

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14407

研究課題名(和文) Cyclin G1\_PP2A-B' の結合を阻害する新規な癌分子標的薬の開発

研究課題名(英文) Development of a novel molecular target drug for cancer therapy.

研究代表者

野島 博 (NOJIMA, HIROSHI)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：30156195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ELAS1ペプチドはサイクリンG1とPP2A B' との結合を阻害する。ELAS1の過剰発現は骨肉腫細胞、前立腺癌細胞、舌癌細胞において、線照射やカンプトテシン刺激によってアポトーシスを引き起こす。しかし、この現象は正常細胞では起きなかった。ELAS1を発現するアデノウイルスを舌癌細胞に感染させるとアポトーシス死を起こした。ELAS1を29アミノ酸から10アミノ酸まで短縮したペプチド(ELAS1-t)を作成し、DU145およびSAS細胞に導入した場合でも効率的にアポトーシスを誘導した。この結果からELAS1-tはペプチド医薬品としても有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Here, we found that ELAS1, a twenty-nine amino acid peptide corresponding to the association domain of Cyclin G1 with protein phosphatase 2A, interacts with the B' gamma subunit of PP2A and competitively inhibits the association with Cyclin G1. We showed that ELAS1 induced apoptotic cell death in U2OS, a human osteosarcoma cells through prevention of dephosphorylation at Mdm2 pT218 and p53 pS46, following DNA double-strand break insults such as gamma-irradiation and irinotecan treatment. We also show that ELAS1 caused apoptosis in prostate adenocarcinoma DU145 cells and tongue squamous-cell carcinoma SAS cells, but not in normal KD cells. The adenovirus that express ELAS1 also killed SAS cells. Notably, Cy5 tagged ELAS1t, which contained only ten amino acids, also efficiently induced apoptosis in both DU145 and SAS cells, suggesting the usefulness of ELAS1t itself as a peptide. Taken together, our results suggest that ELAS1 is therapeutically useful as a peptide drug.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：サイクリンG1 PP2A-B' アポトーシス 骨肉腫細胞 前立腺癌細胞 正常細胞 ペプチド 分子標的薬

## 1. 研究開始当初の背景

サイクリン G1 (CycG1 : CCNG1 遺伝子)は我々の研究室で世界に先駆けて発見・命名した遺伝子(タンパク質)である。これまでの機能解析研究から CycG1 と CycG2 は、タンパク質脱リン酸化酵素 2A の B'γ サブユニット(B'γ と表記)と結合することが分かった。一方、Ccng1/2 それぞれを KO(ノックアウト)したマウスと双方を KO した WKO マウスの 3 種類を作製し、そこから MEF(マウス胎児線維芽細胞: Mouse Embryonic Fibroblast)を樹立した。DNA アルキル化剤であり肝臓特異的に腫瘍を形成する薬剤=DEN (N-ニトロソジエチルアミン) を仔マウスに投与しその後解剖した結果、WT と比較して顕著に腫瘍の数、大きさ共に下回った。すなわち CCNG1/2 を欠損させると癌が出来にくくなることを示唆する。この癌発生抵抗性という極めて珍しい表現型は CycG1/2 機能(PP2A の運搬役)に対する阻害剤が抗癌作用を持つ全く新しい発想に基づいた独自の分子標的薬として有用である可能性を示唆する。これが、研究開始当初の背景である。

## 2. 研究の目的

新しい発想に基づいた、癌細胞を効率よく殺傷する分子標的薬を開発することが本研究の目的である。新規な分子標的薬候補は ELAS1 (イーラズワン) と命名したペプチド(29aa) である (図 1)。ELAS1 は CycG1 と

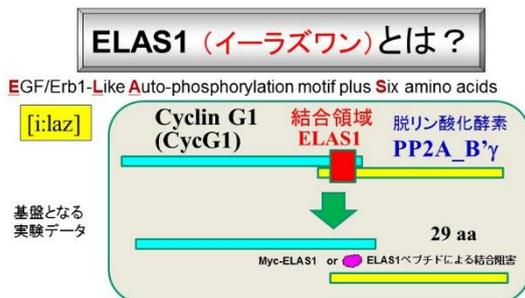


図 1 : ELAS1ペプチドの過剰発現はCyclin G1/PP2A B'γ-Mdm2-p53 という制御経路を介して癌細胞に(おそらく癌幹細胞も)に効率よくアポトーシスを誘導する。

PP2A-B'γ (脱リン酸化酵素制御サブユニット)の結合部位 (29 アミノ酸) を構成するため、過剰発現させると CycG1 と PP2A-B'γ の結合

を競合的に阻害する。CycG1 は PP2A-B'γ を標的へと運搬する機能を持つことで2つの脱リン酸化標的を同時に狙い撃ちできる(図 2)。第1の標的である MDM2

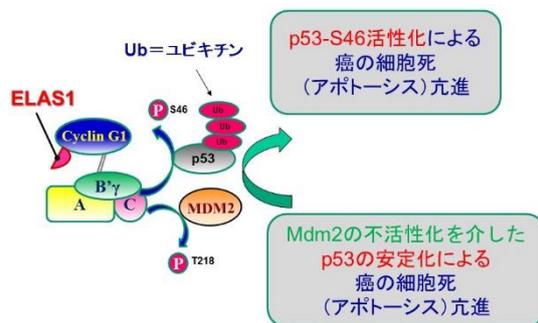


図 2 : ELAS1 は p53-S46 活性化と Mdm2 の不活性化という 2 つの分子標的を狙い撃ちにする事で、アポトーシスを癌細胞のみ誘導する。

(ユビキチンリガーゼ) は p53 をユビキチン化することでプロテアソーム依存性分解を誘導する。ELAS1 は PP2A-B'γ\_CycG1 結合の阻害を通して MDM2 の T216 を脱リン酸化し、不活性化することで p53 の分解を阻害して安定化する。第2の標的は、p53-pS46 (アポトーシス誘導能を持つ) の脱リン酸化促進で、ELAS1 の過剰発現は p53-pS46 を介するアポトーシスを促進する。実際、ELAS1 を骨肉腫細胞 (U2OS) で過剰発現させると PP2A-B'γ\_CycG1 結合を阻害するとともに、DNA 二重鎖切断(DSB)を起こす γ 線照射や化学療法薬 (CPT,irinotecan) などで U2OS を効率よくアポトーシス誘導した。

## 3. 研究の方法

以下の方法を用いて研究を進めた。

- (1)ヒト由来の正常繊維芽細胞 (KD)、および以下の3種類のヒト癌細胞株を用いた: 骨肉腫の一種である肉腫細胞 (U2OS)、腺癌の一種である前立腺癌細胞(DU145)、扁平上皮癌の一種である舌癌細胞 (SAS)。
- (2)細胞に組み込んだ遺伝子の選択的発現のため Doxycycline (Dox) 誘導系 (Tet-on system) を用いた。我々は U2OS-, SAS-, DU-145-advanced 細胞株を各々1ヶ月以上かけて樹立し、Myc-Vector と Myc-ELAS1 プラスミドを

発現する細胞株を樹立した。

(3) 培養プレートに DU145 細胞と SAS 細胞を播き、JBS Protein Transduction Kit (Jena Bioscience) を用いて Cy5-ELAS1, Cy5-ELAS1T ペプチドを細胞へ導入した。細胞導入効率の良い Atto488-BSA を positive control として用いた。

(4) アポトーシスの検出には UNEL assay, MTT assay, フローサイトメトリー (FC), Colony formation assay、クリスタルバイオレット染色を用いた。

(5) 6Myc-ELAS1+IRES1+Flag-p53 を CAG ベクターに組み込んだアデノウイルスを作製した。SAS 細胞を 10 cm ディッシュにまき、80 % confluent の状態で MOI (multiplicity of infection) が 1.0 になるようにアデノウイルス液もしくはコントロール上清を加え、37 °C で 2 時間培養後、CPT を加えた培養培地に交換して 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C で 48 時間培養したのちクリスタルバイオレット染色を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ELAS1 と同等な阻害効果をもつペプチドを化学合成して試験する

1-1) ELAS1 ペプチドを蛍光色素 (Cy5) で標識し、Myc-ELAS1 プラスミドを発現させた場合と同様な効果があるかどうか U2OS 細胞を用いて調べた。その結果、まず Cy5-ELAS1 は、PP2A-B'γ を表面に持つビーズに結合し、PP2A-B'γ と Myc-CycG1 の結合を用量依存的に阻害することが分かった。またタンパク質導入ドメインペプチド CHARLOTTE を利用して U2OS 細胞に取り込ませた Cy5-ELAS1 ペプチドは、細胞内で長時間 (48 時間以上) 安定に存在し、γ 線照射後に強いアポトーシス誘導作用(TUNEL positive cells)を示した。実際、Cy5C-ELAS1 の TUNEL 由来の信号は核内で観察され、負の対照 (ATTO488) に比べて、γ 線照射後における Cy5C-ELAS1 の持つアポトーシス誘導作用は 3 倍程度強いこ

とが明らかとなった。この結果は ELAS1 ペプチドそのものが薬剤として展開できる可能性を示唆する。

##### (2) 腺癌の一種である前立腺癌細胞(DU145)においても ELAS1 は同等なアポトーシス誘導能を持つ。

2-1) これまでに ELAS1 依存性のアポトーシス誘導を証明してきた骨肉腫細胞 (U2OS) は (文献 2) は患者数の少ない骨肉腫の一種であるため、臨床的には普遍性に乏しい。そこで、患者数の多い腺癌の一種である前立腺癌細胞(DU145)を用いて、Myc-Vector または Myc-ELAS1 プラスミドを個別に Dox 誘導発現する細胞株を 2 種類 (DU145\_Myc-Vector、DU145\_Myc-ELAS1) 樹立した。

2-2) これら 2 種類の癌細胞に DNA 二重鎖切断(DSB)を起こす抗癌剤である Camptothecin (CPT)や Irinotecan を細胞培養液に添加したところ、γ 線照射の場合と同様に FACS 解析によってアポトーシスの指標である Sub G1 の増加が観察された(図 3)。

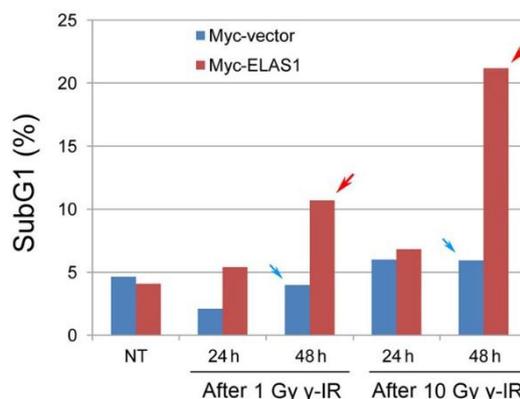


図 3 : ELAS1 は前立腺癌細胞(DU145)においても γ 線照射後にベクターのみに比べて顕著なアポトーシス誘導能を示す。

##### (3) 扁平上皮癌の一種である舌癌 (SAS) においても腺 ELAS1 は同等なアポトーシス誘導能を持つ。

上述の腺癌と同様に患者数の多い扁平上皮癌の一種である舌癌 (SAS) を用いて、Myc-Vector または Myc-ELAS1 プラスミドを個別に Dox 誘導発現する細胞株(SAS\_Myc-Vector、SAS\_Myc-ELAS1)を樹立した。

3-2) これら2種類の癌細胞にγ線照射、CPT、Irinotecanを細胞培養液に添加した場合には、U2OSやDU-145ほどの顕著なアポトーシスは観察されなかった。これはSAS細胞がp53を欠損していることが原因と考えられた。

そこで、外部からp53を追加発現させることを試みた。興味深いことにp53のS46がF46に変異したために悪性が亢進している患者細胞株が報告されている。そこで、S46を様々に変異させたp53を外部から導入することで、ELAS1のアポトーシス誘導能を亢進出来ないかと考えて、フェニルアラニン(F)と構造が類似なアミノ酸であるトリプトファン(W)やチロシン(Y)に変異させたプラスミドを作製した。またリン酸化された時にのみ活性化される野生型のS(セリン)を常時活性化型であるD(アスパラギン酸)に変異させたプラスミドも作製した。

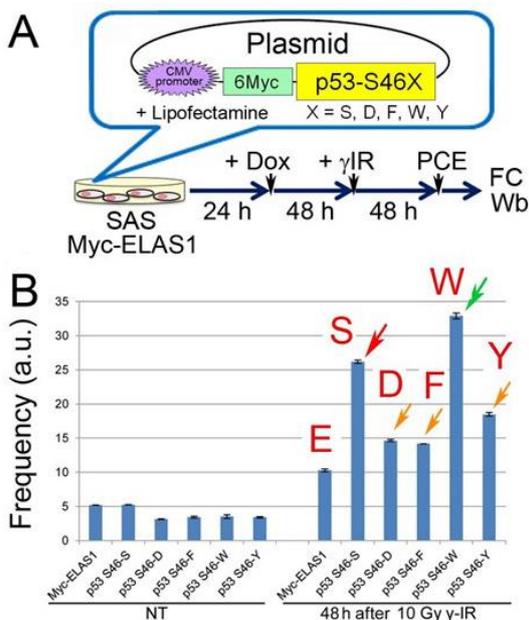


図4：ELAS1は舌癌（SAS）においても外部からp53を追加発現させることで、γ線照射後にベクターのみに比べて顕著なアポトーシス誘導能を示す。

これらをSAS細胞へ導入して発現し、γ線照射してFACS解析したところ、アポトーシスの指標であるSub G1の増加が観察された。その割合はp53-pS46Dでは野生型p53-pS46Sの60%位まで低下したがp53-

pS46Wでは野生型p53-pS46Sの場合より120%まで上昇した(図4)。

#### (4) SAS ELAS1細胞のヌードマウスの舌内への移植実験

SAS\_Myc-ELAS1細胞をヌードマウス舌内に移植し、Dox(+)添加で発現誘導してからIrinotecanを投与するとDox(+)添加でMyc-ELAS1を発現誘導させたヌードマウスにおいてDox(-)のマウスに比べて腫瘍サイズが縮小した(図5)。

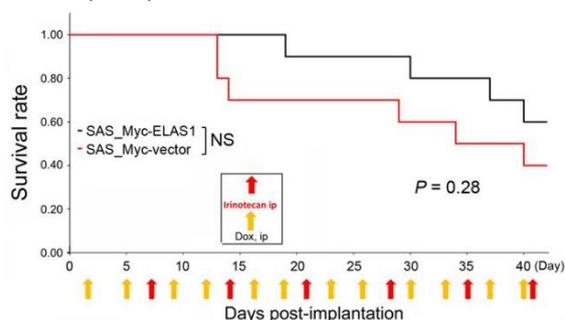


図5：舌内にSAS\_Myc-ELAS1細胞を移植されたヌードマウスは、SAS\_Myc-Vectorを移植されたヌードマウスより長生きした。

#### (5) Myc-ELAS1を装備したアデノウイルス作製

ELAS1の遺伝子治療への応用を目指してMyc-ELAS1を装備したアデノウイルス作製を開始した。そのために、まずCAG\_6Myc-ELAS1+IRES+3FLAG-p53という構成を持つコスミドを作製した。このコスミドDNAをSAS Tet-on細胞(advanced cell)に遺伝子導入(Transfection)し、ハイグロマイシン(Hygromycin)という薬剤で選択培養した後にDox添加し、48h後に細胞抽出液を採取して、それをウェスタン解析した。

その結果、コスミドから発現した6Myc-ELAS1とともに、p53の発現もDox添加の時にだけ確認できた。抗p53抗体のみでなく抗FLAG抗体によってもp53の発現が検出できたことから、IRES1ユニットが有効に動いていることが分かった。ここにIRES1ユニットとは一個のプロモーターから転写されるmRNAから複数のタンパク質が発現するようリボゾームの結合塩基配列で、リボゾームを呼び

込んで IRES 1 下流の（この場合には FLAG-p53） mRNA の翻訳を開始させる機能を持っている。

次に、このコスミドを SAS 細胞に感染させると、 $\gamma$  線照射などで有効にアポトーシスを誘導した。一方、正常細胞である KD 細胞ではアポトーシスを誘導しなかった。この結果は ELAS1 のアポトーシス誘導効果が正常細胞では無効である、すなわち安全性の高さを示唆した。次いで、この Myc-ELAS1+ IRES+FLAG-p53 を装備したアデノウイルスを作製し CPT 存在下に SAS 細胞に感染させたところアデノウイルスを含まないネガコンに比べて有意に細胞死が促進された(図 6)。

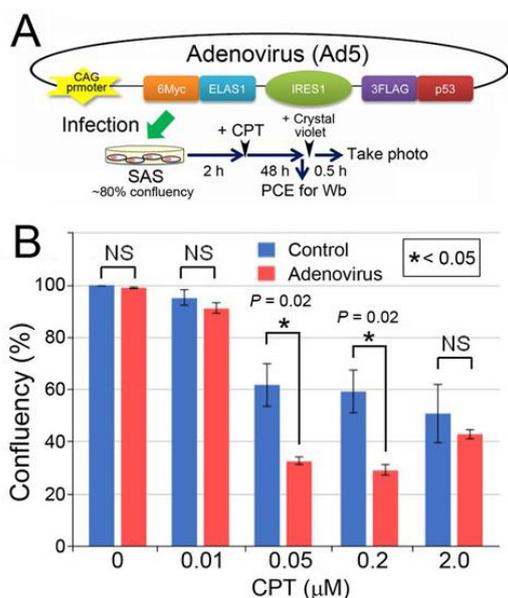


図 6 : Myc-ELAS1 を装備したアデノウイルスが感染した SAS 細胞では有意なアポトーシス死が観察された。

### (6) ELAS1 ペプチドの短縮化

ELAS1 の長さを、29 アミノ酸から、活性をもたせたまま、どこまで短くできるかを調べた。そのために、ELAS1 を N 末端側から徐々に削った、22, 18, 14, 10, 9, 8, 6, 4, 2 アミノ酸数からなるペプチドを化学合成して、培養昆虫細胞からの抽出液を基に作成されている TNT(T7 Insect Cell Extract Protein Expression System)無細胞発現系を使って調製した Myc-CycG1 と GST-PP2A-B $\gamma$  との結合を調べたと

ころ、10 アミノ酸数からなる ELAS1 ペプチドまでが結合阻害効果を持つことが判明した。そこで、これを ELAS1-t (ten) と命名した。次いで、Cy5\_ELAS1-t を化学合成して DU-145 や SAS 細胞に導入したところ、 $\gamma$  線照射後 48 時間で、Cy5\_ELAS1 の場合と同程度のアポトーシス誘導能を示した(図 7)。この結果は ELAS1-t が ELAS1 活性のコア(中心領域)であることを示唆する。

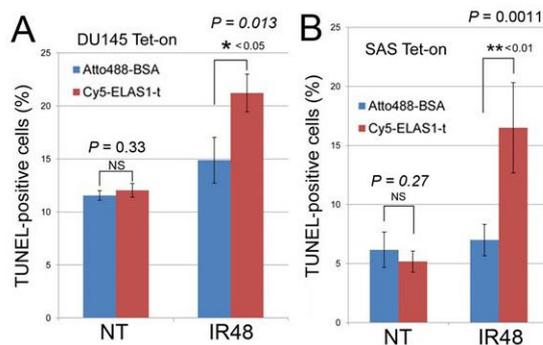


図 7 : 10 アミノ酸までに短縮化した ELAS1-t ペプチドを外部から直接導入された DU-145 および SAS 細胞では、 $\gamma$  線照射後に顕著なアポトーシス死が観察された。

### (7) 考察

創薬ならびに関連疾患の治療に与える影響の観点から考察して、本研究成果が与える学問的インパクトは以下の列挙する諸点において極めて大きいと考える。

- (1) 現状では副作用のため、X 線治療や放射線治療は一生で 1 回しか受けることができないが、ELAS1 を投与すると、X 線治療や放射線治療を 10 回まで受けることができる。
- (2) ELAS1 を投与すると、1/40 (CPT) または 1/5 (Irinotecan) の量で十分に癌を殺せるので、副作用が大幅に軽減できる点が挙げられる。
- (3) CycG1 のノックアウトマウスは正常に生まれて元気に生育するので、副作用の少ない分子標的薬となりうると考える。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件; うち主要 6 件)

- (1) Uchihashi T, Ota K, Yabuno Y, Ohno S, Fukushima K, Naito Y, Kogo M, Yabuta N, Nojima H. ELAS1 induces apoptotic death

in DU145 and SAS cancer cells, but not in normal KD cells. *Onco Target*, 2017 in press.

- (2) Fukushima K, Wang M, Naito Y, Uchihashi T, Kato Y, Mukai S, Yabuta N, Nojima H. GAK is phosphorylated by c-Src and translocated from the centrosome to chromatin at the end of telophase. *Cell Cycle*, 2017 Mar 4;16(5):415-427. doi: 10.1080/15384101.2016.1241916.
- (3) Ohno S, Ikeda JI, Naito Y, Okuzaki D, Sasakura T, Fukushima K, Nishikawa Y, Ota K, Kato Y, Wang M, Torigata K, Kasama T, Uchihashi T, Miura D, Yabuta N, Morii E, Nojima H. Comprehensive phenotypic analysis of knockout mice deficient in cyclin G1 and cyclin G2. *Sci Rep*. 2016 Dec 16;6:39091. doi: 10.1038/srep39091.
- (4) Ohno S, Naito Y, Mukai S, Yabuta N, Nojima H: ELAS1-mediated inhibition of the cyclin G1-B'γ interaction promotes cancer cell apoptosis via stabilization and activation of p53. *Oncogene*, 34(49): 5983-5996, 2015. doi: 10.1038/onc.2015.47.
- (5) Hasegawa S, Nagano H, Konno M, Eguchi H, Tomokuni A, Tomimaru Y, Wada H, Hama N, Kawamoto K, Kobayashi S, Marubashi S, Nishida N, Koseki J, Gotoh N, Ohno S, Yabuta N, Nojima H, Mori M, Doki Y, Ishii H: Cyclin G2: A novel independent prognostic marker in pancreatic cancer. *Oncol Lett*, 10(5): 2986-2990, 2015. doi: 10.1128/MCB.00136-16.
- (6) Nishikawa Y, Okuzaki D, Fukushima K, Mukai S, Ohno S, Ozaki Y, Yabuta N, Nojima H: Withaferin A Induces Cell Death Selectively in Androgen-Independent Prostate Cancer Cells but Not in Normal Fibroblast Cells. *PLoS One*, 10(7): e0134137, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0134137.

[学会発表] (計 7 件;うち主要 4 件)

- (1) 太田香織、池田純一郎、大野将一、向井智美、鳥形康輔、内藤陽子、王冕、奥崎大介、藪田紀一、三浦大作、森井英一、野島博. サイクリン G1/G2 欠損マウスの表現型解析. 第 3 8 回日本分子生物学会年会(2015 年 12 月 1 日), 神戸国際会議場.
- (2) 太田知絵, 向井智美, 太田香織, 奥崎大介, 藪田 紀一, 野島 博. Cyclin G-associated kinase (GAK) phosphorylates TAp63 to upregulate expression of LCE1C gene, 第 3 8 回日本分子生物学会年会(2015 年 12 月 1 日) 神戸国際会議場
- (3) Kaori Ota, Toshihiro Uchihashi, Yusuke Yabuno, Mikihiko Kogo, Norikazu Yabuta

and Hiroshi Nojima. ELAS1 peptide caused apoptosis in both adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. 第75回日本癌学会学術総会 (2016年10月7日) パシフィコ横浜

- (4) 太田知絵、篠倉悠久、奥崎大介、福島孝士朗、向井智美、藪田紀一、野島 博. GAK がリン酸化した TAp63はLCE1C 遺伝子を特異的に転写誘導する。第 3 9 回日本分子生物学会年会(2016年12月2日) パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

- 1) 文部科学省科学研究費新学術領域研究がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動 <http://ganshien.umin.jp/research/spotlight/nojima/index.html>

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 細胞死促進剤

発明者: 野島博

権利者: 大阪大学知的財産本部 (管理番号 K20130266)

出願番号: 特願 2014-052612

出願年月日: 2014 年 (平成 26 年) 3 月 14 日

出願国: 日本

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 細胞死促進剤

発明者: 野島博

権利者: 大阪大学知的財産本部 (管理番号 K20130266)

出願番号: 特願 2014-052612

取得年月日: 2016 年 3 月 4 日

特許番号: 特許第 5892666 号

出願国: 日本

国内外の別: 国内

[その他] ホームページ等

<http://molgenet.biken.osaka-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

野島 博 (NOJIMA HIROSHI)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号: 3 0 1 5 6 1 9 5