

## 論文の内容の要旨

論文題目 Wnt シグナルを活性化する幹細胞増殖因子 R-spondin の  
代替低分子化合物の同定

氏名 中田 亮

Wnt シグナルカスケードは種を超えて広く保存されており、初期発生や器官形成、出生後の幹細胞の分化・増殖・極性の維持だけでなく、組織の再生においても重要な役割を果たしている。その複雑なシグナル伝達機構は厳密に制御されているが、癌を始めとした様々な疾患において調節異常が報告されている。通常では Wnt シグナルは、細胞質の  $\beta$ -catenin 分解複合体などにより負に制御されているが、近年、Wnt シグナル伝達系を正に調節する機構(R-spondin-LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 系)が哺乳類の幹細胞の膜上に存在することが明らかになった。互いに高い相同性を持つ Wnt 標的遺伝子 ZNRF3 と RNF43 (Zinc/RING finger protein3 / RING finger protein43)は細胞膜型 E3 ubiquitin ligase であり、Wnt 受容体を分解する negative regulator である。一方、7 回膜貫通型受容体 LGR4/5/6 (Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor)は、分泌タンパクである R-spondin が存在すると ZNRF3/RNF43 と会合し、これを細胞内に取り込む。すると Wnt 受容体の細胞膜上での発現が増加し、Wnt ligand 依存的に細胞内シグナル伝達が増強される。つまり R-spondin-LGR4/5/6 - ZNRF3/RNF43 系は、Wnt 受容体の膜上の発現を調節することで Wnt シグナルを増強する。この機構は脊椎動物にのみ存在するユニークなシステムであり、腸管や毛包の上皮系幹細胞で発見された。R-spondin1 は、ZNRF3/RNF43 と LGR5 の会合を介して Wnt シグナルを増強し、腸管における LGR5 陽性成体幹細胞を増殖させる事が知られている。臨床的な意義を示す例として、R-spondin1 投与によりクローン病に類似したマウスの炎症性腸病変が改善したという報告や、放射線化学療法下で生じるマウスの腸管粘膜障害を緩和したという報告があり、消化管の再生医療領域において注目が集まっている。他方、一部のヒト大腸癌において R-spondin 融合遺伝子や RNF43 の遺伝子異常が見つかり、癌による治療標的としても有望視されている。

最近になり、この制御系の構成分子である R-spondin や LGR4/5/6、ZNR3/RNF43 は肝臓や肺、さらには心臓や血管内皮細胞といった心血管系組織にも発現していることが明らかになってきた。さらに、R-spondin3 が心血管系の発生や構造維持に関与することを示唆する複数の独立した結果が報告されており、病的状態における心血管系組織の再生機構にも関与している可能性が想定されている。このように、Wnt シグナルの膜上の調節機構である R-spondin-LGR4/5/6-ZNR3/RNF43 系は、再生医療分野において魅力的な分野と考えられるが、これをターゲットにした低分子化合物創薬シーズ探索研究は、我々が関与する範囲では未だ行われていない。本研究では、R-spondin-LGR4/5/6-ZNR3/RNF43 系を制御する物質を、低分子化合物ライブラリー（1 万化合物）からスクリーニング・同定することにより腸管上皮や血管新生の再生を促す物質（増強剤）、心保護物質（増強剤・阻害剤）、抗癌剤（阻害剤）の開発を目指すことにした。

まず、R-spondin 依存的な LGR4/5/6 と ZNR3/RNF43 のタンパク質間相互作用をワンステップで検出するために、 $\beta$ -galactosidase fragment complementation 法を用いた新規ハイスループットスクリーニングシステムを構築した。enzyme fragment complementation 法は二つのタンパク質の会合を定量的にモニターする方法として知られている。酵素  $\beta$ -galactosidase は、N 末端側の 6kDa の  $\alpha$  断片と、残りの C 末端側の  $\omega$  断片に分離すると酵素活性を失うが、両者が会合すると酵素活性が復活する。そこで、LGR4/5/6 に  $\alpha$  断片を融合させたキメラ：LGR4/5/6- $\alpha$  と、ZNR3 と RNF43 の細胞内ドメインを欠失させた変異遺伝子 ZNR3  $\Delta$  C/RNF43  $\Delta$  C に、 $\beta$ -galactosidase の  $\omega$  断片を融合させたキメラ：ZNR3  $\Delta$  C- $\omega$ /RNF43  $\Delta$ - $\omega$  を作成した。これらのキメラタンパクは R-spondin 依存的に会合すると、 $\beta$ -galactosidase の酵素活性が復活して化学発光として定量的に評価することができる。このアッセイ系に対して種々の条件検討を重ね、スクリーニングに耐えうるシステムを構築することに成功した。そして、東京大学創薬機構が保有する低分子化合物コアラライブラリー（1 万種類）を対象に、R-spondin 活性増強剤および阻害剤のスクリーニングを実施した。R-spondin 依存的な LGR4- $\alpha$  と ZNR3  $\Delta$  C- $\omega$  の会合を阻害する物質は存在しなかったが、会合を増強する物質が 1 つだけ存在した（T-710065）。この化合物は東京大学薬学部天然物合成化学教室で合成された indolocarbazole 誘導体であった。全 20 万種ライブラリー中に存在する類縁化合物のうち T-710066 は、T-710065 の糖側鎖が 7 位アミノ基と結合したもので構造的類似性が高く、より強い会合増強作用を発揮した（EC<sub>50</sub> 300 nM）。驚くべきことに、T-710066 は R-spondin の非存在下でも標的タンパクの会合を誘導した。この化合物による会合誘導は、LGR4- $\alpha$  と ZNR3  $\Delta$  C- $\omega$  だけでなく LGR5 を除く全ての組み合わせにおいても起こり、また  $\beta$ -galactosidase 自体に対する活性はむしろ低下させたことから、化合物による LGR4/6- $\alpha$  と ZNR3  $\Delta$  C/RNF43  $\Delta$  C- $\omega$  の会合誘導が、特異的な反応である可能性が示唆された。

一方、HEK293T 細胞に TCF/Lef Luciferase reporter plasmid を一過性に発現させ、R-spondin3 で刺激すると用量依存的に Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化した。qPCR による

遺伝子定量評価では LGR4/6 と ZNRF3 が発現していたので、このレポーターアッセイを用いると、内在性 LGR4 と ZNRF3 の会合を介した Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化を定量的に評価できることを見出した。そして T-710066 で刺激すると、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが活性化した (EC<sub>50</sub> 約 300 nM)。ところが T-710066 には、protein kinase C (IC<sub>50</sub> 95 nM) や tyrosine kinase A (IC<sub>50</sub> 2 nM)、VEGF receptor kinase (IC<sub>50</sub> 7 nM) といった各種 kinase の阻害活性が報告されており、 $\beta$ -catenin 分解複合体を構成するリン酸化酵素を阻害することによって、TCF/Lef レポーターを活性化させている可能性が浮上した。

そこで、異なる二つの機能欠失実験により、T-710066 が内在性の LGR4 と ZNRF3 を介して Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを上昇させていることを示した。第一に、ZNRF3 の細胞内ドメインを欠失させた変異体を decoy タンパクとして発現させた細胞において、T-710066 による Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化が消失した。第二に CRISPR/CAS9 システムで ZNRF3 を knockout した細胞において、T-710066 による Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの活性化が消失した。これらの実験結果から、T-710066 は R-spondin 様の作用を持つ Wnt シグナルの活性化剤であることが帰結された。

結晶構造解析を用いた先行研究によると、少なくとも LGR4-ZNRF3、LGR5-RNF43 の会合には、R-spondin1 が必要と報告されており、低分子化合物である T-710066 がタンパクの機能を代替するという事象は非常に興味深い発見であった。この低分子化合物がどのようなメカニズムで R-spondin 非依存的に会合を誘導するのか、タンパク結合実験や結晶構造解析などを用いて今後明らかにする必要がある。

臨床的応用の展望としては、T-710066 は R-spondin と同様の作用を持つ Wnt シグナルの活性化剤であるため、再生医療領域における有望な創薬シーズである。そして、低分子化合物はリコンビナントタンパクと比較して生物由来の成分が紛れ込まないため抗原抗体反応が起きにくいという点と、合成が比較的容易であるため大量かつ安価に調製しやすい点において優れている。また、本機構による Wnt シグナルの活性化は、LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 を発現する細胞に選択的に起こるため、ターゲット細胞以外の意図しない Wnt シグナルの活性化を惹起しない点で、単なる Wnt ligand 投与より特異的である。

R-spondin1 が小腸陰窩に存在する LGR5 陽性幹細胞を増殖させ、マウスの炎症性腸病変や化学療法下で生じる腸管粘膜障害を改善すると報告されているように、この R-spondin 代替低分子化合物にも同様の作用が期待される。薬理的活性が高くないためか、マウス腸陰窩細胞を用いた実験系では、T-710066 による腸陰窩の増殖が起きなかった。しかし、後述のように化合物の活性がより強い誘導体が取得できれば増殖効果が期待でき、消化器疾患再生医療領域における創薬シーズとして魅力的である。

また、R-spondin3 が Wnt シグナルの活性化を介して心血管系の発生や構造維持に関与することを示す複数の独立した結果が報告されており、病的状態における血管新生機構にも関与している可能性が示唆される。Wnt1 タンパクや、Wnt シグナルを活性化させた血管内皮前駆細胞を下肢虚血マウスに投与すると病態が改善するという報告があり、T-710066 お

よびその誘導体が血管新生効果を持つ可能性がある。今後、正常血管や新生血管において LGR4/5/6-ZNRF3/RNF43 系が発現している構成細胞を明らかにする必要がある。

一方で T-710066 は、2つの薬理学的な問題点を有する。第一に、T-710066 は R-spondin 様と比較して活性が弱い点である。キメラタンパクの会合アッセイ、Wnt レポーターアッセイのどちらにおいても  $EC_{50}$  は R-spondin3 の約 1/1000 低値であった。第二に、各種の kinase の阻害活性が細胞に対して毒性として働く可能性を持っている点である。しかし、R-spondin 様活性と protein kinase 活性が分離できるような誘導体が合成できれば、本研究は大きく発展する可能性がある。この創薬シーズを基に、より活性が強かつオフターゲット活性を欠失した誘導体を取得するために、外部機関との共同研究を開始した。