

研究報告書  
令和3年度：A課題

令和5年 3月 6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 国立医薬品食品衛生研究所

住所 神奈川県川崎市川崎区殿町 3-25-26

研究者氏名 出水 庸介

(研究課題)

がん関連転写因子を標的とした中分子ペプチド阻害剤の開発

---

令和4年3月1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。

【目的】

転写因子の活性化には、コアクチベータのヘリカルモチーフを介した転写因子への結合が重要であることが知られている。本研究では、これらの相互作用 (Protein-Protein Interaction、PPI) を阻害できる非天然型アミノ酸を含むヘリカルペプチドの開発を目指し、本年度は  $\beta$ -catenin をモデルタンパク質として選択した。

Wnt/ $\beta$ -catenin 経路は、細胞の恒常性の維持に関与する経路である。一方で、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の過剰な転写活性化は多様ながんの発症に関与していることが報告されている<sup>1)</sup>。そのため、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路は抗がん剤開発における魅力的な創薬標的であると考えられている。特に、経路の下流に位置する転写因子である T cell specific transcription factor (TCF) と  $\beta$ -catenin との相互作用は、Wnt/ $\beta$ -catenin 経路の転写活性化におけるトリガーとしての役割を担っている。そこで本研究では、TCF と  $\beta$ -catenin の相互作用を阻害する中分子ペプチドの開発を目的とした。具体的には、Liver Receptor Homologue-1 (LRH-1) の  $\beta$ -catenin への相互作用部位が、TCF の N 末端ヘリックスとオーバーラップしていることが報告されたことに着目し、LRH-1 誘導化ヘリックスペプチドによる TCF/ $\beta$ -catenin 相互作用

阻害剤の開発を行なった。

#### 【方法】

LRH-1 の部分配列を基にした、LRH-1 ペプチドの合理的な設計、及び生体適合性の向上に向けて、ペプチドの  $\alpha$ -ヘリックス構造の安定化等を狙ったアミノ酸側鎖架橋や、細胞膜の透過性を向上させるために細胞膜透過性ペプチドを導入した LRH-1 ペプチドの設計、合成を行った。続いて、合成した LRH-1 ペプチドの  $\beta$ -catenin への結合活性評価、及び細胞を用いて細胞増殖抑制評価や Wnt シグナル経路阻害活性評価に基づく生理活性評価を行った。

#### 【結果と考察】

ペプチドスクリーニングにより見出されたペプチド **St7** (H- $\beta$ Ala-AA-S<sub>5</sub>-LDY-S<sub>5</sub>-Nle-CNY) は、 $\beta$ -catenin に対して結合活性を示し、溶液中で安定な  $\alpha$ -ヘリックス構造を形成し、さらに、加水分解酵素に対する耐性を有することが明らかとなった。続いて、細胞膜透過性ペプチドの一つである Penetratin (RQIKIWFQNRRMKWKK) を導入した **Penetratin-st7** (RQIKIWFQNRRMKWKK- $\beta$ Ala-AA-S<sub>5</sub>-LDY-S<sub>5</sub>-Nle-CNY) は、Wnt シグナル経路に増殖が依存する DLD-1 細胞に対してのみ、濃度依存的な細胞増殖抑制活性を示した。さらに、Wnt シグナル経路の転写活性化を濃度依存的に阻害することを明らかにした。

本研究では、 $\beta$ -catenin に結合する天然型ペプチド配列を基に、ステーブル構造を導入することで  $\beta$ -catenin への結合親和性を損なうことなく、化学的安定性を高めたヘリカルペプチドの設計に成功した。さらに、それらの配列に細胞膜透過性ペプチドをコンジュゲートすることで、細胞内で標的の転写活性化を阻害できるペプチドの開発に成功した。本コンセプトは他の PPI 阻害ペプチド開発にも有用であり、中分子ペプチド医薬品開発や生命科学研究の発展のためのケミカルツールとして利用されることを期待したい。

#### 【発表論文】

1. Development of a penetratin-conjugated stapled peptide that inhibits Wnt/ $\beta$ -catenin signaling  
K. Tsuchiya, M. Kiyoshi, N. Hashii, M. Fujita, T. Kurohara, A. Ishii-Watabe, K. Fukuhara, T. Misawa,\* Y. Demizu\*  
*Bioorg. Med. Chem.* 73, 117021 (2022).

#### 【謝辞】

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援を賜りました、公益財団法人がん研究振興財団に深く感謝申し上げます。