

研 究 報 告 書

一般課題：A

(平成28年度)

平成30年 5月 7日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀 田 知 光 殿

研究施設 国立がん研究センター

住 所 東京都中央区築地 5-1-1

研究者氏名 増田 万里



(研究課題)

大腸がん幹細胞を標的とするTNIK阻害剤が作用する分子ネットワークの解明

平成29年 4月 1日付助成金交付のあった標記一般課題：Aについて研究が終了致しましたのでご報告いたします。

大腸がんの90%以上の症例でWntシグナル経路の遺伝子に変異があり、同経路の恒常的活性化がみられる。Wntシグナルの活性化はがん幹細胞の発生・維持に深く関与することが知られており、同経路が遮断できれば、がん幹細胞を根絶し、大腸がんの根治が期待できる可能性がある。しかし、大腸がんの多くはAPCがん抑制遺伝子に機能喪失変異があるため、APCタンパクの下流で本シグナル経路を遮断する必要がある。多くの研究者がこれまで同経路の活性を薬剤で遮断することを試みているが未だ臨床応用されたものはなく、その開発は困難と考えられていた。

我々は、Wntシグナル経路の最下流の転写因子TCF4と相互作用する **TNIK (TRAF2 and NCK-interacting protein kinase)** を同定し、化合物スクリーニングによりTNIK阻害剤NCB-0846を同定した。更に、NCB-0846は大腸がん幹細胞の特徴であるALDH活性やスフェア形成能を抑制し、免疫不全マウスでの造腫瘍性を著しく抑制することを明らかにした(Masuda *et al.*, *Nature Commun.*, 26 ; 7 : 12586, 2016)。

本課題では、我々が現在大腸がんの治療薬として開発しているTNIK阻害剤NCB-0846の作用機序の詳細を解明し、治療効果が期待できる投与対象者の選別を行うコンパニオンマーカーや薬効のモニタリングマーカー等のバイオマーカー候補を見出し、更に安全な薬剤の開発のためにoff-target効果を解明することを当初の目的とした。

NCB-0846 は理論的には Wnt シグナル伝達経路の遺伝子に変異のある全ての大腸がんに奏効するはずだが、実際には感受性が低い細胞株も存在する。その原因として、①TNIK の発現量や活性化の違い、②他の生存シグナルとのクロストーク、③阻害剤の off-target 効果等が考えられる。さらに TNIK が多機能タンパク(Masuda et al., *Pharm. Ther.*, 156:1, 2015)であることが影響している可能性もある。よって NCB-0846 が作用するシグナルネットワークの詳細を把握する必要があると考えた。

まずは、大腸がん細胞株 HCT-116 及び DLD-1 を NCB-0846 と NCB-0970 (TNIK 阻害活性を持たない NCB-0846 の構造異性体) で処理し、様々なシグナル伝達経路のキーとなる伝達分子のリン化プロファイリングを我々が独自に開発した逆相タンパクアレイ (Reverse Phase Protein Array; RPPA) 法により行った。様々なシグナル伝達経路のキーとなる伝達分子のリン化プロファイルをウエスタン法にて検証を行ったところ、両結果には高い相関が得られた。NCB-0846 は、TNIK キナーゼ活性を阻害することにより Wnt シグナル経路を遮断する薬剤であるが、NCB-0846 処理細胞と NCB-0970 処理細胞より得られたリン酸化プロファイルの比較解析により、NCB-0846 のみで、特徴的にリン酸化が増加あるいは減少するタンパクを見出した。これらのタンパクの中には Wnt シグナルへの関与がこれまで報告のないタンパクも見ついている。TNIK は多機能なタンパク質であることがこれまで報告されており、本解析で検出された Wnt シグナル以外のシグナル経路が NCB-0846 により作用を受けていることが明らかになった。興味深い現象の一つとして Histone H2A のリン酸化(γ H2AX)が NCB-0846 処理により強く誘導されることが今回の解析で明らかになった。本現象はウエスタン法でも確認され、共焦点顕微鏡解析によって薬剤処理後に γ H2AX foci が形成されることも確認された。NCB-0846 には強いアポトーシス誘導効果があるが、NCB-0846 によって DNA 損傷・修復シグナルが活性化し、更にはアポトーシスを引き起こしている可能性が示唆された。よって γ H2AX foci の形成が大腸がんにおいて本薬剤の治療効果モニタリングマーカーとなる可能性が示唆された。本研究の今後の課題として、NCB-0846 及び TNIK 阻害による DNA 損傷・修復シグナル活性化の機序の詳細を解明しすることを目標としていきたい。

本研究助成関連の査読付き論文；

○Masuda M, Yamada T. Signaling pathway profiling using reverse-phase protein array and its clinical application. *Expert Rev Proteomics*. 2017 Jul;14 (7):607-615.

本研究関連の代表的学会発表；

1. ○Mari Masuda, Yuko Uno, Shigeki Kashimoto, Hideki Moriyama, Masaaki Sawa and Tesshi Yamada. Application of Proteomic Technology in Development of Novel TNIK Inhibitor Blocking Wnt Signaling. 日本プロテオーム学会 2017 年大会 JHUPO 第 15 回大会, 7 月 26-28 日、2017、大阪 (招待講演)
2. ○Mari Masuda, Takeomi Inoue, Yuko Uno, Hideki Moriyama, Shigeki Kashimoto, Naoko Goto, Masaki Sawa and Tesshi Yamada. Preclinical development of NCB-0846, a novel TNIK inhibitor that blocks Wnt signaling in colorectal cancer. 第 76 回日本癌学会学術総会、9 月 28-30 日、2017、横浜
3. ○Mari Masuda, Takeomi Inoue, Yuko Uno, Masaaki Sawa and Tesshi Yamada. Elucidation of Signaling Pathways Affected by TNIK Inhibitor, NCB-0846, Using Reverse-Phase Protein Array RPPA Global Workshop 2017、9 月 14-16 日、2017、ダブリン、アイルランド (招待講演) (国際学会)
4. ○増田万里。がん高精度医療における逆相タンパクアレイ基盤の有用性。北里疾患プロテオーム研究会、3 月 20 日、2018、神奈川 (招待講演)