

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20822

研究課題名(和文) HuRをターゲットとした分子標的薬の開発～がんの制御を目指して～

研究課題名(英文) The development of a HuR-targeted drug as a new therapeutics agent

研究代表者

格口 渉 (Kakuguchi, Wataru)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70740645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：HuRに結合する化合物を見出すため、1570化合物で構成される承認薬ライブラリーを示差走査型蛍光定量法を用いてスクリーニングした。その中から、抗トリパノソーマ薬であるSuraminを見出し、表面プラズモン共鳴を用いて特異的にHuRに結合することを証明した。また、SuraminがHuRの機能に対して影響を及ぼすかどうかを確認するため、舌癌細胞株であるHSC-3に作用させ、ARE-mRNAの発現量と安定化を確認し、HuRの機能を阻害していることを確認した。また、舌癌細胞の浸潤能などの悪性形質を減弱させた。これらより、Suraminは口腔がんに対する新しい抗がん治療法に成り得ることが証明された。

研究成果の概要(英文)：we screened 1570 compounds in the approved drug library by differential scanning fluorimetry (DSF) to discover a HuR-targeted compound. Of them, suramin, an anti-trypanosomal drug, binds specifically to HuR on surface plasmon resonance (SPR). We confirmed that suramin significantly decreased ARE-mRNA and protein expression. The mRNAs were destabilized by suramin. Furthermore, the motile and invasive activities of a tongue carcinoma cell line, HSC-3, treated with suramin were markedly lower than those of control cells. The above findings suggest that suramin binds to HuR and inhibits its function. We also showed that the anticancer effects of suramin were caused by the inhibition of HuR function, indicating its potential as a novel therapeutic agent in the treatment of oral cancer.

研究分野：Oral cancer

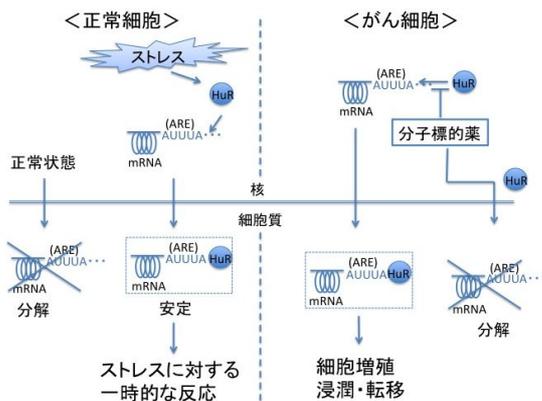
キーワード：HuR Oral cancer ARE-mRNA screening approved drug library

1. 研究開始当初の背景

がんに対する分子標的薬は、がんの特徴的な遺伝子やタンパクなどをターゲットとするため、効果的かつ副作用が少ないと考えられてきた。しかし、耐性を持つがん細胞の存在や、従来の予想とは異なり多くの副作用がみられるため、より理想的なターゲットの探求が必要とされている。

HuR は、RNA 認識部位である RNA recognition motif (RRM) を有しており、AU-rich element (ARE) を持つ mRNA (ARE-mRNA) に特異的に結合する。ARE は、*c-fos*、*c-myc* などのがん遺伝子、*VEGF* など、*COX-2* などの血管新生関連遺伝子、*cyclin A* などの細胞周期調節遺伝子といった細胞増殖や生存に関連する遺伝子の mRNA に存在する。

ARE-mRNA は正常細胞ではすぐに分解されるが、ストレスなどの条件下では HuR の核外輸送が促進され、ARE を安定化している。一方、がん細胞では HuR は恒常的に核外輸送されており、ARE-mRNA は安定化され、がんの悪性形質に関わっている。

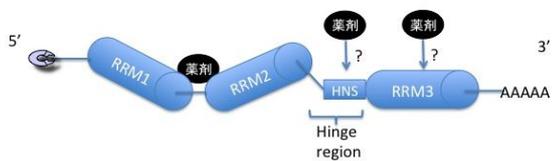


HuR は多くの悪性腫瘍で過剰発現しており、特に細胞質の局在の増加は悪性度に相関している。HuR の抑制は抗腫瘍効果が期待できると予測され、多くのがん細胞で検証されてきた。筆者は、口腔がん細胞の HuR をノックダウンすると、*c-myc*、*COX-2* mRNA の安定化を阻害し、細胞増殖関連タンパクの発現を低下させ、増殖能・浸潤能などの悪性形質が減弱することを証明している (Kakuguchi et

al; Mol. cancer. res, 2010)。このように、HuR・ARE-mRNA の核外輸送・安定化は、がんにとって非常に重要であることがわかっている。

近年、HuR の構造解析がすすみ、mRNA に結合する RRM1,2 は分子標的薬の薬剤結合部位になり得ることがわかっている。RRM1,2 は、HuR が mRNA に結合するために重要な部位であり、この部位の阻害は HuR の重要な機能の一つである ARE-mRNA の安定化を阻害し、抗腫瘍効果を発揮すると予想される。がんにとって重要な因子である HuR を阻害する分子標的薬の開発は、新しいがん治療として期待ができる。

HuR 分子標的薬結合部位



2. 研究の目的

本研究の目的は、がんの制御を行うために HuR に対する分子標的薬を開発することである。HuR に結合する化合物のスクリーニングを行い、in vitro での HuR-化合物の結合を確認し、その化合物を口腔がん細胞に作用させ、その挙動を解析する。その化合物が HuR に結合し、HuR の機能を阻害することを確認し、口腔がん細胞における増殖・浸潤活性といった悪性形質を抑制することを証明する。

3. 研究の方法

(1) HuR タンパクの精製: pGEX-6p-1 に HuR の全長配列を組み込み、大腸菌 BL21 に transformation し、GST-HuR タンパクを作製し抽出する。その後 GST を切り離し、HuR タンパクを精製した。

(2) HuR タンパクに対する Hit 化合物の検索: DSF (differential scanning fluorimetry) を用いて、ヨーロッパやアメリカで上市されたことのある薬剤で構成された承認薬ライ

ブラリーを screening し、相互作用がある化合物を選定した。

(3) HuR に対する特異的な結合の確認: DSF で pick up された HuR と相互作用がある薬剤を SPR(Surface plasmon resonance)を用いて、HuR に特異的に結合する化合物かどうかを確認した。

(4) Hit 化合物の HuR に対する効果の確認: 化合物が ARE-mRNA の発現量や安定化に対する影響を確認するため、口腔がん細胞に Hit 化合物を異なる濃度で作用させ *c-fos*, *c-myc*, *COX-2*, *cyclinA2*, *cyclinB1* などの HuR と結合する ARE-mRNA の挙動を Real time RT-PCR 法で確認した。

(5) 口腔がん細胞に対する Hit 化合物の効果: 口腔がん細胞に対し、wound healing assay や invasion assay を用いて、Hit 化合物が口腔がん細胞の悪性形質を減弱するかどうかを確認した。

4. 研究成果

(1) 1570 種類からなる承認薬ライブラリーに対し、DSF を用いて、HuR に対して相互作用がある化合物を検索した。化合物は HuR に対して約 4 等量となるように調整して、DSF を行った。DSF の温度変化が 1 度以上の化合物を相互作用があると判断し、55 化合物を選定した。次に、温度変化 55 化合物の濃度を HuR タンパクに対し 10 等量となるように調整し、DSF において濃度依存性に相互作用が増強するかどうかを確認した。DSF の温度変化が 2 度以上かつ初めの DSF より変化が大きいものを濃度依存性変化があると判断し、8 化合物を選定した。8 化合物は 1 化合物がプラスに変化し、7 化合物がマイナスに変化していた。DSF の温度変化がプラスに変化した化合物 suramin を Hit 化合物とし、実験を進めることとした。

(2) Suramin が HuR に特異的に結合することを、SPR を用いて確認した。HuR と Suramin

は KD 値 $2.4 \times 10^{-4} \text{M}$ であり、センサーグラムは Box 型であった。affinity は強くないものの、Suramin は HuR に特異的に結合しており、素早く結合し、素早く解離する薬物動態を示すことがわかった。

(3) Suramin を HSC-3 細胞に作用させたところ、*c-fos*, *c-myc*, *COX-2*, *cyclinA2*, *cyclinB1*, などの HuR に結合する ARE-mRNA の発現量を減少させることが明らかとなった。また、ARE-mRNA ではないが、HuR に結合するとされている *cdk1* についても mRNA 発現量を減少させることが明らかとなった。*cyclinA2* と *cyclinB1* に関しては、actinomycinD を用いた RNA 安定化実験も行い、Suramin はその安定化を阻害することも証明した。

(4) Suramin を HSC-3 細胞に作用させ、運動能を wound healing assay にて、浸潤能を invasion assay にて確認し、それらを著しく減弱することが証明された。

Suramin は薬 100 年前に開発された薬剤であり、抗トリパノソーマ薬として知られている。また、Suramin は抗がん作用があることも知られており、前立腺がんなどでは臨床応用され一定の評価を得ているが、その機序ははっきりとわかっていない。本研究で、Suramin は HuR の機能 (ARE-mRNA の安定化) を阻害することで、口腔がん細胞の悪性形質を減弱することが明らかとなった。このことは Suramin の機序を解明する一翼を担うと考えられる。

Suramin は口腔がん細胞に対し高い効果が期待できることから、HuR をターゲットとした新しい抗がん治療として確率し得ると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 1 件)

格口 渉, 既存薬ライブラリーを用いた HuR 標的化合物のスクリーニングと舌癌細胞へ

の効果, 第 62 回日本口腔外科学会総会・学
術大会, 2017 年 10 月 21 日, 国立京都国際会
館 (京都)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

格口 渉 (KAKUGUCHI, Wataru)

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号 : 70740645

(2) 研究分担者

なし