

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04314

研究課題名(和文)新規がんタンパク質dynAPによる腫瘍形成機構の解明と分子標的治療薬の開発

研究課題名(英文)Functional analysis of novel oncogene dynAP and the identification of its inhibitors

研究代表者

水上 民夫(Mizukami, Tamio)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：80367896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：dynAPは細胞のがん化と悪性化に関与し、有望な新規がん治療標的分子である。本研究は、dynAPによるがん化機構の解明と、その阻害抗体・低分子化合物の創製により、がん分子標的治療分野に画期的な新薬を提供することを目的とした。その達成のために、(1) dynAPによるがん化の分子機構の解明、(2) dynAPのがん化機能を阻害する開発リード低分子化合物の探索・同定、(3) dynAPのがん化機能を阻害する開発リード抗体の取得、(4) dynAPの糖鎖の構造と機能の解析、の4課題に取り組んだ。本研究で得られたdynAPによるがん化機構に関する知見、開発リード物質をもとに、今後の開発の推進が期待される。

研究成果の概要(英文)：Human dynactin-associated protein (dynAP) is a transmembrane protein that promotes AktSer473 phosphorylation. NIH3T3 cells expressing dynAP vigorously formed spheroids in anchorage-deficient three-dimensional culture. NIH3T3dynAP cells injected into nude mice produced tumors with abundant blood vessels and weak cell-cell contacts. Thus, dynAP could be a new oncoprotein and a target for cancer therapy. Here, we investigate the biological properties of dynAP including structural and functional analysis of the sugar chains in dynAP and identified lead antibodies and chemicals targeting dynAP. These findings would promote dynAP targeting drug development.

研究分野：がん分子標的治療

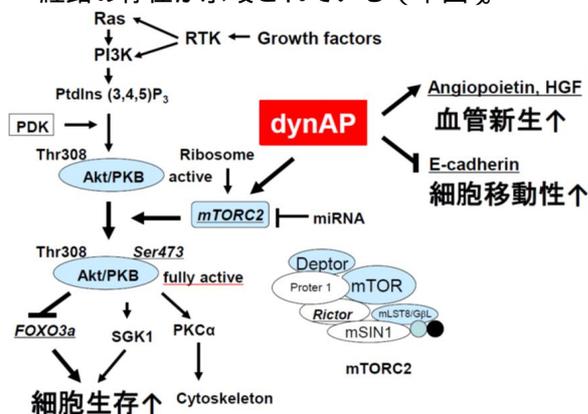
キーワード：分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

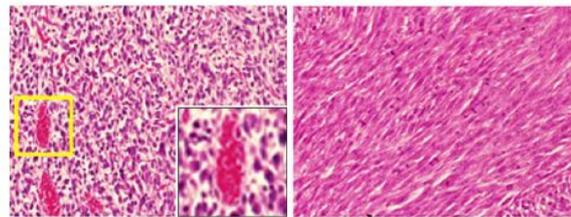
がんは日本人の死因の第1位を占め、年間35万人強の命を奪っており、がん対策は、国民の健康にとって重大な課題となっている。過去10数年、がんの薬物療法は大きな進展を見せている。進展の要因は、Bcr-Ablを標的とするイマチニブの開発事例のように、がん遺伝子の産物を標的とする分子標的創薬戦略にある(水上民夫、世界における抗がん剤開発の現状。腫瘍内科。11, 293, 2013)。分子標的抗がん剤の創薬過程の最重要課題は、まず標的分子を発見することである。申請者らは、本課題の研究対象であるdynAP(dynactin-associated protein)が、新規がん治療標的分子としての妥当性を持つことを証明している(基盤研究(B) H24~H26、「がん特異的タンパク質 dynAP: 新規がん治療標的としての検証」。以下に成果の概要を示す。)

申請者らは、「ヒト化酵母」技術により、酵母の増殖停止を指標として、機能未知のヒトタンパク質群から創薬標的タンパク質を効率良く探索すると同時に、当該タンパク質に作用する創薬シード化合物を簡便にスクリーニングする系を確立した(Sekigawa M. et al. J Biomol Screen. 15, 368, 2010)。この方法により6個の新規がん遺伝子候補を発見した。これらが発見したNIH3T3細胞は全てマウスに腫瘍を形成する。これらのうち、本研究の対象であるdynAPは最も研究が進展しており、以下に述べるように有望な抗がん剤創薬標的であることを証明し(Kunoh T. et al. Mol Cancer Ther. 9, 2934, 2010)、さらにdynAP特異的な阻害剤(Ergostane類縁体)を発見した(Ueda JY. et al. J. Antibiot. 63, 139, 2010)。

dynAPは細胞膜に局在する膜貫通型タンパク質であり、C-末端側が細胞外に露出している。dynAPを標的とする抗体医薬開発の可能性や新規な受容体である可能性を考え、dynAPを重点的に研究してきた。これまでの知見より、dynAPによるがんの生存・増殖モデルとして、dynAPの発現亢進 mTORC2の必須サブユニットであるRictorの発現亢進 AktSer473のリン酸化亢進 FoxO3aのリン酸化亢進によるアポトーシス阻害・細胞生存の経路の存在が示唆されている(下図)。



dynAPを発現させたNIH3T3/dynAP細胞は、in vitro系でのがん細胞の特徴であるフォーカス形成能、軟寒天中のコロニー形成能、そしてスフェロイド形成能(3次元培養)を示す。マウス移植実験では、NIH3T3/dynAPは豊富な血管を持ち、細胞間の接着が緩んだ独特の腫瘍組織を形成する(下左図がNIH3T3/dynAP、下右図がNIH3T3/H-Ras由来の腫瘍組織のHE染色像)。さらに形成されたNIH3T3/dynAP由来の腫瘍組織はゼリー状のヒアルロン酸と推定される構造体に覆われる特徴をもつ。NIH3T3/dynAPによる特徴ある腫瘍形成は、dynAPがAktのリン酸化を亢進し、血管新生促進因子の発現を上昇させ、そして接着因子E-cadherinの発現レベルを低下させることによるのではないかと考えている。さらに、ヒト細胞KMST-6(dynAP非発現細胞)でもdynAPはがん化能を持つ。すなわちKMST-6にdynAPを発現すると、Aktのリン酸化を亢進し、in vitro及びin vivo両系で腫瘍性を示す。



dynAP H-Ras

なお、本研究に関連する国内外の研究動向であるが、dynAPは申請者らが新規に同定した創薬標的タンパク質であり、現時点において申請者らの論文以外、国内及び国外の機関からdynAPに関する報告はない。また、申請者らは、酵母スクリーニング系、dynAPタンパク質及び阻害剤に関する特許申請(特願2010-001604)を行い、医薬品開発の観点からも他の追従を許さない状況となっている。

2. 研究の目的

本研究は、dynAPのがん化機構を解明するとともに、そのがん化機能を阻害する抗体、低分子性化合物を創製し、がん分子標的治療分野に画期的な新薬を提供することを目的とする。

(1) dynAPによるがん化の分子機構の解明

アノイクス(anoikis)とは、その生存や増殖にマトリックスへの接着を必要とする細胞が、マトリックスのない条件におかれた場合にアポトーシス死する現象であり、アノイクス抵抗性は細胞のがん化を示す有力な指標とされている。dynAPを発現したNIH3T3、KMST-6細胞は足場のない3次元培養で活発にスフェロイドを形成し、アノイクス抵抗性を示す。スフェロイドの形成には、細胞間接着及び細胞骨格に参与する分子の再編成が必要と考えられ、dynAP発現によるこれらの分子の変化を精査する。

(2) dynAP のがん化機能を阻害する開発リード低分子性化合物の探索・同定

既に同定した dynAP 阻害剤 (Ergostane 類縁体) の活性は弱く、開発リード化合物としては不適である。そこで dynAP による腫瘍形成機構の解明、dynAP を標的とする分子標的薬の開発を目的として、スフェロイド形成能を指標とし、dynAP のがん化機構を選択的に阻害する薬剤を同定する。

(3) dynAP のがん化機能を阻害する開発リード抗体の取得

dynAP の C 末端は細胞外に露出しており、抗体医薬開発の可能性を秘めている。細胞外露出領域を認識し、スフェロイド形成を強く阻害する抗体を取得し、開発のリード抗体とする。

(4) dynAP の糖鎖の構造と機能の解析

dynAP は、全長 210 のアミノ酸残基(aa)より構成され、114-134aa に膜貫通ドメイン(TM domain)、173-210aa にスレオニン/セリンリッチドメイン(T/S rich domain)を持つ。また、75-77aa および 143-145aa に N 結合型糖鎖修飾部位のコンセンサス配列が存在する。さらに細胞外に露出する C 末端側領域には、合計 23 箇所の潜在的な O 結合型糖鎖修飾部位が存在している。ここでは、dynAP の糖鎖の構造を解析し、dynAP の糖鎖修飾のがん化能に及ぼす影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) dynAP によるがん化の分子機構の解明

・スフェロイドの培養：NIH3T3/dynAP, NIH3T3/H-Ras を 500 cells / well になるように、細胞低吸着性 U 底型 96 ウェルプレート (PrimeSurface® 96U, 住友ベークライト社) に播種し、48 時間、シングルスフェロイドの培養を行った。2D での培養は通常の高吸着性の培養 10cm 径のディッシュを用いて行った。

・RNA 解析：15 枚の 96 ウェルプレートからスフェロイドを回収し、Rneasy mini kit (キアゲン) を使用して RNA を抽出した。マイクロアレイ解析は、アジレント法により、発現量が 2 倍以上変動した因子を解析した (タカラバイオによる委託解析)。リアルタイム PCR 解析は THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて行った。

(2) dynAP のがん化機能を阻害する開発リード低分子性化合物の探索・同定

NIH3T3/dynAP は、通常の 2 次元培養ではコントロールの lacZ 発現細胞と増殖は変わらないが、低吸着性 U 底ウェルプレート上の 3 次元のスフェロイド形成能は顕著に亢進する。dynAP のがん化機構を選択的に阻害する薬剤を同定するために、Ras がん遺伝子を

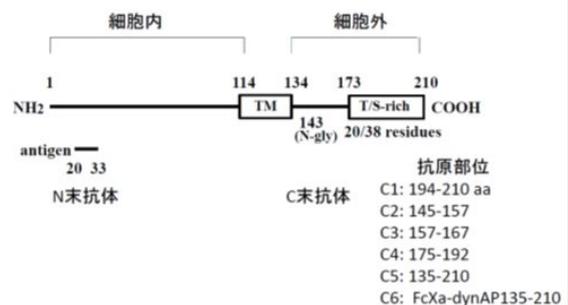
発現させた NIH3T3 細胞 (NIH3T3/Ras) をコントロール細胞とし、低吸着性 U 底プレート上の 3 次元のスフェロイド形成能の選択的な阻害を指標としたスクリーニング系を構築した。

スクリーニングの対象化合物として、360 種の生理活性化合物、抗がん剤より構成される、化学療法基盤支援活動より提供された標準阻害剤キットを用いた。

スクリーニングの結果、選択的な阻害作用を示す薬剤の標的分子やそのシグナル伝達経路が、dynAP による腫瘍形成機構に関わると推定した。

(3) dynAP のがん化機能を阻害する開発リード抗体の取得

dynAP の一次配列と抗体作成の抗原部位



dynAP タンパク質は全 210 アミノ酸より構成されるが、135~210 番目の C 末端側部分が細胞外に表出していることがこれまでの研究により明らかとなっている。タンパク質の表出アミノ酸予測を行って、免疫源となるペプチド配列 (C1~C4) をデザインした。その他、135~210 番目全長のタンパク質部分 (C5) とそれに Fc 領域付加した組換えタンパク質 (C6) を動物細胞で発現・精製し、免疫源とした。

(4) dynAP の糖鎖の構造と機能の解析

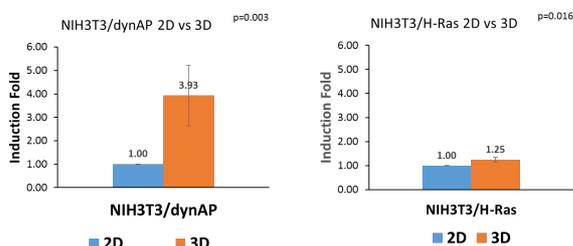
・糖鎖の構造解析：dynAP の C 末端側領域の 135-210 aa 部分 (dynAP (135-210)) を含む組換えタンパク質を HEK293F 宿主で分泌発現・精製し、dynAP (135-210) に含まれる糖鎖の構造解析を行った。糖分解酵素の Neuraminidase、O-glycosidase、PNGaseF で処理し、Brigh & Dyer 法によって水溶性画分として糖鎖を抽出した。3-アミノキノリン (3-AQ) ラベル化法を用いて質量分析装置 (MS) による糖鎖構造解析を行った。抽出した N 結合型糖鎖は NuTip carbon により脱塩・精製し、3-AQ によるラベル化を行った。O 結合型糖鎖は 3-AQ ラベル化した後、ZipTip C18 を用いて脱塩・精製した。MS スペクトルは、JMS-3000 マトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間質量分析装置 Spiral-TOF MS (JEOL (株)) を用いて Spiral/Positive モードで測定した。

・糖鎖の機能解析：dynAP の 3 種の糖鎖修飾部位変異体 (N 型糖鎖修飾を受ける 143 番目の Asn を Gln に置換した dynAPN143Q、C 末端

側の Ser/Thr-rich ドメイン (173-210aa) を欠失させた dynAP C38、両変異を組み合わせた dynAP C38N143Q) を発現させた細胞を造成した。さらに、これらの変異体の細胞内局在と、スフェロイド形成能、軟寒天中のコロニー形成能、フォーカス形成能などのがん化能を調べた。

4. 研究成果

(1) dynAP によるがん化の分子機構の解明
 dynAP を発現させた NIH3T3 細胞を 2 次元と 3 次元で培養し、3 次元培養選択的に発現変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ、qPCR により解析した結果、Has1/2 (ヒアルロン酸合成酵素)、CD44 (ヒアルロン酸受容体)、Twist2、インテグリンファミリーなどアノキス抵抗性への関与が報告されている遺伝子を同定した。Has2 の場合、NIH3T3/dynAP の 3D 培養で顕著な発現量の亢進 (3.93 倍) を示したが、一方、NIH3T3/H-Ras では大きな発現亢進は見られなかった (下図)。



本結果は、NIH3T3/dynAP 由来の腫瘍組織はゼリー状のヒアルロン酸と推定される構造体に覆われるのに対し、NIH3T3/H-Ras 由来の腫瘍塊にはゼリー状の構造体が見られなかったことと整合する。

よって、これらの知見より、dynAP 発現によるアノキス抵抗性にはヒアルロン酸の生成が関与している可能性が強く考えられた。

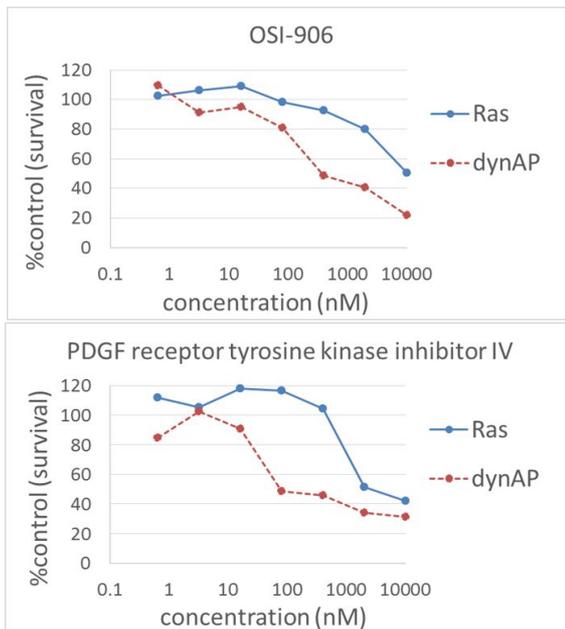
(2) dynAP のがん化機能を阻害する開発リード低分子性化合物の探索・同定

化学療法基盤支援活動より提供された標準阻害剤キットの 360 化合物を対象とする 1 次スクリーニングの結果、12 化合物が NIH3T3/dynAP 選択的なスフェロイドの増殖阻害作用を示した (下表)。

阻害剤	標的	GI50 (nM)	
		NIH3T3/dynAP	NIH3T3/Ras
PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor IV	PDGFR	148	964
OSI-906	IGF-1R	100	>1000
A83-01	ALK	99	>1000
PD 98059	MEK	19	>1000
Cantharidin	PP2A	70	>1000
Radicicol	HSP90	26	408
tamibarotene	retinoids	20	>1000
Scriptaid	HDAC	69	446
ABT-737	bcl-2	328	>1000
Nocodazole	tubulin depolymerization	176	526
Cycloheximide	protein synthesis	46	309
Doxorubicin, HCl	antitumor(DNA)	58	378

1 次スクリーニングで阻害活性が見いだされた 12 化合物については、ATP 値を指標として、スフェロイドの増殖阻害の再現性を調べた結果、PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor IV と OSI-906 (IGF-1R 阻害剤) が

NIH3T3/dynAP 選択的なスフェロイドの増殖阻害作用を示した (下図)。



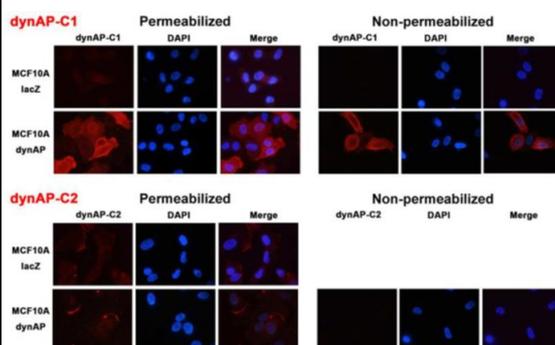
すなわち、PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor IV と OSI-906 の標的分子である PDGFR、IGF-1R の経路が dynAP による腫瘍形成機構に関わることが示唆された。

(3) dynAP のがん化機能を阻害する開発リード抗体の取得

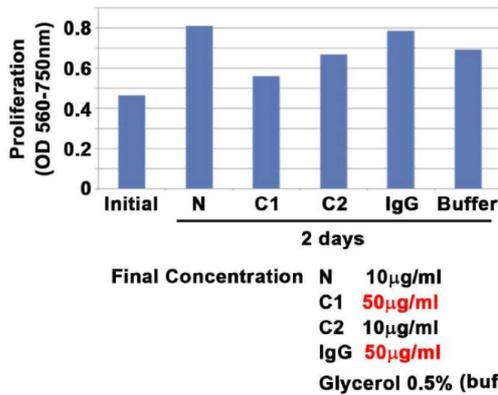
合計 6 種の抗原ペプチド・タンパク質を、ウサギに免疫して抗血清を取得し、それぞれの抗血清の抗原結合カラムでのアフィニティー精製により、抗原との反応性を持つポリクローナル抗体を取得した。

ELISA 法による検討で、C1 と C2 ペプチド配列を免疫源として取得した 2 種のポリクローナル抗体 (C1、C2 抗体と略称する) が抗原ペプチドと顕著に強い反応性を示すことが判明したことから、C1、C2 抗体に絞って、dynAP 安定発現株との反応性を検討した。

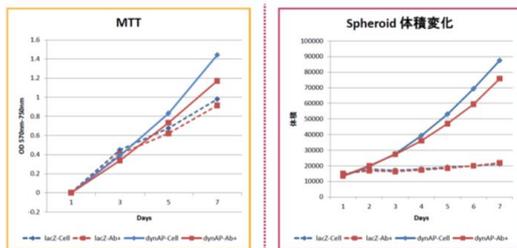
非透過処理、非処理条件下で、C1 抗体による染色で細胞膜に強いシグナルが観察されたものの、C2 抗体では、微弱なシグナルしか見られず、C1 抗体のみが細胞膜上に発現する dynAP の構造を認識できることがわかった (下図)。



ヒト子宮頸がん細胞株であるHeLa細胞の2次元培養による増殖に対して、C1抗体及びC2抗体の添加の影響を比較検討したところ、C1抗体でより強く細胞増殖が阻害されることがわかった(下図)。



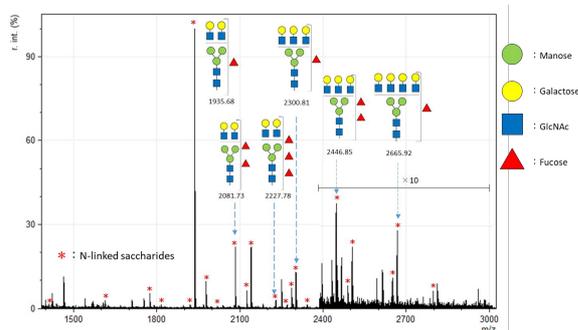
次に、C1抗体を用いて、全長dynAPの安定的発現によりがん化したマウスNIH3T3細胞の2次元平面培養系及び3次元スフェロイド培養系での増殖への影響を評価したところ、2次元及び3次元培養系ともに細胞の増殖を有意に阻害できることが明らかとなった(下図)。



上記の検討の結果、C1抗体はC1配列特異的にdynAP発現細胞の増殖を阻害することが判明した。これらの結果は、今後のC1配列を免疫源とする、dynAP発現がん細胞の増殖を強力に抑制できるモノクローナル抗体の開発の妥当性を示すものである。

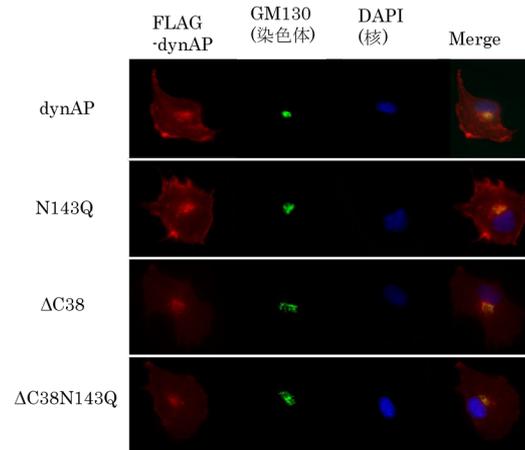
(4) dynAPの糖鎖の構造と機能の解析

・糖鎖の構造解析：dynAP(135-210)はN結合型糖鎖とO結合型糖鎖が付加されており、いずれも高度な修飾を受けていることが判明した。すなわち、N結合型糖鎖は、1-3分子のフコース化複合型であり、22種の不均一性を示した。またO結合型糖鎖には、core 1構造が検出された(下図)。



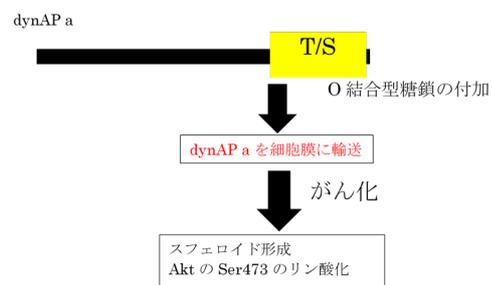
・糖鎖の機能解析：

dynAP糖鎖変異体の細胞内局在の解析から、N143QはdynAP aと同様にゴルジ体と細胞膜に局在したが、C38とC38N143Qはゴルジ体のみにも局在し、細胞膜への局在性を失うことが明らかとなった(下図)。



これまでの研究により、dynAP aのTMドメインからC末端側の細胞外領域を欠失させたdynAP Cは、ゴルジ体にものみ局在することが示されている。本研究により、C38で欠失しているC末端の38アミノ酸(T/S rich domain)が細胞膜への局在に必要なことが明らかとなった。dynAPのO結合型糖鎖は細胞内でゴルジ体から細胞膜へ輸送されるモデルが考えられるが、その際にT/S rich domainに付加されるO結合型糖鎖が重要な役割を担っていることを示唆する結果と言える。

NIH3T3EGFP/dynAP糖鎖変異体のスフェロイド形成能の比較検証から、C38はスフェロイド形成能を失っていることが明らかとなった。本知見はすなわち、dynAP aのスフェロイド形成能の発現にはO結合型糖鎖修飾を受けるC末端38アミノ酸領域が必要であることを示している。上記の局在性の結果も含めて考えると、dynAPのスフェロイド形成能の発現には、T/S rich domainへのO結合型糖鎖の付加によるdynAPの細胞膜への輸送が必要であるとのモデルの提唱が可能である(下図)。なおdynAPによるがん化メカニズムの第一ステップはmTORC2を介するAktのSer473のリン酸化の亢進である。Aktの活性化は細胞膜直下で起きることから、dynAPの細胞膜へ局在は必須と考えられる。



5. 主な発表論文等

〔論文発表〕(計1件)

Kunoh T, Wang W, Kobayashi H, Matsuzaki D, Togo Y, Tokuyama M, Hosoi M, Koseki K, Wada S, Nagai N, Nakamura T, Nomura S, Hasegawa M, Sasaki R, Mizukami T: Human Dynactin-Associated Protein Transforms NIH3T3 Cells to Generate Highly Vascularized Tumors with Weak Cell-Cell Interaction. PLoS One. 2015 Aug 18;10(8):e0135836. doi: 10.1371/journal.pone.0135836. eCollection 2015. PMID: 26284361

〔学会発表〕(計6件)

尹 驍博、小西 貴之、堀川 和男、田中 峻太、細井 美穂、久能 樹、和田 修一、長谷川 慎、佐々木 隆造、水上 民夫：新規ヒトがんタンパク質 dynAP の糖鎖の機能解析 第 40 回日本分子生物学会学術集会(神戸)(2017年12月6日)

小西 貴之、尹 驍博、堀川 和男、田中 峻太、細井 美穂、久能 樹、和田 修一、長谷川 慎、佐々木 隆造、水上 民夫：新規ヒトがんタンパク質 dynAP の糖鎖の構造解析 第 40 回日本分子生物学会学術集会(神戸)(2017年12月6日)

田口大貴、久能樹、長谷川慎、佐々木隆造、水上民夫：新規がんタンパク質 dynAP による腫瘍形成機構の解明：dynAP 発現依存的なスフェロイド形成の阻害剤の探索。第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会(福岡)(2017年6月15日)

水上民夫、細井美穂、長谷川 慎、佐々木隆造、藤本博己、生藤邦夫：高速細胞スキャナーを用いたスフェロイド培養による抗がん剤スクリーニング法の開発。第7回スクリーニング学研究会(東京)(2016年11月25日)

徳山奨浩、久能樹、長谷川慎、佐々木隆造、水上民夫：新規がんタンパク質 dynAP による腫瘍形成機構の解明：dynAP 発現依存的なアノキス抵抗性に関わる因子の探索。第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会(別府)(2016年5月31日)

水上 民夫、田口 大貴、和田 裕馬、東郷 有希、長谷川 慎、細井 美穂、土田 美江、佐々木 隆造、藤本 博己、上山 憲司、小林 正嘉：光干渉断層撮影法(Optical Coherence Tomography; OCT)を用いたスフェロイドの3次元(3D)形状計測に基づく抗がん剤の新たなスクリーニング・薬効評価法の開発 第38回日本分子生物学会学術集会(神戸)(2015年12月2日)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：新規抗がん剤およびそのスクリーニング方法

発明者：水上民夫、久能樹、和田修一、向由起夫、太田伸二、夏目徹、家村俊一郎、新家一男、五島直樹、高木基樹、佐々木隆造

権利者：学校法人関西文理総合学園、独立行政法人産業技術総合研究所、社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、株式会社フロンティアファーマ

種類：特許

番号：特許第5920904号

登録年月日：2016年4月22日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/research/h/%E6%95%99%E5%93%A1%E3%81%AE%E7%B4%B9%E4%BB%8B%EF%BC%88%E6%B0%B4%E4%B8%8A-%E6%B0%91%E5%A4%AB%EF%BC%89/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

水上 民夫(MIZUKAMI, Tamio)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：80367896

(2)連携研究者

佐々木 隆造(SASAKI, Ryuzo)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・客員教授

研究者番号：60077378

長谷川 慎(HASEGAWA, Makoto)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：10367899

中村 肇伸(NAKAMURA, Toshinobu)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：80403202

永井 信夫(NAGAI, Nobuo)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：90260281

高橋 玲(TAKAHASHI, Rei)

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60144565