

# 研究報告書

平成30年度：A課題

令和年 6月 1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 4月 1日付で助成金交付を頂きました標記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。

大腸がんの約90%以上の症例には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。これまで多く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い。

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)。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がキナーゼプロファイリング解析により明らかになっている。よって、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た。中でも DNA 損傷の指標となる Histone H2A のリン酸化( $\gamma$ H2AX)を強く誘導することが明らかになった。NCB-0846 には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と考えられた。一方、 $\gamma$ H2AX foci の形成が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。

次年度は、NCB-0846 による  $\gamma$ H2AX foci 形成のメカニズムについて検討を行った。逆相タンパク質アレイ法による解析結果より、NCB-0846 処理後の細胞では  $\gamma$ H2AX のリン酸化を誘導するキナーゼ ATM 及びその下流分子が特徴的に活性化されていることが明らかになった。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によって 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ことが示唆された。

最終年度である平成 30 年度は、NCB-0846 が惹起する  $\gamma$ H2AX 発現誘導のメカニズムについて詳細の検討を行った。NCB-0846 は ATM と共に DNA-PK のリン酸化も誘導しており、更に NCB-0846 により形成される  $\gamma$ H2AX foci は 53BP と共に局在するため、NCB-0846 が DNA 二本鎖切断を引き起こしていることが明らかになった。また、siRNA による TNIK ノックダウンでも、本現象が認められた。従って、NCB-0846 は DNA 二本鎖切断を誘導することによって ATM DNA 損傷シグナルの活性化し、更にアポトーシスを惹起していると考えられる。以上の結果をまとめ、現在投稿論文を準備中である。

#### 本研究助成関連の査読付き論文及び総説；

1. Sekita T, Yamada T, Kobayashi E, Yoshida A, Hirozane T, Kawai A, Uno Y, Moriyama H, Sawa M, Nagakawa Y, Tsuchida A, Matsumoto M, Nakamura M, Nakayama R, **Masuda M**. Feasibility of targeting Traf2- and Nck-interacting Kinase in Synovial Sarcoma. *Cancer*, 2020, 12(5):E1258, doi: 10.3390/cancers12051258.
2. Miyanaga A, **Masuda M**, Motoi N, Tsuta K, Nakamura Y, Nishijima N, Watanabe S, Asamura H, Tsuchida A, Seike M, Gemma A, Yamada T. Whole-exome and RNA sequencing of pulmonary carcinoid reveals chromosomal rearrangements associated with recurrence. *Lung Cancer*, 2020 145:85-94, doi: 10.1016/j.lungcan.2020.03.027.
3. Sugano T, Yoshida M, **Masuda M**, Ono M, Tamura K, Kinoshita T, Tsuda H, Honda K, Gemma A, Yamada T. Prognostic impact of ACTN4 gene copy number alteration in hormone receptor-positive, HER2-negative, node-negative invasive breast carcinoma. *Br J Cancer*, 2020 doi: 10.1038/s41416-020-0821-y
4. **Masuda M\*** Yamada T. Utility of reverse-phase protein array for refining precision oncology. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1188:239-249.

本研究関連の代表的学会発表：

1. 増田万里. Wnt シグナルを標的とした大腸がん治療薬の開発及びその適応拡大の可能性、第 160 回お茶の水がんアカデミア集会、2020 年 1 月 22 日
2. **Masuda M.**, Y. Uno, H. Moriyama, T. Hirozane, N. Goto, M. Sawa, and T. Yamada. Elucidation of Signaling Network Affected by TNIK Inhibitor, NCB-0846, Using Reverse-Phase Protein Array Analysis. The 78<sup>th</sup> JCA Annual Meeting, Kyoto, Japan, Sep. 26-28, 2019
3. 関田哲也、山田哲司、後藤尚子、弘實透、小林英介、川井章、松本守雄、中村雅也、中村ロバート、増田万里. 滑膜肉腫に対する TNIK 阻害剤の有効性. 第 39 回日本腫瘍マーカー研究会、京都、2019 年 9 月 25 日
4. **Masuda M.**, Utility of Reverse-Phase Protein Array for Proteogenomic Analysis. Tokyo Cancer Moonshot Workshop. Tokyo, Japan, Jun. 24, 2019.
5. 増田万里. TNIK 阻害剤の apoptosis 誘導機序の解明、第 15 回日本臨床プロテオゲノミクス研究会、市ヶ谷、東京、2019 年 5 月 11 日
6. **Masuda M.**, Application of the TNIK inhibitor, NCB-0846, to colorectal cancer treatment and beyond. 8<sup>th</sup> Global Reverse Phase Protein Array Workshop. Tokyo, Japan, Mar. 24-25, 2019.