

**【目的】** 大腸がんや肝がんでは、高頻度に Wnt シグナルの活性化が発がん重要な役割を演じている。Wnt シグナルを阻害する薬剤は有望な抗がん剤になるとのプルーフ・オブ・コンセプトが得られているが、これまでに上市に至った化合物はない。我々は Wnt シグナルを阻害する化合物を探索するための新規レポーターアッセイを開発し、試験的なスクリーニングを行ったところ、ヒット化合物として Brefeldin A (BFA) が得られた。そこで本研究では、BFA の Wnt シグナルへの影響を確認するとともに、その機序を明らかにすることを目的としている。また新たな化合物ライブラリーをスクリーニングし、新規抗がん剤開発へと繋げることを目的としている。

**【方法】** 1. Wnt 活性に応じて変動する 2 種類のレポータープラスミド TOP-Flash reporter plasmid (TOPFLASH-Rluc) および histidine ammonia-lyase (HAL) reporter plasmid (pHALx8-minFluc) を作製し、Dual Luciferase Assay を行った。2. HepG2 細胞に化合物を投与後 24 時間にタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットにて Wnt シグナル関連分子の発現を解析した。3. 化合物投与後 48 時間に RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析と、発現変動遺伝子群によるパスウェイ解析を実施した。

**【結果】** レポーターアッセイの結果、BFA は TOP-Flash のレポーター活性を抑制するとともに *AXIN2*, *LGR5* の発現を低下させた。加えて BFA は HepG2 細胞において野生型および変異型  $\beta$ -catenin タンパク質の量を減少させた。これらの結果から、BFA は  $\beta$ -catenin タンパク質の低下を介して Wnt シグナルを抑制することが示唆された。

マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現解析の結果、BFA は Golgi 機能関連分子に加え、Wnt パスウェイにも有意な変動をもたらした。Golgi 阻害剤の中で GBF1 阻害作用がある BFA と GCA は  $\beta$ -catenin タンパク質を減少させたが、GBF1 阻害作用がない Exo1 は低下させなかった。

更に 2 万化合物のスクリーニングを実施し、新たに Wnt シグナル阻害化合物候補 139 種類を同定した。

BFA による TOP-Flash レポーター活性低下と下流遺伝子の発現抑制

