

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07341

研究課題名(和文)術後補助化学療法効果予想マーカーに対するタンパク質相互作用創薬への分子機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the molecular mechanism for the prognostic biomarker of adjuvant chemotherapy

研究代表者

三浦 奈美 (Miura, Nami)

日本医科大学・先端医学研究所・助教

研究者番号：80636978

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アクチニン-4(ACTN4)の細胞における浸潤・転移能への寄与について、分子レベルでの解析を行なった。ACTN4とアクチンがダイレクトに結合している像を原子間力顕微鏡を用いて動画で撮影することに成功した。さらに、ACTN4の野生型と2種の変異体の間で結合様式の違いがあることを見出した。またin vitroリン酸化を行える系を確立し、ACTN4がEpidermal growth factor receptor (EGFR)により直接リン酸化されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、非小細胞肺癌における術後補助化学療法の効果予測バイオマーカーであるACTN4のアクチンフィラメントとの結合様式およびACTN4のリン酸化に対する新たな知見が得られた。この結果から、ACTN4の生物学的活性化機構の一部を明らかにすることができ、ACTN4に対するダイレクトな創薬やACTN4のリン酸化機構を介した創薬が期待される。また、様々ながん種類でACTN4の発現していることが報告されているため、非小細胞肺癌だけでなく他のがんの種類への治療への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Actinin-4 (ACTN4), an actin-bundling protein previously identified by our laboratory, is closely associated with variety of cellular processes, including cell motility and cancer metastasis. In this study, we found that the three-dimensional structure of the actin-binding domains of two ACTN4 mutants differs from that of wild-type ACTN4 and that these changes are responsible for the biological characteristics of ACTN4-mediated diseases. Using an in vitro kinase assay and mass spectrometry, we confirmed the tyrosine phosphorylation of ACTN4 by epidermal growth factor receptor (EGFR) directly. The mass spectroscopy sequence coverage of the ACTN4 peptide was 77.6%, and six new phosphorylation sites were identified.

研究分野：分子生物学

キーワード：アクチニン-4 バイオマーカー タンパク質相互作用 翻訳後修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本では臨床試験のエビデンスに基づき、肺癌 IA, IB 期の症例にウラシル・テガフル配合剤(UFT)の使用が術後補助化学療法の標準治療として推奨されている。しかし、肺癌患者には高齢者が多いことなどから、積極的な施行の判断は難しいとされている。一部の人には早期であるにも関わらず外科的手術後に転移が見られ、この人たちには手術時には見つける事のできなかった残存病変(微小転移巣)があったのではないかと考えられる。残存病変の有無について検出する手段があるならば、術後補助化学療法の効果を予測することができ、積極的に術後補助化学療法を行うべき人たちを選別することが可能となる。

アクチニン-4 (ACTN4)は、アクチンと結合しアクチンフィラメントを架橋するタンパク質であり、1998年に国立がん研究センター研究所において世界に先駆けてクローニングされた (Honda et al. J. Cell Biol. 1998)。申請者らのグループでは、ACTN4の遺伝子コピー数の増加とそれに伴うタンパク質の発現亢進が、卵巣がん、大腸がん、膵がん、唾液

腺がん、舌がんなどで有意に全生存期間を短くすることを明らかにし、ACTN4が個別化治療バイオマーカーや創薬標的としてあることを示した (Noro, Miura, Honda et al. Annals of Oncology 2013; Watanabe, Miura, Honda et al. Brit. J. Cancer 2015; Kakuya, Miura, Honda et al. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2017)。加えて、ACTN4タンパク質ががんの浸潤転移能と細胞突起形成機構への関与し、ACTN4と予後の相関がACTN4の発現により細胞の転移能亢進しているためであることを明らかにした (Miura, Honda et al. Oncotarget 2016)。また、非小細胞肺癌については、I/II期非小細胞肺癌に対するシスプラチンとビノレルビンによる補助化学療法の有効性を証明した前向き臨床試験(JBR.10)のデータの再解析から、ACTN4の発現から術後補助化学療法の効果が予測できる可能性を示した (Miura, Honda et al. Oncotarget 2016)。

ACTN4の発現、転移能、予後との相関から、ACTN4は術後補助化学療法の治療効果予測バイオマーカーであり、さらにACTN4は転移を抑制する治療標的として有用でもある。もし、ACTN4に対する創薬が可能であるのならば、選別された術後補助化学療法を必要とする人に、マーカー分子に対する直接的な治療が可能となり、ACTN4に対する創薬は期待されるものである。しかしながら、ACTN4の創薬はACTN4-アクチンのタンパク質間相互作用(Protein-protein interaction: PPI)がターゲットであり通常の方法による創薬は難しい。そのためにはACTN4の生物学的活性化機構を明らかにし、新規の探索方法を構築する必要がある。

2. 研究の目的

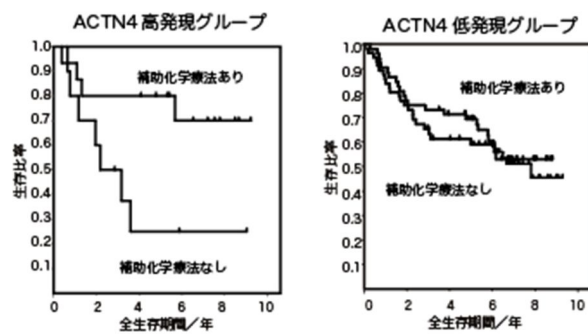
ACTN4に対する創薬開発のための基盤として、我々は細胞の転移浸潤能におけるACTN4の生物学的活性化機構を解明し、生物学的な機能解明の研究から創薬標的として評価研究までシームレスに行うことを目的とした。

3. 研究の方法

1) ACTN4/アクチンフィラメントの結合機序の解明

ACTN4組換えタンパク質(変異体タンパク質を含む)の作製を行い、これらを用いて、生物物理学的相互作用解析(surface plasmon resonance analysis:SPR)などによりACTN4/アクチンフィ

図 非小細胞肺癌 IB/II 期における補助化学療法の効果と ACTN4 の発現



ラメントの結合様式を観測した。さらに、作製した組換え ACTN4 を用い、ACTN4 の立体構造の解析および ACTN4/アクチンフィラメント複合体の観察を原子間力顕微鏡を用いて行った。

2) ACTN4 に結合する小分子化合物の探索

ACTN4/アクチンフィラメント結合の阻害できる化合物を得ることを目標とし、ACTN4 へ結合する小分子化合物の探索を行った。

3) ACTN4 リン酸化の責任キナーゼの探索

ACTN4 のリン酸化による機能解析を行った。組換えキナーゼライブラリーを用意し、様々なキナーゼによる ACTN4 のリン酸化能を調べ、ACTN4 リン酸化サイトの同定とそのリン酸化責任キナーゼの特定を行った。これらのキナーゼによるリン酸化サイトの変異体を作製し細胞の運動能を、疑似リン酸化 ACTN4 を用いて、共沈法を用いて ACTN4/アクチンフィラメント結合アッセイを行い、ACTN4 のリン酸化による機能を調べた。

4. 研究成果

1) ACTN4/アクチンフィラメントの結合機序の解明

ACTN4 の組換えタンパク質による *in vitro* 結合アッセイでは、変異体の 1 種 ACTN4-K255E は ACTN4 野生型 (ACTN4-WT)、もう一つの変異型 (ACTN4-Sp) と比べてアクチンへの結合性が高かった。SPR による結合アッセイでは、ACTN4-WT, ACTN4-K225E, ACTN4-Sp がアクチンへの異なる結合・解離の様式をしていること、アクチンへの結合が複数の段階を経て起きることを観測した。また、ACTN4/アクチ

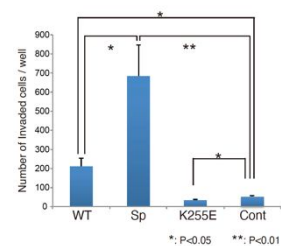


図 ACTN4 の野生型と変異型を A549 細胞株に過剰発現させた時の浸潤アッセイ

ンの結合を原子間力顕微鏡で観察し、結合解離の様子の撮影に成功した。次に、細胞株 A549 に ACTN4-WT, ACTN4-Sp を過剰発現させ、マトリゲルを使った浸潤アッセイを行い、これらの細胞の浸潤性を調べた。コントロール細胞に比べて ACTN4-WT を発現させた細胞は浸潤性が向上し、ACTN4-Sp を発現させた細胞は ACTN4-WT の細胞よりもさらに浸潤性が上がった。

ACTN4 のアクチン結合ドメインは 2 つの calponin homology subdomain (CH1, CH2) からなり、ACTN4-Sp と全ての FSGS のアミノ酸変異は CH2 の同一ヘリックスの同一平面上に位置していた。さらに、この CH2 ヘリックス上の平面は CH1 と CH2 の境界面であった。このことから ACTN4 変異体の機能変化は、CH1 と CH2 の相互作用の変化をもたらすことにより、アクチンへの結合性や細胞の運動性を変えたのではないかと考えられた。

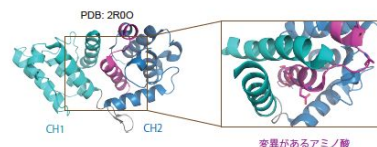


図 ACTN4 のアクチン結合ドメインの構造

2) ACTN4 に結合する小分子化合物の探索

ACTN4 の機能阻害のためには ACTN4 に化合物が結合することが必要であると考え、組換え ACTN4 タンパク質に結合する小分子の探索を行った。ハイスループットスクリーニングと文献調査から、組換え ACTN4 タンパク質に結合できる小分子化合物の候補分子を 1 化合物見つけることができた。この化合物と組換え ACTN4 タンパク質の結合を表面プラズモン共鳴法で測定し、ACTN4 における結合ドメインを特定することができた。次にマトリゲルを用いた浸潤アッセイを行ったところ、この化合物を添加すると肺腺がん細胞株 (A549, PC9) の浸潤能を低下させた。一方で、この化合物は肺腺がん細胞株の細胞増

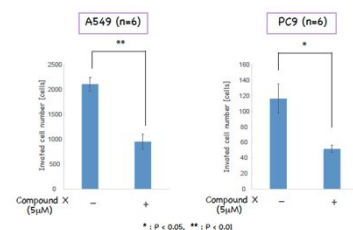


図 ACTN4 に結合する compound X による浸潤アッセイへの効果

殖には変化を与えなかった。したがって、この化合物は ACTN4 を介して細胞の転移能を抑制する化合物候補であり、さらなる ACTN4 に結合する化合物の探索の際にはリファレンス分子にできると考えられた。

3) ACTN4 リン酸化の責任キナーゼの探索

80 種類の組換え活性型キナーゼに対して組換え ACTN4 タンパク質がリン酸化されるか調べた。リン酸化抗体を使ったウエスタンブロットから、47 種類のキナーゼに *in vitro* において ACTN4 をリン酸化することが可能であることを見出した。さらに質量分析装置を使って、それらのキナーゼによってリン酸化された ACTN4 タンパク質のリン酸化サイトを決めた。31 種類のキナーゼから 15 箇所のリン酸化サイトの検出をすることができた。それぞれのキナーゼごとにリン酸化するサイトに違いが見られた。これにより、責任キナーゼ候補を絞り込むことができた。今後、これらの候補キナーゼの阻害剤を用いた ACTN4 をターゲットとした治療を行うことができる可能性があると考えられる。

EGF(Epidermal Growth Factor)刺激により細胞内で ACTN4 のリン酸化がされることが知られており、今回のリン酸化責任キナーゼ候補に EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)は含まれていた。ACTN4 の EGFR によるリン酸化サイトの 1 つである Y265 の変異体を発現する細胞を作製し、その細胞のマトリゲルを用いた浸潤アッセイを行った。いずれの変異体も浸潤能が低下したことから、ACTN4 の Y265 のリン酸化は浸潤と関係することが明らかとなった。

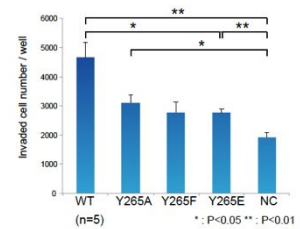


図 ACTN4 Y265 変異体発現細胞の浸潤アッセイ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Onidani Kaoru, Shoji Hirokazu, Kakizaki Takahiko, Yoshimoto Seiichi, Okaya Shinobu, Miura Nami, Sekikawa Shoichi, Furuta Koh, Lim Chwee Teck, Shibahara Takahiko, Boku Narikazu, Kato Ken, Honda Kazufumi	4. 巻 110
2. 論文標題 Monitoring of cancer patients via next generation sequencing of patient derived circulating tumor cells and tumor DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2590-2599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.14092	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Xu Xiaojun, Honda Kazufumi, Miura Nami, Hori Shutaro, Le Blanc Solange, Bergmann Frank, Gaida Matthias M., Volkmar Michael, Schimmack Simon, Hackert Thilo, Strobel Oliver, Felix Klaus	4. 巻 11
2. 論文標題 Actinin-4 splice variant - a complementary diagnostic and prognostic marker of pancreatic neuroendocrine neoplasms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 2318 ~ 2328
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7150/jca.37503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shoji Hirokazu, Miura Nami, Ueno Hideki, Honda Kazufumi	4. 巻 18
2. 論文標題 Measurement of copy number of ACTN4 to optimize the therapeutic strategy for locally advanced pancreatic cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 624 ~ 629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pan.2018.06.003	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Nami Miura, Hideki Yamaguchi, Kazufumi Honda
2. 発表標題 Functional analysis of the prognostic biomarkers actinin-4 and its splice variant
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nami Miura, Kaoru Onidani, Kazufumi Honda
2. 発表標題 Analysis of the epidermal growth factor-induced phosphorylation of actinin-4 involved in cancer metastasis
3. 学会等名 17th Human Proteome Organization World Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nami Miura, Kaoru Onidani, Kazufumi Honda
2. 発表標題 予後予測バイオマーカーであるアクチニン-4とその変異体の機能解析
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本医科大学 先端医学研究所 生体機能制御学部門 ホームページ https://www.nmsbiomarker.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
---------	---------