

研究報告書

平成29年度：A課題

令和元年5月8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30年3月9日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

殆どの大腸がん症例ではWntシグナル経路の遺伝子に変異があり、同経路が恒常的に活性化している。Wntシグナルはがん幹細胞の発生・維持に関与していることが知られており、同経路の遮断により、がん幹細胞が根絶され、大腸がんの根治が期待される。しかしながら、大腸がんの約80%の症例にAPCがん抑制遺伝子の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の遮断が必要がある。これまで世界中の研究者が同経路の活性を遮断できる薬剤の開発を試みているが未だ臨床応用されたものはなく、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)。更に、NCB-0846にはTNIK以外にも幾つかのキナーゼ(FLT3, JAK3, NuaK1/2, CDK等)に対し阻害効果があることもキナーゼプロファイリング解析により明らかにしている。本薬剤による安全な精密医療の実現には、NCB-0846が作用する分子ネットワークの全体像を正確に把握することによって作用機序の詳細を解明し、奏効性及び有害事象が予測できるバイオマーカーを開発する必要性があると考え、本研究の発想に至った。

NCB-0846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。

本研究課題は平成 28 年度からの継続課題であり、初年度は、NCB-0846 或いは NCB-0970 (TNIK 阻害活性を持たない NCB-0846 の構造異性体) で処理した大腸がん細胞株について、独自に開発した逆相タンパクアレイ (Reverse Phase Protein Array; RPPA) 法でリン酸化プロファイルの比較解析を行った。その結果、NCB-0846 処理によってのみ特徴的にリン酸化が増加或いは減少する複数のタンパクを見出しが、中でも DNA 損傷の指標となる Histone H2A のリン酸化(γ H2AX)を強く誘導することが明らかになった。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。

本年度は、NCB-0846 による γ H2AX 発現誘導のメカニズム解明に取り組んだ。 γ H2AX のリン酸化を誘導するキナーゼとして ATM、ATR が挙げられるが、それらの活性化によって DNA 損傷シグナルの活性化が起きているものと予測された。また、逆相タンパク質アレイ法による解析結果でも、ATM 下流分子のリン酸化の変化が検出されており、これらについて Western 法で検証を行ったところ、NCB-0846 は ATM 依存的 DNA 損傷シグナルの活性化を誘導していることが確認された。更に細胞周期解析によって、NCB-0846 は G2 アレスト誘導後、M 期への移行を阻害し、アポトーシスを引き起こしていることが明らかになった。ATM 依存的 DNA 損傷シグナルの活性化は G2 アレスト誘導後、アポトーシスを引き起こすことが知られており、NCB-0846 は ATM DNA 損傷シグナルの活性化を介して G2 アレスト誘導後、アポトーシスを引き起こしている可能性が高い。更に、siRNA により TNIK をノックダウンしたところ、 γ H2AX の発現誘導が Western 法で検出され、 γ H2AX foci の形成が免疫染色法により検出された。よって NCB-0846 による ATM DNA 損傷シグナルの活性化に伴うアポトーシスは on-target の TNIK 阻害効果によるものと考えられる。NCB-0846 は ATM と共に DNA-PK のリン酸化も誘導するため、NCB-0846 が DNA 二本鎖切断を引き起こすことが示唆される。本現象の作用機序を解明することが平成 30 年度の研究目標である。

本研究助成関連の査読付き論文及び総説：

1. Masuda M. Hunting hidden pieces of signaling pathways in hepatocellular carcinoma. *HepatoBiliary Surg Nutr.* 2018. doi: 10.21037/hbsn.2018.10.10
2. Akihiko Miyanaga, Mari Masuda, Tesshi Yamada. Chapter 10. Biomarkers of Lung Cancer: Liquid Biopsy Comes of Age. *Biomarkers in Cancer Therapy*. In press.

本研究関連の代表的学会発表：

1. T. Sugano, M. Masuda, Y. Uno, N. Goto, M. Seike, M. Sawa, A. Gemma, T. Yamada. Traf2-and Nck-interacting kinase (TNIK) inhibitor, NCB-0846, suppresses TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer. AACR Annual meeting 2018, 4月 14–18 日, 2018. シカゴ、イリノイ、米国 (国際学会)
2. T. Hirozane, M. Masuda, N. Goto, T. Sugano, N. Asano, E. Kobayashi, K. Horiuchi, H. Morioka, A. Kawai, M. Sawa, M. Matsumoto, M. Nakamura, T. Yamada. TRAF2 and NCK-interacting protein kinase (TNIK) regulates cancer stemness and adipogenesis of

- osteosarcoma cells. AACR Annual meeting 2018, 4月 14–18 日, 2018. シカゴ、イリノイ、米国（国際学会）
- 3. 近藤格、服部恵美、塩澤久美子、尾野雅哉、増田万里、山田哲司. 肉腫のプロテオゲノミクス解析：国際がんプロテオゲノミクスコンソーシアム（ICPC）. 第 14 日本臨床プロテオゲノミクス研究会. 5月 12 日, 2018, 東京
 - 4. 近藤格、服部恵美、尾野雅哉、増田万里、川井章、山田哲司. 肉腫のプロテオゲノミクス解析：国際がんプロテオゲノミクスコンソーシアム（ICPC）. 日本質量分析学会・日本プロテオーム学会 2018 年合同大会, 5月 15–18 日, 2018, 大阪
 - 5. Toru Hirozane, Mari Masuda, Naoko Goto, Teppei Sugano, Naofumi Asano, Eisuke Kobayashi, Akira Kawai, Keisuke Horiuchi, Morio Matsumoto, Masaya Nakamura, Masaaki Sawa, Hideo Morioka, Tesshi Yamada. TNIK is a novel molecular target for osteosarcoma treatment and controls osteosarcoma cell fate. 2018 CTOS Annual Meeting, 11月 14–17 日, 2018. ローマ、イタリア（国際学会）
 - 6. ○Mari Masuda, Takeomi Inoue, Yuko Uno, Naoko Goto, Masaaki Sawa and Tesshi Yamada. Clarification of the Signaling Network Affected by the TNIK Inhibitor, NCB-0846, Using Reverse-phase Protein Array. The Human Proteome Organization (HUPO) 2018 meeting, 9月 30–10月 3 日, 2018. オーランド、フロリダ、米国（国際学会）
 - 7. 宮永晃彦、増田万里、鳴幸治、西島伸彦、清家正博、浅村尚生、弦間昭彦、山田哲司. 網羅的ゲノム解析を用いた肺カルチノイドの新規治療標的遺伝子の同定. 第 59 回日本肺癌学会学術総会, 11月 29 日–12月 1 日, 2018. 東京
 - 8. 増田万里、弘實透、宇野佑子、澤匡明、山田哲司. 大腸がん幹細胞の遺伝子転写を標的とした新規分子標的治療薬の開発. 第 14 回日本がん分子標的治療学会・TR ワークショップ, 1月 18 日, 2019. 東京
 - 9. ○Mari Masuda. Application of the TNIK inhibitor, NCB-0846, to colorectal cancer treatment and beyond. 8th Global Reverse Phase Protein Array Workshop, 3月 24–25 日, 2019. 東京（招待講演/国際学会）