

京都大学	博士 (薬科学)	氏名	潘彦君
論文題目	Studies on the anticancer effect of bisabosqual A, as a novel asparagine synthetase inhibitor, in human non-small cell lung cancer cells (非小細胞肺癌細胞における新規アスパラギン合成酵素阻害剤としてのビスボスクアール A の抗がん効果に関する研究)		
<p>Asparagine synthetase (ASNS) as an imperative enzyme for the <i>de novo</i> biosynthesis of asparagine (Asn), becomes a promising anticancer target. In several solid tumors, ASNS expression exhibited positive correlation with tumor growth, including lung cancer, breast cancer and gastric cancer. Moreover, overexpressed ASNS was associated to the chemoresistance and metastasis <i>in vivo</i>, while ASNS knockdown constrained tumor growth in mouse xenograft models. Asn depletion was considered a vital factor of ASNS anticancer effect. Cancer cells demand for abundant nutrition to support their rapid proliferation, and thus amino acid depletion, such as Asn or glutamine depletion, is a prospective strategy for inhibiting cancer through the impact on metabolic vulnerability. Therefore, ASNS inhibition becomes a potential cancer chemotherapy.</p> <p>No ASNS inhibitors have been used clinically so far. Most of ASNS inhibitors are the analogs of β-aspartyl-AMP intermediate or transition-state in ASNS reaction. Although transition-state analogs could suppress ASNS at nanomolar concentrations, their low cell permeability and instability obviously impeded their anticancer activity. Consequently, it is urgent to develop ASNS inhibitors with a novel pharmacophore as well as effective anticancer activity.</p> <p>Higher ASNS expressions were observed in lung cancer tissues than in normal lung tissues, and the cell growth of non-small cell lung cancer (NSCLC) was impaired by ASNS knockdown. However, further study about anticancer effectiveness and underlying mechanism of ASNS inhibitors was scantily focused on. Accordingly, in this study, I disclose a new covalent binding ASNS inhibitor, bisabosqual A (Bis A), and investigate its anticancer mechanism in human NSCLC cells, as well as the synergistic effect with L-asparaginase (L-ASNase) or mTOR inhibitors.</p> <p>Chapter 1 The identification of bisabosqual A as a potential ASNS inhibitor and the investigation of the binding site of bisabosqual A on ASNS</p> <p>Human ASNS (hASNS), catalyzing aspartate and glutamine to produce Asn and glutamate, contains two conserved domains, the N-terminal (residues 1-216) glutaminase domain and the C-terminal (residues 217-561) synthetase domain. The PP_i production indicating the formation of β-aspartyl-AMP intermediate, was used to measure ASNS activities in many studies. However, PP_i production could not reflect the complete of whole ASNS reaction containing the catalysis of N-terminus. Hence, an <i>in vitro</i> screening system detecting product AMP concentrations, was constructed using a purified recombinant hASNS to evaluate ASNS activities. By executing this system to screen our <i>in-house</i> microbial metabolite library, a unique bisabolane-type meroterpenoid molecule bisabosqual A (Bis A), produced by the fungus <i>Stachybotrys</i> sp. RF-7260, was identified as a potential ASNS inhibitor. Moreover, the study of structure-activity relationship among Bis A, and its analogs bisabosquals B, C, and D, further confirmed that Bis A was a promising hit molecule.</p> <p>After incubation of Bis A with ASNS followed by SDS-PAGE and Coomassie brilliant blue staining, the band intensity of ASNS significantly decreased and the band moved up to a larger molecular weight, with the increased concentrations of Bis A, which suggested the covalent binding of Bis A on ASNS. Subsequently, LC-MS/MS was used to investigate their binding site, and Bis A was observed to modify K556 sites with evidently high modification rate. The reported high-resolution crystal structure of ASNS</p>			

lacked a few residues including residues 536-561, and thus AlphaFold2 model structure of ASNS was predicted. Through conducting CovDock, a ligand binding pocket around K556, as well as a covalent docking pose of ASNS-Bis A complex were observed, revealing that Bis A could covalently bind to K556 site of ASNS *via* Schiff-base formation. Furthermore, K556A mutant that lysine was replaced by alanine at the 556 site of ASNS was constructed. The results showed that K556A mutant could not be significantly inhibited by Bis A, implying the importance of K556 site to ASNS inhibitory activity of Bis A.

Chapter 2 The anticancer effect and mechanism of bisabosqual A in non-small cell lung cancer cells

In order to determine the anticancer effect of Bis A, human non-small cell lung cancer (NSCLC) A549 and H1299 cells were used. Bis A could significantly suppress the cell viability of not only 2D-culture but also 3D-spheroid of A549 cells or H1299 cells. Besides, Bis A was observed to target ASNS in cells through performing cellular thermal shift assay, siASNS transfection experiment, as well as the Asn supplementation experiment. In addition, the results revealed the synergistic effect of Bis A and L-asparaginase (L-ASNase), an enzyme depleting extracellular Asn, in impeding cell proliferation.

Even though intracellular Asn level was decreased by Bis A in A549 cells, it recovered to a similar level of negative control, upon longer treatment, which suggested the existence of a negative feedback pathway. Therefore, at first, ATF4, a transcription activator of ASNS, and its involved GCN2-eIF2 α -ATF4 axis of AAR signaling pathway were investigated, and the results indicated that this axis was activated after treatment with Bis A. Afterwards, through GSEA analysis and western blot analysis, Bis A was shown to upregulate PI3K-AKT-mTORC1 and RAF-MEK-ERK pathways, and the combination treatment of Bis A and mTOR inhibitors exhibited synergistic effects in antiproliferative activity. Accordingly, these results revealed that the activation of GCN2-eIF2 α -ATF4, PI3K-AKT-mTORC1 plus RAF-MEK-ERK pathways by Bis A was related to the negative feedback regulation.

The mTORC1 activation inhibits autophagy, as well as autophagy and ROS are involved in apoptosis. Consequently, the effect of Bis A on autophagy, oxidative stress and apoptosis in A549 cells was studied. The results showed that Bis A inhibited autophagy and induced oxidative stress plus apoptosis. In addition, Bis A was observed to hinder cell migration by performing wound healing assay and transwell-plate assay. Furthermore, epithelial-mesenchymal transition (EMT) triggered by TGF- β was rescued, in some extent, by Bis A through reducing the expression of N-cadherin and vimentin, and enhancing the expression of E-cadherin, indicating the inhibition by Bis A on EMT.

In conclusion, this study identified a new ASNS inhibitor, Bis A, with unique pharmacophore and binding site, and for the first time, revealed K556 site had the potential to affect the efficacy of the ASNS inhibitor. In mechanism, Bis A exerted anticancer activity through promoting oxidative stress and apoptosis, while impeding autophagy, cell migration and EMT. Thus, Bis A could be a promising lead molecule in development of ASNS inhibitors. Additionally, the synergistic effect of Bis A with L-ASNase or the mTOR inhibitor showed a prospective strategy for cancer chemotherapy.

(論文審査の結果の要旨)

がん細胞は高い栄養要求性があり、L-グルタミン (L-Gln) や L-アスパラギン (L-Asn) などの欠乏は、肺がん、乳がん、白血病細胞、前立腺がんなどの増殖や転移を抑制する。細胞外 Asn を低下させる L-アスパラギナーゼは急性リンパ性白血病 (ALL) の治療薬として承認されているが、治療に伴う細胞内アスパラギン合成酵素 (ASNS : asparagine synthetase) の発現上昇による耐性が大きな課題になっている。ASNS は、Asn の de novo 合成を担っている酵素であり、肺がん、前立腺がん、膵がん、大腸がんなどで高発現しており、かつ抗がん剤耐性機構にも寄与しており、がん分子標的として非常に注目されている。ASNS は 561 残基のアミノ酸からなり、N 末側 (1-216) にグルタミンナーゼドメイン、C 末側 (217-561) にシンセターゼドメインを有しており、基質となるアスパラギン酸 (Asp) と ATP を反応させ活性化 β -aspartyl-AMP 中間体を生成すると同時に、L-Gln の加水分解によって生じたアンモニアと反応させ、四面体型遷移状態を経て Asn を生成する。これまでに、基質や遷移状態を模倣した阻害剤やプラチナ製剤などが ASNS 阻害剤として報告されているが、細胞膜透過性や活性強度などに大きな問題を抱えている。そこで、著者は、新規ファーマコホアを有する ASNS 阻害剤ビスボスクアール A の開発を行い、非小細胞肺がん細胞 (A549 細胞、H1299 細胞) におけるビスボスクアール A の抗がん作用機序の解析と L-アスパラギナーゼや mTORC 阻害剤との併用効果について検討した。

第 1 章では、著者は、ヒト線維肉腫 H1080 細胞由来の ASNS をクローニング後、大腸菌を用いて発現・精製を行い、ASNS 阻害剤スクリーニング系を構築した。続いて、in-house 天然化合物ライブラリーを探索源にスクリーニングを実施し、糸状菌 *Stachybotrys* sp. RF-7260 が産生する bisabolan 型メルテルペノイドであるビスボスクアール A を有望な ASNS 阻害剤として見出した。さらに、ビスボスクアール A が ASNS の K556 に Schiff-base 形成を介してコバレントに結合し、 β -aspartyl-AMP 中間体の生成を抑制することを明らかにした。また、CovDock を用いた in silico シミュレーションにより、ASNS の K556 を中心にビスボスクアール A 結合ポケットが存在することを示した。

第 2 章では、著者は、非小細胞肺がん細胞 (A549 細胞、H1299 細胞) の 2 次元培養、3 次元スフェロイド培養の両系において、ビスボスクアール A が顕著な抗がん作用を示し、この効果は ASNS のノックダウンや Asn の添加により減弱することを明らかにした。また、細胞サーマルシフトアッセイ (CETSA) により、ビスボスクアール A が細胞内において ASNS を標的としていることを示し、さらには、ビスボスクアール A が L-アスパラギナーゼとの併用により相乗的に抗がん作用を示すことを明らかにした。一方、ビスボスクアール A 処理した A549 細胞においては、RNAseq データの解析により、負のフィードバック経路として PI3K-AKT-mTORC1 経路、RAF-MEK-ERK 経路の活性化が観察された。また、Asn 欠乏時には、アミノ酸応答 (AAR: amino acid response) 経路の一つである GCN2-eIF2 α -ATF4 経路の活性化も報告されており、本経路の活性化はビスボスクアール A 処理時に観察された。しかし、ビスボスクアール A 処理により活性化されるこれら負のフィードバック経路は、mTORC 阻害剤 (torin-1, ラパマイシン) との併用により克服可能であることを示した。さらに、ビスボスクアール A は、オートファージを阻害すること、酸化的ストレスによりアポトーシスを誘導すること、細胞遊走や上皮間葉転換 (EMT) を抑制することを明らかにした。

以上、著者は、ASNS 阻害剤として新規ファーマコホアを有するビスボスクアール A を見出し、ASNS の K556 にコバレントに結合し酵素活性を抑制すること、非小細胞肺がん細胞において、L-アスパラギナーゼや mTORC 阻害剤と相乗的に抗がん作用を示すこと、酸化的ストレス誘導により抗がん効果を示すことなどを明らかにした。本研究成果は、ビスボスクアール A が有望な抗がん剤シーズとなりうることを示し、また、ASNS 阻害剤と L-アスパラギナーゼや mTORC 阻害剤との併用治療が有効ながん化学療法になりうることを示し、今後の発展が大いに期待される。

よって、本論文は博士 (薬科学) の学位論文として価値あるものと認める。また、令和 6 年 2 月 14 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。