

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名： (日本語) 転写因子 KLF5 の蛋白間相互作用阻害により癌細胞を選択的に抑制する新しい大腸癌治療薬の開発
(英語) Development of new anti-colorectal cancer drugs which selectively suppress cancer cells by protein-protein interaction inhibition of transcriptional factor KLF5.

研究開発担当者 (日本語) 学校法人 自治医科大学 学長 永井良三
所属 役職 氏名： (英語) Ryozo Nagai, President, Jichi Medical University

実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究開発課題名：

(日本語) KLF5 を標的にした大腸癌の選択的抑制治療薬の開発とその作用機構の解明：研究統括、研究開発のデザイン、全体計画の策定

(英語) Development of new anti-colorectal cancer drugs which selectively suppress cancer cells by targeting transcriptional factor KLF5 and discovery of the action mechanism of the compounds: Research management, Research design, Management of total research plan.

研究開発代表者 所属 役職 氏名：

(日本語) 学校法人 自治医科大学 学長 永井良三

(英語) Ryozo Nagai, President, Jichi Medical University

分担研究開発課題名：

(日本語) KLF5 を標的にした大腸癌の選択的抑制治療薬の開発：病理組織学的解析とそれによる化合物の薬効評価

(英語) Development of new anti-colorectal cancer drugs which selectively suppress cancer cells by targeting transcriptional factor KLF5: Pathological analysis and evaluation of the cancer suppressing effects by the compounds.

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 学校法人 自治医科大学 人体病理学部門・教授 田中亨

(英語) Akira Tanaka, Professor, Department of Pathology, Jichi Medical University

分担研究開発課題名：

(日本語) KLF5 を標的にした大腸癌の選択的抑制治療薬の開発とその作用機構の解明：化合物の作用機構解明、化合物の薬効評価

(英語) Development of new anti-colorectal cancer drugs which selectively suppress cancer cells by targeting transcriptional factor KLF5: Discovery of action mechanisms of the compounds and evaluation of the cancer suppressing effects by the compounds.

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 学校法人 自治医科大学 人体病理学部門・講師 仲矢丈雄

(英語) Takeo Nakaya, Assistant Professor, Department of Pathology, Jichi Medical University

分担研究開発課題名：

(日本語) KLF5 を標的にした大腸癌の選択的抑制治療薬の開発：三次元 sphere 培養による癌幹細胞増殖抑制効果の解明

(英語) Development of new anti-colorectal cancer drugs which selectively suppress cancer cells by targeting transcriptional factor KLF5: Evaluation of the cancer suppressing effects of the compounds, based on 3 dimensional sphere culture.

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 国立大学法人 東京工業大学 化学生命科学研究所 特別研究員 中野洋文

(英語) Hirofumi Nakano, Staff Scientist, Laboratory for Chemistry and Life Science, Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology

分担研究開発課題名：

(日本語) 癌を選択的に抑制する NC 化合物の化学構造の改良：KLF5 を標的とする化合物のデザイン

(英語) Improvement of the chemical structure of the compounds which selectively suppress cancer cells: Chemical designing of the compounds which target KLF5.

研究開発分担者 所属 役職 氏名：

(日本語) 株式会社 PRISM BioLab 代表取締役社長 小路弘行

(英語) Hiroyuki Kouji, President, PRISM BioLab

II. 成果の概要（総括研究報告）

我々は、大腸癌の最重要の原因である Wnt シグナルの恒常的活性化による腸上皮幹細胞からの腫瘍形成に、転写因子 KLF5 が必須であることを解明した(*Cancer Res* 2014)。また、ヒト大腸癌で正常腸上皮に比べ KLF5 の発現が増加することも報告した。これらの結果は、KLF5 が大腸癌治療薬の有力な分子標的であることを示す。

KLF5 は天然変性蛋白で、立体構造が解明されておらず、立体構造に基づく KLF5 阻害薬の開発ができない。この困難を克服するため、我々は、独自の方法で KLF5 を阻害すると予想される低分子化合物を設計、合成した(NC 化合物)。このイノベーションは、KLF5 の正常機能をできるだけ抑制せず、KLF5 の癌を促進する機能のみ選択的に阻害する低分子化合物の作製を可能にした。

今期、我々は、KLF5 阻害薬の大腸癌細胞抑制能を調べる中で、NC 化合物の化学構造と癌細胞抑制能の間に、構造活性相関があることに気づいた。

そこで、我々は、化学構造と癌細胞抑制能の相関に関して議論を行った。その議論に基づき、上記構造活性相関から高い活性を持つと予想される 36 種類の NC 化合物を、今期に新たに系統的に化学合成した。

我々は、36 種類の NC 化合物の系統的解析を行い、化合物の化学構造と大腸癌細胞抑制能の間に、明確な構造活性相関があることを発見し証明した。

この結果は、化合物の化学構造改良の方向性を明確にした。

また、我々は、新規 NC 化合物を癌幹細胞の性質を保っている生体内での癌により近い 3 次元単スフェアで大腸癌細胞を培養し、増殖と形態を非染色で経時的に計測できる方法を用いて評価した。NC 化合物は側鎖のわずかな違いにより活性が大きく変化することが示され、活性のない類縁化合物も複数見出された。得られた化合物の構造活性相関は、次の新規 NC 化合物のデザインに活かされている。

我々は、NC 化合物の癌細胞選択的な増殖抑制の作用機構の解明するため、NC 化合物に対する感受性が異なる大腸癌細胞を求めて 3 次元単スフェア増殖アッセイを行った。HCT116 は球形のスフェア、Colo320 は葡萄状のスフェアを形成し増殖するが NC 化合物に対する感受性は両大腸癌細胞でよく相関している。

我々は、NC 化合物のなかから動物モデルでの高次評価を行う化合物を選択するため、毒性試験用モデル生物を用いた NC 化合物の毒性・安全性評価に着手した。米国 FDA などが新規化合物の初期毒性試験モデルとして推進している線虫、*C. elegans* を用いた試験とその簡便なアッセイ法を検討し、線虫の動きを 96 穴プレート液体培地中で測定する条件を見出した。

We discovered that a transcription factor KLF5 is essential for oncogenicity of intestinal stem cells (*Cancer Research* 2014). We also reported that the expressions of KLF5 were higher in colorectal cancer epithelia than those in normal intestinal epithelia in human surgical specimens. These suggested that KLF5 is a promising target molecule for colorectal cancer drugs.

Because KLF5 is an intrinsically disordered protein, its three-dimensional structure has not been solved. Therefore it is impossible to develop KLF5 inhibitors based on the three-dimensional structure of KLF5. In order to overcome the difficulty, we designed and synthesized the low molecular weight compounds which suppress KLF5 based on our original methods (NC compounds). This innovation made it possible to suppress the cancer promoting function of KLF5 selectively with lesser suppression of the normal functions of KLF5.

We found the structure-activity relationship between the chemical structures of the compounds and their ability to

suppress colorectal cancer cells.

We intensively discussed about the structure-activity relationship of the compounds. Based on the discussions, we newly designed and systematically synthesized 36 NC compounds which were supposed to have high activity to selectively suppress colorectal cancer cells.

Through the systematic analysis of 36 NC compounds, we discovered and certified the clear structure-activity relationship between the chemical structures of NC compounds and their ability to suppress colorectal cancer cells.

We evaluated anti-tumor activity of NC compounds, using our new single 3D sphere culture method which maintains the characteristics of cancer stem cells. The slight differences of side chain of NC compounds influenced the anti-tumor activity including several in-active (inactive) analogues. The structure-activity relationship of NC compounds has been applied to design new NC compounds.

To elucidate the mechanism of cancer cell-specific growth inhibition by NC compounds, we compared difference of sensitivity for NC compounds between colorectal cancer cells. HCT116 formed spherical single sphere, whereas Colo320 grew as an acinar sphere. NC compounds inhibited both cells in equivalent potential.

We performed acute toxicity assay. To select a few NC compounds for evaluation in animal model, we tested the nematode *C. elegans* model that has been recommended by US FDA and could develop a new simple assay method. Movement of the nematode can be monitored using liquid culture in 96 well plate.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Future Directions for KLF Research, 口頭, 永井良三, FASEB Science Research Conference “KLF and Sp Transcription Factors in Disease and Regenerative Medicine”, 2016/8/7, 国外
2. The protein interaction inhibitors of KLF5 suppress Wnt signal activation selectively in colorectal cancer cells, 口頭, 仲矢丈雄, 中野洋文, 河西政次, 吉森篤史, 田中亨, 小路弘行, 永井良三, FASEB Science Research Conference “KLF and Sp Transcription Factors in Disease and Regenerative Medicine”, 2016/8/9, 国外
3. Small molecular mimics of KLF5 suppress the survival and Wnt-KLF5 signaling of colorectal cancer cells, 口頭, 仲矢丈雄, 中野洋文, 河西政次, 吉森篤史, 田中亨, 小路弘行, 永井良三, 日本癌学会学術総会 (International session), 2016/10/6, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
なし。

(4) 特許出願
なし。