

生死の天秤シグナルに作用する天然物基盤小分子の創成

千葉大学大学院薬学研究院 活性構造化学研究室

荒井 緑

<本研究の目的>

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（Notch-Hes シグナル、ヘッジホッグ（Hh）シグナル、ウイント（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、独自の植物、放線菌エキストライブラリーおよび千葉大学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。本研究で見いだした天然物基盤小分子の骨格を用いて、多様性志向型合成を用いる誘導体合成展開を行い、さらに高活性な「生死の天秤シグナルモジュレーター」を創成する。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。

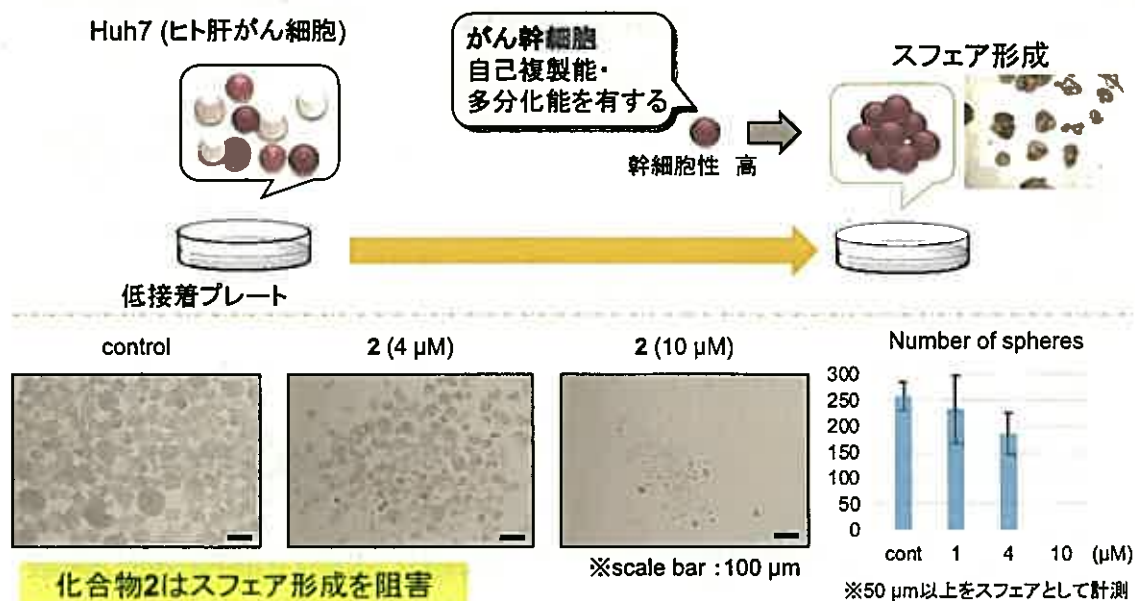
<方法・結果>

今回、ヘッジホッグ（Hh）シグナルの転写因子 glioma-associated oncogene homolog 1（GLI1）の担持ビーズを作成し、「標的タンパク質指向型単離法」により Hh シグナル阻害剤を天然物より見いだしたので報告する。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1）。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 担持ビーズを作成した。当研究室保有のタイ・バングラデシュ植物エキストライブラリーの 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^{2,3)}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（IC₅₀）はそれぞれ、9.1, 5.8, 14.2, 7.2, 9.2 μM であった。

そのうち活性が最も強かった化合物 2 に着目し、GLI1 と結合するかを CD スペクトルを用いて確認したところ、Kd 値 7.7 μM で実際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、ケトン部が 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。

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。IC₅₀ はそれぞれ、9.4, 9.0, 6.9 μM であった（図2）。

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3）。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。



“がん幹細胞性”の減少！

図3 化合物2によるがん幹細胞性の抑制効果

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。

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IC₅₀ 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。

参考文献

- 1) Arai, M. A.*; Ochi, F.; Makita, Y.; Chiba, T.; Higashi, K.; Suganami, A.; Tamura, Y.; Toida, T.; Iwama, A.; Sadhu, S. K.; Ahmed, F.; Ishibashi, M.* "GLI1 inhibitors isolated by target protein oriented natural products isolation (TPO-NAPI) with hedgehog inhibition" *ACS Chem. Biol.* **2018**, *13*, 2551-2559.
- 2) Hosoya, T.; Arai, M. A.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Ishibashi, M. "Naturally Occurring Small-molecule Inhibitors of Hedgehog/GLI-mediated Transcription" *ChemBioChem* **2008**, *9*, 1082-1092.
- 3) 荒井緑, "天然由来ヘッジホッグシグナル阻害剤の探索", 日本女性科学者の会学術誌, **2015**, *15*, 20-27.