

令和 6 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19H01064

研究課題名(和文)細胞骨格ダイナミクスに基づく分子輸送制御システムの解明と革新的癌創薬への新展開

研究課題名(英文)Elucidation of molecular transport control systems based on cytoskeleton dynamics and new developments in innovative cancer drug discovery.

研究代表者

渡部 昌実 (Watanabe, Masami)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：70444677

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,000,000円

研究成果の概要(和文)：各種の癌細胞を用いた研究にて、Dynaminおよびその関連分子群の細胞骨格動態に関する機能の解析を行い、成果を得た。また正常細胞を用いた研究では、糸球体足細胞におけるDynaminと微小管の関係についての研究を実施し、Dynaminが微小管束の形成に働き、結果として微小管を安定化させる可能性を見出した。一方で癌創薬の観点から、候補薬の内視鏡下生体内投与による作用機序解明のためのイヌを用いた動物実験の系を立ち上げ、新しい薬剤投与手技を用いて各種薬剤の薬効評価を実施することが可能となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌の悪性進展とAndrogen不応性のKeyとなるタンパク質分子の細胞内輸送における独自の観点から、微小管輸送ダイナミクスの細胞内分子機構を解明し、新規治療・創薬標的を探索した。また、泌尿器科領域での臨床応用へと結び付けていくための大動物を用いたin vivo投与の研究手法を確立した。一方で本研究は、様々なタンパク質複合体の働きに焦点を当てて新たな知見の獲得を目指すものでもあり、細胞生物学的にも学術的意義が認められる。

研究成果の概要(英文)：In research using various cancer cells, we have analyzed the function of dynamin and its related molecules in cytoskeleton dynamics, and have obtained results. In research using normal cells, we have also conducted research on the relationship between dynamin and microtubules in glomerular podocytes, and found that dynamin may play a role in the formation of microtubule bundles, thereby stabilizing microtubules. From the perspective of cancer drug discovery, we have established an animal experiment system using dogs to elucidate the mechanism of action of candidate drugs by endoscopic in vivo administration, making it possible to evaluate the efficacy of various drugs using new drug administration techniques.

研究分野：泌尿器科

キーワード：癌創薬 細胞内輸送 in vivo投与

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌等の各種難治性疾患に対する新規治療法の開発は、医療研究分野において極めて重要な課題である。我々は近年、癌抑制タンパク質 REIC/Dkk-3 が各種正常・癌細胞内において Oncogenic Ras シグナルを抑制することを明らかにした。本研究に至った我々の前段研究では、細胞質内における Key タンパク質分子の輸送機構の根幹を担う Dynein モーターの要素：SGTA (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein ) および Tctex-1 が REIC/Dkk-3 と結合し、Ras および Androgen 受容体シグナルの両方を一元的に制御することを明らかにした。一方で、Dynein モーターによるこれら細胞維持必須分子の微小管輸送では、細胞骨格制御に不可欠のタンパク質：Dynamine が極めて重要な役割を果たすとされるが、その機序は未だ解明に至っていない。これらの研究開始時の背景に基づき、本研究を実施した。

### 2. 研究の目的

本研究では、前立腺癌の悪性進展と Androgen 不応性の Key となるシグナル分子群の細胞内輸送における独自の観点から、REIC/Dkk-3、SGTA、Tctex-1、Dynein モーター、Dynamine および細胞骨格因子が関わる細胞内分子輸送システムの制御機構を解明することとした。また、Dynamine およびその関連分子群は、従来、エンドサイトーシス機構に基づく細胞骨格制御に機能することが示唆されているが、我々はそれらの細胞骨格制御分子の機能を細胞内分子輸送システムの観点から解明し、癌をはじめとする難治性疾患の新規治療標的タンパク質群を同定、革新的な癌および難治性疾患における創薬へと発展させることを目標とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、特に尿路系細胞において、Actin 線維-微小管細胞骨格制御に必須のタンパク質：Dynamine の制御に関する各種の関連タンパク質の機能を解析した。我々はこれまでの研究により Dynamine による Actin 線維への作用について、活性型 Dynamine の集合体から成る Dynamine リングにより Actin 線維が集束されることを明らかにしている。また、Dynein モーターによる細胞維持必須分子の微小管輸送のトラックに細胞骨格が利用されることが知られている。これらのことから、Dynamine 関連タンパク質が、Dynamine の GTP アーゼとしての機能と通して Actin 線維-微小管細胞骨格ダイナミクスにより Dynein モーターを制御し、結果として各種シグナル分子等の微小管輸送および細胞骨格制御に重要な役割を果たすことが考えられる。そこで、より具体的には、前立腺癌の悪性進展と Androgen 不応性・Steroid 応答性の Key となるシグナル分子群の細胞内輸送における観点を踏まえ、特に Dynamine 関連タンパク質の機能を中心に細胞内分子輸送システムの制御機構を解明する研究を行った。加えて、微小管細胞骨格ダイナミクスに基づく癌細胞の具体的な悪性形質の変化についても解析を加え、細胞生物学的観点からの新しい基礎研究・創薬研究の切り口を明確にすることとした。また、その他の

尿路系癌細胞・正常細胞において、より細胞生物学的な切り口から、Dynamin およびその関連分子群の細胞骨格動態に関する機能の解析を行った。

一方で本研究では、各種医薬品候補薬の *in vivo* 投与での作用機序解明・効果定量に繋がる独自の薬剤投与方法、動物実験解析系を確立させるための研究を実施した。すなわち、様々な低分子薬剤、ドラッグリポジショニングに基づく新薬開発の基盤を、Dynamin 微小管 細胞骨格軸についての生理学的機序の観点から確立すると同時に、様々な医薬候補品の *in vivo* 動物実験解析系により難治性疾患群の新規治療法を開発する方向性とした。

#### 4. 研究成果

各種の癌細胞および正常細胞を用いた研究にて、Dynamin およびその関連分子群の細胞骨格動態に関する機能の解析を行い、成果を得た。まずヒト前立腺癌 PC3 細胞において、細胞内での分子輸送の観点から、ステロイドホルモン受容体の核内移行に関する研究を行った。本研究の Key となる細胞骨格制御タンパク質群 : Dynamin 関連分子の機能解析を軸として研究を進めた。具体的には、Dynamin 関連分子の細胞内発現量に基づくステロイド受容体シグナル動態について解析を行い、細胞内分子輸送システムの観点から各種細胞骨格因子について機能解析を行った。以前の研究では、REIC/Dkk-3 タンパク質が SGTA (small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein) の二量体化を阻害し、ヒト前立腺癌 PC3 細胞におけるアンドロゲン受容体 (AR) 輸送とシグナル伝達をアップレギュレーションすることが示されている。一方で、AR を含むステロイド受容体の核への輸送は、同様に Dynein モーター依存的に行われると考えられるため、本研究ではステロイド受容体の一つ : グルココルチコイド受容体 (GR) の輸送における SGTA と REIC/Dkk-3 の役割を解析した。細胞質内の GR 輸送の *in vitro* レポーターアッセイをヒト前立腺癌 PC3 細胞とヒト 293T 細胞で実施したところ、SGTA タンパク質に関して、細胞内で GR の核への輸送に対する抑制効果が観察された。REIC/Dkk-3 タンパク質に関しても、PC3 細胞における GR 輸送に対する抑制効果が観察された。shRNA による SGTA の枯渇条件下では、PC3 細胞における REIC/Dkk-3 による GR 輸送のダウンレギュレーションは、枯渇していない条件と比較して有意に増強され、SGTA を介した GR 輸送の阻害における REIC/Dkk-3 の代償的役割が示唆された。これらの成果は、細胞におけるステロイド受容体輸送およびシグナル伝達に関する一つの新たな知見として論文発表された。

また、ヒト膀胱癌 T24 細胞を用いた本研究課題の関連研究により、癌細胞の集団運動・移動能 (癌の浸潤・転移に強く相関する) が、Pacsin 2 タンパク質によって制御されることが明らかとなった。Pacsin 2 は (Syndapin と呼ばれる) 哺乳類の多くの組織の細胞内で発現が認められ、細胞膜を変形する作用を持つ BAR (Bin-amphiphysin-Rvs167) ドメインを持つタンパク質であり、エンドサイトーシスや細胞運動・移動等の細胞骨格動態を伴う様々な状況で機能するタンパク質である。具体的な成果として、siRNA によって Pacsin 2 の発現量を低下させると、細胞が一定の方向性を持って移動するようになることを見出し、それらの細胞では複数の細胞が集まって塊を形成し、その境界領域の細胞表面には悪性腫瘍で発現する細胞接着

分子N-カドヘリンが集積することが明らかとなった。(N-カドヘリンは、カルシウム依存的に細胞同士を接着させる主要な細胞接着分子:カドヘリンの一つである。N-カドヘリンは神経や心筋の細胞で機能するほか、癌の転移に関わることが報告されている。)また、Pacsin 2 の発現量が低下した状態ではN-カドヘリンが細胞内に取り込まれなくなり、細胞表面のN-カドヘリン量が増えて細胞同士が接着しやすくなることが明らかとなった。この細胞接着におけるPacsin 2 の働きは、膀胱癌 T24 細胞だけでなく、ヒト肺癌 H1299 細胞においても同様に観察された。これらの結果は、細胞表面の N-カドヘリンをエンドサイトーシスによって細胞内に取り込むためには Pacsin 2 が必要であることを示している。Pacsin 2 は、様々な癌細胞において N-カドヘリンのエンドサイトーシスを介して細胞の集団移動・浸潤・転移を制御すると考えられ、細胞骨格・分子輸送ダイナミクスの細胞内制御機構に係る一つの新しい治療・創薬標的タンパク質であることが明らかとなった。

一方で、腎臓における正常細胞:糸球体足細胞(ポドサイト:糸球体を構成する細胞の一つである)に着目した研究を実施し、Dynamin およびその関連分子群の細胞骨格動態に関する機能の解析を行った。すなわち、Dynamin およびその関連分子群が微小管束の形成に機能し、結果として微小管を安定化させる可能性を検証するために、ポドサイトにおける Dynamin と微小管の関係についての研究を実施した。免疫組織化学的解析により、ラット腎臓において Dynamin 1 がポドサイトに発現することが示され、また培養したマウスポドサイトにおける Dynamin 1 の細胞内分布を調べたところ、Dynamin 1 はポドサイトの中心部から直線的に放射状に分布し、その先の細胞の突起まで局在することが明らかとなった。マウスポドサイトでの Dynamin 1 と細胞骨格:微小管の分布を 2 重染色により解析したところ、Dynamin 1 と微小管束が放射状に存在し極めて類似した細胞内分布を示すことが確認された。培養マウスポドサイトで Dynamin 1 の機能を調べるため、siRNA によって Dynamin 1 タンパク質の細胞内発現をノックダウンしたところ、微小管の束が減少するとともに当該細胞の細胞突起の数も減少することが明らかとなった。さらに Dynamin 1 と Dynamin 2 のノックアウトマウスから単離した培養ポドサイトにおいても、前述の siRNA によって細胞内 Dynamin 1 タンパク質をノックダウンした場合と同様に、細胞突起の著しい形成阻害が認められた。これらの結果により、Dynamin 1 は微小管の束を作ることでポドサイトの細胞突起の形成を強くサポートしていると結論付けた。腎糸球体は多くの毛細血管が集まって球状に見える器官であり、糸球体に入った血液は『ふるい』にかけられ不要な水分・老廃物が除去される。この水分・老廃物は尿とともに排出される一方で、アルブミン等のタンパク質はこの『ふるい』の機能のおかげで血液から除かれる(失われる)ことは無い。ポドサイトは、多数の突起を細胞の外側に出して隣り合うポドサイト同士でその突起を規則的に噛み合わせながら、基底膜と一体的構造となって糸球体の毛細血管を覆っている。このポドサイトの細胞突起の噛み合わせが血液からタンパク質を濾しとる『ふるい』として機能することが知られており、ポドサイトの機能障害により『ふるい』装置が働かなくなるとタンパク質尿が発生するとされる。今回の研究により、このポドサイトの細胞突起が形成する腎糸球体における『ふるい』構造について、ポドサイトの細

胞骨格制御機構としての Dynamin-微小管 axis の関与が強く示唆された。

一方で我々は早期に臨床的出口の方向性を模索するため、将来的な創薬の候補となる各種試験薬について、局所治療薬としての治療有効性を再現性の高い形で解析するための動物実験解析系を確固なものとした。すなわち、癌創薬の観点から Dynamin 阻害物質に関して応用展開研究を実施するべく、試験薬等の in vivo 内視鏡的塗布投与での作用機序解明に係るイヌ動物実験の有用性の検証を行った。結果として、イヌ膀胱において簡便に信頼性の高い形で in vivo 塗布投与での作用機序解明・効果定量を可能とする薬剤投与・評価方法を確立した。当該動物実験解析系は、膀胱の難治性疾患等に対する革新的創薬への新展開に不可欠の技術であると考えている。一方で、これまでのイヌにおける上記の研究成果を踏まえ、ヒト臨床応用を念頭においた膀胱での各種医薬品の粘膜表面塗布のための具体的手技の検討を行った。結果として、膀胱軟性鏡または硬性鏡を用いると仮定したそれぞれの場合について、当該内視鏡的医薬品投与技術の表在性膀胱疾患への展開戦略に関する知見を得ることができた。今後も、各種薬剤を用いた当該治療的投与法の臨床応用に向けた研究を継続していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 La TM, Tachibana H, Li SA, Abe T, Seiriki S, Nagaoka H, Takashima E, Takeda T, Ogawa D, Makino SI, Asanuma K, Watanabe M, Tian X, Ishibe S, Sakane A, Sasaki T, Wada J, Takei K, Yamada H.	4. 巻 34 (12)
2. 論文標題 Dynamin 1 is important for microtubule organization and stabilization in glomerular podocytes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FASEB J	6. 最初と最後の頁 16449 ~ 16463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.202001240RR	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 Iwata Takehiro, Sadahira Takuya, Ochiai Kazuhiko, Ueki Hideo, Sasaki Takanori, Haung Peng, Araki Motoo, Watanabe Toyohiko, Nasu Yasutomo, Watanabe Masami	4. 巻 20
2. 論文標題 Tumor suppressor REIC/Dkk-3 and its interacting protein SGTA inhibit glucocorticoid receptor to nuclear transport	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental and Therapeutic Medicine	6. 最初と最後の頁 1739 ~ 1745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/etm.2020.8819	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 Fujita H, Bando T, Oyadomari S, Ochiai K, Watanabe M, Kumon H, Ohuchi H.	4. 巻 74 (3)
2. 論文標題 Dkk3/REIC, an N-glycosylated Protein, Is a Physiological Endoplasmic Reticulum Stress Inducer in the Mouse Adrenal Gland	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Med Okayama	6. 最初と最後の頁 199-208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18926/AMO/59950	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 Tanaka Emi, Uchida Daisuke, Shiraha Hidenori, Kato Hironari, Ohyama Atsushi, Iwamuro Masaya, Watanabe Masami, Kumon Hiromi, Okada Hiroyuki	4. 巻 20
2. 論文標題 Promising Gene Therapy Using an Adenovirus Vector Carrying REIC/Dkk-3 Gene for the Treatment of Biliary Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Gene Therapy	6. 最初と最後の頁 64 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1566523220666200309125709	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 Lin Wenfeng, Li Chaoming, Xu Naijin, Watanabe Masami, Xue Ruizhi, Xu Abai, Araki Motoo, Sun Ruifen, Liu Chunxiao, Nasu Yasutomo, Huang Peng	4. 巻 Volume 16
2. 論文標題 Dual-Functional PLGA Nanoparticles Co-Loaded with Indocyanine Green and Resiquimod for Prostate Cancer Treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Nanomedicine	6. 最初と最後の頁 2775 ~ 2787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/IJN.S301552	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 該当する

1. 著者名 Xue Ruizhi, Lin Wenfeng, Fujita Hirofumi, Sun Jingkai, Kinoshita Rie, Ochiai Kazuhiko, Futami Junichiro, Watanabe Masami, Ohuchi Hideyo, Sakaguchi Masakiyo, Tang Zhengyan, Huang Peng, Nasu Yasutomo, Kumon Hiromi	4. 巻 13
2. 論文標題 Dkk3/REIC Deficiency Impairs Spermiation, Sperm Fibrous Sheath Integrity and the Sperm Motility of Mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 285 ~ 285
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes13020285	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 Wint Haymar, Li Jianzhen, Abe Tadash, Yamada Hiroshi, Higaki Takumi, Nasu Yasutomo, Watanabe Masami, Takei Kohji, Takeda Tetsuya	4. 巻 136
2. 論文標題 Pacsin 2-dependent N-cadherin internalization regulates the migration behaviour of malignant cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs260827
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.260827	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 Gohara Yuma, Tomonobu Nahoko, Kinoshita Rie, Futami Junichiro, Audebert L?na, Chen Youyi, Komalasar Ni Luh Gede Yoni, Jiang Fan, Yoshizawa Chikako, Murata Hitoshi, Yamamoto Ken-ichi, Watanabe Masami, Kumon Hiromi, Sakaguchi Masakiyo	4. 巻 101
2. 論文標題 Novel extracellular role of REIC/Dkk-3 protein in PD-L1 regulation in cancer cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 431 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00109-023-02292-w	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	定平 卓也  (Sadahira Takuya)  (20733322)	岡山大学・大学病院・助教   (15301)	
研究分担者	黄 鵬  (Fan Pen)  (00610841)	岡山大学・中性子医療研究センター・研究准教授   (15301)	
研究分担者	竹居 孝二  (Takei Kouji)  (40322226)	岡山大学・医歯薬学域・教授   (15301)	
研究分担者	竹田 哲也  (Takeda Takuya)  (30302368)	岡山大学・医歯薬学域・研究准教授   (15301)	
研究分担者	落合 和彦  (Ochiai Kazuhiko)  (30550488)	日本獣医生命科学大学・獣医学部・准教授   (32669)	
研究分担者	野口 洋文  (Noguchi Hirofumi)  (50378733)	琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・教授   (18001)	
研究分担者	山田 浩司  (Yamada Kouji)  (80325092)	岡山大学・医歯薬学域・准教授   (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	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	那須 保友  (Nasu Yasutomo)  (20237572)	岡山大学・医歯薬学域・教授         (15301)	

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