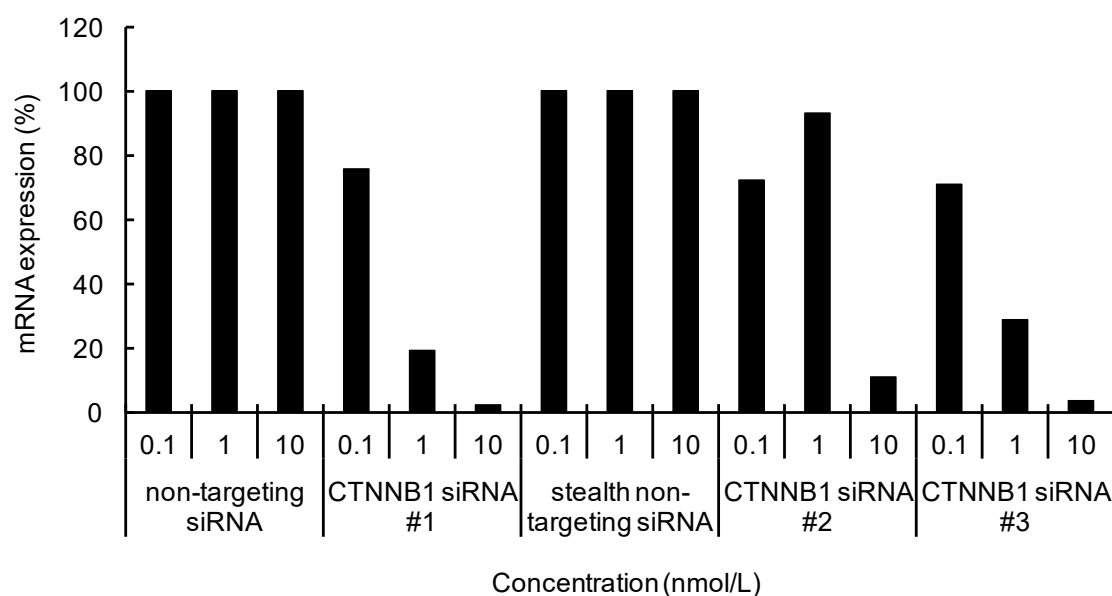


Figure 10 Target gene knockdown by *CTNNB1* siRNA.

CTNNB1 siRNA#1, #3 induces the knockdown of *CTNNB1* mRNA from 1 nmol/L. *CTNNB1* siRNA #2 induces the knockdown of *CTNNB1* mRNA from 10 nmol/L. *CTNNB1* siRNA was transfected to DLD-1/TCF-Luc cells. After 48 h, mRNA was collected and the expression level of *CTNNB1* was measured by an RT-PCR. mRNA expression of *CTNNB1* was normalized to *GAPDH*.

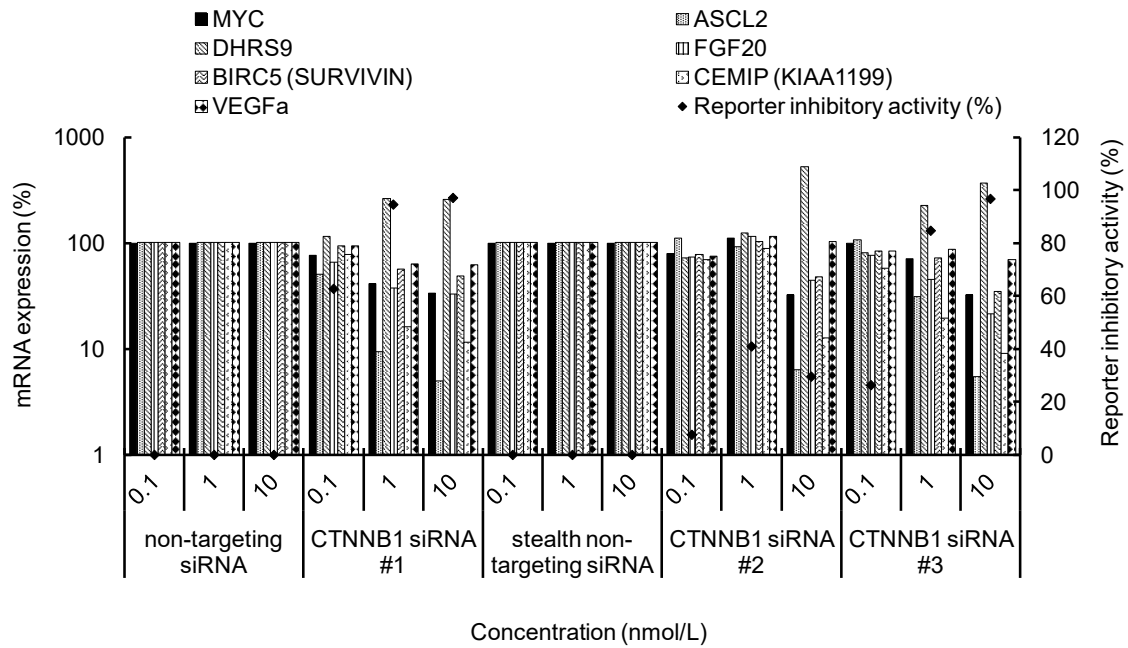


Figure 11 Wnt/ β -catenin pathway downstream gene regulation by *CTNNB1* siRNA in DLD-1/TCF-Luc cells.

CTNNB1 siRNA #1, #2 and #3 induces expression changes of Wnt/ β -catenin pathway downstream genes. *CTNNB1* siRNA was transfected to DLD-1/TCF-Luc cells. After 48 h, mRNA was collected and the expression levels of the Wnt/ β -catenin downstream genes were measured by an RT-PCR. mRNA expression of Wnt/ β -catenin pathway downstream gene was normalized to *GAPDH*.

Table 1 The correlation coefficients of the gene expression profiles between *CTNNB1* siRNAs and XAV939- or K-756-treated cells.

	CTNNB1 siRNA #1	CTNNB1 siRNA #2	CTNNB1 siRNA #3
CTNNB1 siRNA #1	NA	NA	NA
CTNNB1 siRNA #2	0.99	NA	NA
CTNNB1 siRNA #3	0.94	0.92	NA
XAV939	0.79	0.74	0.69
K-756	0.78	0.73	0.72

NA, not applicable.

次に、Wnt/ β -catenin 経路阻害剤として報告されていた XAV939 を DLD-1/TCF-Luc 細胞に添加し、遺伝子発現プロファイルを求めた。*CTNNB1* siRNA を導入した DLD-1/TCF-Luc 細胞の遺伝子発現プロファイルと比較すると、最も高い相関係数が $r = 0.79$ であり、相関が認められた (Table 1)。以上の結果より、遺伝子発現プロファイルの比較は Wnt/ β -catenin 経路選択的な阻害剤を取得する上で有効であることが判明した。K-756 を、レポーター活性を阻害した濃度である 1 $\mu\text{mol/L}$ の濃度で DLD-1/TCF-Luc 細胞に添加し、遺伝子発現プロファイルを求めた (Figure 12)。*CTNNB1* siRNA を導入した DLD-1/TCF-Luc 細胞の遺伝子発現プロファイルと比較すると最も高い相関係数が $r = 0.78$ であり、相関が認められた (Table 1)。以上の結果より、K-756 は *CTNNB1* siRNA と同様に、内在性の Wnt/ β -catenin 経路を選択的に阻害する低分子化合物であることが判明した。

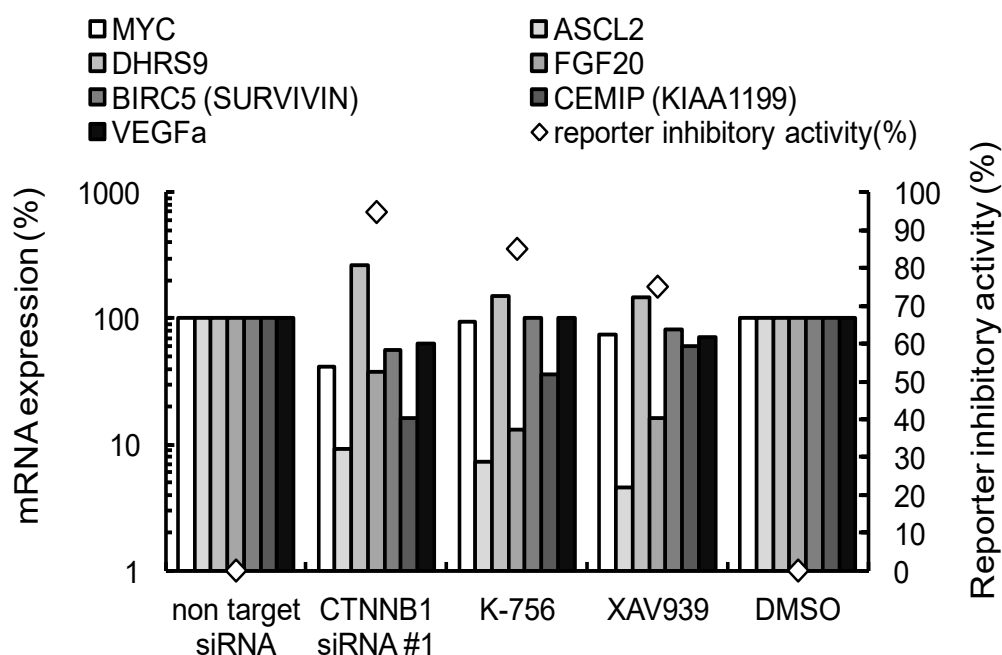


Figure 12 Wnt/ β -catenin downstream gene regulations by *CTNNB1* siRNA, K-756 or XAV939

in DLD-1/TCF-Luc cells.

The K-756 regulates Wnt/ β -catenin downstream genes. The reporter inhibitory concentration of K-756 (10 $\mu\text{mol/L}$) or XAV939 (3 $\mu\text{mol/L}$) was added to DLD-1/TCF-Luc cells. After 24 h, mRNA was collected and the expression levels of the Wnt/ β -catenin downstream genes were measured by an RT-PCR. *CTNNB1* siRNA#1 (1 nmol/L) was transfected to DLD-1/TCF-Luc cells. After 48 h, mRNA was collected and an RT-PCR was performed.

2.2.3 Wnt/ β -catenin 経路関連タンパク質の発現解析

K-756 が Wnt/ β -catenin 経路を選択的に阻害することが、これまでの実験結果より明らかとなったが、K-756 が Wnt/ β -catenin 経路を阻害するメカニズムは不明であった。そこで、Wnt/ β -catenin 経路関連分子の発現解析を実施した。 β -catenin は活性化すると脱リン酸化され

るため、脱リン酸化 β -catenin を認識する抗体で活性化型 β -catenin を検出した。その結果、K-756 は活性化した β -catenin の発現を抑制した (Figure 13)。このとき、K-756 は β -catenin の mRNA は抑制しなかったことから、 β -catenin の分解を促進することが推測された。 β -catenin は APC、Axin1/2、GSK3 β 、CK1 α と複合体を形成し、プロテアソームで分解される(1)。そこで、Axin1 及び Axin2 の発現を検出した結果、K-756 は Axin1 及び Axin2 のタンパク質発現を上昇させることが判明した (Figure 13)。K-756 は Axin1/2 タンパク質の発現を安定化させることで、活性化 β -catenin の分解を誘導し、Wnt/ β -catenin 経路を阻害することが推測された。

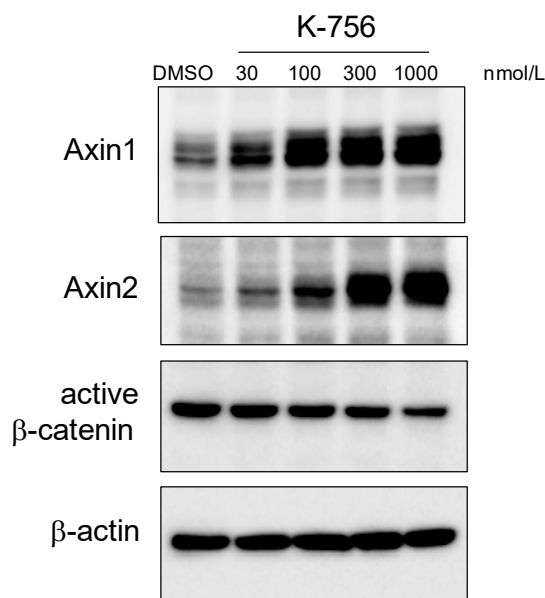


Figure 13 Axin1/2 stabilization and active β -catenin suppression by K-756 in DLD-1/TCF-Luc cells.

K-756 stabilizes Axin1 and 2 and decreased the level of active β -catenin. K-756 was added to DLD-1/TCF-Luc cells. After 24 h, the cells were collected and Western blotting was performed.

2.3. 考察

レポーターアッセイは内在性のシグナル経路阻害を簡便に測定する方法として、低分子化合物スクリーニングに多用されてきた。一方で、レポーター遺伝子であるルシフェラーゼ自体の遺伝子発現阻害やタンパク質合成阻害、ルシフェラーゼの酵素反応阻害を阻害する低分子化合物が偽陽性として取得されることが課題であった。例えば、RNA合成阻害剤やタンパク質合成阻害剤である。さらにルシフェラーゼ反応は ATP と Mg^{2+} を利用するため、ATP と拮抗する低分子化合物や、 Mg^{2+} のキレート剤によっても反応が阻害され、これらの化合物も偽陽性としてレポーターアッセイで頻繁にヒットすることが知られている。したがって、レポーターアッセイで効率的に目的とする化合物を取得するためには、非特異的なレポーター活性阻害剤を除外するためのカウンターアッセイ系の構築が重要になる。本研究で用いたカウンターアッセイ系である DLD-1/mtTCF-Luc 細胞は TCF 結合配列に変異が入っており、TCF 結合とは関係のない非特異的な転写因子の結合によりルシフェラーゼ遺伝子の発現を誘導する。したがって、DLD-1/TCF-Luc 細胞と DLD-1/mtTCF-Luc 細胞のレポーター活性をともに阻害する化合物は Wnt/ β -catenin 経路と関係のない作用メカニズムを持つことが容易に推測される。K-756 は DLD-1/TCF-Luc 細胞のレポーター活性は阻害するが、DLD-1/mtTCF-Luc 細胞のレポーター活性は阻害しないため、Wnt/ β -catenin 経路の阻害剤であると判断した。ただし、レポーター活性は内在性シグナル阻害を検出する代替の指標であり、実際に内在性シグナル阻害を評価するまで、真に目的とする作用を持つか判断できない。さらに Wnt/ β -catenin 経路の下流遺伝子の中には TCF 以外の転写因子でも制御される遺伝子があり、1 種類の遺伝子変動を評価するだけでは、その化合物が内在性の Wnt/ β -catenin 経路を阻害するとは判断できない。そこで本研究では 7 種類の Wnt/ β -catenin 経路の下流遺伝子の遺伝子発現変動プロファイルの評価した。Wnt/ β -catenin 経路選択的な阻害剤である *CTNNT1* siRNA を導入した細胞と K-756 を添加した細胞の遺伝子発現変動プロファイルを比較した結果、高い相関を示したため、K-756 を真に Wnt/ β -catenin 経路選択的な阻害剤と判断した。以上の結果より、本研究において実施した 2 種類のレポーターアッセイ系及び遺伝子発現変動プロファイル解析は選択的な Wnt/ β -catenin 経路阻害剤を効率的に取得するために有効であったといえる。

本研究によって、K-756 は Axin1/2 を安定化することで、活性化した β -catenin の分解を誘導し、Wnt/ β -catenin 経路を阻害することが明らかとなった。Axin1/2 は APC、GSK3 β 、CK1 α と複合体を形成し、 β -catenin の分解を誘導する。野生型 APC は全長 2843 a.a. であるが、本研究に用いた DLD-1 細胞の APC は 1-1427 a.a. からなる欠損変異型 APC である(31)。DLD-1 細胞の欠損変異型 APC は β -catenin との結合サイトの一部を欠損するため、野生型 APC と比較するとその結合は弱い、 β -catenin と結合し、 β -catenin をユビキチン化して分解する(31)。したがって、DLD-1 細胞は APC 欠損変異を有するものの、 β -catenin の分解機構は機能している。一方、DLD-1 細胞の欠損変異型 APC は Axin1/2 との結合サイトを欠損するため、Axin1/2 と結合できない。それにも関わらず、DLD-1 細胞では K-756 による Axin1/2 の安定化によって β -catenin の分解が誘導された。これは、Axin1/2 が APC を介さずに β -catenin の分解を誘導できることを示唆する。また、Axin1/2 は APC、GSK3 β 、CK1 α と比較して、極めて発現量が低いにも関わらず、その発現量の変化が β -catenin の分解に大きく影響を与えることが

報告されている(32)。この分子機構により、細胞は Axin1/2 の発現量のみを制御することで効率的に β -catenin の分解機構を制御でき、Wnt/ β -catenin 経路の恒常的な活性化を防ぐことが可能になる。以上のメカニズムにより、K-756 は Axin1/2 を安定化することで β -catenin の分解を迅速に誘導し、下流の Wnt/ β -catenin 経路を阻害したと考えられる。

2.4. 小括

第2章ではDLD-1/TCF-Luc細胞を用いて、Wnt/ β -catenin経路を阻害する低分子化合物の探索を実施した。続いて、非特異的なレポーター活性阻害剤を除外するために、DLD-1/mtTCF-Luc細胞を用いてレポーター評価を実施した。その結果、K-756がDLD-1/TCF-Luc細胞のレポーター活性を選択的に阻害することを見出した。次にK-756が内在性のWnt/ β -catenin経路を選択的に阻害するか検討するため、Wnt/ β -catenin経路下流遺伝子の発現変動プロファイル解析を実施した。その結果、K-756を添加した細胞のWnt/ β -catenin経路下流遺伝子発現変動プロファイルはCTNNB1 siRNAを導入した細胞のプロファイルと高い相関を示し、K-756がWnt/ β -catenin経路選択的な阻害剤であることが示された。K-756がWnt/ β -catenin経路を阻害するメカニズムを解明するために、活性化型 β -catenin、Axin1/2の発現を検出したところ、K-756は活性化 β -cateninを減少させ、Axin1/2の発現を安定化させることを見出した。Axin1/2は β -cateninの分解を制御することから、K-756はAxin1/2を安定化することで β -cateninの分解を促進し、Wnt/ β -catenin経路を阻害することが示唆された。

第3章 K-756 の標的同定

第2章の検討結果より、K-756はAxin1/2を安定化することで活性化型 β -cateninの分解を促進し、Wnt/ β -catenin経路を阻害することが明らかとなった。本章ではK-756の標的を同定することを試みた。

3.1 実験材料と実験方法

3.1.1 実験材料

- PARP1 Chemiluminescent Assay Kit (BPS bioscience)
- PARP2 Chemiluminescent Assay Kit (BPS bioscience)
- PARP3 Chemiluminescent Assay Kit (BPS bioscience)
- TNKS1 Histone Ribosylation Assay Kit (Antibody Detection) (BPS bioscience)
- TNKS2 Histone Ribosylation Assay Kit (Antibody Detection) (BPS bioscience)
- PARP6 Chemiluminescent Assay Kit (BPS bioscience)
- PARP7 Chemiluminescent Assay Kit (BPS bioscience)
- PARP11 Chemiluminescent Assay Kit (BPS bioscience)
- PBS (Thermo Fisher Scientific)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific)
- Fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)
- HEPES (1M), PH7.2-7.5 (Thermo Fisher Scientific)
- Pyruvate Solution (Thermo Fisher Scientific)
- D-(+)-Glucose Solution (45%) (Sigma-Aldrich)
- Penicillin-Streptomycin (PS) (Thermo Fisher Scientific)
- Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific)
- Hygromycin B (Wako Pure Chemical)
- Steady-Glo Assay System (Promega)
- Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Wako Pure Chemical)
- RNeasy plus kit (QIAGEN)
- QIA shredder (QIAGEN)
- SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit and Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Thermo Fisher Scientific)
- TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- NP40 Cell Lysis Buffer (Sigma-Aldrich)
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)
- Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories)
- Lane Marker Reducing Sample Buffer (5 \times) (Thermo Fisher Scientific)
- Running Buffer Solution (10 \times) for SDS - PAGE, Tris - Glycine (Nacalai Tesque)
- 20 \times TBS Tween-20 Buffer (Thermo Fisher Scientific)

- Supersep ACE 10% 13well (Wako Pure Chemical)
- Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad Laboratories)
- Immobilon-P PVDF Membrane (Merck Millipore)
- Skim Milk (Nacalai Tesque)
- Anti-Axin1 antibody (Cell Signaling Technology)
- Anti-Axin2 antibody (Cell Signaling Technology)
- Anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich)
- Anti-Mouse IgG, HRP-Linked F(ab')₂ Fragment Sheep (GE Healthcare)
- Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked F(ab')₂ Fragment Donkey (GE Healthcare)
- SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)
- Succinic Acid Monosodium Salt (Nacalai Tesque)
- Polyethylene glycol monomethyl ether 5000 50% w/v solution (Hampton Research)

3.1.2 細胞培養

実験方法は 2.1.1 に記載した方法にしたがった。

3.1.3 Tankyrase 及び PARP 酵素阻害活性評価

Tankyrase の酵素阻害活性評価には PARP1 Chemiluminescent Assay Kit、PARP2 Chemiluminescent Assay Kit、PARP3 Chemiluminescent Assay Kit、TNKS1 Histone Ribosylation Assay Kit (Antibody Detection)、TNKS2 Histone Ribosylation Assay Kit (Antibody Detection)、PARP6 Chemiluminescent Assay Kit、PARP7 Chemiluminescent Assay Kit、PARP11 Chemiluminescent Assay Kit を用いた。酵素阻害活性評価には、それぞれ N 末に GST タグを付加した全長の PARP1、PARP3、PARP6、PARP7 及びアミノ酸配列 8-338 からなる部分長の PARP11 並びにアミノ酸配列 1001-1327 からなる部分長の TNKS1 のリコンビナントタンパク質を用いた。TNKS2 の酵素阻害活性評価には N 末に His タグと GST タグを付加し、アミノ酸配列 849-1166 からなる部分長のリコンビナントタンパク質を用いた。PARP1、PARP3、PARP6、PARP7、PARP11 は大腸菌から、TNKS1 及び TNKS2 はバキュロウィルスを用いて Sf9 細胞から精製したタンパク質を用いた。酵素反応を実施する前に、PBS で希釈した基質となる Histone H2A/H2B を 50 μ L プレートに添加し、一晚 4°C で静置した。翌日 200 μ L の PBST バッファー(1×PBS, containing 0.05% Tween-20)で 3 回洗浄した。150 μ L の Blocking buffer をウェルに添加し、30 min 室温に静置した。200 μ L の PBST バッファーで 3 回洗浄した。5 μ L の 10× PARP assay buffer 及び 2.5 μ L の β -NAD⁺並びに 17.5 μ L の H₂O を各ウェルに添加した。1 ng/ μ L の酵素溶液を 20 μ L ウェルに添加し、酵素反応を開始した。1 h 室温で酵素反応を実施した。200 μ L の PBST バッファーで 3 回洗浄し、100 μ L の Blocking バッファーを添加した。プレートを 10 min ローテーターで振盪し、Blocking バッファーを除去した。Blocking バッファーを用いて 800 倍希釈した一次抗体を含む溶液を 150 μ L 添加した。1 h 室温で振盪し、200 μ L の PBST バッファーで 3 回洗浄し、100 μ L の Blocking バッファーを添加した。プレートを 10 min ローテーターで振盪し、Blocking バッファーを除去した。Blocking バッファーを用いて 1000 倍希釈した二次抗体を含む溶液を 150 μ L 添加し、30 min 室温で振盪した。

200 μ L の PBST バッファーで 3 回洗浄し、100 μ L の Blocking バッファーを添加した。50 μ L の HRP chemiluminescent substrate A と 50 μ L の HRP chemiluminescent substrate B を混合し、各ウェルに 100 μ L 添加した。BioTek Synergy 2 microplate reader で発光を測定し、Graphpad Prism ソフトウェアで酵素阻害活性の IC₅₀ 値を算出した。

3.1.4 Wnt/ β -catenin 経路レポーター阻害活性評価

実験方法は 2.1.2 に記載の方法にしたがった。

3.1.5 Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子発現変動解析及び遺伝子発現プロファイルの相関解析

実験方法は 2.1.3 及び 2.1.4 に記載の方法にしたがった。

3.1.6 Axin1/2 のウェスタンブロッティング

実験方法は 2.1.5 に記載の方法にしたがった。

3.1.7 TNKS1-K-756 の X 線複合体解析

Tankyrase1 (TNKS1) catalytic domain (CD), amino acids 1091-1324 は CreLux (München, Germany) から購入した。Tankyrase1 のアポ体結晶は、シッティングドロップ蒸気拡散法により行い、0.1 mol/L Na-Succinate pH 5.8、6 w/v% PEG MME 5000 の条件で得た。Tankyrase1 と K-756 の複合体結晶は 0.5 mmol/L K-756、0.1 mol/L Na-Succinate pH 5.8、20 w/v% PEG MME 5000 の組成のソーキング溶液に 18 時間浸漬させた。抗凍結剤溶液は、0.5 mmol/L K-756、0.1 mol/L Na-Succinate pH 5.8、30 w/v% PEG MME 5000 の溶液を用いた。この TNKS1 CD の K-756 との複合体結晶は、空間群 $P2_12_12$ ($a = 158.85$ Å, $b = 74.68$ Å, $c = 84.60$ Å) に属した。

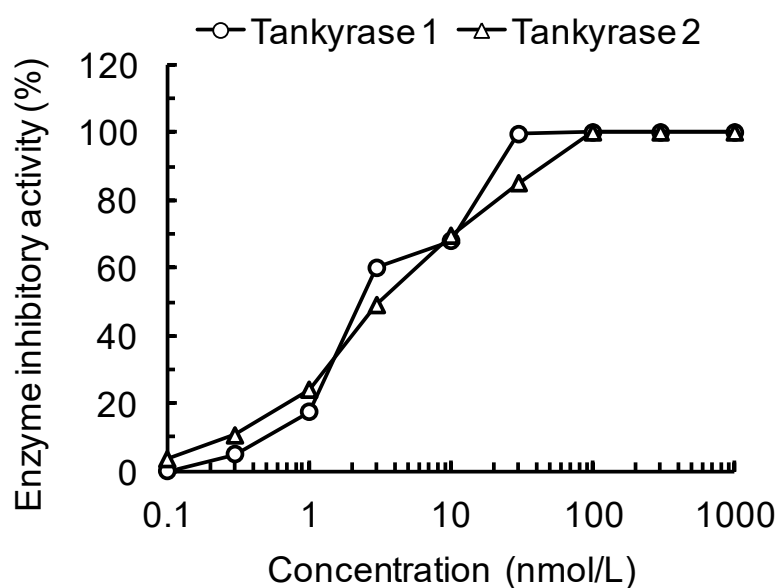
X 線回折データは、高エネルギー加速器研究機構 (KEK) 物質構造科学研究所 放射光科学研究施設内の Photon Factory (PF) のビームライン BL5A を用いて収集した。X 線回折実験に供した結晶は、抗凍結剤溶液に浸漬した後、少量の抗凍結剤溶液とともにループで掬って直ちに液体窒素に浸漬し、瞬間的に冷却させた。100K の超低温窒素気流下で X 線回折実験を行った。測定した X 線回折データは、プログラム HKL2000(33)により指数付けとスケーリングを行い、以後の構造解析は、スケーリング後のデータを用いた。構造解析は、CCP4 パッケージ(34)内のプログラム Phaser(35)及びプログラム Refmac5(36)を用いて、分子置換法により行った。K-756 と Tankyrase1 の複合体構造解析の結果は登録番号：5ETY として Protein data bank に登録した。

3.2 実験結果

3.2.1 K-756 の Tankyrase 酵素阻害活性

2009 年に Chang らにより、Tankyrase 阻害剤 XAV939 が Axin1/2 を安定化することで Wnt/ β -catenin 経路を阻害することを報告した(22)。そこで、同様の作用が認められた K-756 が Tankyrase を阻害するか検証した。Tankyrase1 と Tankyrase2 の酵素阻害活性を評価した結果、K-756 はそれぞれ Tankyrase1 を $IC_{50} = 31$ nmol/L で、Tankyrase2 を $IC_{50} = 36$ nmol/L で阻害した (Figure 14A)。XAV939 についても同様に評価したところ、Tankyrase1 を $IC_{50} = 4.6$ nmol/L で、Tankyrase2 を $IC_{50} = 2.2$ nmol/L で阻害した (Figure 14B)。

A



B

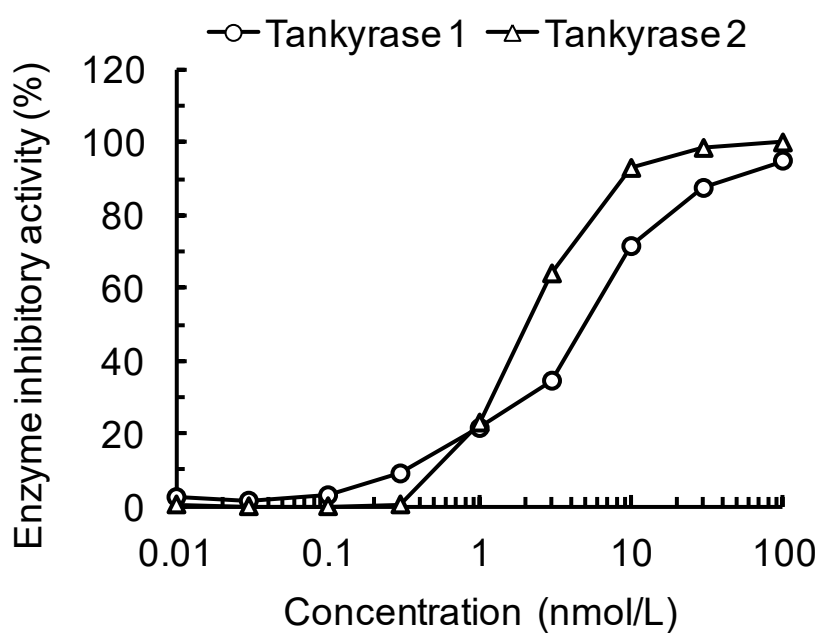


Figure 14 Tankyrase enzyme inhibition by K-756 and XAV939.

A, K-756 and B, XAV939 inhibit TNKS1 and 2 enzyme activity. Poly ADP ribosylation activities of TNKS1 and TNKS2 were measured by TNKS1 and TNKS2 Histone Ribosylation Assay Kit. Each point represents the mean. (duplicate)

3.2.2 Tankyrase 阻害剤 XAV939、IWR-1、IWR-3 の DLD-1/TCF-Luc 細胞における Wnt/ β -catenin 経路レポーター阻害活性

K-756 は Tankyrase の酵素活性を阻害した。そこで、既存の Tankyrase 阻害剤 XAV939、IWR-1、IWR-3 が K-756 と同様に DLD-1/TCF-Luc 細胞の Wnt/ β -catenin 経路を阻害するか検証した。IWR-1 と IWR-3 は 2009 年に Chen らが Wnt/ β -catenin 経路阻害剤として報告し(23)、同年に Huang らによって Tankyrase が標的であることが明らかになった(22)。XAV939、IWR-1、IWR-3 は DLD-1/TCF-Luc 細胞のレポーター活性をそれぞれ $IC_{50} = 110$ nmol/L、 $IC_{50} = 93$ nmol/L、 $IC_{50} = 1700$ nmol/L で阻害した。XAV939、IWR-1、IWR-3 は DLD-1/mtTCF-Luc 細胞のレポーター活性を 10 μ mol/L まで阻害しなかった (Figure 15)。

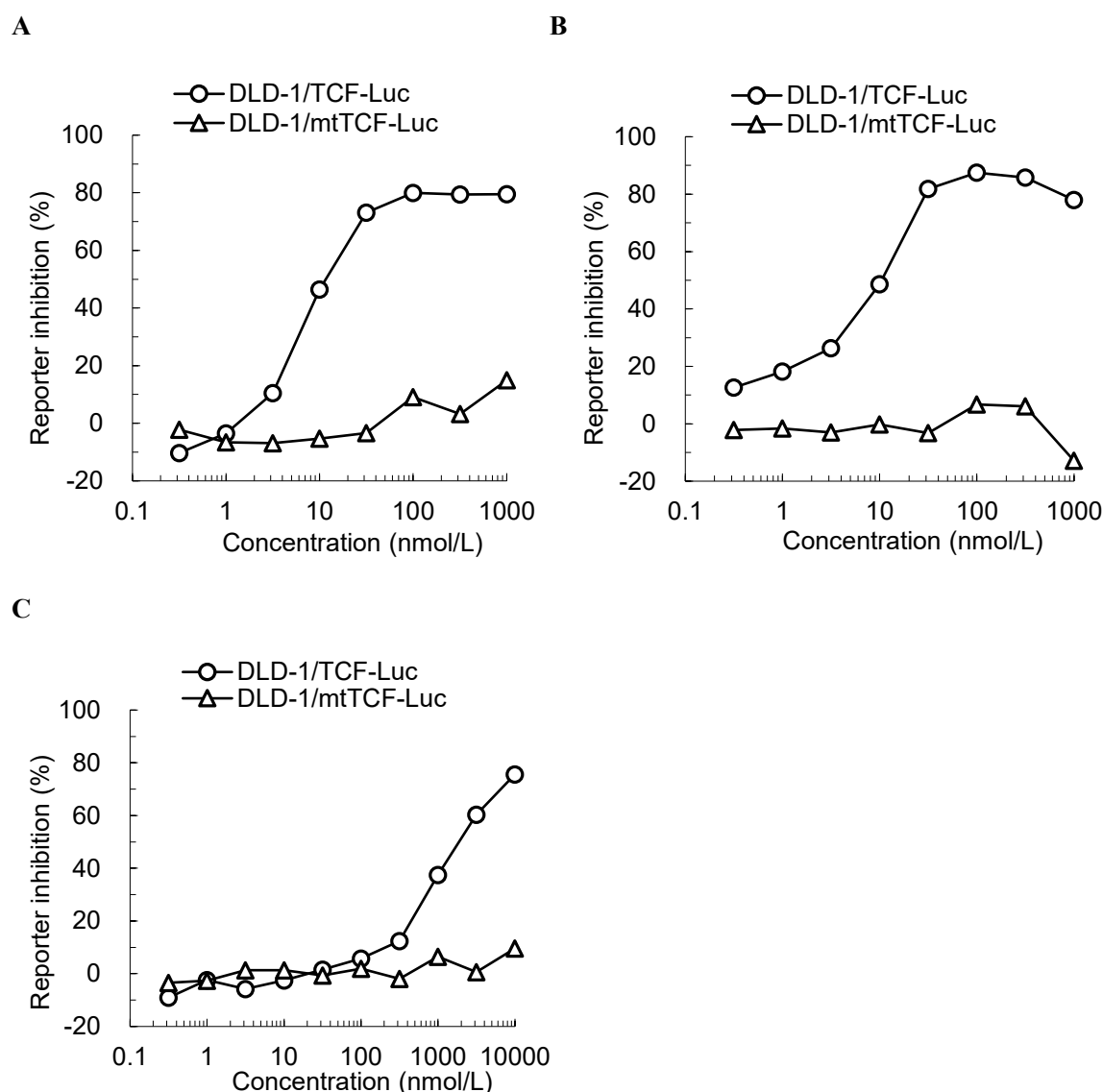


Figure 15 Wnt/ β -catenin pathway reporter inhibition by XAV939, IWR-1 and IWR-3.

A, XAV939, **B**, IWR-1 and **C**, IWR-3 inhibit the luciferase activity of DLD-1/TCF-Luc cells but do not inhibit DLD-1/mtTCF-Luc cells. DLD-1/TCF-Luc cells and DLD-1/mtTCF-Luc cells were treated with **A**, XAV939, **B**, IWR-1, or **C**, IWR-3. After 18 h, luciferase reporter activity was measured. Each point represents the mean. (triplicate)

3.2.3 Tankyrase 阻害剤 XAV939、IWR-1、IWR-3 の DLD-1/TCF-Luc 細胞における Wnt/ β -catenin 下流遺伝子発現阻害作用評価

XAV939、IWR-1、IWR-3 は DLD-1/TCF-Luc 細胞の Wnt/ β -catenin 経路レポーター活性を阻害した。そこで、XAV939、IWR-1、IWR-3 が Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子(MYC、ASCL2、DHRS9、FGF20、CEMIP(KIAA1199))の発現を変動させるかリアルタイム RT-PCR で検証した。その結果、いずれの化合物も Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子(MYC、ASCL2、DHRS9、FGF20、CEMIP(KIAA1199))の発現を変動させた (Figure 16)。

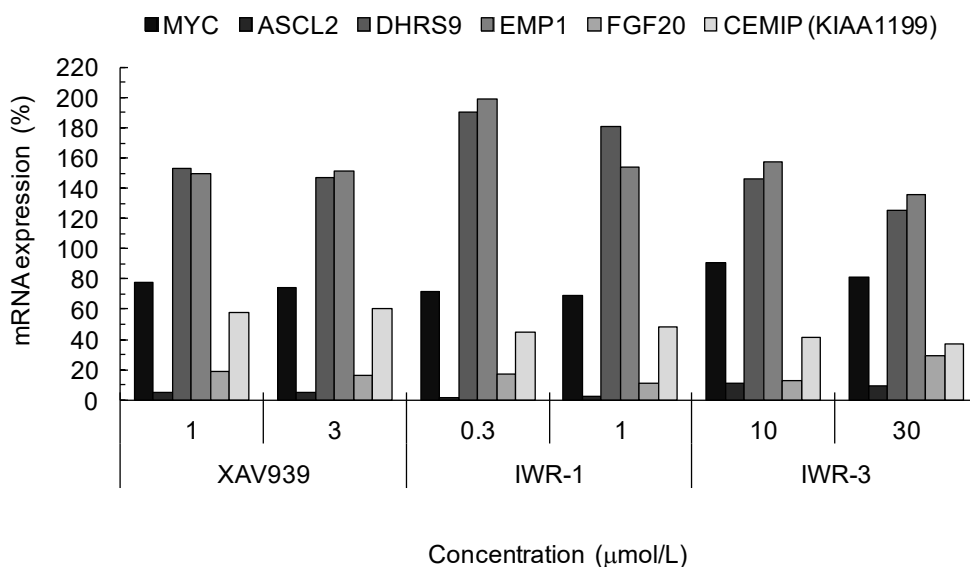


Figure 16 The Wnt/ β -catenin downstream gene regulation by XAV939, IWR-1 and IWR-3 in DLD-1/TCF-Luc cells.

The expressions of the Wnt/ β -catenin downstream genes after XAV939, IWR-1 and IWR-3 treatment. The reporter inhibitory concentration of XAV939 (1, 3 μmol/L), IWR-1 (0.3 and 3 μmol/L) and IWR-3 (10, 30 μmol/L) was added to DLD-1/TCF-Luc cells. After 24 h, mRNA was collected and the expression levels of the Wnt/ β -catenin downstream genes were measured by an RT-PCR.

3.2.4 Tankyrase 阻害剤 XAV939 の Axin1/2 安定化作用

Tankyrase 阻害剤 XAV939 は Axin1/2 を安定化して、Wnt/ β -catenin 経路を阻害することが報告されている(22)。そこで、XAV939 が DLD-1/TCF-Luc 細胞の Axin1 と Axin2 の発現を安定化するかウェスタンブロッティングで検証した。その結果、XAV939 は DLD-1/TCF-Luc 細胞の Axin1 と Axin2 の発現を上昇させ、安定化させた (Figure 17)。

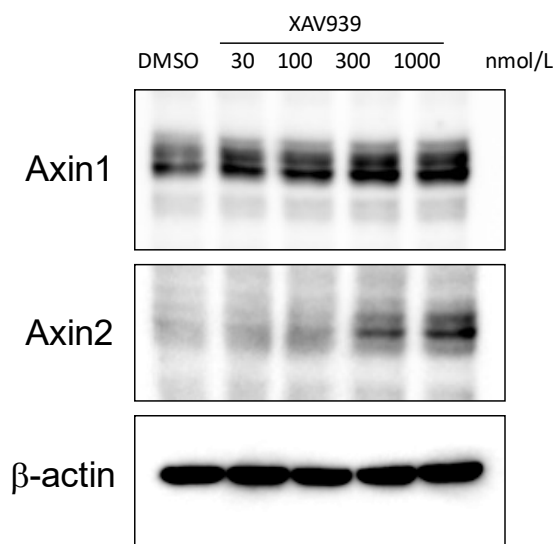


Figure 17 Axin stabilization by XAV939 in DLD-1/TCF-Luc cells.

XAV939 stabilizes Axin1 and Axin2 expression in DLD-1/TCF-Luc cells. XAV939 was added to DLD-1/TCF-Luc cells. After 24 h, the cells were collected and western blotting was performed.

3.2.5 K-756 の PARP ファミリー酵素阻害評価

これまでの結果より、K-756 は XAV939 と同様に Tankyrase を阻害し、Axin1/2 を安定化させることで、Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子を変動させることが明らかとなった。Tankyrase は PARP ファミリーに属し、別名が PARP5 である。XAV939 は PARP ファミリーの PARP1 及び PARP2 も阻害することが報告されている(22)。そこで、K-756、XAV939、IWR-1 の 10 μ mol/L における PARP ファミリー選択性を評価した。Tankyrase1、Tankyrase2、PARP1、PARP2、PARP3、PARP6、PARP7、PARP11 に対する酵素阻害評価を実施した結果、K-756 と IWR-1 は 10 μ mol/L で Tankyrase1 と Tankyrase2 以外の酵素を阻害しなかった（エラー! 参照元が見つかりません。）。一方、XAV939 は Tankyrase1 と Tankyrase2 以外にも PARP1 と PARP2 を 10 μ mol/L で 90%以上阻害した（エラー! 参照元が見つかりません。）。なお、文献によると XAV939 の Tankyrase1 と Tankyrase2 の酵素阻害活性と、PARP1 と PARP2 に対する酵素阻害活性の IC₅₀ 値は 10 倍以上乖離があり、Tankyrase1 と Tankyrase2 に対する酵素阻害活性は PARP1 と PARP2 に対する酵素阻害活性よりも低濃度で誘導される(22)。したがって、Wnt/ β -catenin 経路を阻害する濃度では Tankyrase のみを阻害するため、Tankyrase 選択的阻害剤である K-756 と同等の作用を示すが、より高濃度では PARP1 と PARP2 の阻害が誘導され、K-756 とは異なる作用を示すと考えられる。

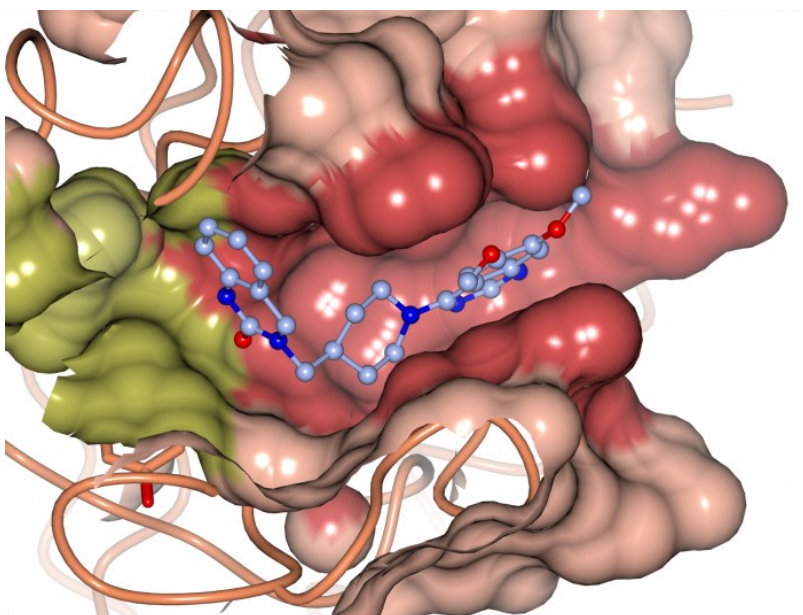
Table 2 Enzyme inhibitory activity against PARP family enzymes.

Compound	Enzyme inhibitory activity (%) at 10 μ mol/L							
	TNKS1	TNKS2	PARP1	PARP2	PARP3	PARP6	PARP7	PARP11
K-756	97	100	8	1	0	7	13	3
XAV939	100	100	98	100	10	13	9	29
IWR-1	100	100	8	0	11	2	4	0

3.2.6 K-756 と Tankyrase1 の複合体構造解析

Tankyrase の基質である β -nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD⁺) は ADP リボースのドナーとなる。Tankyrase は β -NAD⁺ を基質として、ADP リボース部位を標的タンパク質に付加し、ニコチンアミドを遊離する (25, 37)。過去の研究より、Tankyrase 阻害剤が結合する異なる二種類のポケットが同定されている。それらは、ニコチンアミド結合ポケットと induced ポケットである。XAV939 はニコチンアミドの類似構造部位を有しており、XAV939 は Tankyrase1 のニコチンアミド結合ポケットに結合し、Ser1221 と Gly1185 と水素結合をする (38)。この結合モードは他の PARP ファミリー酵素でもみられるため、XAV939 は Tankyrase だけでなく、PARP1 と PARP2 を阻害すると考えられる。一方、Tankyrase 阻害剤 IWR-1 は induced ポケットに結合する。この induced ポケットは Tankyrase のアポ体には存在しない (39, 40)。Induced ポケットの名称は、そのポケットが Phe1188 の大きな構造変化により造られることに由来する。そして Induced ポケットには β -NAD⁺ の ADP 部位が結合する。したがって、induced ポケットに結合する阻害剤はアロステリックな阻害様式となり、ニコチンアミドとの非競合阻害を可能にすることが示唆されている (40)。K-756 の Tankyrase との結合モードを明らかにするため、Tankyrase1 と K-756 の複合体結晶を解析した。その結果、K-756 が Tankyrase1 の induced ポケットに結合することが明らかとなった (Figure 18)。K-756 の quinazoline-2-one のカルボニル基の酸素は Tyr1213 の NH 基と水素結合を形成した。この水素結合は他の induced ポケットに結合する Tankyrase 阻害剤においても認められている (41)。K-756 の 6'7'-dimethoxyquinoxaline 部位は Phe1188 と His1201 とスタッキング型の相互作用を形成した。K-756 と Phe1188, His1201 の相互作用は、K-756 の Tankyrase1 への選択的な結合に大きく寄与する。なぜなら、Phe1188, His1201 は Tankyrase のみに存在し、他の PARP ファミリー酵素には存在しないためである (40)。

A



B

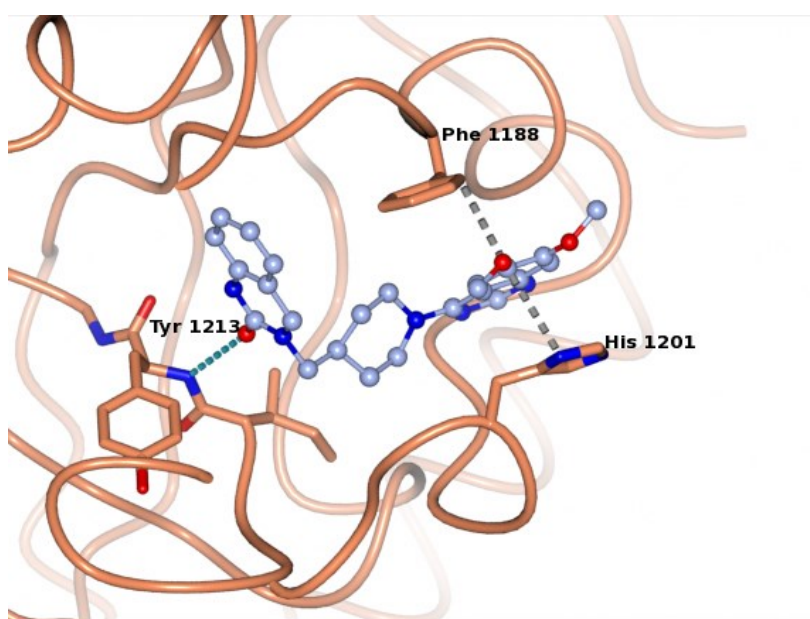


Figure 18 K-756 binds to the induced-pocket of Tankyrase1.

A, Surface representation of the K-756 bound induced-pocket of TNKS 1. The protein surface around the ligand binding pockets is drawn with salmon pink. The induced pocket that K-756 binds is colored in red, while the nicotinamide binding pocket is gold. **B**, The interaction between K-756 and TNKS 1. The C α trace of the TNKS 1 is shown with K-756, which is represented as ball-and-stick models with its carbon atoms colored in light blue. The residues involving the interaction between K-756 and TNKS 1 are shown as sticks. The hydrogen bond interaction is shown in a green dashed line and the stacking interaction is shown in a grey dashed line.

3.4 考察

K-756は Tankyrase を阻害することで Axin1/2 を安定化し、Wnt/ β -catenin 経路を阻害することが明らかとなった。Tankyrase は PARP ファミリーに属する poly-ADP リボシル化酵素であり、Axin1/2 を poly-ADP リボシル化する。poly-ADP リボシル化された Axin1/2 は RNF146 によってユビキチン化され、プロテアソームで分解される(27)。Tankyrase はテロメアを制御する TRF を poly-ADP リボシル化する酵素として発見されたが(25)、Wnt/ β -catenin 経路との関連は知られていなかった。Wnt/ β -catenin 経路阻害剤である XAV939 の標的分子として、Tankyrase が同定されたことから、Tankyrase と Wnt/ β -catenin 経路の関連が明らかとなった(22)。Wnt/ β -catenin 経路とがんの関連は 1990 年代初頭に報告され、以来 Wnt/ β -catenin 経路阻害剤が精力的に探索されてきた(19)。しかしながら、Wnt/ β -catenin 経路には低分子化合物の標的となるような分子が報告されておらず、Wnt/ β -catenin 経路を低分子化合物で選択的に阻害することは難しいと考えられてきた(19)。一方、Tankyrase は同じファミリーに属する PARP1 及び PARP2 の阻害剤が BRCA1/2 変異がんを対象に臨床開発されており(42)、低分子化合物の標的として魅力的な候補である。したがって、新規 Tankyrase 阻害剤 K-756 は Wnt/ β -catenin 経路を阻害する低分子化合物として、有望な薬剤開発のリード化合物となり得る。

Tankyrase 阻害剤の PARP ファミリー選択性については、その結合部位から考察ができる。Tankyrase は β -NAD⁺ の ADP リボースを基質タンパク質に付加し、ニコチンアミドを遊離する。XAV939 は Tankyrase のニコチンアミド結合サイトに結合する(43)。一方、IWR-1 はニコチンアミド結合サイトとは異なるポケットに結合し、そのポケットは IWR-1 が結合する際に形成されることから induced ポケットと呼ばれる(40)。K-756 は Tankyrase1 の induced ポケットに結合することが明らかとなった。Tankyrase のニコチンアミドポケットはすべての PARP ファミリーが有するドメインであるが、induced ポケットは Tankyrase のみが有するドメインである(40)。したがって、K-756 が Tankyrase 以外の PARP ファミリーを阻害しない理由は、その結合様式によって説明できる。

K-756 の 6'7'-dimethoxyquinoxaline 部位のメトキシ基は Tankyrase の induced ポケット内の His1201 と Phe1188 とスタッキング相互作用することが明らかとなった。K-756 の不活性類縁体 K-050 は 6'7'-dimethoxyquinoxaline 構造を有さないことから Tankyrase と結合できず、Wnt/ β -catenin 経路阻害活性を消失したと推測できる。

3.5 小括

第3章では K-756 の標的同定を試みた。Tankyrase 阻害剤 XAV939 が Axin1/2 を安定化させ、Wnt/ β -catenin 経路を阻害することが報告されていたことから、K-756 の標的が Tankyrase であるという仮説をたてた。K-756 の Tankyrase 酵素阻害作用を評価した結果、K-756 は Tankyrase1 及び Tankyrase2 を阻害した。Tankyrase は PARP ファミリーに属することから、K-756 の PARP ファミリーに対する選択性を評価したところ、K-756 は Tankyrase 選択的な阻害剤であることが判明した。Tankyrase1 と K-756 の複合体構造解析の結果より、K-756 は Tankyrase1 の induced ポケットに結合することが明らかとなった。Induced ポケットは PARP ファミリーの中で Tankyrase にしか存在しないため、induced ポケットに結合する K-756 は Tankyrase 選択的な阻害剤であると考えられる。

第4章 K-756 の大腸がん細胞に対する増殖阻害活性

Wnt/ β -catenin 経路の異常はさまざまながんの原因として考えられてきた(18)。特に β -catenin の分解を制御する APC 変異は 85%の大腸がんでは認められている(19)。したがって、Wnt/ β -catenin 経路阻害剤が治療に用いられる第一候補のがんは大腸がんである。そこで、本研究では、K-756 の APC 変異大腸がん細胞への増殖阻害活性を評価した。

4.1 実験材料と実験方法

4.1.1 実験材料

- RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific)
- DMEM high glucose (Thermo Fisher Scientific)
- Fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)
- HEPES (1M), PH7.2-7.5 (Thermo Fisher Scientific)
- Pyruvate Solution (Thermo Fisher Scientific)
- D-(+)-Glucose Solution (45%) (Sigma-Aldrich)
- Penicillin-Streptomycin (PS) (Thermo Fisher Scientific)
- PBS (Thermo Fisher Scientific)
- Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific)
- Hygromycin B (WAKO Pure Chemical)
- dimethyl sulfoxide (DMSO) (WAKO Pure Chemical)
- Cell titer Glo (Promega)
- XTT reagent (Roche)
- Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific)
- Stealth non-targeting siRNA (#12935-113、Thermo Fisher Scientific)
- *CTNNB1* siRNA #2 (#HSS102461、Thermo Fisher Scientific)
- *CTNNB1* siRNA #3 (#HSS102462、Thermo Fisher Scientific)
- RNAiMax (Thermo Fisher Scientific)
- RNeasy plus kit (QIAGEN)
- QIAshredder (QIAGEN)
- SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit and Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Thermo Fisher Scientific)
- TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- NP40 Cell Lysis Buffer (Sigma-Aldrich)
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)
- Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories)
- Lane Marker Reducing Sample Buffer (5×) (Thermo Fisher Scientific)
- Running Buffer Solution (10×) for SDS - PAGE, Tris - Glycine (Nacalai Tesque)
- 20× TBS Tween-20 Buffer (Thermo Fisher Scientific)
- Supersep ACE 10% 13well (WAKO Pure Chemical)

- Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad Laboratories)
- Immobilon-P PVDF Membrane (Merck Millipore)
- Skim Milk (Nacalai Tesque)
- Anti-Axin1 antibody (Cell Signaling Technology)
- Anti-Axin2 antibody (Cell Signaling Technology)
- Anti-unphospho- β -catenin antibody (Millipore)
- Anti- β -actin antibody (Sigma-Aldrich)
- Anti-Mouse IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment Sheep (GE Healthcare)
- Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment Donkey (GE Healthcare)
- SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)

4.1.2 細胞培養

レポーター細胞株 DLD-1/TCF-Luc の培養方法は 2.1.2 に記載した。APC 変異ヒト大腸がん細胞株 COLO 320DM 及び SW403 は American Type Culture Collection (Manassas, VA)にて購入した。COLO 320DM 細胞は 10% FBS と 1% PS を含む RPMI1640 培地を用い、37°C 5% CO₂ 存在下で培養し、継代した。SW403 細胞は 10% FBS と 1% PS を含む DMEM high glucose 培地を用い、37°C 5% CO₂ 存在下で培養し、継代した。細胞は 0.05% trypsin/EDTA を用いて継代した。すべての細胞株は PowerPlex 16 STR System を用いて医薬基盤研究所にて認証された。

4.1.3 *CTNNB1* siRNA による細胞増殖阻害作用評価

DLD-1/TCF-Luc 細胞を 96 ウェルプレートに 1000 cells/well になるように 90 μ L で播種し、同時に RNAiMax を用いて siRNA を導入した。Opti-MEM に懸濁した siRNA 100 nM の溶液 10 μ L に RNAiMax 0.1 μ L を添加し、混合し、室温に 15 min 静置した。各ウェルに、この混合溶液 10 μ L を添加した。144 h 後に細胞内 ATP 量を検出する Cell titer Glo 試薬を 25 μ L 添加し、Top Count NXT で細胞数を測定した。

4.1.4 化合物による細胞増殖阻害作用評価

DLD-1/TCF-Luc 細胞は 250 cells/well、COLO 320DM 細胞は 500 cells/well、SW403 細胞は 1000 cells/well になるように 96 ウェルプレートに 60 μ L で播種し、翌日に 40 μ L の化合物希釈液を添加した。化合物希釈液は DMSO の最終濃度が 0.1%になるように培地を用いて調製した。化合物添加後、0 h 及び 144 h 後に 50 μ L の XTT 試薬を添加し、DLD-1/TCF-Luc 細胞は 37°C で 90 min、COLO 320DM 細胞と SW403 細胞は 37°C で 3 h 培養後、SpectraMax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)で吸光度を測定した。

4.1.5 Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子発現阻害作用評価

COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞を 2×10^5 cells/well になるように 24 ウェルプレートに 1000 μ L で播種した。翌日 DMSO 最終濃度が 0.1%になるように化合物を添加し、24 h 後に細胞を回収し、リアルタイム RT-PCR で Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子の発現変動を評価し

た。RNA 精製からリアルタイム RT-PCR は 2.1.4 に記載した方法にしたがった。

4.1.6 Axin1/2 及び活性化型 β -catenin ウェスタンブロッティング

COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞を 10 cm シャーレに 5×10^5 cells/well になるように 10 ml で播種し、翌日 DMSO 最終濃度が 0.1% になるように化合物を添加した。24 h 後に細胞を回収し、ウェスタンブロッティングで Axin1/2 と活性化型 β -catenin の発現を検出した。ウェスタンブロッティングは 2.1.5 に記載した方法にしたがった。

4.2 実験結果

4.2.1 *CTNNB1* siRNA を用いた Wnt/ β -catenin 経路依存的細胞の探索

K-756 は DLD-1/TCF-Luc 細胞の Wnt/ β -catenin 経路を阻害したが、細胞増殖は阻害しなかった (Figure 19)。そこで、Wnt/ β -catenin 経路依存的に増殖する APC 変異大腸がん細胞を、*CTNNB1* siRNA を用いて探索した。*CTNNB1* siRNA は選択的に Wnt/ β -catenin 経路を阻害するため、*CTNNB1* siRNA によって増殖が阻害される細胞は Wnt/ β -catenin 経路依存的に増殖するといえる。APC 変異 COLO 320DM 細胞及び APC 変異 SW403 細胞細胞に *CTNNB1* siRNA を導入した結果、細胞の増殖が阻害された (Figure 20A, Figure 20B)。このとき、*CTNNB1* siRNA による *CTNNB1* のノックダウンが認められた (Figure 21)。したがって、COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞は Wnt/ β -catenin 経路依存的に増殖する細胞であると判断し、K-756 によっても増殖阻害が誘導されると推測した。

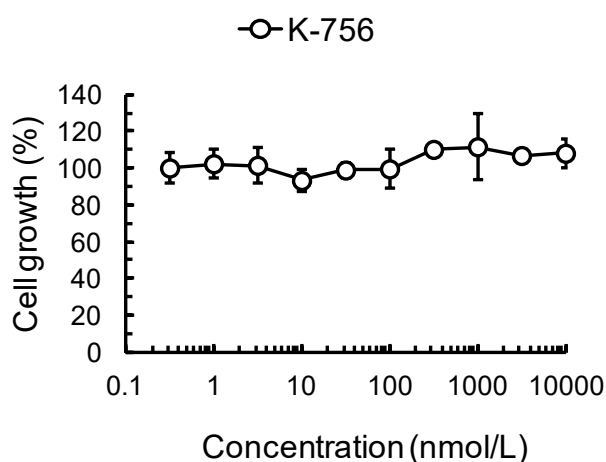


Figure 19 The cell growth inhibition assay of K-756 in DLD-1/TCF-Luc cells.

K-756 does not inhibit cell growth of DLD-1/TCF-Luc cells. Cells were seeded to 96-well plates. Next day compound was added to the cells. After 144 h, XTT assay was performed to measure cell growth inhibitory activity. Each point represents the mean \pm S.D. (triplicate).

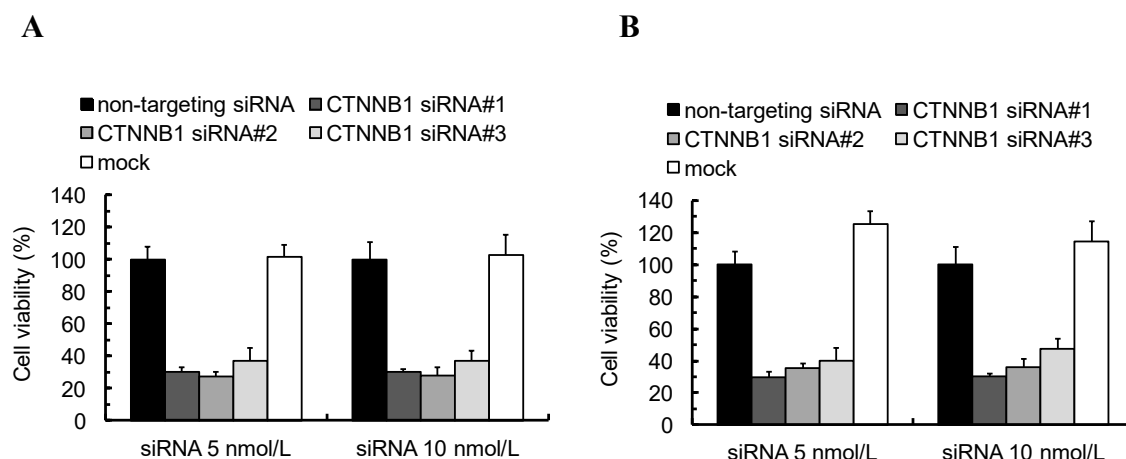


Figure 20 The cell growth inhibition assay of *CTNNB1* siRNA in COLO 320DM and SW403 cells.

CTNNB1 siRNA inhibits the cell growth of **A**, COLO 320DM and **B**, SW403. *CTNNB1* siRNA was transfected to COLO 320DM and SW403 in 96 well plates. After 144 h, cell viability was measured. Each column represents the mean \pm S.D. (triplicate).

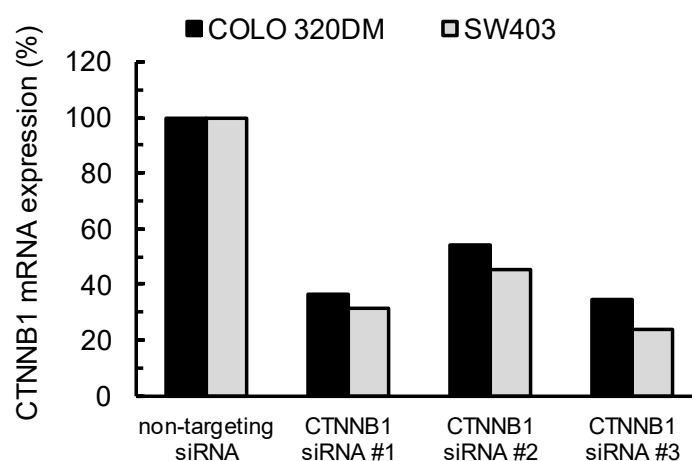


Figure 21 The target gene knockdown by *CTNNB1* siRNA in COLO 320DM and SW403 cells.

CTNNB1 siRNA induces the knockdown of *CTNNB1* mRNA. Cells were seeded to 12-well plate. Each of *CTNNB1* siRNA #1, 2 and 3 was transfected to the cells. After 48 h, mRNA was collected and the expression levels of the *CTNNB1* gene was measured by an RT-PCR.

4.2.2 COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞における K-756 の Wnt/ β -catenin 経路阻害作用

K-756 を COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞に添加し、24 h 後の Wnt/ β -catenin 下流遺伝子変動を解析した。その結果、K-756 はいずれの細胞においても Wnt/ β -catenin 下流遺伝子を変動させた (Figure 22A, Figure 22B)。さらに K-756 は COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞の Axin1 及び Axin2 を安定化し、活性化型 β -catenin の発現を減少させた (Figure 23A, Figure 23B)。

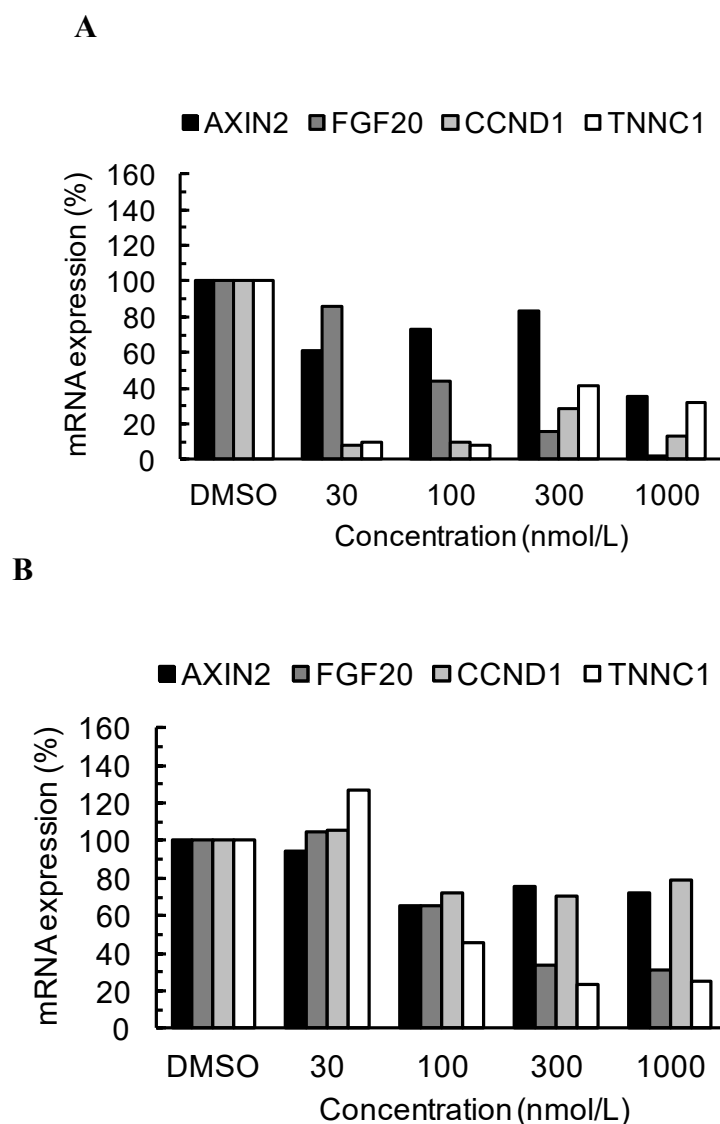


Figure 22 The Wnt/ β -catenin downstream gene regulation in COLO 320DM and SW403 cells.

K-756 regulates Wnt/ β -catenin downstream genes in **A**, COLO 320DM cells and **B**, SW403 cells. Cells were seeded to 12-well plate. Next day, K-756 was added to the cells. After 24 h, cells were collected for RT-PCR.

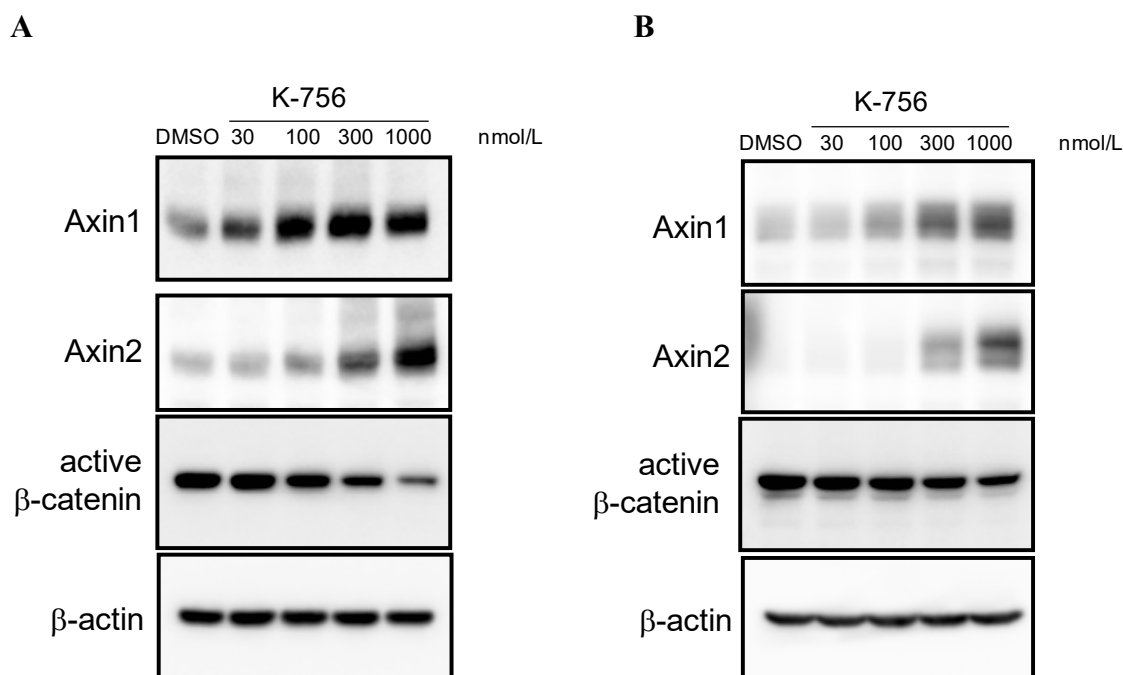


Figure 23 Axin1/2 stabilization and active-β-catenin inhibition by K-756 in COLO

320DM and SW403 cells.

K-756 stabilizes Axin1 and Axin2 and decreased active β-catenin in **A**, COLO 320DM cells and **B**, SW403 cells. Cells were seeded to 10 cm dishes. Compound was added to the cells and after 24 h, cells were collected for W.B. analysis.

4.2.3 COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞における K-756 の細胞増殖阻害作用

K-756 は COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞の Wnt/β-catenin 下流遺伝子を変動させた。そこで、K-756 が COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞の増殖を阻害するか検討した。細胞播種の翌日、K-756 を添加し、144 h 後の細胞増殖阻害活性を評価した。その結果、K-756 は COLO 320DM 細胞の増殖を $GI_{50} = 780$ nmol/L で阻害した (Figure 24A)。さらに K-756 は SW403 細胞の増殖を $GI_{50} = 270$ nmol/L で阻害した (Figure 24B)。一方、不活性類縁体 K-050 は COLO 320DM の増殖を 10 μmol/L まで阻害しなかった (Figure 25)。以上の結果から、K-756 は Wnt/β-catenin 経路を阻害することで COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞の増殖を阻害することが明らかとなった。XAV939 及び IWR-1 についても同様に増殖阻害作用評価を実施した。その結果、IWR-1 は COLO 320DM 細胞の増殖を $GI_{50} = 410$ nmol/L、SW403 細胞の増殖を $GI_{50} = 1300$ nmol/L で阻害した。一方、XAV939 はいずれの細胞においても 10 μmol/L まで細胞増殖阻害活性が 30%以下であった (Figure 24A, Figure 24B)。XAV939 は COLO 320DM 細胞の増殖は阻害しなかったが、Axin1/2 の安定化を誘導した (Figure 26)。

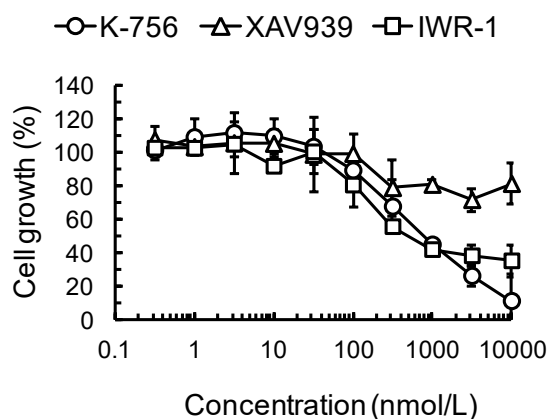
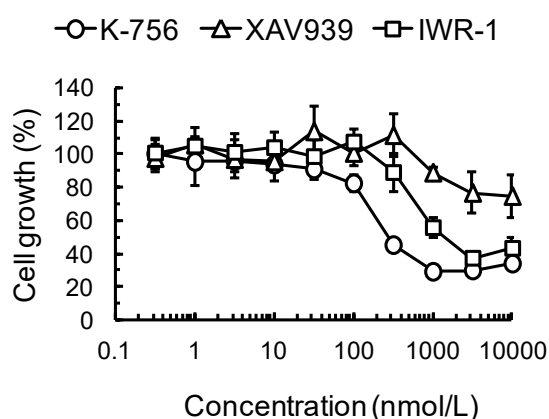
A**B**

Figure 24 The cell growth inhibition assay in COLO 320DM and SW403 cells.

K-756 and IWR-1 inhibits the cell growth of **A**, COLO320 DM and **B**, SW403 cells. XAV939 partially inhibits the cell growth of **A**, COLO320 DM and **B**, SW403 cells. Cells were seeded to 96-well plates. Next day compounds were added to the cells. After 144 h, XTT assay was performed to measure cell growth inhibitory activity. Each point represents the mean \pm S.D. (triplicate).

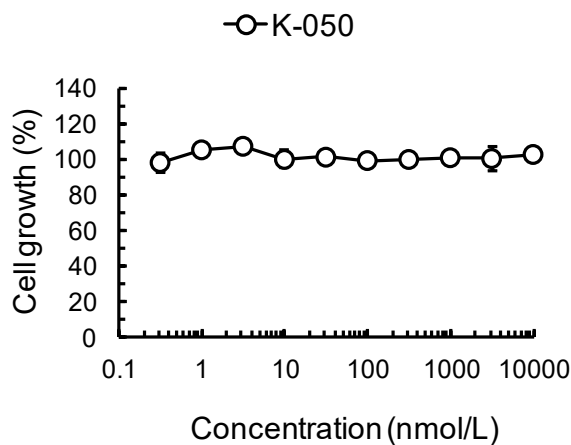


Figure 25 K-050 does not inhibit cell growth of COLO 320DM cells.

K-050, an inactive analogue of K-756 does not inhibit cell growth of COLO 320DM cells. Cells were seeded to 96-well plates. Next day compound was added to the cells. After 144 h, XTT assay was performed to measure cell growth inhibitory activity. Each point represents the mean \pm S.D. (triplicate).

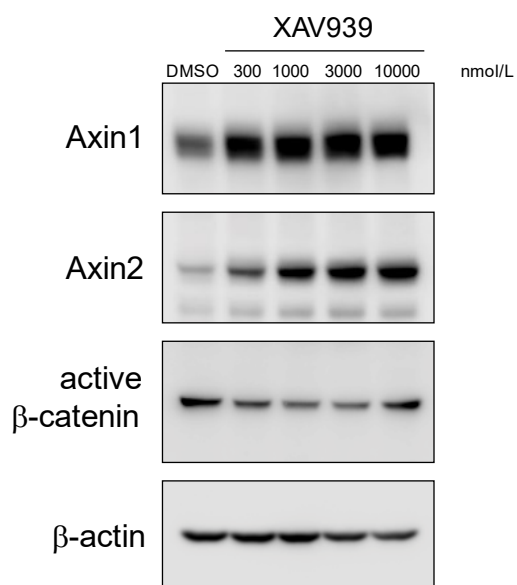
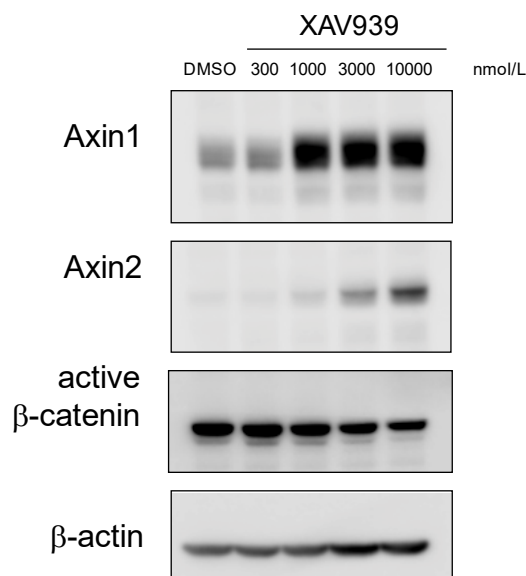
A**B**

Figure 26 Axin1/2 stabilization and active- β -catenin inhibition by XAV939 in COLO 320DM and SW403 cells.

XAV939 stabilizes Axin1 and Axin2 and decreases active β -catenin in **A**, COLO 320DM cells and **B**, SW403 cells. Cells were seeded to 10 cm dishes. Compound was added to the cells and after 24 h, cells were collected for W.B. analysis.

4.4 考察

K-756 は DLD-1/TCF-Luc 細胞の Wnt/ β -catenin 経路を阻害したが、細胞増殖を阻害しなかった。Huang らは XAV939 が低血清培地における DLD-1 細胞のコロニー形成を阻害することを報告している(22)。低血清培地で増殖した DLD-1 細胞は、EGF などの増殖因子による刺激が抑制され、Wnt/ β -catenin 経路依存的な増殖を示した可能性がある。本研究の実験条件はより一般的な抗がん作用の評価方法にしたがい、10%血清存在下で 144 h における細胞増殖阻害作用を評価した。K-756 が APC 変異 DLD-1/TCF-Luc 細胞に対して、Wnt/ β -catenin 経路阻害にも関わらず細胞増殖阻害作用を示さなかった理由としては他の増殖経路の活性化が考えられる。例えば、DLD-1/TCF-Luc 細胞は APC 変異以外にも *KRAS* 変異や *PIK3CA* 変異を有している(44)。したがって、DLD-1/TCF-Luc 細胞は Wnt/ β -catenin 経路ではなく *KRAS*/MEK/ERK 経路もしくは Akt/PI3K 経路依存的に増殖している可能性がある。

一方、K-756 は COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞の増殖を阻害した。COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞は *CTNNB1* siRNA によっても増殖が阻害されたことから、これらの細胞は Wnt/ β -catenin 経路依存的に増殖していることが明らかとなった。このように同じ APC 変異大腸がん細胞であっても、Wnt/ β -catenin 経路阻害に対して異なる感受性を示すことが明らかとなった。Scholer-Dahirel らは *CTNNB1* shRNA で *CTNNB1* をノックダウンした際に抗腫瘍効果を示す大腸がん細胞株として、LS411N 細胞及び SW403 細胞を報告した(45)。そして、これらの細胞の感受性規定因子として、野生型 *PIK3CA* の可能性を指摘している。この仮説の裏付けにはより多くの細胞株での評価が必要である。また、Wnt/ β -catenin 経路は Notch 経路及び Hedgehog 経路と並び、幹細胞の自己複製に重要な経路として知られている。腫瘍から細胞株を樹立する過程で、腫瘍中の幹細胞が失われ、これらの経路に対する依存性が失われてしまう可能性がある。したがって、細胞株化されていない腫瘍の手術検体を用いることができればより正確に Wnt/ β -catenin 経路阻害剤の抗がん作用が評価できるかもしれない。

4.5 小括

第4章では、K-756がAPC変異大腸がん細胞の増殖を阻害するか検証した。スクリーニング及び作用機構解析に使用したDLD-1/TCF-Luc細胞に対して、K-756は細胞増殖阻害作用を示さなかった。そこで、*CTNNB1* siRNAを用いてWnt/ β -catenin経路阻害に対して増殖阻害作用を示す大腸がん細胞を探索した。その結果、*CTNNB1* siRNAがCOLO 320DM細胞及びSW403細胞の細胞増殖を阻害することが判明した。これらの細胞に対するK-756の増殖阻害作用を評価する前に、K-756がWnt/ β -catenin経路を阻害するか検証したところ、K-756はWnt/ β -catenin経路下流遺伝子を変動させ、Axin1/2を安定化し、活性化型 β -cateninの発現を減少させた。続いて、細胞増殖阻害作用を評価した結果、K-756はCOLO 320DM細胞及びSW403細胞の増殖を阻害した。以上の結果より、K-756がAPC変異大腸がんに対して抗がん作用を示すことが明らかとなった。

第5章 K-756 の非小細胞肺癌細胞に対する EGFR 阻害剤との併用効果

これまでの研究結果より、K-756 は APC 変異大腸がん細胞株 COLO 320DM と SW403 に対して単剤で増殖阻害作用を示すことが明らかとなった。一方、非小細胞肺癌細胞において Casás-Selves らが、*TNKS* shRNA が EGFR 阻害剤 gefitinib と併用効果を示すことを報告した(46)。そこで、本章では非小細胞肺癌細胞に対する K-756 と EGFR 阻害剤 gefitinib の併用効果を検証した。EGFR 阻害剤は臨床において EGFR 変異の非小細胞肺癌患者に対して使用されているため、本研究においても EGFR 変異非小細胞肺癌 PC-9 細胞を検証に用いた。PC-9 細胞は *EGFR* の Exon19 に欠損変異があり、gefitinib に対して高い感受性を示す細胞である(47)。

5.1 実験材料と実験方法

5.1.1 実験材料

- RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific)
- Fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)
- Penicillin-Streptomycin (PS) (Thermo Fisher Scientific)
- PBS (Thermo Fisher Scientific)
- Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific)
- XTT reagent (Roche)
- Maxwell 16 Cell LEV Total RNA Purification Kit (Promega)
- SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit and Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- NP40 Cell Lysis Buffer (Sigma-Aldrich)
- Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich)
- Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories)
- Lane Marker Reducing Sample Buffer (5×) (Thermo Fisher Scientific)
- Running Buffer Solution (10×) for SDS - PAGE, Tris - Glycine (Nacalai Tesque)
- 20× TBS Tween-20 Buffer (Thermo Fisher Scientific)
- Supersep ACE 10% 13well (WAKO Pure Chemical)
- Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad Laboratories)
- Immobilon-P PVDF Membrane (Merck Millipore)
- Skim Milk (Nacalai Tesque)
- Anti-Axin1 antibody (Cell Signaling Technology, MA)
- Anti-Axin2 antibody (Cell Signaling Technology, MA)
- Anti-β-actin antibody (Sigma-Aldrich)
- Anti-Mouse IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment Sheep (GE Healthcare)
- Anti-Rabbit IgG, HRP-Linked F (ab')₂ Fragment Donkey (GE Healthcare)
- SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific)

5.1.2 細胞培養

ヒト非小細胞肺癌(Non Small Cell Lung Cancer; NSCLC) PC-9 は免疫生物研究所 (Nagoya, Japan)にて購入した。PC-9 細胞は 10% FBS と 1% PS を含む RPMI1640 培地を用い、37°C 5% CO₂ 存在下で培養し、継代した。細胞は 0.05% trypsin/EDTA を用いて継代した。細胞株は PowerPlex 16 STR System を用いて医薬基盤研究所にて認証された。

5.1.3 Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子変動評価

PC-9 細胞を 2×10^5 cells/well になるように 24 ウェルプレートに 1 ml で播種し、翌日 K-756 を添加した。24 h 後に Maxwell 16 Cell LEV Total RNA Purification Kit を用いて Maxwell 16 Instrument により RNA を自動精製した。培地を除去後、250 μ L の Homogenous solution を添加した。さらに 250 μ L の Lysis buffer を添加し、よくピペッティングして細胞を溶解した。カートリッジに全量の細胞溶解液を添加し、Maxwell 16 Instrument で RNA を自動精製した。Nano drop を用いて RNA 濃度を測定した。リアルタイム RT-PCR は 2.1.4 に記載した方法で実施した。

5.1.4 Axin1 のウェスタンブロッティング

PC-9 細胞を 5×10^5 cells/well になるように 6 ウェルプレートに 2 ml で播種し、翌日 K-756 を添加した。24 h 後に培地を除去し、PBS を添加しスクレイパーを用いて細胞を剥離した。細胞懸濁液を遠心 (1000 rpm、5 min) 後、PBS を除去し細胞ペレットを回収した。ウェスタンブロッティングは 2.1.5 に記載した方法にしたがった。

5.1.5 細胞増殖阻害作用評価

PC-9 細胞を 1000 cells/well になるように 96 ウェルプレートに 60 μ L で播種し、翌日 K-756 もしくは gefitinib もしくは両化合物の希釈液 40 μ L を添加した。0 h 及び 72 h 後に 50 μ L の XTT 試薬を添加し、37°C で 3 h 培養後に SpectraMax 340PC (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を用いて吸光度を測定した。

5.1.6 併用効果の解析

K-756 と gefitinib の併用効果は Calcsyn ソフトウェア (BIOSOFT、Cambridge、UK)を用いて解析した。Calcsyn ソフトウェアは Chou 及び Talalay が考案したプログラムを用いて開発された(48)。K-756 単剤及び gefitinib 単剤を添加した際の細胞増殖阻害データ、並びに両化合物を併用した際の細胞増殖阻害データを Calcsyn ソフトウェアに入力し、併用効果の指標である Combination Index (CI)を算出した。CI<1 で併用効果、CI=1 で相加効果、CI>1 で阻害効果があると定義される(48)。さらに $0.1 < CI < 0.3$ は強い併用効果と定義される。Fraction affected (Fa)は薬剤による細胞増殖阻害割合であり、Fa-CI プロットは薬剤同士の併用効果を示すプロットである。Fa-CI プロットは、Calcsyn ソフトウェアで算出し、各プロットの数値を Excel ソフトウェアにエクスポートし、併用効果の実測値とともにグラフ化した。

5.2 実験結果

5.2.1 K-756 の PC-9 細胞における Tankyrase 阻害作用

K-756 と EGFR 阻害剤 gefitinib の併用効果を評価する前に、K-756 が PC-9 細胞の Wnt/ β -catenin 経路阻害するか評価した。K-756 は PC-9 細胞の Axin1 を安定化した (Figure 27)。したがって、K-756 は PC-9 細胞の Tankyrase を阻害することが明らかとなった。なお、Axin2 の発現は認められなかった。

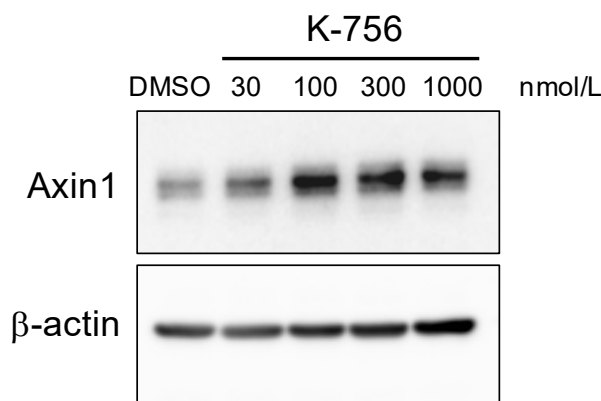
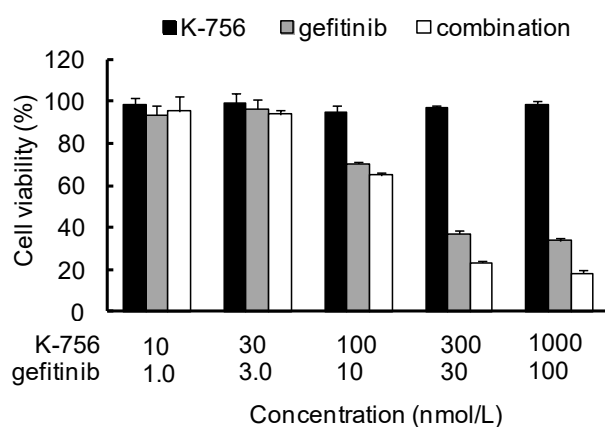
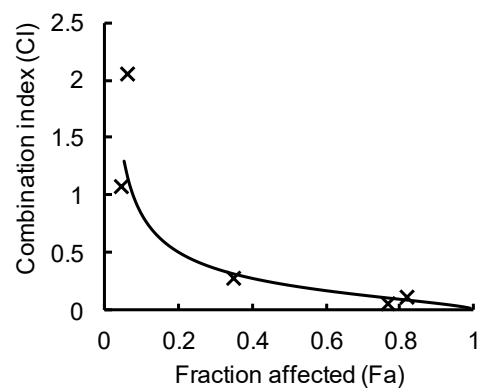


Figure 27 Axin1 stabilization by K-756 in PC-9 cells.

K-756 stabilizes Axin1 in PC-9 cells. Cells were seeded to 10 cm dishes. K-756 was added to the cells and after 24 h, cells were collected for W.B. analysis.

5.2.2 K-756 と EGFR 阻害剤 gefitinib の併用効果

K-756 と EGFR 阻害剤 gefitinib をそれぞれ添加したときと、両化合物を同時に添加したときの 72 h 後の PC-9 細胞に対する細胞増殖阻害作用を評価した。K-756 は単剤では PC-9 細胞の細胞増殖を阻害しなかった。Gefitinib は PC-9 細胞の細胞増殖を阻害したが、K-756 は 10 μ mol/L まで阻害しなかった (Figure 28A)。次に K-756 と gefitinib の併用効果を検証するため、K-756 と gefitinib を 10 対 1 の濃度比で添加した。その結果、gefitinib 単剤に対して、K-756 と gefitinib を併用すると細胞増殖阻害作用が増強された (Figure 28A)。Calculusyn ソフトウェアを用いて、50%細胞増殖阻害時の併用効果を示す CI value at ED₅₀ を算出したところ、0.21 であった (Figure 28B)。以上の結果より、K-756 と gefitinib を併用すると強い併用効果を示すことが明らかとなった。

A**B**

CI Values at		
ED ₅₀	ED ₇₅	ED ₉₀
0.21	0.11	0.05

Figure 28 Synergistic growth inhibition by gefitinib and K-756 in NSCLC cells PC-9.

K-756 shows synergistic cell growth inhibition with gefitinib. Cells were treated with K-756, gefitinib and K-756 plus gefitinib for 72 h, and cell viability was determined by XTT assay. **A**, The results at a concentration ratio of 10:1 (K-756: gefitinib) is represented as percent of cell viability in drug treated cells relative to control cells. Each column represents the mean \pm S.D. (triplicate). The combination index (CI) defining the interaction between K-756 and gefitinib at a concentration ratio of **B**, 10:1 (K-756: gefitinib) is plotted against the effect of antiproliferative activity. CI value at 50% inhibition is shown at the bottom of each graph.

5.4 考察

EGFR 変異の非小細胞肺癌に対して EGFR 阻害剤は生存期間を延長することが認められているが、治療後の再発が大きな課題となっている(49)。したがって、EGFR 阻害剤と併用効果を示し、EGFR 阻害剤の効果を持続させる薬剤は有望な治療薬として期待される。そこで、Casás-Selves らは EGFR 阻害剤 gefitinib と併用効果を示す shRNA のスクリーニングを実施し、TNKS shRNA が gefitinib と併用効果を示すことを明らかにした(46)。非小細胞肺癌細胞を移植した担がんマウスに gefitinib を投与すると腫瘍は退縮するが、投与を終えると再び増殖する。しかし、TNKS をノックダウンしたがん細胞を移植したマウスでは gefitinib 投与後の再発期間が有意に延長した(46)。併用効果のメカニズムは EGFR 経路と Wnt/ β -catenin 経路のクロストークではないかと Casás-Selves らは考察している。

本研究では、EGFR 変異非小細胞肺癌 PC-9 細胞を用いて、K-756 と gefitinib と併用効果を検証した。その結果、両化合物による併用効果が認められた。さらに、併用効果を示した濃度において、K-756 は Axin1 を安定化しており、K-756 による Tankyrase の阻害作用が gefitinib との併用効果を誘導したと推測された。なお、Casás-Selves らは CTNNB1 shRNA 及び TCF4 shRNA も TNKS shRNA と同様に gefitinib と併用効果を示すことを報告しており (46)、Wnt/ β -catenin 経路阻害が併用効果の原因であると考察している。したがって、K-756 による gefitinib との併用効果は、Tankyrase 阻害に基づく Wnt/ β -catenin 経路阻害が原因であると考えられる。

Tankyrase 阻害剤は EGFR 阻害剤以外にも MEK 阻害剤や Akt 阻害剤との併用効果が報告されている(44, 50)。いずれの併用効果もメカニズムは不明である。Wnt/ β -catenin 経路は EGFR 経路、MAPK 経路、PI3K/Akt 経路とクロストークすることが報告されているため、Wnt/ β -catenin 経路阻害が他のシグナル経路にも影響する可能性がある(50-52)。例えば、Wnt の過剰発現が EGFR 経路を活性化し、EGFR 変異のがん細胞では β -catenin の核への蓄積が上昇している、EGFR が PI3K/Akt 経路を介して β -catenin を活性化することが報告されている(51)。K-756 による Wnt/ β -catenin 経路阻害が gefitinib と併用効果を示すメカニズム解析は今後の研究課題である。

5.5 小括

第 5 章では、EGFR 変異非小細胞肺癌 PC-9 細胞に対する K-756 と EGFR 阻害剤 gefitinib との併用効果を検討した。K-756 は PC-9 細胞の Axin1 を安定化したことから、PC-9 細胞の Tankyrase を阻害することが認められた。続いて、K-756 と gefitinib を 10 対 1 の濃度比率で PC-9 細胞に添加したところ、細胞増殖阻害に対する強い併用効果が認められた。以上の結果より、K-756 は単剤では PC-9 細胞に対して細胞増殖阻害を誘導しないが、gefitinib との併用療法により非小細胞肺癌に対して抗がん作用を示すことが明らかとなった。

第6章 K-756 の *in vivo*における Wnt/ β -catenin 経路阻害作用

これまで *in vitro* における K-756 の Wnt/ β -catenin 経路阻害を検証してきた。本章では、K-756 の *in vivo* における Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を検証した。

6.1 実験材料と実験方法

6.1.1 実験材料

- RPMI 1640(Thermo Fisher Scientific)
- Fetal bovine serum (FBS) (Thermo Fisher Scientific)
- HEPES (1M), PH7.2-7.5 (Thermo Fisher Scientific)
- Pyruvate Solution (Thermo Fisher Scientific)
- D-(+)-Glucose Solution (45%) (Sigma-Aldrich)
- Penicillin-Streptomycin (PS) (Thermo Fisher Scientific)
- PBS (Thermo Fisher Scientific)
- Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific)
- Hygromycin B (WAKO Pure Chemical)
- Bright-Glo luciferase assay system (Promega)
- RNeasy mini Kit (QIAGEN)
- RNase-Free DNase set (QIAGEN)
- QIAshredder (QIAGEN)
- 2-mercaptoethanol (Nacalai tesque)
- SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit and Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)
- Albumin, Bovine (Nacalai tesque)
- Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad)
- 1.5 g/L potassium dihydrogen phosphate (Nacalai tesque)
- 1 mL/L Triton X-100 (Sigma-Aldrich)
- 5 mol/L potassium hydroxide solution (WAKO Pure Chemical)
- 0.5% MC400 (WAKO Pure Chemical)

6.1.2 細胞培養

レポーター細胞株 DLD-1/TCF-Luc の培養方法は 2.1.2 に記載した。

6.1.3 投与試験

SCID マウス (C.B.17/Icr-scid/scidJcl、♂、5 週齢) は、日本クレア株式会社から購入した。5 日間の馴化飼育の後に、前日にバリカンで毛刈りをしておいたマウスの腹側皮下に、PBS に懸濁した DLD-1/TCF-Luc 細胞を、 5×10^6 cells/0.1 mL/マウス移植した。移植後 13 日目に、腫瘍体積が 236.38 から 595.80 mm³ までのマウス (平均 \pm SD = 420.89 \pm 98.21 mm³) を選択し、Microsoft Office Excel 2003 を用いて、各群の平均腫瘍体積がほぼ等しくなるように

12 群（1 群 5 匹）に群分けした。腫瘍体積は、以下の式で計算した。

腫瘍体積 = 腫瘍長径 × 腫瘍短径 × 腫瘍短径 × 1/2

群分けの翌日に、投与溶媒（0.5% MC400）または被験薬物（K-756 : 100, 200, 400 mg/kg）を 1 日 1 回、3 日間連続で経口投与した。投与用量は、0.01 mL/g body weight とし、使い捨ての 1 mL シリンジ及び経口ゾンデを用いた。最終投与の 25 時間後から、腫瘍を回収し、液体窒素中で急速凍結した。

6.1.4 腫瘍中の Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子発現阻害評価

mRNA の回収には、RNeasy mini Kit を用いた。凍結した腫瘍の重量を測定し、腫瘍重量 20 mg あたり 1 mL の buffer RLT（buffer RLT 1 mL あたり 10 μ L の 2-mercaptoethanol 含有）中で腫瘍をホモジナイズした。ホモジナイズ後、サンプルを QIAshredder に添加し、室温で遠心（15000 rpm、2 min）し、QIAshredder の通過画分を、RNeasy spin column に添加し、さらに遠心（15000 rpm、1 min）した。通過画分は廃棄し、RNeasy spin column に 350 μ L Buffer RW1 を添加し、遠心（15000 rpm、15 sec）した。通過画分は廃棄し、DNase I 溶液 80 μ L を RNeasy spin column に添加し、室温で 15 min 静置した。350 μ L Buffer RW1 を添加し、遠心（15000 rpm、15 sec）した。通過画分は廃棄し、RNeasy spin column に 500 μ L Buffer RPE を添加し、遠心（15000 rpm、15 sec）した。通過画分は廃棄し、RNeasy spin column に 500 μ L Buffer RPE を添加し、遠心（15000 rpm、2 min）した。通過画分は廃棄し、RNeasy spin column を新しい 2 mL エッペンチューブに設置し、遠心（15000 rpm、1 min）した。通り抜けた画分は廃棄し、RNeasy spin column を新しい 1.5 mL エッペンチューブに設置し、滅菌済み精製水を 50 μ L 添加し、室温に 1 min 静置した。遠心（15000 rpm、1 min）し、カラム中の RNA を溶出した。リアルタイム RT-PCR は 2.1.4 に記載した方法にしたがった。プライマーは以下を用いた。

GAPDH : TaqMan Gene Expression Assays, Assay ID: Hs99999905_m1

FGF20 : TaqMan Gene Expression Assays, Assay ID: Hs00173929_m1

各サンプルの *FGF20* の発現量は、以下の式で補正した。

遺伝子補正後の値 = 遺伝子発現量 ÷ *GAPDH* 発現量

補正後の値を用いて、各群の遺伝子発現量の平均値及び S.E. を求めた。Vehicle 処理群対比の遺伝子発現量は、各群の遺伝子発現量の平均値及び S.E. を vehicle 処理群の遺伝子発現量の平均値で除することで計算した。

6.1.5 腫瘍中の Wnt/ β -catenin 経路レポーター阻害活性評価

Lysis buffer は、1.5 g/L リン酸 2 水素カリウム、1 mL/L Triton X-100 を適当量の蒸留水に溶解させた後に、5 mol/L の水酸化カリウム溶液で pH 7.8 に調整した。最終的に、蒸留水で 1 L にメスアップしたものを、10 倍液として保存し、使用時に、蒸留水で 10 倍希釈して使用した。凍結した腫瘍の重量を測定し、腫瘍重量 20 mg あたり 1 mL の lysis buffer 中で腫瘍をホモジナイズした。サンプルを 4°C で遠心（15000 rpm、10 min）し、上清を回収した。タンパク質定量を行った後に、0.25 μ g/ μ L になるように、Lysis buffer で希釈した後に、40 μ L/well ずつ 96 well plate（PerkinElmer）に分注した。Lysis buffer で 3 倍希釈した Bright-Glo

Assay Reagent を 20 μ L/well 加え攪拌したのちに、TopCount NXT (PerkinElmer) で、レポーター活性を測定した。Vehicle 処理群対比のレポーター活性は、各群のレポーター活性の平均値及び S.E.を、vehicle 処理群のレポーター活性の平均値で除することで計算した。

6.1.6 統計解析

Vehicle 処理群に対する薬剤処理群のレポーター活性及び *FGF20* の発現量は、一元配置分散分析 (one-way ANOVA) 後に、ダネットの検定を実施して有意差検定をした。統計解析は Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, NC)を用いて実施した。

6.2 実験結果

6.2.1 K-756 による *in vivo* Wnt/ β -catenin 経路レポーター阻害活性

K-756 が *in vivo* においても Wnt/ β -catenin 経路を阻害するか検証するため、SCID マウスを用いて、DLD-1/TCF-Luc ゼノグラフトマウスモデルを作製した。Vehicle (0.5% MC400) もしくは K-756 100、200、400 mg/kg を 1 日 1 回、3 日間連続で投与した。最終投与の 25 h 後に腫瘍を回収し、K-756 による *in vivo* レポーター阻害活性を検討した。回収された腫瘍からタンパク質を抽出し、タンパク質濃度を均一にし、レポーター活性を測定した。その結果、投与量依存的な阻害作用が認められた (Figure 29)。

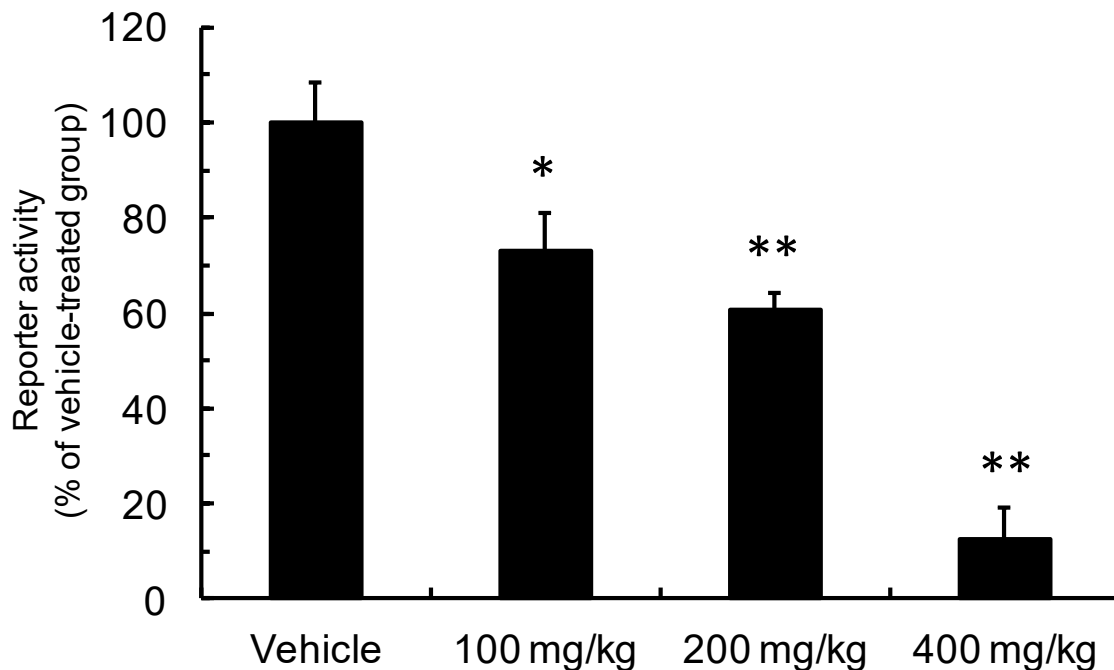


Figure 29 K-756 inhibits TCF-Luc reporter activity in DLD-1/TCF-Luc cell xenograft tumors.

K-756 inhibits TCF-Luc reporter activity in DLD-1/TCF-Luc cell xenograft tumors. Mice were subcutaneously implanted with DLD-1/TCF-Luc cells. After 14 days, 0.5% MC 400 or K-756 was orally administered to the mice once a day for 3 days. Twenty-five h after the last administration, the tumors were collected from the mice; after protein lysis, a reporter assay was performed. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 5$); the asterisks indicate a statistically significant difference in comparison to the vehicle treated group (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$) in a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test.

6.2.2 K-756 による *in vivo* Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子発現阻害

K-756 が内在性の Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子を阻害するか検証するため、6.2.1 で回収した腫瘍から mRNA を抽出した。リアルタイム RT-PCR を実施し、Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子である *FGF20* の発現を測定した。その結果、*FGF20* の発現は 100 mg/kg 投与群から顕

著に減少した (Figure 30) 。最大阻害活性は K-756 の 400 mg/kg 群において認められた。

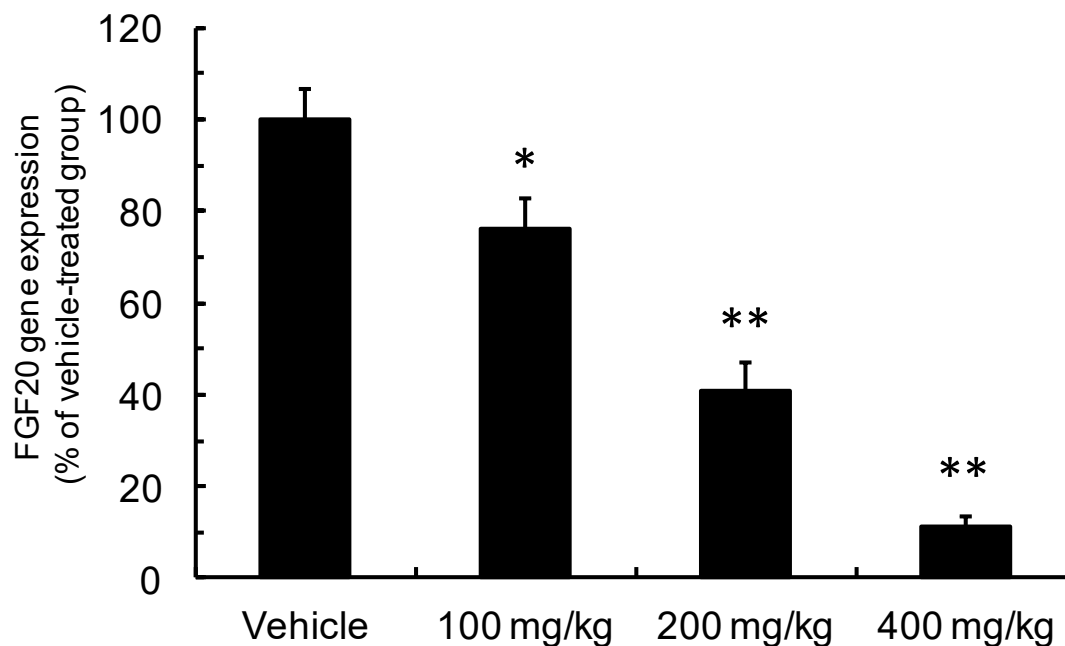


Figure 30 K-756 inhibits Wnt/ β -catenin downstream *FGF20* expression in DLD-1/TCF-Luc cell xenograft tumors.

K-756 inhibits the *FGF20* expression downstream of Wnt/ β -catenin in DLD-1/TCF-Luc cell xenograft tumors. The tumors were prepared and collected as previously described. RNA was extracted from the tumor; after mRNA extraction, an RT-PCR was performed. Each column represents the mean \pm S.E. ($n = 5$); the asterisks indicate a statistically significant difference in comparison to the vehicle treated group (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$) in a one-way ANOVA followed by a Dunnett's test.

6.3 考察

K-756 は経口投与により、マウスの皮下に移植した DLD-1/TCF-Luc 細胞の Wnt/ β -catenin 経路を阻害した。これまでに報告されている代表的な Tankyrase 阻害剤 XAV939 や IWR-1 は代謝不安定な Tankyrase 阻害剤であり、*in vivo* における薬理評価は報告されていない。XAV939 は溶解性と、ラットの肝ミクロソームにおける安定性が低く、*in vivo* では十分な曝露が得られないことが推測された(53)。IWR-1 のマウス血中における半減期が 60 min であり、その代謝産物の解析から IWR-1 のアミド基が分解されることが報告された(54)。*in vivo* の研究が最も進んでいる Tankyrase 阻害剤 G007-LK は経口投与ではなく、腹腔内投与で実験に使用された(44)。したがって、Tankyrase 阻害剤の *in vivo* における作用の解明は十分ではなく、K-756 のような経口投与可能な Tankyrase 阻害剤は Tankyrase のがんにおける役割を明らかにする上でも必要なツールとなり得る。抗がん剤開発のリード化合物としても、経口投与可能な化合物であることは大きなメリットとなる。

6.4 小括

第6章ではK-756の*in vivo*薬理作用を検証した。DLD-1/TCF-Luc細胞を移植し腫瘍を形成させたSCIDマウスにK-756を経口投与した。腫瘍を回収し、Wnt/ β -catenin経路レポーター活性とWnt/ β -catenin経路下流遺伝子である*FGF20*の発現を評価した。その結果、K-756は100 mg/kg投与群から濃度依存的にレポーター活性と*FGF20*の発現を有意に阻害した。したがって、K-756は経口投与可能な選択的Tankyrase阻害剤として抗がん剤開発のためのリード化合物になることが示唆された。

総括

本研究では、大腸がんで異常な活性化が認められる Wnt/ β -catenin 経路を阻害する低分子化合物を取得するため、TCF 結合配列を用いたレポーターアッセイ系を構築し、ケミカルライブラリーを用いたスクリーニングを実施した。その結果、新規 Wnt/ β -catenin 経路阻害剤 K-756 を見出した。遺伝子発現変動プロファイル解析により、K-756 が APC 変異 DLD-1 細胞の内在性 Wnt/ β -catenin 経路を選択的に阻害することが明らかとなった。さらに K-756 は Axin1/2 の発現を安定化することで、活性化型 β -catenin の分解を促進し、TCF/ β -catenin 転写複合体による Wnt/ β -catenin 経路下流遺伝子の発現を抑制することが判明した。

次に K-756 の標的同定を実施したところ、K-756 は PARP ファミリーに属する Tankyrase の酵素活性を阻害することが明らかとなった。さらに複合体構造解析の結果から、K-756 が Tankyrase1 の induced ポケットに結合することが明らかとなった。K-756 は他の PARP ファミリーの酵素活性は阻害しないことから、Tankyrase 選択的な阻害剤であることが判明した。

K-756 の大腸がん細胞に対する抗がん作用を検証するため、APC 変異 COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞に対する細胞増殖阻害作用を検討した。その結果、K-756 は COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞に対して、細胞増殖阻害作用を誘導した。このとき、K-756 は COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞の Wnt/ β -catenin 経路の発現を阻害し、Axin1/2 を安定化させた。したがって、K-756 は COLO 320DM 細胞及び SW403 細胞の Wnt/ β -catenin 経路を阻害することで、細胞増殖を阻害することが明らかとなった。

K-756 のさらなる抗がん剤としての可能性を追求するために、K-756 の非小細胞肺がんに与える影響を検討した。EGFR 変異非小細胞肺がん PC-9 細胞で K-756 と EGFR 阻害剤 gefitinib を同時添加した結果、K-756 は gefitinib による細胞増殖阻害作用を増強した。K-756 と gefitinib の添加濃度が 10 対 1 のときの CI values at ED₅₀ = 0.21 であり、K-756 は gefitinib と強い併用効果を示すことを見出した。

最後に K-756 を用いた *in vivo* における Wnt/ β -catenin 経路阻害作用を評価した結果、連日投与の 3 日目において、K-756 100 mg/kg 投与群から顕著な腫瘍中の Wnt/ β -catenin 経路阻害作用が認められた。

以上のように本研究で見出された新規 Tankyrase 選択的阻害剤 K-756 は単剤において大腸がん、そして EGFR 阻害剤との併用において非小細胞肺がんに対して抗がん作用を示した。今後は K-756 をリード化合物として、より活性が強い誘導体の創製が期待される。さらに K-756 は Tankyrase や Wnt/ β -catenin 経路のがんにおける機能の解明においても有用な実験ツールとなり得る。

今後の研究課題としては、Wnt/ β -catenin 経路阻害剤が効果を示すことが報告されている乳がん、メラノーマ、膵臓がん(20, 21, 55, 56)などの異なるがん種における K-756 の作用が挙げられる。例えば、TCF/ β -catenin 結合阻害剤 PKF118-310 や Wnt 翻訳後修飾を制御する Porcupine 阻害剤 LGK974 は乳がんに対して抗腫瘍効果を示した(55, 21)。抗 Wnt2 抗体はメラノーマに対して抗腫瘍効果を示した(56)。抗 Frizzled 抗体は膵臓がんに対して抗腫瘍効果を示した(20)。したがって、K-756 についてもこれらのがんに対して単剤で抗がん作用を示す可

能性がある。K-756はEGFR阻害剤と併用効果を示したが、他のTankyrase阻害剤で報告されているMEK阻害剤やAkt阻害剤の併用効果(44, 50)についても検討する必要がある。併用効果を示すメカニズムについても明らかにすることができれば、Wnt/ β -catenin経路のがん細胞における新たな機能を発見できる可能性がある。

本研究ではK-756の抗がん作用を*in vitro*の細胞増殖阻害作用で評価したが、*in vivo*の腫瘍に対してはより多様な作用が期待される。例えば、Wnt/ β -catenin経路は細胞分化、腫瘍を取り巻く線維芽細胞の浸潤や血管新生そして抗腫瘍免疫に対しても影響を与える可能性が指摘されている(57-60)。

Wnt/ β -catenin経路を阻害するTankyrase阻害剤を抗がん剤として開発するための懸念事項として、毒性が挙げられる。Wnt/ β -catenin経路は正常な腸管上皮細胞のcryptにおける幹細胞の維持に重要なことが知られており(1)、Wnt経路を阻害するDKK1の過剰発現トランスジェニックマウスではcrypt形成阻害に伴う腸管毒性が報告されている(61)。さらにLauらはTankyrase阻害剤G007-LKを用いた抗腫瘍試験において、高容量を投与したマウスで腸管毒性が認められたことを報告している(44)。一方、Wnt/ β -catenin経路阻害剤である抗Frizzled抗体OMP18R5(20)やPorcupine阻害剤LGK974(21)は臨床試験に進んでいることから、非臨床モデルにおいては安全域が確保できたことが推測される。このことから、Wnt/ β -catenin経路阻害剤が一樣に腸管毒性を示すかどうかは現時点では判断できない。また、G007-LKの腸管毒性がすべてのTankyrase阻害剤に認められる現象なのか、G007-LKの構造特有の現象なのか、は不明である。したがって、K-756の薬効試験においては、薬効とともに毒性についても慎重に検討し、安全域が認められるかどうか慎重に検討する必要がある。

謝辞

本研究において終始熱心な御指導と御鞭撻を賜りくださった静岡県立大学大学院薬学研究院教授 浅井章良先生に心より感謝申し上げます。

本論文に関して審査及び御指導、御助言を賜りました静岡県立大学大学院薬学研究院教授 石川智久先生、奥直人先生、橋本博先生に心より感謝致します。

本論文の作成にあたり、貴重な御助言をいただきました静岡県立大学大学院薬学研究院講師 小郷尚久先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行、本論文の作成に際して、多大な御協力いただいた協和発酵キリン株式会社 研究開発本部 中井龍一郎主任研究員、高橋雄一研究員、渡部康雄研究員、石田広志主任研究員、齋藤純一主任研究員、鈴木道彦主任研究員に心より感謝申し上げます。

本論文の作成に際して、御協力、御助言をいただきました静岡県立大学大学院薬学研究院 創薬探索センターのメンバーに感謝いたします。

最後に研究生活を支えてくれた家族に心から感謝いたします。

参考文献

1. Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006;127:469–80.
2. Sharma RP. Wingless - a new mutant in *D. melanogaster*. *D.I.S.* 1973. page 134.
3. Nusse R, Varmus HE. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*. 1982;31:99–109.
4. Nusse R, Brown A, Papkoff J, Scambler P, Shackleford G, McMahon A, et al. A new nomenclature for int-1 and related genes: The Wnt gene family. *Cell*. 1991;64:231.
5. Ashton-Rickardt PG, Dunlop MG, Nakamura Y, Morris RG, Purdie CA, Steel CM, et al. High frequency of APC loss in sporadic colorectal carcinoma due to breaks clustered in 5q21-22. *Oncogene*. 1989;4:1169–74.
6. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*. 1991;66:589–600.
7. Novellademunt L, Antas P, Li VSW. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A review in the theme: Cell signaling: Proteins, pathways and mechanisms. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 2015;309:C511–21.
8. van Noort M, Clevers H. TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer. *Dev Biol*. 2002;244:1–8.
9. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*. 1998;281:1509–12.
10. Kim PJ, Plescia J, Clevers H, Fearon ER, Altieri DC. Survivin and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Lancet*. 2003;362:205–9.
11. Chamorro MN, Schwartz DR, Vonica A, Brivanlou AH, Cho KR, Varmus HE. FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J*. 2005;24:73–84.
12. Jubb AM, Chalasani S, Frantz GD, Smits R, Grabsch HI, Kavi V, et al. Achaete-scute like 2 (*ascl2*) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia. *Oncogene*. 2006;25:3445–57.
13. Birkenkamp-Demtroder K, Maghnouj A, Mansilla F, Thorsen K, Andersen CL, Øster B, et al. Repression of KIAA1199 attenuates Wnt-signalling and decreases the proliferation of colon cancer cells. *Br J Cancer*. 2011;105:552–61.
14. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC. Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res*. 2001;61:6050–4.
15. Nadauld LD, Phelps R, Moore BC, Eisinger A, Sandoval IT, Chidester S, et al. Adenomatous polyposis coli control of C-terminal binding protein-1 stability regulates expression of intestinal retinol dehydrogenases. *J Biol Chem*. 2006;281:37828–35.
16. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, et al. The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 1999;96:5522–7.
17. Kimelman D, Xu W. Beta-catenin destruction complex: Insights and questions from a

- structural perspective. *Oncogene*. 2006;25:7482–91.
18. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 2000;14:1837–51.
 19. Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:387–98.
 20. Gurney A, Axelrod F, Bond CJ, Cain J, Chartier C, Donigan L, et al. Wnt pathway inhibition via the targeting of Frizzled receptors results in decreased growth and tumorigenicity of human tumors. *Proc Natl Acad Sci*. 2012;109:11717–22.
 21. Liu J, Pan S, Hsieh MH, Ng N, Sun F, Wang T, et al. Targeting Wnt-driven cancer through the inhibition of Porcupine by LGK974. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110:20224–9.
 22. Huang S-MA, Mishina YM, Liu S, Cheung A, Stegmeier F, Michaud GA, et al. Tankyrase inhibition stabilizes axin and antagonizes Wnt signalling. *Nature*. 2009;461:614–20.
 23. Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan C-W, et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol*. 2009;5:100–7.
 24. Waaler J, Machon O, Tumova L, Dinh H, Korinek V, Wilson SR, et al. A novel tankyrase inhibitor decreases canonical Wnt signaling in colon carcinoma cells and reduces tumor growth in conditional APC mutant mice. *Cancer Res*. 2012;72:2822–32.
 25. Smith S. Tankyrase, a poly(ADP-Ribose) polymerase at human telomeres. *Science*. 1998;282:1484–7.
 26. Riffell JL, Lord CJ, Ashworth A. Tankyrase-targeted therapeutics: expanding opportunities in the PARP family. *Nat Rev Drug Discov*. 2012;11:923–36.
 27. Callow MG, Tran H, Phu L, Lau T, Lee J, Sandoval WN, et al. Ubiquitin ligase RNF146 regulates tankyrase and Axin to promote Wnt signaling. *PLoS One*. 2011;6:e22595.
 28. Korinek V. Constitutive transcriptional activation by a beta-Catenin-Tcf Complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science*. 1997;275:1784–7.
 29. Nomoto Y, Obase H, Takai H, Hirata T, Teranishi M, Nakamura J, et al. Studies on cardiotonic agents. I. Synthesis of some quinazoline derivatives. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1990;38:1591–5.
 30. Takai H, Obase H, Teranishi M, Karasawa A, Kubo K, Shuto K, et al. Synthesis of piperidine derivatives with a quinazoline ring system as potential antihypertensive agents. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1986;34:1907–16.
 31. Yang J, Zhang W, Evans PM, Chen X, He X, Liu C. Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. *J Biol Chem*. 2006;281:17751–7.
 32. Lee E, Salic A, Krüger R, Heinrich R, Kirschner MW. The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol*. 2003;1:e10.
 33. Otwinowski Z, Minor W. Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol*. 1997;276:307–26.
 34. Collaborative Computational Project N 4. The CCP4 suite: programs for protein

- crystallography. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 1994;50:760–3.
35. McCoy AJ, Grosse-Kunstleve RW, Adams PD, Winn MD, Storoni LC, Read RJ. Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr*. 2007;40:658–74.
 36. Murshudov GN, Skubák P, Lebedev AA, Pannu NS, Steiner RA, Nicholls RA, et al. REFMAC 5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr*. 2011;67:355–67.
 37. Shultz MD, Kirby CA, Stams T, Chin DN, Blank J, Charlat O, et al. [1,2,4]Triazol-3-ylsulfanylmethyl-3-phenyl-[1,2,4]oxadiazoles: antagonists of the Wnt pathway that inhibit tankyrases 1 and 2 via novel adenosine pocket binding. *J Med Chem*. 2012;55:1127–36.
 38. Bregman H, Gunaydin H, Gu Y, Schneider S, Wilson C, Dimauro EF, et al. Discovery of a class of novel tankyrase inhibitors that bind to both the nicotinamide pocket and the induced pocket. *J Med Chem*. 2013;56:1341–5.
 39. Narwal M, Venkannagari H, Lehtiö L. Structural basis of selective inhibition of human tankyrases. *J Med Chem*. 2012;55:1360–7.
 40. Gunaydin H, Gu Y, Huang X. Novel binding mode of a potent and selective tankyrase inhibitor. *PLoS One*. 2012;7:e33740.
 41. Hua Z, Bregman H, Buchanan JL, Chakka N, Guzman-Perez A, Gunaydin H, et al. Development of novel dual binders as potent, selective, and orally bioavailable tankyrase inhibitors. *J Med Chem*. 2013;56:10003–15.
 42. Fong PC, Boss DS, Yap TA, Tutt A, Wu P, Mergui-Roelvink M, et al. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers. *N Engl J Med*. 2009;361:123–34.
 43. Karlberg T, Markova N, Johansson I, Hammarström M, Schütz P, Weigelt J, et al. Structural basis for the interaction between Tankyrase2 and a potent Wnt-signaling inhibitor. *J Med Chem*. 2010;53:5352–5.
 44. Lau T, Chan E, Callow M, Waaler J, Boggs J, Blake RA, et al. A novel tankyrase small-molecule inhibitor suppresses APC mutation-driven colorectal tumor growth. *Cancer Res*. 2013;73:3132–44.
 45. Scholer-Dahirel A, Schlabach MR, Loo A, Bagdasarian L, Meyer R, Guo R, et al. Maintenance of adenomatous polyposis coli (APC)-mutant colorectal cancer is dependent on Wnt/ β -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108:17135–40.
 46. Casas-Selves M, Kim J, Zhang Z, Helfrich BA, Gao D, Porter CC, et al. Tankyrase and the canonical Wnt pathway protect lung cancer cells from EGFR inhibition. *Cancer Res*. 2012;72:4154–64.
 47. Ono M, Hirata A, Kometani T, Miyagawa M, Ueda S, Kinoshita H, et al. Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation. *Mol Cancer Ther*. 2004;3:465–72.
 48. Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism

- and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 2006;58:621–81.
49. Reck M, Popat S, Reinmuth N, De Ruyscher D, Kerr KM, Peters S. Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014;25:iii27–39.
 50. Tenbaum SP, Ordóñez-Morán P, Puig I, Chicote I, Arqués O, Landolfi S, et al. β -catenin confers resistance to PI3K and AKT inhibitors and subverts FOXO3a to promote metastasis in colon cancer. *Nat Med.* 2012;18:892–901.
 51. Paul I, Bhattacharya S, Chatterjee A, Ghosh MK. Current understanding on EGFR and Wnt/ β -Catenin signaling in glioma and their possible crosstalk. *Genes Cancer.* 2013;4:427–46.
 52. Hu T, Li C. Convergence between Wnt- β -catenin and EGFR signaling in cancer. *Mol Cancer.* 2010;9:236.
 53. Shultz MD, Cheung AK, Kirby CA, Firestone B, Fan J, Chen CH-T, et al. Identification of NVP-TNKS656: The use of structure–efficiency relationships to generate a highly potent, selective, and orally active tankyrase inhibitor. *J Med Chem.* 2013;56:6495–511.
 54. Lu J, Ma Z, Hsieh JC, Fan CW, Chen B, Longgood JC, et al. Structure-activity relationship studies of small-molecule inhibitors of Wnt response. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2009;19:3825–7.
 55. Hallett RM, Kondratyev MK, Giacomelli AO, Nixon AML, Girgis-Gabardo A, Ilieva D, et al. Small molecule antagonists of the Wnt/ β -catenin signaling pathway target breast tumor-initiating cells in a Her2/Neu mouse model of breast cancer. *PLoS One.* 2012;7:e33976.
 56. You L. An Anti-Wnt-2 Monoclonal Antibody Induces Apoptosis in malignant melanoma cells and inhibits tumor growth. *Cancer Res.* 2004;64:5385–9.
 57. Dow LE, O'Rourke KP, Simon J, Tschaharganeh DF, van Es JH, Clevers H, et al. Apc restoration promotes cellular differentiation and reestablishes crypt homeostasis in colorectal cancer. *Cell.* 2015;161:1539–52.
 58. Carstens JL, Shahi P, Van Tsang S, Smith B, Creighton CJ, Zhang Y, et al. FGFR1-WNT-TGF- signaling in prostate cancer mouse models recapitulates human reactive stroma. *Cancer Res.* 2014;74:609–20.
 59. Newman AC, Hughes CCW. Macrophages and angiogenesis: a role for Wnt signaling. *Vasc Cell.* 2012;4:13.
 60. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic β -catenin signalling prevents anti-tumour immunity. *Nature.* 2015;523:231–5.
 61. Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium. *Genes Dev.* 2003;17:1709–13.