19　新規Wnt阻害物質の探索と作用機序の解明	古川　洋一

【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に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。

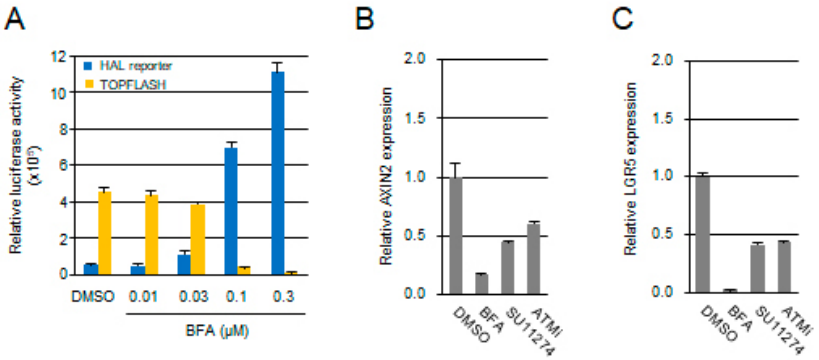
【方法】1. Wnt 活性に応じて変動する 2 種類のレポータープラスミド TOP-Flash reporter plasmid (TOPFLASH-Rluc) および histidine ammonia-lyase (HAL) reporter plasmid (pHALx8-minFluc) を作製し、Dual Luciferase Assay を行った。2. HepG2 細胞に化合物を投与後 24 時間にタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットにて Wnt シグナル関連分子の発現を解析した。3. 化合物投与後 48 時間に RNA を抽出し、マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析と、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 β-catenin タンパク質の量を減少させた。これらの結果から、BFA は β-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 β-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



19. 新規 Wnt 阻害物質の探索と作用機序の解明

古川　洋一

東京大学 医科学研究所 臨床ゲノム腫瘍学分野

Key words：がん，Wnt シグナル，低分子化合物，スクリーニング

緒　言

大腸がんは悪性新生物による日本人の死亡原因の第 3 位、肝がんは第 5 位を占め、毎年これらのがんでそれぞれ約 5 万人、約 2 万 8 千人の患者が亡くなっている。したがって大腸・肝がんの治療法開発は、医療上の重要な課題である。大腸がんや肝がんでは、高頻度に Wnt シグナルの活性化が認められる。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、これまでに承認され上市に至った薬剤はない。そこで我々は、古典的 Wnt シグナルの活性を測定するための特異的レポーターアッセイを開発した［1］。このアッセイを用いて試験的に低分子ライブラリーをスクリーニングしたところ、Brefeldin A（BFA）などの候補化合物が同定された。そこで本研究では、同定された候補化合物の作用機序を明らかにするとともに、大規模な化合物ライブラリーをスクリーニングし、新たなヒット化合物を探索した。本研究により、がん細胞における Wnt シグナルの様々な調節メカニズムが明らかになるとともに、抗がん剤開発のリードとなる化合物が同定されることが期待される。

方　法

1.　レポーターアッセイ

Wnt シグナルの活性を測定するために、TOP-Flash reporter plasmid（TOPFLASH-Rluc）および histidine ammonia-lyase（HAL）reporter plasmid（pHALx8-minFluc）を作製し、これらを恒常的に発現する肝芽細胞腫由来の HepG2 細胞株（4-61 細胞）を樹立した。4-61 細胞に化合物を投与して 24 時間後に Dual Luciferase Assay によるレポーター活性の測定を行った。測定は FLUOstar OPTIMA（BMG Labtech、Offenburg、Germany）を用いた。

2. ウエスタンブロット解析

HepG2 細胞および SW480 細胞に化合物を投与し、48 時間後にタンパク質を抽出した。一次抗体は anti-β-catenin（9582、Cell Signaling Technology、Danvers、MA）、anti-AXIN2（2151、Cell Signaling Technology）、anti-β-actin（A5441、Sigma、St. Louis、MO）を用い、二次抗体はそれぞれ対応する抗体を使用した。

3. 遺伝子発現解析およびパスウェイ解析

BFA あるいは溶媒（DMSO）を培地に加えた HepG2 細胞から 24 時間後に RNA を抽出し、マイクロアレイ（SurePrint G3 Human Gene Expression、Agilent Technologies、Santa Clara、CA）を用いた遺伝子発現解析を行った。データ解析は GeneSpring GX13.1 software package （Agilent Technologies）を使用した。p-value < 0.05 かつ FDR q-value < 0.25 を有意として、発現変動した遺伝子群を抽出した。Gene Ontology 解析には Molecular Signature Database v5.1（MSigDB）の遺伝子セット情報を利用した。パスウェイ解析は Gene Set Enrichment Analysis（GSEA）で行った。

4. 大規模化合物ライブラリーを用いた候補阻害物スクリーニング

市販の 2 万化合物ライブラリー（Namiki Shoji Co., Ltd. Tokyo Japan）を購入し、4-61 細胞に化合物を 10～50 μM で投与し、24 時間後に細胞を溶解しレポーター活性を測定した。

結　果

1.　BFA による Wnt シグナル阻害

BFA が Wnt シグナルの下流の TCF/LEF 転写因子の活性化を抑制するかどうか検討するために、TOP-Flash reporter plasmid（TOPFLASH-Rluc）および HAL reporter plasmid（pHALx8-minFluc）を発現する HepG2 細胞（4-61 細胞）に BFA を投与し、24 時間後にレポーターアッセイを行った。その結果、BFA の濃度が 0.03 μM で HAL の活性が有意に上昇し、TOP-Flash の活性が軽度減少した。また 0.1 μM では HAL および TOP-Flash の活性がそれぞれ著明に上昇、減少した（図 1A）。

更にWntシグナルの活性低下により下流遺伝子の発現が減少するかどうか調べるため、古典的Wntシグナルの標的遺伝子*AXIN2*および*LGR5*の発現をqPCRにて検討した。その結果、BFAにより*AXIN2*および*LGR5*の発現が有意に低下した（図1B、1C）。スクリーニングで同時に同定された候補化合物SU11274とATM inhibitorも、これらの遺伝子の発現を抑制した。

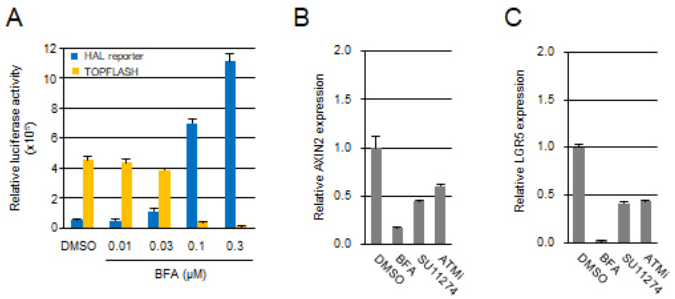


図 1.　Brefeldin A（BFA）による Wnt シグナルの抑制

A）TOPFLASH および HAL reporter 活性への効果

B）BFA および SU11274、ATMI の *AXIN2* 遺伝子発現への影響

C）BFA および SU11274、ATMI の *LGR5* 遺伝子発現への影響

2.　Wnt シグナル阻害機構の解析

BFA による Wnt シグナルの抑制機構を調べるため、Wnt シグナルの中心的メディエーターである β-catenin の発現と、Wnt シグナルの標的分子 AXIN2 の発現をウエスタンブロットにより解析した。その結果、BFA により HepG2 細胞内の野生型および変異型 β-catenin タンパク質の低下が認められ、qPCR の結果に一致して AXIN2 タンパクの発現も減少した（図 2A）。

他の Golgi 阻害剤も同様の抑制作用があるかどうか検討するために、Golgicide A（GCA）および Exo1 を HepG2 細胞に投与し発現解析を行った。その結果、GCA は BFA と同様に β-catenin、AXIN2 の発現を抑制したが、Exo1 は抑制しなかった（図 2B）。これらの結果から、Wnt シグナルの抑制は Golgi 阻害剤共通の作用ではなく、BFA と GCA に共通し、Exo1 にはない作用であることが判明した。

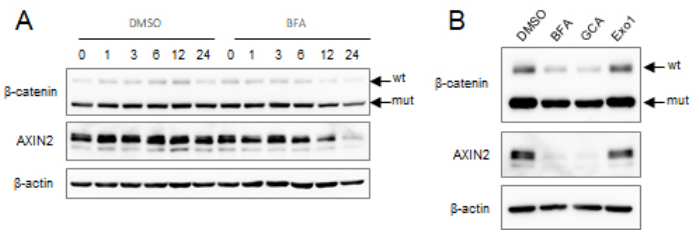


図 2.　BFA, GCA, Exo1 の β-catenin、AXIN2 発現への影響

A）BFA による経時的な β-catenin、AXIN2 タンパク質の変化

B）Golgi 阻害剤 BFA、GCA、Exo1 の Wnt 抑制作用の比較

3. BFA による遺伝子発現変化とパスウェイ解析

BFA による HepG2 細胞への影響を調べるために、マイクロアレイによる網羅的な遺伝子発現プロファイル解析を行った。その結果、Wnt シグナルの下流遺伝子 *AXIN2* の発現は約 4.3 分の 1、*LGR5* は約 29.5 分の 1、*MYC* は約 5.3 分の 1、*RNF43* は約 24.2 分の 1 に減少した。発現変動する遺伝子群を用いたパスウェイ解析では、Golgi Vesicle Transport （q-value = 0.001）に有意な変化を認める（図 3A）とともに、Wnt／β-catenin パスウェイ（q-value = 0.008）にも有意な変化を認めた（図 3B）。

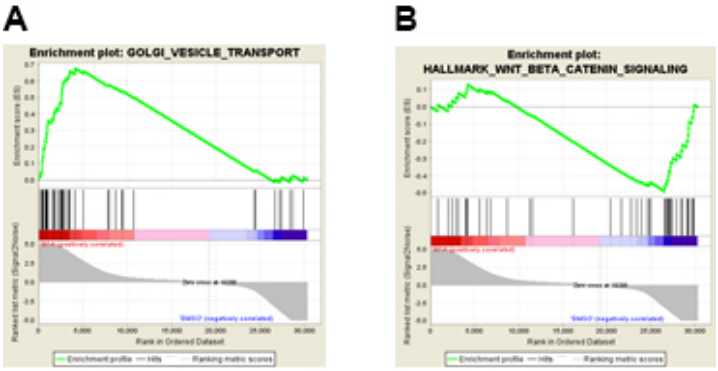


図 3. 発現変動遺伝子によるパスウェイ解析

A）BFA による Golgi Vesicle Transport 関連遺伝子群の変化

B）BFA による Wnt／β-catenin 関連遺伝子群の変化

4. 大規模化合物ライブラリーを用いた候補阻害物スクリーニング

Wnt 阻害を作用機序とする新たな抗がん剤として更に有望な化合物を同定するために、4-61 細胞を用いて約 2 万種類の化合物ライブラリーをスクリーニングしたところ、計 139 種類の候補化合物が得られた。

考　察

本研究により BFA がβ-catenin タンパク質を減少させ Wnt シグナルを抑制することが明らかとなった。また BFA は TOP-Flash のレポーター活性を用量依存的に抑制するとともに、その活性抑制に一致して TCF/LEF 複合体で調節される下流遺伝子 *AXIN2* や *LGR5* の発現も減少させることが示された。このことは我々のアッセイ系が Wnt 阻害化合物のスクリーニングに有用であることを示している。

BFA の作用機序に関しては、brefeldin A resistant guanine nucleotide exchange factor 1 （GBF1）や brefeldin A-inhibited guanine nucleotide exchange proteins BIG1 and BIG2 の阻害により、小胞体からゴルジへの物質輸送の阻害が知られている［2］。また Madin-Darby canine kidney （MDCK）細胞を BFA で処理すると、β-catenin タンパク質が Golgi 内に捉えられるとの報告もある［3］。したがって Golgi の障害がβ-catenin の正常な移動を障害し、β-catenin タンパク質の産生を抑制する可能性が考えられる。Golgi 阻害剤 GCA と Exo1 のうち、GCA は BFA と同じく GBF1 阻害作用があるのに対し、Exo1 にはその作用がない［4，5］。我々の検討では BFA と GCA がβ-catenin タンパク質を抑制するのに対し、Exo1 は抑制しなかった。したがって GBF1 阻害作用がβ-catenin の抑制に重要な役割を演じているかもしれない。いずれにせよ Golgi におけるβ-catenin タンパク質の制御と細胞内分布について、更なる解析が必要である。

本研究では約 2 万化合物のスクリーニングも行った。今後は本スクリーニングで得られたヒット化合物の解析を通じて、Wnt シグナル抑制物質の作用機序の解明を行うとともに、臨床応用に向けた開発研究を進めていく予定である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学医科学研究所臨床ゲノム腫瘍学分野の山口貴世志博士、朱赤博士、大杉友之博士、池上恒雄博士である。

文　献

1） Yamaguchi K, Zhu C, Ohsugi T, Yamaguchi Y, Ikenoue T, Furukawa Y. Bidirectional reporter assay using HAL promoter and TOPFLASH improves specificity in high-throughput screening of Wnt inhibitors. Biotechnol Bioeng. 2017 Dec;114（12）:2868-2882. DOI: 10.1002/bit.26394

2） Casanova JE. Regulation of Arf activation: the Sec7 family of guanine nucleotide exchange factors. Traffic. 2007 Nov;8（11）:1476-85. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2007.00634.x

3） Sheen VL, Ganesh VS, Topcu M, Sebire G, Bodell A, Hill RS, Grant PE, Shugart YY, Imitola J, Khoury SJ and others. Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. Nat Genet. 2004 Jan;36（1）:69-76, Epub 2003 Nov 30. DOI: 10.1038/ng1276

4） Feng Y, Yu S, Lasell TK, Jadhav AP, Macia E, Chardin P, Melancon P, Roth M, Mitchison T, Kirchhausen T. Exo1: a new chemical inhibitor of the exocytic pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 27;100（11）:6469-74. DOI: 10.1073/pnas.0631766100

5） Saenz JB, Sun WJ, Chang JW, Li J, Bursulaya B, Gray NS, Haslam DB. Golgicide A reveals essential roles for GBF1 in Golgi assembly and function. Nat Chem Biol. 2009 Mar;5（3）:157-65. DOI: 10.1038/nchembio.144