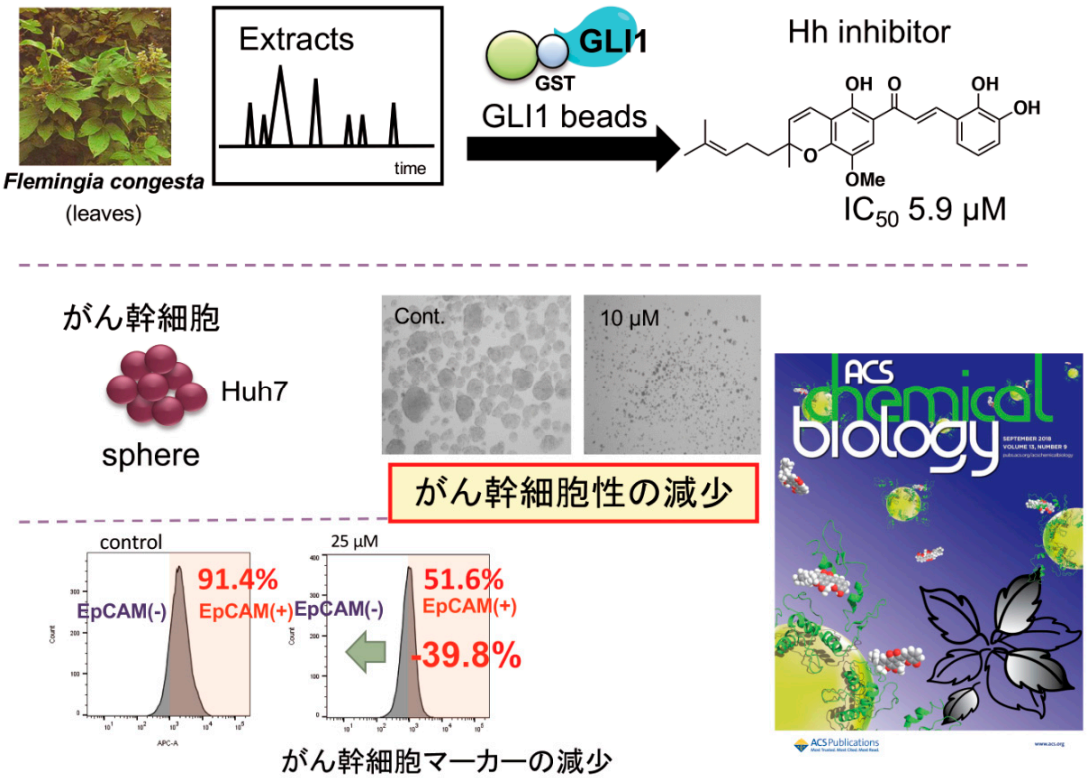
1　生死の天秤シグナルを制御する天然基盤小分子の創成	荒井　緑

【目的】生体の健常状態か疾病状態かは、生命の鍵となるシグナル伝達が正常か異常かに作用される場合が多々ある。たとえば発生・分化で重要なシグナルがコンポーネントの変異等によりひとたび異常亢進するとがんに繋がる。本研究では生死のバランスを保っている重要シグナル（ヘッジホッグ（Hh）シグナル、Notch-Hes シグナル、ウィント（Wnt）シグナル等、以下、生死の天秤シグナルと呼ぶ）を標的とし、その効果的モジュレーターを研究室独自の植物、放線菌エキスライブラリーおよび千葉化合物ライブラリーから見いだすことを目的とする。手法としては、我々が近年構築し提唱してきた「タンパク質ビーズ」を用いる「標的タンパク質指向型単離法」および独自に構築した細胞レポーターアッセイを用いる。得られた化合物の細胞に及ぼす影響を精査し、新規な医薬リード候補を創出することを目的とする。
【方法】「標的タンパク質指向型単離法」は、「タンパク質ビーズ」を用いて天然素材のエキス（天然物の混合物）から標的タンパク質に結合する化合物を迅速に見いだす方法である。今回、我々は、生死の天秤シグナルの一つであるヘッジホッグ（Hh）シグナルの阻害剤を見いだすことを目的とし、その転写因子である glioma-associated oncogene（GLI1）を担持した GLI1 ビーズを用いて、GLI1 を直接的に阻害する天然物を探索した。
【結果】GLI1 ビーズを用いる「標的タンパク質指向型単離法」を構築し、天然物エキスをスクリーニングしたところ、バングラデシュ植物 *Flemingia congesta* のエキスがヒットした。本エキスより、GLI1 に結合し、Hh シグナルを阻害するカルコン型天然物 5 種の単離に成功した。そのうち化合物 **2** は、Hh シグナルが異常亢進している種々がん細胞に対し、細胞毒性を示した。また化合物 **2** は GLI1 と DNA の複合体形成を阻害した。さらに化合物 **2** は、Hh シグナル関連タンパク質である B cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion region 1（BMI1）のタンパク質量を減少させ、肝がん細胞（Huh 7）の「がん幹細胞性」を著しく減少させた。このように今回、GLI1 ビーズを用いる「標的タンパク質指向型単離法」により、「がん幹細胞性」を減少させる Hh 阻害剤を見いだすことに成功した。

標的タンパク質指向型天然物単離によるヘッジホッグシグナル阻害剤の探索



1. 生死の天秤シグナルを制御する天然基盤小分子の創成

荒井　緑

千葉大学 大学院薬学研究院 活性構造化学研究室

Key words：天然物，がん，ヘッジホッグシグナル，阻害剤，タンパク質ビーズ

緒　言

生体の健常状態か疾病状態かは、生命の鍵となるシグナル伝達が正常か異常かに作用される場合が多々ある。たとえば発生・分化で重要なシグナルがコンポーネントの変異等によりひとたび異常亢進するとがんに繋がる。本研究では生死のバランスを保っている重要シグナル（ヘッジホッグ（Hh）シグナル、Notch-Hes シグナル、ウィント（Wnt）シグナル等、以下、生死の天秤シグナルと呼ぶ）を標的とし、その効果的モジュレーターを研究室独自の植物、放線菌エキスライブラリーおよび千葉化合物ライブラリーから見いだすことを目的とする。その手法としては、我々が近年構築し提唱してきた「タンパク質ビーズ」を用いる「標的タンパク質指向型単離法」および独自に構築した細胞レポーターアッセイを用いることとした。得られた化合物のがん細胞、神経幹細胞に及ぼす影響を精査し、新規な医薬リード候補を創出することを最終目標とする。

「標的タンパク質指向型単離法」は、リガンドフィッシングとも呼ばれる。2005 年に半田らがラテックスビーズに FK506-binding protein（FKBP）を担持し、*Streptomyces tsukubaensis* の培養エキスより FK506 の HPLC での同定に成功している［1］。この後、我々のグループは磁気ビーズにビタミン D 受容体を担持し、タイ産植物 *Limnocharis flava* からビタミン D 受容体に結合する天然物を見いだし、実際に HPLC のピーク情報を用いて実際に天然物の単離に成功した［2］。これは、「標的タンパク質指向型単離法」を用いて実際に天然物を単離した初めての例となった。我々はその後も、神経幹細胞の分化を抑制している hairy and enhancer of split 1（Hes1）担持ビーズを作製し、Hes1 に結合し、その活性を阻害し、神経幹細胞の分化を活性化する天然物を見いだした［3〜5］。今回、我々は、生死の天秤シグナルの一つであるヘッジホッグ（Hh）シグナルの阻害剤を見いだすことを目的とし、その転写因子である glioma-associated oncogene（GLI1）を担持した GLI1 ビーズを用いて、GLI1 を直接的に阻害する天然物を探索した［6］。

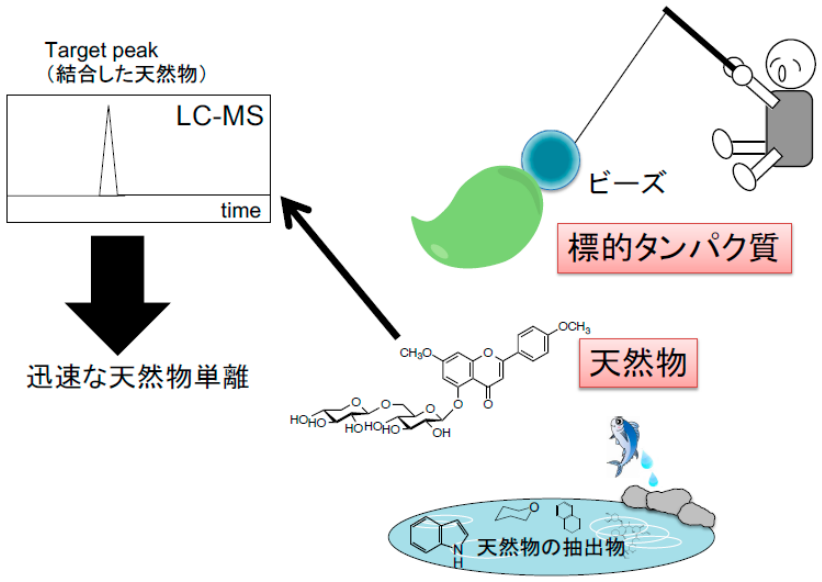


図 1. 標的タンパク質指向型天然物単離法

方法および結果

1. GLI1 ビーズを用いる標的タンパク質指向型天然物単離法の構築と、Hh シグナル阻害剤の単離

Hh シグナルは生体内において、細胞の分化や幹細胞の維持等に重要なシグナルであるが、異常亢進すると種々のがんの発生に寄与することが報告されている。そのため、がんの新しい治療薬として Hh シグナル阻害剤は注目されている。そこで今回、シグナルの最下流に位置する転写因子 GLI1 に着目し、GLI1 に直接作用する Hh シグナル阻害剤を天然物から見いだすことを計画した（図 2）。GLI1 の DNA に結合する部分（5 つの Zn フィンガードメイン）を含む部分タンパク質を glutathione *S*-transferase（GST）融合タンパク質として大腸菌から発現・精製し、GST の基質である glutathione をビーズの表面に有する glutathione sepharose 4B beads（GE Healthcare）に保持させ、GLI1 担持ビーズを作製した。当研究室保有のタイ・バングラデシュ植物エキスライブラリーの MeOH エキスと 4 度 2 時間の間混合し、GLI1 に結合しなかった天然物を洗浄した後、GLI1 に結合した天然物を EtOH を加えることで溶出させ、HPLC によりそのリテンションタイムの情報を得た。コントロールには GST ビーズを用いた。その結果、バングラデシュ産植物の *Flemingia congesta* のエキスがヒットした。HPLC のピークをもとに、カルコン型天然物を 5 種（**1**～**5**）の単離に成功した。GLI1 による転写活性を、GLI1 結合サイトをプロモーター部に持ち、下流にルシフェラーゼの遺伝子がある DNA を安定発現させたアッセイ系により確認したところ、全ての化合物が Hh 阻害活性を示した。化合物 **1**～**5** の阻害活性（IC_{50}）はそれぞれ、9.1、5.8、14.2、7.2、9.2 μM であった。

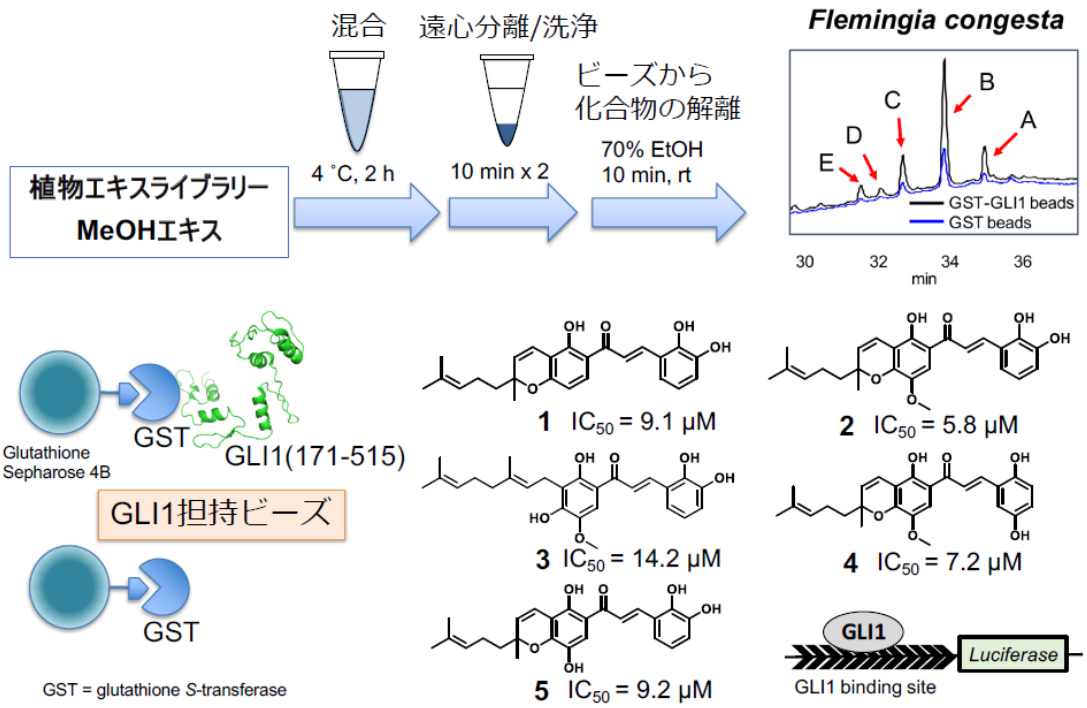
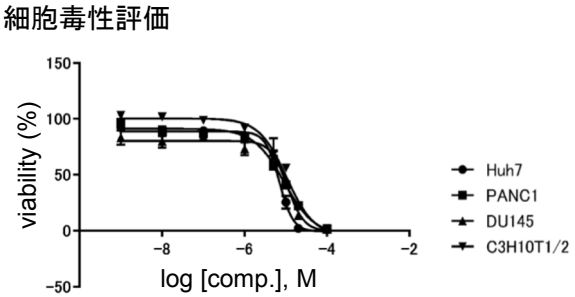


図 2. GLI1 ビーズを用いた標的タンパク質指向型天然物単離による Hh 阻害剤の探索

そのうち活性が最も強かった化合物 **2** に着目し、実際に GLI1 タンパク質と結合するかを CD スペクトルを用いて確認した。化合物がタンパク質に結合すると構造変化を起こし、特にα-helix 部の CD パターンに変化が現れることが知られている。今回も CD パターンの変化が濃度依存的に認められ、Kd 値 7.7 μM で GLI1 タンパク質とに結合することが明らかとなった。また、ドッキングシュミレーションにて検討したところ、ケトン部が GLI1 タンパク質 350 番目のリジンと、またフェノール水酸基が 375 番目のアスパラギン酸と水素結合することが示唆された。キラルカラムにて両光学異性体を分離したが、興味深いことに、光学異性体はどちらも同等の Hh シグナル阻害活性を示した。

2. Hh シグナル阻害剤 2 のがん細胞への効果およびがん幹細胞抑制作用

また、Hh シグナルが異常亢進しているヒト前立腺がん細胞 DU145、ヒト膵臓がん細胞 PANC1、ヒト肝がん細胞 Huh7 に対して、化合物 **2** は細胞毒性を示した。IC_{50} はそれぞれ，9.4、9.0、6.9 μM であった（図 3）。残念ながら本化合物は正常細胞である C3H10T1/2 にも毒性を示した。



Cell line	IC_{50} (μM)
DU145 (ヒト前立腺がん細胞)	9.4
PANC1 (ヒト膵臓がん細胞)	9.0
Huh7 (ヒト肝がん細胞)	6.9
C3H10T1/2 (マウス胚由来線維芽細胞)	10.4

図 3. 化合物 **2** の種々がん細胞に対する細胞毒性

そのうち、ヒト肝がん細胞 Huh7 において、Hh 関連遺伝子の転写への影響を Western blotting で確認したところ、予想どおり Hh 関連タンパク質で抗アポトーシスタンパク質 BCL2、Hh タンパク質の受容体 PTCH、および B cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion region 1（BMI1）のタンパク質量を減少させた（図 4）。そのうち、BMI1 の減少に着目した。BMI1 はポリコーム抑制複合体の構成タンパク質の一つで、エピジェネティックコントロールにより、クロマチンの凝集を引き起こし、がん職制遺伝子 Ink4a／ARF の発現を抑制し、結果としてがんのがん幹細胞性を上げている。そこで、化合物 **2** ががん幹細胞性を減少させることができるか検討することにした。

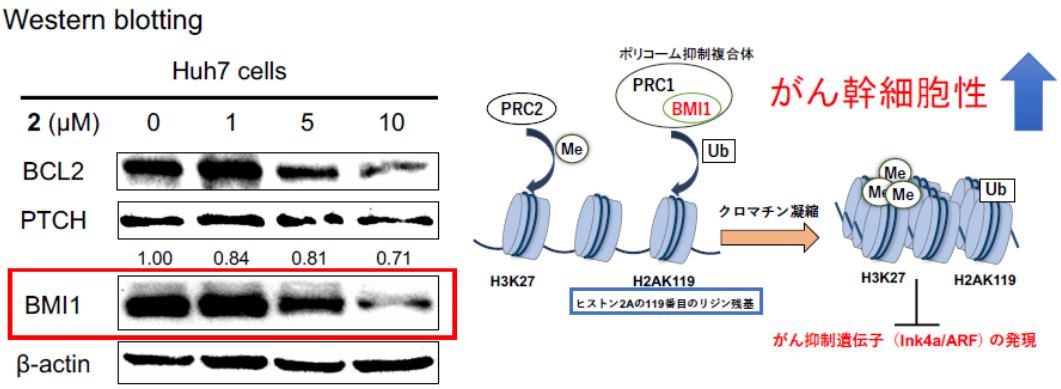


図 4. 化合物 2 は Hh 関連タンパク質を減少させた

がん幹細胞は、その自己増幅能により、足場が弱い培養条件でも増殖し細胞塊（スフェア）を形成することが知られている。そこで，Huh7 細胞を用いて化合物 **2** の効果を検討した（図 5）。化合物 **2** は 4.0 μM にて顕著にスフェア形成を抑制し、10 μM では 50 μm 以上のスフェアは全く観察されなくなった。このように化合物 **2** は Huh7 のがん幹細胞性を顕著に減少させた。

また，フローサイトメトリーを用いて、Huh7細胞のがん幹細胞マーカーへの化合物**2**の影響を検討した。その結果、がん幹細胞マーカーの一つEpithelial cell adhesion molecule（EpCAM）を91.4％（コントロール）から、51.6％（化合物**2** 25 μM）まで激減させることが明らかとなった。

さらに、化合物**2**がGLI1とDNAとの結合を阻害するかをゲルシフトアッセイを用いて検討を行った。化合物**2**は、50 μMにてGLI1とDNAとの結合を阻害することが明らかとなった。

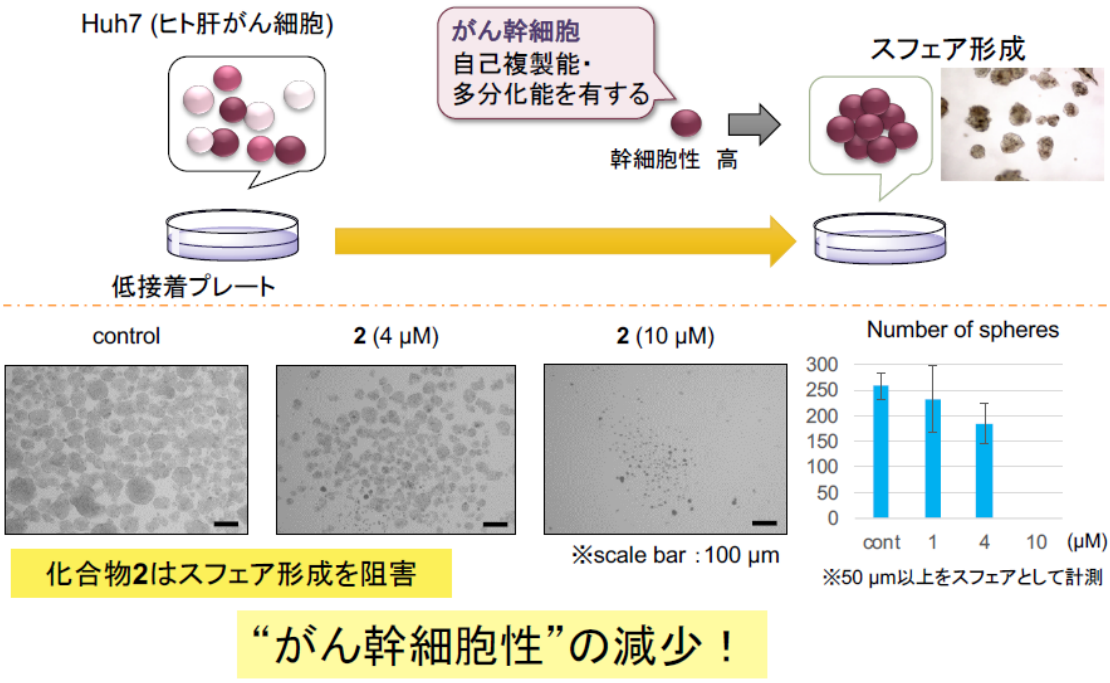


図 5. 化合物 2 によるがん幹細胞性の抑制効果

考　察

このように今回、Hh シグナル阻害剤の探索方法として転写因子 GLI1 担持ビーズを用いる「標的タンパク質指向型天然物単離法」を開発し、5 種の天然物の単離に成功した。そのうち化合物 **2** は GLI1 に結合し GLI1 の DNA との結合を阻害し、Hh シグナル転写活性を IC_{50} 5.8 μM で阻害した。さらに化合物 **2** は Hh シグナルが亢進しているヒト肝がん細胞 Huh7 のがん幹細胞性を減少させることが明らかとなった。

Hhシグナルの異常はしばしば上流のタンパク質SMOの変異によって起こる。しかしながら、ほとんどの開発されたHhシグナル阻害剤はSMOのアンタゴニストである。GLI1は本シグナル伝達の最下流であるため、SMOが変異しているがんにも効果的であり、その阻害剤開発は大変渇望されている。今回、GLI1ビーズを用いることにより、GLI1とDNAの複合体形成を阻害する化合物を効率よく見いだせた。この方法により、より効果的なHhシグナル阻害剤を見いだす一手法になったと考えている。また、このように転写因子ビーズを用いることで、他の生死の天秤シグナルにおいても、効果的な阻害剤を見いだせると考えている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、千葉大学薬学研究院の石橋正己教授、千葉大学医学研究院の千葉哲博講師、田村裕准教授、菅波晃子助教である。植物サンプルについては、バングラデシュクルナ大学の Sadhu 教授、ダッカ大学の Ahmed 教授に大変お世話になった。本研究は 6 年制コースの越智富美江氏がアッセイ系の構築からメカニズム解明まですべて行った。また、千葉大学医学研究院（現・東京大学医科学研究所）の岩間厚志教授、千葉大学薬学研究院の戸井田敏彦教授、東恭平助教（現・東京理科大学薬学部講師）に多大なご支援を賜りました。また、本研究に対し多大なご援助を頂きました上原記念生命科学財団に厚く御礼申し上げます。

文　献

1) Ohtsu Y, Ohba R, Imamura Y, Kobayashi M, Hatori H, Zenkoh T, Hatakeyama M, Manabe T, Hino M, Yamaguchi Y, Kataoka K, Kawaguchi H, Watanabe H, Handa H. Selective ligand purification using high-performance affinity beads. Anal Biochem. 2005 Mar 15;338(2):245-52. PMID: 15745744

2) Arai MA, Kobatake E, Koyano T, Kowithayakorn T, Kato S, Ishibashi M. A method for the rapid discovery of naturally occurring products by proteins immobilized on magnetic beads and reverse affinity chromatography. Chem Asian J. 2009 Dec 1;4(12):1802-8. PMID: 19924763 DOI: 10.1002/asia.200900357

3) Arai MA, Ishikawa N, Tanaka M, Uemura K, Sugimitsu N, Suganami A, Tamura Y, Koyano T, Kowithayakorn T, Ishibashi M. Hes1 inhibitor isolated by target protein oriented natural products isolation (TPO-NAPI) of differentiation activators of neural stem cells. Chem Sci. 2016 Feb 1;7(2):1514-1520. PMID: 29899896 DOI 10.1039/c5sc03540f.

4) Arai MA, Tanaka M, Tanouchi K, Ishikawa N, Ahmed F, Sadhu SK, Ishibashi M. Hes1-Binding Compounds Isolated by Target Protein Oriented Natural Products Isolation (TPO-NAPI). J Nat Prod. 2017 Feb 24;80(2):538-543. PMID: 28191975 DOI: 10.1021/acs.jnatprod.6b01072.

5) Arai MA, Yamaguchi Y, Ishibashi M. Total synthesis of agalloside, isolated from Aquilaria agallocha, by the 5-O-glycosylation of flavan. Org Biomol Chem. 2017 Jun 14;15(23):5025-5032. PMID: 28569322 DOI: 10.1039/c7ob01004d.

6) Arai MA, Ochi F, Makita Y, Chiba T, Higashi K, Suganami A, Tamura Y, Toida T, Iwama A, Sadhu SK, Ahmed F, Ishibashi M. GLI1 inhibitors isolated by target protein oriented natural products isolation (TPO-NAPI) with hedgehog inhibition. ACS Chem Biol. 2018 Sep 21;13(9):2551-2559. PMID: 30160475 DOI: 10.1021/acschembio.8b00492.