

Chemical biological studies of small molecules
targeting mutant β -catenin tumor

July 2020

Hiroaki Ikeda

報告番号	① 乙 第	号	氏 名	池田 拓慧
主 論 文 題 名 : Chemical biological studies of small molecules targeting mutant β -catenin tumor (β -catenin 変異がんを標的とする化合物を用いたケミカルバイオロジー研究)				
(内容の要旨) β -catenin は Wnt シグナル伝達経路の中心を担う重要な分子であり、細胞増殖を厳密に制御している。しかし、 β -catenin (<i>CTNNB1</i>)に活性型の変異が生じると、 β -catenin は常に安定化し核内に蓄積、増殖シグナルが異常に亢進する。 β -catenin の変異は大腸がんの約 10%、肝細胞がんの約 20%など様々ながん種で認められるが、このようながんに対して有効な治療薬は未だ開発されていない。そこで本論文では β -catenin 変異型がん細胞選択的にアポトーシスを誘導する化合物を取得し、その薬理活性評価と作用機構解析を行うことで、 β -catenin 変異がんを標的とする新たながん化学療法戦略を模索した。 β -catenin 変異型 HCT116 細胞にアポトーシスを誘導し、 β -catenin 野生型 A375 細胞にはアポトーシスを誘導しない化合物を探索し、天然物ライブラリーより metacycloprodigosin (mcPG)、合成化合物ライブラリーより DS37262926 (miclxin)に目的の活性を見出した。 (1) vacuolar-type H ⁺ -ATPase (V-ATPase)阻害剤による β -catenin 変異型がん細胞選択的アポトーシス誘導 放線菌 K622 株培養液に目的の活性を見出し、mcPG を活性本体として同定した。mcPG は V-ATPase を阻害することが報告されており、他の V-ATPase 阻害剤 bafilomycin A1 および concanamycin A も同様に β -catenin 変異がん細胞選択的にアポトーシスを誘導することを見出した。さらに、 β -catenin 野生型 HEK-293T 細胞に変異 β -catenin を過剰発現させると V-ATPase 阻害剤によりアポトーシスが誘導されたことから、V-ATPase 阻害剤は変異 β -catenin 依存的にアポトーシスを誘導することが示唆された。 (2) MIC60 阻害剤による変異 β -catenin 依存的ミトコンドリアストレス誘導 第一三共株式会社より供与された合成化合物ライブラリーより miclxin に目的の活性を見出した。miclxin は β -catenin 野生型アレルを欠損した HCT116 <i>CTNNB1</i> Δ 45/-にアポトーシスを誘導したが、変異型アレルを欠損した HCT116 <i>CTNNB1</i> +/-にはアポトーシスを誘導しなかった。miclxin アフィニティビーズを用いて結合タンパク質を探索し				

た結果、**miclxin** がミトコンドリア内膜タンパク質複合体(MICOS)構成因子である**MIC60** と結合することが分かった。**miclxin** は、**MIC60** を標的とすることでミトコンドリア膜電位を低下させ、**eIF2 α -ATF4-CHOP** 経路の活性化を伴うミトコンドリア・ストレスを誘発した。このストレス応答として **Bcl-2** の発現減少、**AIF** の核内移行によるアポトーシスが誘導されることを明らかにした。また **β -catenin** ノックダウンによって **miclxin** によるミトコンドリア・ストレス誘導が阻害された。これらの結果から、**MIC60** の阻害によって変異 **β -catenin** 依存的にミトコンドリア・ストレスが誘導されることが示唆された。

Thesis Abstract

No. 1

Registration Number	<input checked="" type="checkbox"/> "KOU" <input type="checkbox"/> "OTSU"	Name	Hiroaki Ikeda
No.	*Office use only		
Thesis Title			
Chemical biological studies of small molecules targeting mutant β -catenin tumor			
Thesis Summary			
<p>Wnt signaling pathway is known as a proliferation signaling, in which β-catenin plays a crucial role. Although β-catenin regulates cell proliferation, active mutation of β-catenin gene, <i>CTNNB1</i>, causes nuclear accumulation of β-catenin protein, resulting in aberrant tumor growth. β-catenin is mutated in a variety of tumors, including 10% of sporadic colon carcinomas and 20% of hepatocellular carcinomas, however, there are still no effective therapeutic compounds. In this thesis, we screened for the compounds which induced apoptosis selectively in β-catenin-mutated tumor cells. We expected to find new chemo-therapeutic strategy targeting β-catenin-mutated tumor through chemical biological studies using these compounds.</p> <p>We screened for the compounds which induced apoptosis in β-catenin-mutated HCT116 cells but not in β-catenin wild-type A375 cells, and found metacycloprodigiosin (mcPG) and DS37262926 (miclxin), from microbial extracts and synthetic compounds library, respectively.</p> <p>(1) Selective apoptosis in β-catenin-mutated tumor cells by vacuolar-type H^+-ATPase (V-ATPase) inhibitors</p> <p>We found <i>streptomyces</i> strain K622 extracts induced apoptosis selectively in β-catenin-mutated tumor cells, and identified this active compound to be mcPG. mcPG is reported to inhibit V-ATPase, and other V-ATPase inhibitors, bafilomycin A1 and concanamycin A, also induced apoptosis selectively in β-catenin-mutated tumor cells. Furthermore, V-ATPase inhibitors did not induce apoptosis in β-catenin wild-type HEK-293T cells but induced apoptosis in HEK-293T cells transfected with mutant β-catenin. These results suggested that V-ATPase inhibitors induced apoptosis in a mutant β-catenin-dependent manner.</p> <p>(2) Mutant β-catenin-dependent mitochondrial stress by MIC60 inhibitor</p> <p>Miclxin was provided by Daiichi-Sankyo Pharmaceutical Company. Miclxin exhibited mutant β-catenin-dependent apoptosis in β-catenin-mutated HCT116 cells and isogenic HCT116 <i>CTNNB1</i> $\Delta 45^-$ cells, however, this effect was not observed in isogenic HCT116 <i>CTNNB1</i> $+/-$ cells. Using miclxin-immobilized beads, MIC60, which is one of the major component of the mitochondrial contact site and cristae organizing system (MICOS)</p>			

Thesis Abstract

No. 2

complex, was identified as a target protein of miclxin. We revealed that MIC60 dysfunction by miclxin induced the loss of mitochondrial membrane potential, and mitochondrial stress via eIF2 α -ATF4-CHOP axis. Activation of the mitochondrial stress response was responsible for the downregulation of Bcl-2, and subsequent AIF-dependent apoptosis. Mitochondrial stress induced by miclxin was suppressed by knockdown of β -catenin. These results indicated that MIC60 inhibition induced mitochondrial stress in a mutant β -catenin-dependent manner.