

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07037

研究課題名(和文)天然化合物AusDに高い感受性を示すがん細胞の分子遺伝学的特徴の解明

研究課題名(英文)Characterization of cancer cells highly sensitive to the natural compound AusD

研究代表者

定家 真人(Sadaie, Mahito)

東京理科大学・理工学部応用生物科学科・准教授

研究者番号：70415173

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Austocystin D(AD)は、一部のがん細胞株において、シトクロムP450(CYP)依存的にDNA損傷と増殖抑制を引き起こす天然化合物である。この化合物に高い感受性を持つ細胞はCYP2J2の発現量が多い傾向にある。本研究では、CYP2J2発現の抑制と亢進が、それぞれADの感受性およびDNA損傷誘導を軽減、増強させることを示した。酵素活性を欠いたCYP2J2の過剰発現は、ADへの感受性を増強させなかった。ADの細胞毒性に關与する遺伝子のスクリーニングでは、CYPの活性化に關与する遺伝子が同定された。これらの結果は、CYP2J2とその酵素活性がADの細胞毒性に必要なことを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた結果は、CYP2J2とその酵素活性がaustocystin Dの細胞毒性に必要なことを示している。先行研究で得られた知見と総合すると、CYP2J2によるaustocystin Dの代謝がこの細胞毒性をもたらすと考えられる。Austocystin Dは、がん治療のためのプロドラッグとして利用できる可能性があり、CYP2J2発現レベルの高さは、この化合物が効果を発揮できる細胞のバイオマーカーとして使用される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Austocystin D(AD) is a natural compound that causes cytochrome P450 (CYP) monooxygenase-dependent DNA damage and growth inhibition in some cancer cell lines. Cells highly sensitive to this compound tend to express high levels of CYP2J2, but it is not clear whether CYP2J2 is required for the cytotoxicity of this compound. In the present study, we showed that knockdown and overexpression of CYP2J2 alleviated and enhanced both AD sensitivity and DNA damage induction, respectively. Overexpression of CYP2J2, which lacks enzymatic activity, did not increase susceptibility to AD. Screening for genes involved in AD cytotoxicity identified those involved in CYPs activation. These results indicate that CYP2J2 and its enzymatic activity are required for AD cytotoxicity. AD metabolism by CYP2J2 may confer the cytotoxicity. AD could be used as a cytotoxic prodrug for cancer therapy, and the high CYP2J2 expression level possibly be used as a biomarker for cells in which this compound is effective.

研究分野：分子生物学

キーワード：austocystin D シトクロムP450 細胞毒性 プロドラッグ 骨肉腫 がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Austocystin D は 1974 年に初めて単離・構造決定されたカビ由来の天然化合物である。その後、薬剤排出に関わる MDR1 を過剰発現するヒト細胞の増殖を抑制する化合物であることが報告されたが、最近になって austocystin D の細胞毒性と MDR1 発現には関連性がないことが示された。

これまでに austocystin D の作用機序を明らかにする試みはほとんど行われていないが、最近の研究により、austocystin D はそのビニルエーテル部位が細胞内でシトクロム P450 (CYP) モノオキシゲナーゼ依存的に酸化されて活性化体となることや、DNA 鎖切断を誘導し細胞増殖を抑制することが示唆された。興味深いことに、austocystin D は正常細胞への毒性は低く一部のがん細胞に選択的な毒性を示す。

この化合物に感受性の高い細胞は、CYP2J2 の発現レベルが高い傾向にあることが知られているが、CYP2J2 がこの化合物の細胞毒性に必要なかどうかは明らかにされていない。また、austocystin D 高感受性を決定づける遺伝的背景や遺伝子発現の特徴の全容も明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、CYP2J2 の遺伝子操作を行うことで、austocystin D の細胞毒性に CYP2J2 がどうかを精査すること、また、austocystin D の細胞毒性に関わる遺伝子のスクリーニングを行うことで、austocystin D 高感受性を決定づける遺伝的背景や遺伝子発現の特徴を見出すことを目的とする。これらを総合して、austocystin D による細胞増殖抑制の分子機序を明らかにする。

本研究により、austocystin D の生物活性についての基礎的な知見が与えられるだけでなく、austocystin D 感受性という表現型を基軸にして、新たな分子間ネットワークの発見が期待される。austocystin D 高感受性を示すがん細胞に共通するバイオマーカーが見つければ、austocystin D が抗がん剤のリード化合物候補になる可能性と、このバイオマーカーを指標にした個別化医療につなげられる可能性がある。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、以下の方法を用いた。

- (1) ヒト細胞の austocystin D 高感受性と CYP2J2 の発現レベルの高さの間に相関があるという先行研究の結果を確認するため、複数の細胞株を用いてその austocystin D 感受性と CYP2J2 の発現レベルを調べ、相関解析を行った。
- (2) Austocystin D による DNA 鎖切断の誘導や細胞増殖の抑制が CYP2J2 に依存するかを調べるため、CYP2J2 のノックダウンあるいは過剰発現が、細胞の austocystin D 感受性に影響を与えるか実験した。
- (3) Austocystin D による DNA 鎖切断の誘導や細胞増殖の抑制が CYP2J2 の酵素活性に依存するかを調べるため、野生型 CYP2J2 またはその酵素活性変異体を細胞で発現させ、austocystin D 感受性に与える影響が異なるか調べた。
- (4) Austocystin D の細胞毒性に関わる遺伝子を網羅的に探索するため、CRISPR ガイド RNA スクリーニングを行った。

4. 研究成果

austocystin D の感受性と CYP2J2 の発現レベルとの間には強い正の相関があること、CYP 阻害剤処理によって austocystin D の細胞毒性が低下することが示されていることから、austocystin D の細胞毒性への CYP2J2 の関与が示唆されていた。しかし、CYP2J2 がその毒性に必要なかど

うかは明らかになっていなかった。

本研究で我々は 11 の骨肉腫由来細胞株について調査したところ、austocystin D の感受性と CYP2J2 の発現レベルがよく相関すること、austocystin D 処理により DNA 損傷と細胞増殖抑制が誘導されることが確認された。CYP2J2 の発現を抑制すると、austocystin D の感受性と DNA 損傷誘導が緩和された。その一方で、CYP2J2 を過剰発現すると、austocystin D の感受性と DNA 損傷誘導が増強されることがわかった。これらの結果から、austocystin D が持つ細胞毒性には、CYP2J2 が必要であることが示された。

CYP2J2 が持つ酸化活性に必要なアミノ酸の変異体である CYP2J2 G312R を過剰発現させても、austocystin D の細胞毒性の増強は認められなかったことから、austocystin D の細胞毒性が CYP2J2 とその酵素活性に依存していることが示された。Austocystin D の細胞毒性に関わる遺伝子を網羅的に探索するため、austocystin D 処理による細胞増殖抑制を回避させる CRISPR ガイド RNA のスクリーニングを行ったところ、CYP の活性化に関わる遺伝子が複数同定された。以上の実験結果、および、CYP により酸化を受けることが示唆されるビニルエーテル部位を持たない dihydro-austocystin D には細胞毒性がないことから、austocystin D は細胞内で CYP2J2 により酸化され、DNA 損傷と細胞増殖の抑制を誘導するものと考えられる。

本研究で得られたデータは、austocystin D の感受性と CYP2J2 の発現レベルとの相関が単なる偶然ではなく、CYP2J2 の発現レベルの高さが austocystin D 高感受性細胞のバイオマーカーとなり得ることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 定家真人
2. 発表標題 The balance between fragility and stability of the genome in telomerase-independent cancer cells
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島有紀子、新家一男、旦慎吾、石川冬木、定家真人
2. 発表標題 天然化合物AusDに高い感受性を示すがん細胞の分子遺伝学的特徴の解明
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小島有紀子、滝川雅大、新家一男、旦慎吾、石川冬木、定家真人
2. 発表標題 骨肉腫細胞に対する天然化合物AusDの細胞傷害性の分子メカニズム
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022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
研究協力者	石川 冬木 (Ishikawa Fuyuki)		

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
研究協力者	新家 一男 (Shin-ya Kazuo)		
研究協力者	旦 慎吾 (Dan Shingo)		

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