

機関番号：32676

研究種目：若手研究（スタートアップ）→ 研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890268

研究課題名（和文） 肺がんにおけるがん原遺伝子 Pokemon を標的とした天然物由来シード化合物の創製

研究課題名（英文） Search for natural products targeting Pokemon signaling pathway

## 研究代表者

細谷 孝博 (HOYOYA TAKAHIRO)

星薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号：30506572

研究成果の概要(和文):Pokemon (POK erythroid myeloid ontogenic factor; LRF, FBI1, ZBTB7A) は、転写抑制因子で、肺がん細胞における過剰発現が、発がんまたはがんの維持に関与していることが報告された。この Pokemon によるシグナル伝達を阻害することが、がん治療薬につながると考えられており、本研究では、天然資源よりシグナル伝達阻害剤を得るための評価系の構築、天然資源のスクリーニングを行なった。本期間において、細胞を用いた評価系の構築とスクリーニングが終了した。

研究成果の概要(英文):Pokemon (POK erythroid myeloid ontogenic factor; LRF, FBI1, ZBTB7A) is a transcriptional suppressor. It is reported that the overexpression of Pokemon in lung cancer cell caused oncogenesis or maintain of the cancer. To search for inhibitors of the Pokemon signaling pathway, new cell-based assay systems were developed and screening of natural product or natural resources have been performed.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,070,000	321,000	1,391,000
23年度	840,000	252,000	1,092,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,910,000	573,000	2,483,000

研究分野：天然物化学

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：天然物、ポケモン、肺がん、スクリーニング、シグナル伝達

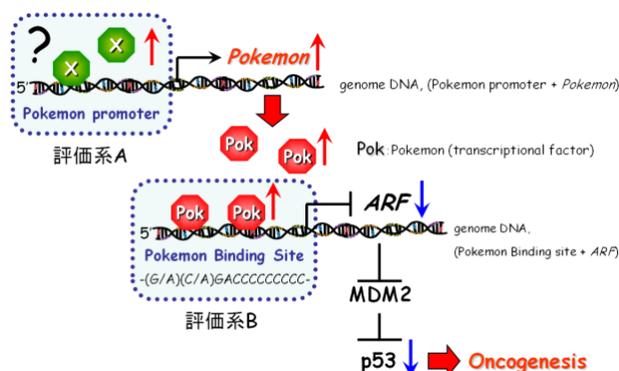
## 1. 研究開始当初の背景

近年の日本における死亡率は、悪性新生物（がん）が上位を占めており、今後もがん疾患は増加すると予想され、医学的にも社会的にも深刻な疾患の一つである。その中でも、肺がんに関しては、全がんによる死亡者数の17%を占めており（WHO 調査）、検査法や治療法が進歩した現代でもなお世界中で年間130万人ほどがこの疾患で死亡している。

転写抑制因子ポケモン（Pokemon：POK

erythroid myeloid ontogenic factor; LRF, OCZF, FBI1 とも呼ばれる)は、POZ (poxvirus and zinc finger) ドメインを有し、C末端に Krüppel 型のジンクフィンガーを有する転写抑制因子である。通常この Pokemon が関与するシグナル伝達経路は、胚の発生や分化、増殖に必要とされているが、近年、肺がん細胞において Pokemon が過剰発現していることが分かり (Apostolopoulou, K., et al., *J. Pathol.* **2007**, *213*, 294-302.; Zhao, Z.-H., et al., *Lung Cancer*, **2008**, *62*, 113-119.)、このポケモンの過剰発現

が原因で発がんまたはがんの維持に重要な役割をしていることが報告された (Maeda, T., et al., *Nature* **2005**, 433, 278-285.)。すなわち、がん抑制遺伝子である ARF (ADP Ribosylation Factor) のプロモーターに転写抑制因子 Pokemon の DNA 認識配列が存在し、Pokemon が ARF の発現を調節している。従って、Pokemon の過剰発現は、ARF の発現を抑制し、下流のシグナルを抑制することで、がん化が引き起こされる (Fig. 1)。



**Fig. 1.** Pokemon signaling cascade in cancer cells.

本研究に関して、2005年 Nature 誌で Maeda らにより転写抑制因子 Pokemon の異常発現ががん化、その維持を引き起こすことが報告され、以降、いくつかの腫瘍細胞で Pokemon が高発現しているとの報告がされている。Maeda らによると、ARF のプロモーター領域に Pokemon binding site (Pokemon 認識配列) が存在し、その転写を負に調節することで ARF の発現を抑制し、p53 を抑制した。その結果、腫瘍形成を助長し、その維持に関与すると報告している (Fig. 1)。また、この Pokemon の異常発現が、in vitro および in vivo の両者において、腫瘍の形成や維持を引き起こすことも確かめられた。その後、非小細胞肺癌 (Apostlopoulou, K., et al., *J. Pathology* **2007**, 213, 294-302)、乳がん細胞 (Agrawal, A., et al., *Exp Mol Pathol.* **2006**, 81, 115-122) などでも Pokemon の過剰発現を認める報告があり、このポケモンの異常発現ががん化を引き起こす証拠の報告が続いている。

一方、2008年 Yang ら (Yang, Y et al. *FEBS J.* **2008**, 275, 1860-1873) による *pokemon* 遺伝子のプロモーター解析が行なわれ、*pokemon* 遺伝子のの上流には、Pokemon の発現に重要な配列があることが明らかにされたが、詳細な転写因子の同定には至っていないが、盛んな研究がなされている。

以上のことより、本シグナル伝達経路とがんとの関係の発見は浅く、詳細な分子メカニ

ズムは解明されていないが、転写抑制因子 Pokemon の過剰発現ががん化、および、がんの生存維持に必要な事実は確かである。

## 2. 研究の目的

肺癌における Pokemon シグナル伝達経路を標的とした治療薬創製のため、新規アッセイ系の構築、天然資源のスクリーニング、および天然資源からの活性化化合物を得ることを目的とした。

本研究では、がん細胞で異常に高発現している遺伝子を一時的に阻害することが出来れば、新規分子標的治療薬の開発につながると考え、この Pokemon を標的とした低分子化合物を天然資源より探索し、最適化を行なうことで、新規抗がん剤の開発を目的とした。

しかし、本シグナルの活性を評価できるアッセイ系は市販されていなかったため、目的に合ったアッセイ系を新たに構築する必要がある。申請当初の予定では、Fig.1 に示す評価系 A および B のプロモーター活性を評価できるレポーターアッセイ系を 2 種類構築する予定であったが、評価系 A に関しては、レポーターアッセイを用いるのではなく、直接の Pokemon タンパク量を定量することで、Pokemon 自体の発現を観察する系とした。評価系 B に関しては、申請書通りの Tet システムを用いたレポーターアッセイにより、Pokemon による転写活性を観察する系とした。

また得られた活性物質のスキヤホールドを基本に、更に強力な活性を有する阻害剤を得るため、合成化学的手法により構造活性相関に関する研究を行い、Pokemon が関与するシグナル伝達経路に特異的に阻害する化合物の創製を目指した。

本研究の様な新規アッセイ系の構築、スクリーニング、天然資源からの活性化化合物の探索をすることで、新たな活性を有する化合物、また新規で新奇な化合物を創出する可能性を秘めている。

このような背景から、申請時点では Pokemon シグナル伝達経路の強力な阻害剤の報告はされていないことから、本シグナルを標的とした天然物由来の活性化化合物を探索することとした。

## 3. 研究の方法

Pokemon を標的としたアッセイ系を構築するにあたり、申請時に提案した評価系 A および B (Fig. 1) について、評価系 A を変更した。

### 3-1. 評価会 A と変更点

評価系 A は、*pokemon* 遺伝子の 5'側上流にあるプロモーター領域を、ゲノム DNA を基に PCR により増幅し、その下流に Luciferase をコードするレポーターベクターの作成を試みた。しかし申請当初は、*pokemon* 遺伝子の発現において、その転写因子や発現メカニズムの解明が進んでいなかったため、レポーターベクターの構築を断念した。その代替策として、細胞内の Pokemon タンパク量を直接定量する方法に切り替えた。すなわち、肺がん細胞 (A549, Pokemon+) を溶解し、dot blot の要領でニトロセルロース膜に滴下し、Pokemon 抗体による Western blotting 法により Pokemon タンパクの量を発光にて定量する。アッセイサンプルを作用させた A549 細胞を溶解し、dot blot 法に A549 細胞内の Pokemon タンパク量を定量し、発光量が下がったサンプルについて、二次評価に移る。二次評価は、実際に SDS-PAGE → Western blotting を行ない、内部標準に  $\beta$ -actin を選び、Pokemon のタンパク量を定量する。

### 3-2. 評価系 B

評価系 B は、Fig. 2 示したような Tet-On システムを用いたレポーターアッセイを構築した。転写抑制因子 Pokemon は、DNA 上の配列-(G/A)(C/A)GACCCCCCCCC-に結合して、転写を負に調節する。この DNA 結合配列を有するレポーターベクター、すなわち、6×-AAGACCCCCCCCC-に TK (Thymidin Kinase) プロモーターを付加し、下流に Luciferase をコードしたベクター (pGL4-Pok BS, Fig. 2., 評価系 B) を作製し、Fig. 3 に示す 3 つの plasmid を遺伝子導入した細胞を作成する。Fig. 3 は、tetracycline (Tc) を添加することで Pokemon を pcDNA3.1-Pok により強制的に発現させ、Fig. 2 で作成したレポーターベクターにてその転写活性の抑制をルシフェラーゼにて観察する系である。本系によりヒットしたサンプルは、Pokemon による転写抑制活性を阻害したことを意味する。

評価系 B : pGL4-PokBS vector (PokBS: Pokemon Binding Site)

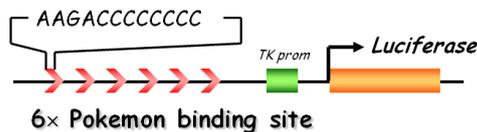


Fig. 2. Reporter vector of pGL4-PokBS.

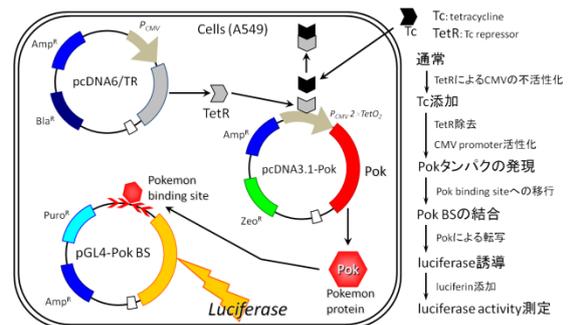


Fig. 3. Cell-based reporter assay system of measuring Pokemon-mediated transcriptional activity using Tet-On System

## 4. 研究成果

### 4-1. 評価系 A の構築

評価系 A は、Pokemon 自体の発現を観察するアッセイ系であり、申請当時に考案したレポーターアッセイではなく、細胞内 (肺がん細胞株: A549) の Pokemon タンパク量を Western blotting により定量する方法にて行なった。多数のアッセイサンプルを処理するため、SDS-PAGE は行わずに、ニトロセルロース膜に dot blot し、それを Western blotting 法にて検出する方法で行なった。また、同時に細胞毒性を評価するため、MTT 法により細胞の生存率を求めた。評価系の検討として、細胞数、サンプル作用時間等の検討を行ない、96-well plate フォーマットで行なえるスクリーニング方法を考案した。

研究室保有のマレーシア、インドネシア産植物抽出物サンプルをスクリーニングしたところ、*Aniomanthus dulcis* (Apocynaceae) leaves および *Aglaia lowii* (Meliaceae) leaves に、顕著な Pokemon タンパクを減少する傾向が見られた。また、MTT 法による細胞生存率も確認しているため、細胞毒性により細胞が少なくなったために起こった減少ではないことは確かめている。二次評価に関しては、SDS-PAGE → Western blotting 法で確認したところ、再現がとれたため、現在、活性を指標とした分離、活性化化合物の精製を行なっている。

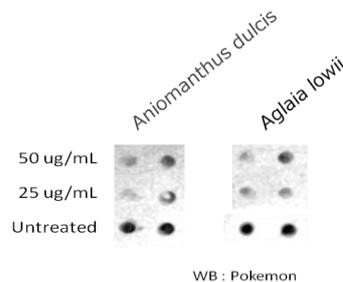


Fig. 4. Hit samples by Assay A

## 4-2. 評価系 B の構築

評価系 B は、転写因子 Pokemon による転写活性を観察するアッセイ系であり、Fig. 3 に示す通り、Pokemon タンパク発現ベクター (pcDNA3.1-Pok) と Pokemon binding domain を有するレポーターベクター (pGL4-PokBS) が必要であった。

### 4-2-1. pcDNA3.1-Pok vector の作成

Pokemon をコードするコードする cDNA 領域 (pENTR207-ZBTB7A(N)) を有するベクターより、clonase により pcDNA3.1 (pT-REx-DEST30) に組換え、目的の Pokemon 発現ベクターを作成した。作成した pcDNA3.1-Pok を、pcDNA6/TR を安定導入した HeLa 細胞に transfection し、Doxycycline (Dox) の有無で Pokemon タンパクに対する Western blotting を行なったところ、Dox により Pokemon タンパクが過剰発現することを確認し、目的の発現ベクターとした (Fig. 5)。

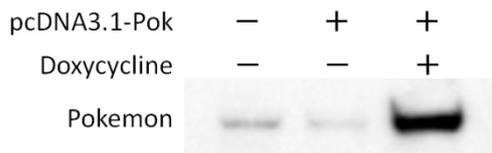


Fig. 5. Pokemon protein overexpression by Dox addition

### 4-2-2. pGL4-Pok BS vector の作成

Pokemon binding domain を有するレポーターベクターは、AAGACCCCCCCC を 6 個つないだ DNA を合成したものを、pGL4 に導入した。また、その下流に付加した TK (thymidine kinase promoter) は、TK 領域を有するベクターを鋳型とした PCR による増幅を行ない、Pokemon binding domain の下流に導入し、目的のレポーターベクターとした。

現在、大量のスクリーニングを行なうため、また、安定したデータを得るために、pcDNA3.1-Pok および pGL4-PokBS (Fig. 3) を安定的に発現する安定発現株の作成を行っている。

現時点 (2011 年) において、Pokemon を標的とした小分子は、Pokemon の発現を抑制する curcumin しか見つけ出されておらず、Pokemon による転写抑制を阻害する化合物はまだ見つかっていない。本研究によって構築されたアッセイ系を用い、Pokemon を標的とする化合物の創出には、意義があることであり、今後のスクリーニング等を進める予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Hosoya, Takahiro; Yamasaki, Fumie; Nakata, Asami; Rahman, Abdul; Kusumawati, Idha; Zaini, Noor Cholies; Morita, Hiroshi.

Inhibitors of Nitric Oxide Production from *Stemona javanica*.

*Planta Medica*, **2011**, 77, 256-258.

2. Hosoya, Takahiro; Nakata, Asami; Zaima, Kazumasa; Latip, Jalifah; Din, Laily Bin; Muslim, Noramly; Morita, Hiroshi.

Papuabalanols A and B, new tannins from *Balanophora papuana*.

*Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **2010**, 58, 738-741.

[学会発表] (計 1 件)

1. 細谷孝博、森田博史、Noramly Muslim、Laily Din

ツチトリモチ科 *Balanophora papana* の成分に関する研究

第 56 回日本生薬学会、(2010)、京都

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

細谷 孝博 (HOSOYA TAKAHIRO)

星薬科大学・薬学部・研究員

研究者番号：30506572