

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08598

研究課題名(和文) 臨床応用に向けたGSK-3活性化物質DIFの抗がん作用標的分子の同定

研究課題名(英文) Identification of the target molecule for GSK-3 activator DIF towards clinical usage

研究代表者

高橋 富美 (Takahashi, Fumi)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：50274436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はグリコーゲン合成酵素キナーゼ-3(GSK-3)の活性化をその分子基盤とし、細胞周期進行をG1期で強力に拘束するDifferentiation-inducing factor；DIFをリード化合物とした、“新規抗がん薬”の開発を目指して研究を続けているが、未だ標的分子の解明に至っていない。そこで本研究では、DIF標的分子の探索・同定を目指し、結合タンパク質として14-3-3が確認された。そこで、14-3-3へのDIFの効果についての検討を行ったところ、DIFと14-3-3が細胞内でも結合している可能性が示唆され、14-3-3がDIFの標的分子の一つであることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

14-3-3はがん細胞の転移や浸潤に大きな役割を果たすHippoシグナル経路の活性調節因子であるYes-associated protein (YAP)と結合することにより、この転写因子の核内移行を制御し、Hippoシグナル経路活性調節に関与することが知られている。DIFによる抗腫瘍効果の検討を行う過程で、がん細胞の転移や浸潤はGSK-3に非依存的に起こる可能性を見出していたので、DIFの作用機序解明にあたって、新たにHippoシグナル経路を加えることができたのは、大きな収穫であった。

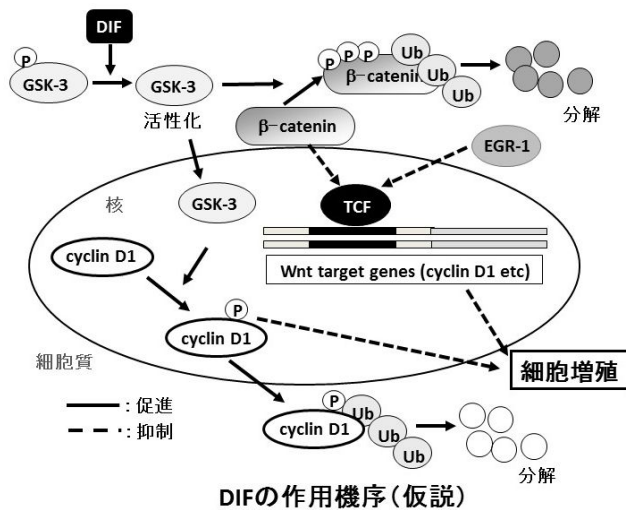
研究成果の概要(英文)：Differentiation-inducing factors (DIFs), first identified in Dictyostelium discoideum, also affect mammalian cells. We reported that DIF-1 and DIF-3 inhibited mammalian cell proliferation by activation of glycogen synthase kinase-3(GSK-3). However, the target molecule(s) of DIFs to activate GSK-3 are not identified yet. Therefore, we tried to clarify the target molecule(s) of DIF using affinity chromatography with DIF-1-tethered resin and found that 14-3-3 could be a candidate protein. We performed quartz crystal microbalance assay. DIFs were revealed to directly bind to 14-3-3. We further confirmed binding of DIF 14-3-3 by thermal shift assay and found that DIF affect 14-3-3 protein stability. As 14-3-3 is known to associate with Yes-associated protein (YAP), we analyzed the effect of 14-3-3 knock down on YAP. We found that DIF-1 significantly reduced phosphorylation level of YAP, thereby activating YAP to translocate to nucleus in HeLa cells.

研究分野：分子薬理学

キーワード：抗がん薬 細胞内シグナル調節 分子標的薬

### 1. 研究開始当初の背景

Differentiation-inducing factor (DIF) は細胞性粘菌が分泌する天然物質である。我々は、DIF (主に DIF-1 と DIF-3) の情報伝達機構について検討し、これらの物質が種々のヒト由来がん細胞および血管内皮細胞において、GSK-3 の活性化を通じて強力にサイクリン D1 の分解促進および合成抑制を引き起こすとともに Wnt/β-カテニンシグナル伝達経路を抑制すること、また、これらにより細胞周期進行を G<sub>1</sub> 期で拘束し細胞増殖を抑制することを見出した (文献 1-7、右図参照)。



さらに、複数のがんモデルマウスを用いて、DIF の経口投与を行ったところ、培養細胞で確認した機序に基づいてがん細胞の増殖や転移を抑制するという結果が得られた (原著論文 4,8)。

従来型の抗がん薬の大部分は細胞周期のなかで、DNA 複製期である S 期と分裂期である M 期をターゲットにしている。しかし、これらの薬剤は、がん細胞のみならず増殖の速い細胞 (白血球系の細胞など) に致死作用をもたらし、しばしば重篤な副作用の原因となるが G<sub>1</sub> 期をターゲットとする DIF では動物実験においてそのような副作用は認められなかった。

このように、GSK-3 の活性化をその分子基盤とする DIF は有望な新規分子標的型抗腫瘍薬として臨床応用できる可能性がある。我々は DIF が GSK-3 の活性化というユニークな機序により生体内でも抗がん作用を持つことを報告してきたが、残念ながら、DIF の標的分子の解明には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究課題は、がん細胞に対し強力な増殖抑制作用を持つ DIF (主に DIF-1 と DIF-3) をリード化合物とした新規分子標的型抗がん薬の開発を目指す研究の一環である。

有望な抗がん薬の開発ターゲットである GSK-3 は、一般的なリン酸化酵素と異なり正常な状態で活性化されているが、増殖シグナルによりその活性が低下し、増殖中のがん細胞では低活性となっている。多くのリン酸化酵素同様、GSK-3 についてもその阻害薬は多数開発されているが、活性化薬についてはいまだ開発されていない。DIF に惹起される GSK-3 の活性化は極めてシャープな反応であるため、明確な標的分子 (結合タンパク質) が存在すると予想される。

そこで本研究課題では、標的分子への選択性を高めた DIF 誘導体 (DIF 分子の最適化) を、新規分子標的型抗がん薬として臨床応用することを目指して、DIF の標的分子の同定・探索を行う。

### 3. 研究の方法

研究は以下のように行った。

- (1) DIF 結合タンパク質の精製は DIF アフィニティーカラムにより行った。結合タンパク質の同定は質量分析により行った。
- (2) QCM (Quartz Crystal Microbalance: 水晶振動子マイクロバランス) 法を用いて DIF と候補となったタンパク質の結合を確認した。

- (3) サーマルシフトアッセイを行い、DIF-1 との結合により候補タンパク質の熱安定性が変化するか否かを検討した。
- (4) 候補となったタンパク質と DIF の作用の関連を検討するために候補タンパク質を siRNA を用いてノックダウンした。

#### 4. 研究成果

##### (1) DIF 結合タンパク質の同定

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞の溶解液を用いて、DIF アフィニティーカラムによる結合タンパク質の精製を行ったところ、以前報告したリンゴ酸デヒドロゲナーゼ以外にもシャペロンタンパク質である 14-3-3 が DIF 結合候補タンパク質である可能性が示唆された (図 1)。

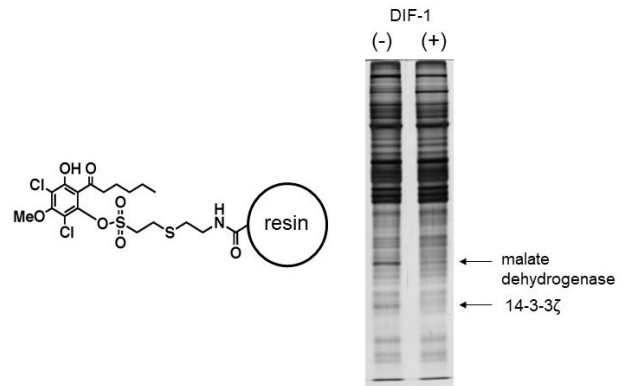


図1 DIF-1結合レジンと特異的結合物

##### (2) QCM を使用した DIF と 14-3-3 結合確認

次に、ヒトリコンビナント 14-3-3 と DIF-1 および DIF-3 の結合について、QCM を使用して確認実験を行った。

図 2 に示すように、14-3-3 を吸着させたチップを使用したときは、牛血清由来アルブミン (BSA) を吸着させたチップを使用したときと比較して、溶液に DIF-1 または DIF-3 を添加したときに著しい振動数の低下が認められ、これらの化合物が 14-3-3 と特異的に吸着していることが示唆された。

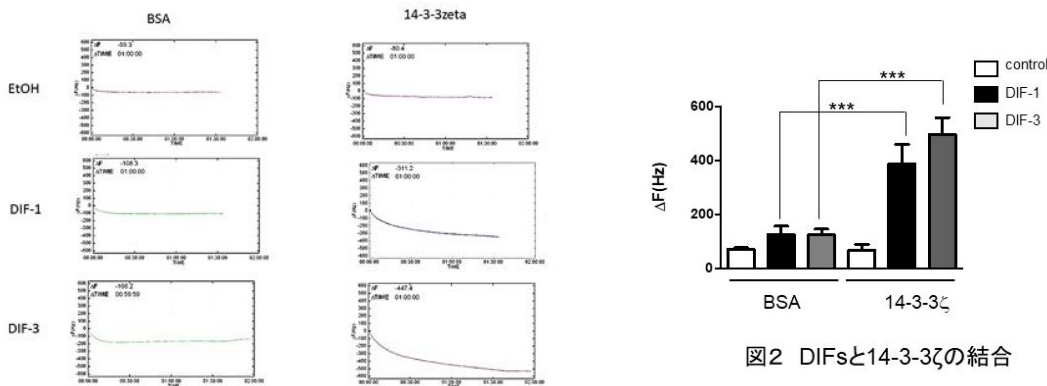


図2 DIFsと14-3-3zetaの結合

##### (3) サーマルシフトアッセイ

さらに、14-3-3 と DIF-1 との結合について検討するために、サーマルシフトアッセイを行った。図 3 に示すように、DIF-1 との結合により 14-3-3 の熱安定性は明らかな低下を示した。このことから DIF-1 が 14-3-3 に結合することが示された。

##### (4) 14-3-3 siRNA の効果

14-3-3 は細胞の接着・増殖・上皮間葉転換に関連する Hippo シグナル経路の主要調節因子として知られている。

そこで、HeLa 細胞を用いて、14-3-3 のノックダウンによる YAP リン酸化への影響を検討した。図 4 に示すように siRNA をもちいて 14-3-3 をノックダウンすることにより、明らかに YAP のリン酸化減少が認められた。この結果から DIF は YAP を介して Hippo シグナル経路にも影響を与える可能性が示唆された。

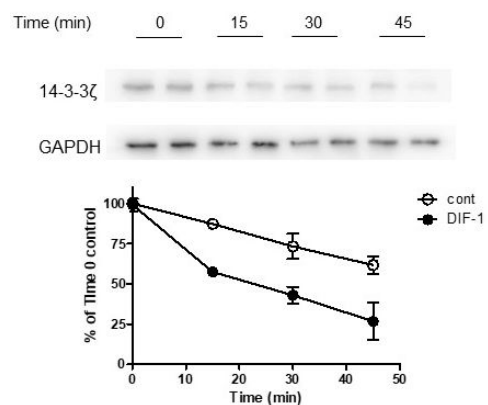
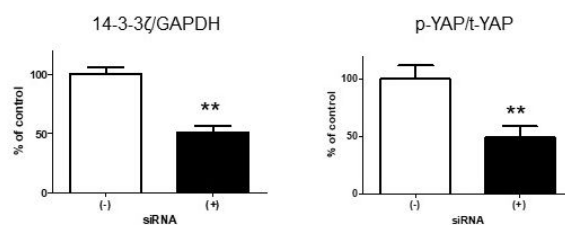


図3 DIFとの結合による14-3-3zeta熱安定性の変化

本研究により、DIFの新しいターゲットタンパク質として14-3-3を同定することができた。

当初の研究計画では、DIFによるGSK-3活性化のトリガーとなるタンパク質の探索・同定を行う予定であったが、GSK-3タンパク質の構造上、当初予定していたタグをつけることが難しかったため、DIFによるアフィニティーカラムを使用したターゲットタンパク質の探索に研究方向をシフトした。

DIFによる抗腫瘍効果の検討を行う過程で、がん細胞の転移や浸潤はGSK-3に非依存的に起こる可能性を見出していたので、DIFの作用機序解明にあたって、新たにHippoシグナル経路を加えることができたのは、大きな収穫であった。



## 【文献】

1. Takahashi-Yanaga F et al. **J Biol Chem** 2003; 278:9663-9670.
2. Yasmin T, Takahashi-Yanaga F, et al. **Biochem Biophys Res Commun** 2005; 338: 903-909.
3. Mori J, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Watanabe Y, Hirata M, et al. **Exp Cell Res** 2005; 310: 426-433.
4. Takahashi-Yanaga F, Mori J, Matsuzaki E, Watanabe Y, et al. **J Biol Chem** 2006; 281: 38489-38497
5. Matsuzaki E, Takahashi-Yanaga F, Miwa Y, Hirata M, et al. **J Bone Miner Res** 2006; 21: 1307-1316.
6. Yoshihara T, Takahashi-Yanaga F, Shiraishi F, Morimoto S, et al. **Mol Cancer** 2010; 9: 245
7. Jingushi K, Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Shiraishi F, et al. **Biochem Pharmacol** 2012;83(1), 47-56.
8. Takahashi-Yanaga F, Yoshihara T, Jingushi K, Igawa K, et al. **Biochem Pharmacol** 2014;89(3), 340-348.

図4 14-3-3 $\zeta$ siRNAによるYAPリン酸化の上昇

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 M. Arioka and F Takahashi-Yanaga	4. 巻 165
2. 論文標題 Glycogen synthase kinase-3 inhibitor as a multi-targeting anti-rheumatoid drug.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 207-213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2019.02.020.	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 -

1. 著者名 Arioka M, Takahashi-Yanaga F, Kubo M, Igawa K, Sasaguri T.	4. 巻 138
2. 論文標題 Anti-tumor effects of differentiation-inducing factor-1 in malignant melanoma: GSK-3-mediated inhibition of cell proliferation and GSK-3-independent suppression of cell migration and invasion.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 31-48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2017.05.004.	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 -

1. 著者名 Tetsuo Fumi, Arioka Masaki, Miura Koichi, Kai Misato, Kubo Momoko, Igawa Kazunobu, Tomooka Katsuhiko, Takahashi Yanaga Fumi, Nishimura Fusanori, Sasaguri Toshiyuki	4. 巻 110
2. 論文標題 Differentiation inducing factor 1 suppresses cyclin D1 induced cell proliferation of MCF 7 breast cancer cells by inhibiting S6K mediated signal transducer and activator of transcription 3 synthesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3761 ~ 3772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1111/cas.14204">https://doi.org/10.1111/cas.14204</a>	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Morishige Shoji, Takahashi-Yanaga Fumi, Ishikane Shin, Arioka Masaki, Igawa Kazunobu, Kuroo Akihiro, Tomooka Katsuhiko, Shiose Akira, Sasaguri Toshiyuki	4. 巻 168
2. 論文標題 2,5-Dimethylcelecoxib prevents isoprenaline-induced cardiomyocyte hypertrophy and cardiac fibroblast activation by inhibiting Akt-mediated GSK-3 phosphorylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 82 ~ 90
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.018">https://doi.org/10.1016/j.bcp.2019.06.018</a>	査読の有無 無
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 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高橋 富美, 石兼 真、豊平 由美子
2. 発表標題 Differentiation-Inducing Factor はYAPを介してHippoシグナル伝達経路に影響を及ぼす
3. 学会等名 第92回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋 富美、有岡 将基、久保 桃子、笹栗 俊之
2. 発表標題 Anti-tumor effect of DIF-1 in malignant melanoma
3. 学会等名 第76回日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 哲翁ふみ, 有岡将基, 高橋富美, 西村英紀, 笹栗俊之
2. 発表標題 Differentiation-inducing factor-1によるトリプルネガティブ乳癌の抑制機序
3. 学会等名 第72回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 哲翁 ふみ, 有岡 将基, 高橋 富美, 西村 英紀, 笹栗 俊之
2. 発表標題 Differentiation-inducing factor-1 suppresses breast cancer cell proliferation by reducing STAT3-mediated cyclin D1 expression
3. 学会等名 第93回日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	笹栗 俊之  (Sasaguri Toshiyuki)  (30261209)	九州大学・医学研究院・教授    (17102)	