

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H05056

研究課題名(和文) がんにおける薬剤耐性の阻害を目指したZIC5標的薬の同定と検証

研究課題名(英文) Study of Drug Resistance in Cancer Cells to Develop Molecular Target Drugs

研究代表者

佐藤 礼子 (Satow, Reiko)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：90469966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞が治療薬に抵抗性を持つ現象である「薬剤耐性」はがん根治を妨げる大きな問題であり、薬剤耐性を克服する治療法の開発が必要である。研究代表者はこれまでに、がん特異的に高発現し、様々な癌の生存や薬剤耐性を亢進させる因子を同定している。本研究課題において、低分子化合物のスクリーニングを行い、この因子の機能を阻害する低分子化合物を複数見出した。また、この因子と結合し制御するタンパク質を複数同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題において、がん特異的に高発現し様々な癌の生存や薬剤耐性を亢進させるタンパク質を阻害する低分子化合物を見出した。この低分子化合物は、メラノーマや薬剤耐性メラノーマに細胞死を誘導したが、正常ヒトメラノサイトや正常ヒトケラチノサイトには細胞死を誘導しなかった。これらのことから、同定した低分子化合物がメラノーマや薬剤耐性メラノーマに有効であると考えられる。また、このタンパク質の制御機構を明らかにすることでさらなる治療薬の開発につながる。

研究成果の概要(英文)："Drug resistance" is a major problem that hinders the remission of cancer, and it is necessary to develop a therapeutic method that overcomes drug resistance. So far, the principal investigator has identified a protein that is highly expressed in many types of cancer, and promotes the survival and drug resistance of various cancers. In this research project, we screened for small molecule compounds and found multiple compounds that inhibit the function of this factor. We also identified several proteins that bind to and control this factor.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

分子標的薬の開発によりがん治療に進展が見られているが、薬剤に対する耐性が生じ、がんの再増殖が起こる事が治療の問題点である。BRAF 遺伝子に変異を持つメラノーマには BRAF 阻害薬が有効であるが、数か月後には BRAF 阻害薬に対する耐性がメラノーマに生じ、BRAF 阻害薬の効果は持続しない。薬剤耐性に関する研究は盛んに行われており、STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) や FAK (Focal Adhesion Kinase) といった分子の活性化によるシグナル伝達が薬剤耐性を亢進させていることが示されている (参考文献、)。しかし、特異性の問題から、これらのシグナル伝達系を阻害する為の優れた標的分子は少ない。

我々はこれまでに、STAT3 や FAK の活性化に寄与し、メラノーマの薬剤耐性を亢進させている遺伝子として癌特異的転写因子を同定している。がん特異的に高発現しているこの転写因子はメラノーマ、大腸癌、前立腺癌の薬剤耐性を亢進させる。この転写因子を阻害すると、分子標的薬や抗がん剤によるがん細胞死の誘導率が大幅に増加する。また、この転写因子の阻害により、既に薬剤耐性を獲得しているメラノーマ細胞の細胞死も誘導する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、癌特異的転写因子の機能を阻害する低分子化合物を見つけ出し、癌特異的転写因子阻害薬が薬剤耐性の減弱に有効であることを示すことである。

3. 研究の方法

- (1) メラノーマ細胞株 A375 において癌特異的転写因子は高発現し、薬剤耐性の亢進に関与している為、A375 細胞を用いてスクリーニングを行った。GFP 融合癌特異的転写因子発現プラスミドを作製し、A375 細胞にトランスフェクション後、puromycin 処理により発現細胞のみをセレクションした。
- (2) 低分子化合物ライブラリーは、主に東京大学創薬機構、創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) から入手した。
- (3) 入手した化合物を 1 の細胞に添加し、InCell Analyzer2000 を用いてスクリーニングを行った。GFP 融合転写因子の核内存在量を減少させる化合物、および GFP 融合転写因子量を減少させる化合物をヒット化合物として同定した。
- (4) 2 次スクリーニングにおいては、タグなしの癌特異的転写因子を過剰発現させたメラノーマ細胞株を使用し、ヒット化合物を添加後、細胞を固定し、癌特異的転写因子の免疫染色を行い、癌特異的転写因子のタンパク量や局在に変化を及ぼす化合物を同定した。
- (5) 得られたヒット化合物を作製済の薬剤耐性メラノーマ細胞株に作用させ、細胞死誘導効果を検証した。
- (6) 得られたヒット化合物を様々な種類のメラノーマ細胞株、およびヒト正常メラノサイトに添加し、細胞死誘導率を検証した。
- (7) 癌特異的転写因子の作用機序を明らかにするため、酵母 two-hybrid 法を行った。
- (8) また、酵母 two-hybrid 法で同定された結合候補タンパク質についてクローニングを行い、免疫沈降法にて癌特異的転写因子との相互作用を検証した。
- (9) 結合タンパク質を発現抑制し、癌特異的転写因子が転写誘導する標的遺伝子の発現が阻害されるかを検証した。

4. 研究成果

- (1) 東京大学創薬機構から提供頂いた 3398 化合物について 1 次スクリーニングを行い、37 個のヒット化合物を得た。
- (2) 2 次スクリーニングを行った結果、4 つのヒット化合物を得た。
- (3) そのうちの 2 つは正常ヒトメラノサイトに対しても細胞死を誘導したことから除外し、正常ヒトメラノサイトには細胞死を誘導せず、メラノーマ細胞に細胞死を誘導する 2 つのヒット化合物を得た。
- (4) これらの化合物が、濃度依存的に内在性標的タンパク量を減少させることを確認した。
- (5) これらの化合物は濃度依存的にリン酸化 STAT3 量を減少させた。
- (6) これらの薬剤が、BRAF 阻害薬と相乗的にメラノーマ細胞数の減少を引き起こすことを示した。
- (7) これらの薬剤は、癌特異的転写因子の発現量の多いメラノーマ細胞株および薬剤耐性メラノーマ細胞株に対して高率に細胞死を引き起こした。しかし、癌特異的転写因子の発現量の低いメラノーマ細胞や正常ヒトメラノサイトには細胞死を誘導しなかった。
- (8) 創薬等先端技術支援基盤プラットフォーム (BINDS) から提供頂いた 8960 化合物について 1 次スクリーニングを行い、150 個のヒット化合物を得た。
- (9) 2 次スクリーニングを行った結果、14 つのヒット化合物を得た。
- (10) これらの化合物が、濃度依存的に標的タンパク質を変動させることを確認した。
- (11) これらの化合物は濃度依存的にリン酸化 STAT3 量を減少させた。
- (12) これらの化合物は、ヒトメラノーマ細胞株および BRAF 阻害薬耐性メラノーマ細胞株の細胞数減少を引き起こし、細胞死を誘導した。
- (13) その他、企業から提供頂いた約 3000 化合物についても同様の試験を行い、3 つのヒット化合物を得ている。
- (14) 酵母 two-hybrid 法により、約 10 個の結合候補タンパク質を同定した。
- (15) 免疫沈降法を行い、3 つの結合タンパク質を同定した。
- (16) この中のひとつのタンパク質を発現抑制すると、癌特異的転写因子により誘導される標的遺伝子の発現が減少することが明らかとなった。

<引用文献>

Lee HJ, Zhuang G, Cao Y, Du P, Kim HJ, Settleman J. Drug resistance via feedback activation of Stat3 in oncogene-addicted cancer cells. *Cancer Cell* 2014;26:207-21.
Hirata E, Girotti MR, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, et al. Intravital imaging reveals how BRAF inhibition generates drug-tolerant microenvironments with high integrin 1/FAK signaling. *Cancer Cell* 2015;27:574-88.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kudo K, Yoneda A, Sakiyama D, Kojima K, Miyaji T, Yamazaki M, Yaita S, Hyodo T, Satow R, Fukami K.	4. 巻 33
2. 論文標題 Cell surface CD63 increased by up-regulated polylysosamine modification sensitizes human melanoma cells to the BRAF inhibitor PLX4032.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 3851-3869
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201800664RR.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 1.Satow R, Inagaki S, Kato C, Shimozawa M, Fukami K.	4. 巻 108
2. 論文標題 Identification of zinc finger protein of the cerebellum 5 as a survival factor of prostate and colorectal cancer cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2405-2412
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13419.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊尊、佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 Screening and Identification of Drug Candidate Compounds Targeting Drug Resistance of Melanoma
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 太田紗瑛、鈴木悠大、久保田汐里、麻田偲、佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 大腸癌進展におけるPhospholipase C 1のProtein Kinase Cを介した作用機序の解明
3. 学会等名 日本生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤礼子
2. 発表標題 日本生化学会奨励賞受賞講演
3. 学会等名 第91回日本生化学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 日本癌学会奨励賞受賞講演
3. 学会等名 日本癌学会奨励賞受賞講演（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲垣翔太、加藤千明、下澤誠、佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 ZIC5はPDGFDを介してFAKやSTAT3を活性化し、前立腺癌及び大腸癌の薬剤耐性を促進する
3. 学会等名 第91回日本生化学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田汐里、麻田偲、佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 大腸癌進展におけるPhospholipase C d1 の作用機序の解明
3. 学会等名 第91回日本生化学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田汐里、麻田 惇、佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 Molecular Mechanisms of Phospholipase C Delta 1 in Colorectal Cancer Cells
3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤礼子、遠藤未来、加藤千明、稲垣翔太、深見希代子
2. 発表標題 神経冠形成遺伝子群に対するスクリーニングによる薬剤耐性促進因子の同定と機能解析
3. 学会等名 第90回日本生化学会 (ConBio2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 ZIC5はFAKやSTAT3の活性化を介してがん細胞の薬剤耐性を亢進させる
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 稲垣翔太、加藤千明、遠藤未来、佐藤礼子、深見希代子
2. 発表標題 ZIC5はPDGFDを介してFAKとSTAT3を活性化し、がんの薬剤耐性を促進する
3. 学会等名 第69回日本細胞生物学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京薬科大学生命科学部ゲノム病態医科学研究所HP
<http://toyaku-ls-genome.com/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------