様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２５年５月３１日現在

機関番号：３２６４４
研究種目：基盤研究（Ｃ）
研究期間：２０１０～２０１２
課題番号：２２５０１０５２
研究課題名（和文）　ヒトセプチン４プラディオン GTPase を標的とした抗癌剤開発の研究
研究課題名（英文）　The study of the development of anti-cancer drug which targets human septin 4 (Bradeion) GTPase.

研究代表者
田中　朝雄（TANAKA TOMOO）
東海大学・医学部・講師
研究者番号：５０１９２１７５

研究成果の概要（和文）：ヒトセプチン４ブラディオン発現癌において、患者の血中微量計測法の確立により超早期診断が可能となり、これらの癌の予防的治療および撲滅が可能となった。進行癌患者への治療は、抗癌剤として奏功する新規物質は皆無であり、生体毒性により応用困難と判定されたが、制癌剤として有望な物質の探査に成功し、免疫賦活・腫瘍内新生血管産成抑制に効果をもたらすことが実際の患者にて示されている（癌研有明病院）。

研究成果の概要（英文）：Our research succeeded to provide a practical tool (serum test) to diagnose early stage of cancer such as benign polyps and adenoma, and colonoscopic dissection of these lesions consequently leads to cancer prevention in candidate population. Systematic search for a novel anti-caner drug candidates resulted in more toxicity than efficacy on cancer cells *in vitro*, and we had to conclude that none of the known candidates could apply in clinics. However, we simultaneously searched and discovered a Chinese compound, Kaiji, which has been introduced to the patients in the NCI Hospital, Ariake, Japan. The limited number of the results showed significant controlling effect on hepatoma and the other adenocarcinoma, by activation of cellular immunity and also by the inhibition of angiogenesis in tumor. We are now applying Kaiji to Drosophila system to show the detailed efficacy on protein-protein and genetic system in cancer cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２０１０年度	１，４００，０００	４２０，０００	１，８２０，０００
２０１１年度	１，３００，０００	３９０，０００	１，６９０，０００
２０１２年度	６００，０００	１８０，０００	７８０，０００
年度			
年度			
総　計	３，３００，０００	９９０，０００	４，２９０，０００

研究分野：総合領域
科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学
キーワード：癌、セプチン、ブラディオン、腫瘍マーカー医療

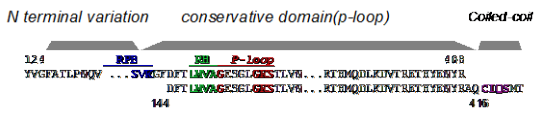
１．　研究開始当初の背景

セプチン遺伝子ファミリーは、細胞骨格線維の形態維持、特に細胞分裂時の機能が重要視されたため、長く分裂酵母等の生物種において研究されてきた。そのため、長く細胞生物学、癌研究分野等医学関連の研究者と興味を共有することなく経過してきた。現在、哺乳類細胞における遺伝子解析が進み、ファミリー全体として13種類に分類されるに至ったが、それも2002年の発見者統一見解まで待たなければならなかった（Macara, IG., Tanaka, M., Tanaka, T., *et al.*, 2002, 下図）。

ヒトセプチン遺伝子ファミリーの統合分類表（2002）

APPROVED HUMAN SEPTIN NOMENCLATURE (Gene/protein)	Previous/ human septin aliases	N-term sequence (human, longest splice variant)	C-term sequence (human, longest splice variant)	Human Genbank accession #s (selected)	Human chromosome locus
SEPT1/Sep1	SEPT4	MDATYYQPS	QSTQSTVL	NM_053935	8q11
SEPT2/Sep2	Ned5, KIAA0158, Pnutl3, Dif6.	MSKQQPPQ	GGSLGHIV	NM_004404, AF054826,	2q37.3
SEPT3/Sep3 v1-3	Sep3	MSFLVPHP	IFSHDSNP	NM_019106	12q13.3
***SEPT4*/Sep4 v1-6**	**Bradeion (α, and β) Pnutl2 (variants 1-4) Human Cdcrel-2(a-b) H5, ARTS, MART**	**MDRSL GWQ**	**QKQMKE NY.**	**NM_004574, NM_080415-7, AF176379, AB008753, AB002110**	**17q23**
SEPT5/Sep5	Pnutl, Cdcrel-1A	MSTQRIYL	MLQQSMQDQ	YI1395, NM_002688	22q11.2
SEPT6/Sep6 v1-6	Sept2, Septin6(I-VI), KIAA0128	MAATDLAR	KRDKEKKSN.	AF047038 62, XB024622,	Xq24
SEPT7/Sep7	hCdc10	MVAQQLNL	NKRKGKKF.	AF122594, NM_001788	7q35-3
SEPT8/Sep8	KIAA0202	MAATDLDRF	RTDRKDKKN.	D86327, BAA13763.1	Sq21
SEPT9/Sep9_v1-4	AF17q25 gene, MSF(a-d), Sep9, SepD1, Ov/Br sep(d), Pnutl4, KIAA0991	MFRDRIMAL	PKTPTAPTM.	NM_006640, AB037028, AF135719, AF135720, AF135721	17q25.2
SEPT10/Sep10	Sep10, Sep1-like	MASRVVAR HL	QGQVSQSR.	AF146760	Xq11.2

ここで、セプチンの酵素としての活性機能解析の端緒は、1982 年Walkerらの活性中心に必須なアミノ酸部分の基本骨格の推定と考えられる。この骨格部分は、Walker’ｓP Box と呼ばれ、長く変更されることなく引用されて来たが、近年X線回折による構造解析、さらに物性化学の技法の進展とともにセプチン分子毎の差異が解明され、ヒトセプチン４ブラディオンにおいては、従来考えられていた酵素活性中心がWalker’ｓ P Boxを下流に大きく越えた拡大アミノ酸領域範囲が必要であることが示された（下図、アミノ酸144-416）（Garcia, W., Tanaka, M., Tanaka, T., *et. al.*, 2008））。



これまで、上図赤字で示したセプチン 2, 5, 6, 9 が良く研究されて来たが、これらは残念ながら細胞・組織特異的発現は認められず、遺伝子ノックアウトマウスにおいても異常が認められないため、研究内容がどうしても実験室内現象論に終始せざるを得ないという欠点を持つ。しかるに、その臓器発現特異性により選別された遺伝子であるブラディオンは、癌の病態解析を筆頭に、極めて有用性の高い機能解析研究進展に適している。ブラディオンは、二価イオン(Mg, Mn)を含む環境下で２量体として機能するGTPaseであり、その酵素活性も、存在する分子量も生体試料を用いる場合も計測系が樹立されている（Garcia, W., Tanaka, M., Tanaka, T. *et al.*, 2007）。特に興味深いことは、生体内にてブラディオンが必要とされ、生産される状況は、ニューロンの様に高酸素・高栄養状態で非常にエネルギー消耗度が高い機能を要求される場合のみであり（脳神経系では能動輸送、癌細胞では加速された分裂増殖）、それぞれの環境下における’Payload’、’fail-safe’物質、ということである。

２．研究の目的

(1) 本研究では、ブラディオンの癌特異的発現、即ち癌細胞にとっての’Payload’、’fail-safe’物質という特徴に注目し、ブラディオンの酵素としての機能に対する活性阻害物質を決定し、そのヒト三次元培養癌細胞・生体試料内での効果発現を検定することにより、抗癌剤開発を行う。既に、ブラディオン計測系を樹立していることから、本研究では、制御物質のブラディオンへの結合能測定および GTPase 活性測定を施行する。阻害剤のブラディオン GTP 活性中心への結合能は、一分子蛍光測定法を用い、測定する。阻害剤のブラディオンの GTPase 活性阻害測定は、ブラディオン溶液中に GTP を添加し、酵素活性発現環境下（２価イオンの至適濃度の調整等）で、GTP→GDP + Pi による反応の変化をみる。酵素活性測定は市販キットを利用するが、ブラディオンでの測定条件を決定する。阻害物質候補・リード化合物の判定もこれらの複数の技法にて計測判定し、効果が認められた候補群については、三次元培養ヒト癌細胞にて分裂増殖阻害、または細胞死誘発能を検定する。加えて薬効検定の必須条件となる生体機能判定としては、既に樹立済みのブラ

ディオン遺伝子導入ショウジョウバエ株（特許承認済）を用い、候補物質の阻害効果検定と同時に生体毒性判定も行う。

(2) セプチン遺伝子ファミリーはその発見の経緯から、細胞分裂や細胞骨格繊維を仲介とする細胞内能動輸送に関わる機能に焦点を当てて研究されてきた。分裂酵母を中心とした研究分野は、哺乳類におけるセプチンの機能も類似のものという先入観を持たせるに十分であったが、近年のゲノム解析によるセプチンGTPaseの網羅により、全く別途の機能が示唆されてきた。その典型が癌マーカーとしてのブラディオン機能である（Tanaka, M., Tanaka, T., Kijima, H., *et al.*, 2003)。他のセプチンにおいても、同様に独自機能が推測されるが、ここで問題となるのは、細胞・組織・臓器による発現特異性である。体細胞にて発現特異性がなく、正常・異常のフェノタイプに関わらず一定発現を示す場合、臨床応用性は低い。ブラディオンは、生体試料中の計測方法も樹立されており、特異的発現を示す癌（大腸癌や泌尿器科癌等）の早期診断・モニターシステムに応用されている。また、アンチセンス技術の応用により、癌細胞内の発現を部分抑制することで癌細胞特異的細胞死を惹起できることも既に報告した（Tanaka, M., Kijima, H., Tanaka, T., *et al.* 2002）。つまり、癌のマーカーとしても制御ターゲットとしても有用であることが示されており、診断に合わせた治療技術開発が最も望ましいターゲットと言えよう。ここで、分子標的医薬開発の取りまとめから、ターゲットとして核内シグナル伝達物質は早晩薬剤耐性になるだけで効果は期待できず（Cancer Celll 4, 111-122, 2008）、望ましい特質として、ゲノムワイドに散在・多発する変異物質よりも生体内に常備されている’payload’蛋白質および’fail-safe’ 酵素を狙え、と提唱された（Nature, 454, 1046-1047, 2008）。もともとゲノムの 90%以上が実際に機能性物質、あるいは‘ものつくり’に関与しないという事実の意義が解明されていないのが現状である。一見、統一性がないように見える癌における個別遺伝子変異群をターゲットにして特定の医薬開発は困難である。常在し、かつ、阻害剤投与で正常組織に毒性発現しない物質こそがターゲットである、という要求水準を再確認したと言えよう。ブラディオンはまさにこの特性に合うべく選別されてきた遺伝子であるところに大きな独創性と意義がある。また、薬剤開発研究に最も大切なものは、薬効よりも毒性判定であることも言を待たない。薬効・毒性双方の評価に、マウスモデルを使用することに関しては、やはりNature 454, 682-985, 2008 に疑義が提唱されており、生物種の差からも効果判定として適切かどうかという議論が従来通り継続されている。疾病対策としての遺伝子発現抑制、機能抑制としては、1）物性化学的に求める作用があるかどうか、2）*in vitro*実験において効果を実証できるか、そして、3）生体機能として効果を実証できるか、という三点が必須であるが、ここで、申請者らは、生体モデルとして困難を回避できるショウジョウバエモデルを開発済みであり、しかも特許戦略として権利帰属も明らかとなっている。このような十分な基盤情報と材料を完備した形での具体的ターゲッティング研究は一般スクリーニングと異なり、十分な成功を期待できる。

２．　研究の方法

(1) ヒトセプチン４ブラディオンの GTP 結合能および GTPase 活性測定法を樹立（物性化学）、
(2) *in silco* 創薬：阻害物質・リード化合物を探査・創製、
(3) *in vitro* 阻害効果判定（３次元細胞培養法による）、
(4) *in vivo* 阻害効果および生体毒性判定（ショウジョウバエモデル使用）、
(5) リード化合物の最適化、

を行い、治療薬候補物質の選定と使用に関わる必要十分な基盤を確立する。

平成 22 年度

(1) ヒトセプチン４ブラディオンの GTP 結合能および GTPase 活性測定法の確立（東海大・田中、産総研・田中）

蛍光標識したブラディオン分子と試料を室温混和し、ブラディオン-試料結合体のゆらぎを測定する一分子蛍光測定法（FCS, 機器名 MF10、産総研に設置）を用いる。また、

表面プラズモン共鳴技術（機器：ビアコア、東海大学に設置）も検討する。ブラディオンのターゲットとなるGTP結合部位の立体モデルを右に示す。ブラディオンの GTPase 活性測定法としては、Enzyme Linked Inorganic Phosphate Assay (ELIPA) を用いる。この方法は、GTP の加水分解によって生じた遊離リン酸（Pi）により，MESG (2-amino-6-methylpurine ribonucleoside) が 2-amino-6-mercapto-methyl purine に変換され，極大吸収波長が 330 nm から 360 nm にシフトする反応を利用する。反応後，360 nm の吸光度を測定し，遊離リン酸量から GTPase 活性を測定するものである。以上の測定のための、ブラディオンの合成・精製法は既に確立され、常備されている。測定時の溶液内至適２価イオン（Mg，Mn）濃度、添加 GTP 濃度等の検討もされている。

(2) *in silco* 創薬−阻害物質候補選定と配備（東海大・田中）

創薬事業のためのリード化合物探索は、アウトソーシングを提供するコンビナトリアルケミストリー技術をもつベンチャー企業に委託し、数百万の化合物ライブラリーをスクリーニングし、リード化合物を得る。スクリーニングのためのブラディオンの準備は、ブラディオンが産総研の特許物質である都合上、本研究体制のみが可能である。阻害物質候補・リード化合物は、①で樹立した測定系でも確認を行う。なお、阻害剤結合部位の模式図を右に示す。

平成２３年度以降の計画

(3) *in vitro* 薬効評価系樹立（東海大・田中、弘前大・鬼島、産総研・田中）

阻害剤候補化合物を大量に合成し、ヒト培養癌細胞（ブラディオン発現癌細胞）を用い、癌細胞へ与える直接効果を検討する。生体内の腫瘍形成は立体的に展開されるものであり、癌細胞は三次元細胞培養で初めて、生体内と同じ遺伝子発現をする場合があるという報告に注目されている。そこで本研究においては、三次元培養法（（株）ベセル）を用い、可能な限り生体条件に適した方法において効果判定を行う。用いる癌細胞は、ブラディオンを発現している大腸癌、悪性黒色腫、前立腺癌の細胞株を用いる。薬効評価は、EC50/IC50 値を用いて数値化する。特に弘前大・鬼島は、制癌効果の培養細胞系での判定に通暁しているため、効果判定のダブルチェック、従来の制癌剤との効果比較などの総合判定を行う。

(4) *in vivo* 薬効評価系樹立（東海大・田中、京都工繊大・山口、産総研・田中）

上記候補物質の実効的薬効評価は、結合阻害・酵素活性阻害効果の数値化測定に加えて、生体モデルを用いた毒性評価試験に立脚すべきである。また、蛋白質が生体内で単独で機能することがあり得ない以上、その合成から代謝までの過程で直接関連する物質群としてのとらえ方、副作用まで考慮することが必須である。本研究では、ブラディオン遺伝子導入ショウジョウバエ株を用いる（特許登録番号：日本国　第3932358号、平成19年3月 30 日登録済、出願人：独立行政法人　産業技術総合研究所　発明者：田中真奈実、山口政光、国際公開番号：WO2002/067670、公開日：平成 14 年 9 月 6 日）。具体的には、このショウジョウバエ株に候補化合物を食餌として与えることにより、遺伝子導入による形態異常（複眼形成にのみ限定した異常、山口の業績の項参照）の改善、もしくは憎悪を定量的に計測するものである。このモデルは、特に癌化・細胞周期の制御に関わるヒト遺伝子に有効であり、形態異常として複眼にのみ機能発現させて数値化された効果を検定することができる。マウスに比べて、時間もコストも短縮できるのは言うまでもない。研究分担者、山口が京都工芸繊維大学附属の国立センターとして、ショウジョウバエの遺伝子導入株作製・維持、およびそれを用いた効果判定実験を行う。

(5) リード化合物の最適化（研究者全員）

結果に従い、リード化合物の最適化−薬効、薬効持続性、投与経路・回数、溶解性など、より薬としての適切な化合物の絞り込みーを行う。

４．研究成果

(1) ヒトセプチン４ブラディオン測定法の確立（東海大・田中、産総研・田中）蛍光標識したブラディオン分子と試料を室温混和し、MF10（オリンパス）を用い、一分子蛍光測定

法（FCS）によりブラディオン-試料結合体のゆらぎを測定する方法を確立した（Tanaka T, Tanaka, M., *et al.*, 2010）。

(2) *in silco*創薬-阻害物質候補選定と配備（東海大・田中、産総研・田中）候補物質選定のため、市販のリード化合物および真菌抽出による抗癌剤候補物質を保持している企業（金沢）への聞き回り調査を行った。引き続き、妥当な候補物質選定を行う。

国の事業として推進されたいくつかのプロジェクトに則り、その抗癌剤候補（例えば、ベータ・ラクタム系抗生物質の一つであるセファロスポリンを産生することで知られているストレプトミセス属の産生する新規物質で、癌細胞の周辺組織浸潤阻害活性、細胞障害活性及びフリーラジカル消去活性を有する化合物）の検定をしたところ、残念ながら有効となる物質は皆無であった。そのほとんどは抗癌剤としての実質効果が認められず、また、正常細胞毒性が強いために実地に使用できる範囲の検定も不可能であった。

(3) *in vitro*薬効評価系樹立（東海大・田中、弘前大・鬼島、産総研・田中）患者血清および大腸内視鏡検査により病変を確認した血清検体を用いて、治療前後のブラディオン検出を行い、既に確立している MF10(オリンパス)による計測系が病変検出のみならず、治療効果判定に資することを確認した。癌、特に本申請にて主たる対象となる大腸癌の治療と予後は、早期発見の可否が大きく影響している。早期病変時の自覚症状がほとんどない本申請対象癌において、ヒトセプチン４ブラディオンGTPase計測による早期診断の実効性については、現在進行形で証明されつつあるが、2012年2月23日発行のNew England J. Medicine誌上において、複数論文にて内視鏡による早期ポリープ除去（大腸洗浄含む）により、大腸癌発症予防、ひいては23年という延命効果が報告され、本研究の先駆的意義が欧米においても同時進行で認められ始めた。

(4) *in vivo* 薬効評価系樹立（東海大・田中、京都工繊大・山口、産総研・田中）抗癌剤候補物質の生体毒性および抗癌作用の生体を用いた検索のため、遺伝子変異ショウジョウバエ株の配備を行った。この遺伝子変異は、細胞内シグナル伝達経路の一つのHippo経路遺伝子は、ショウジョウバエに過剰発現させることにより、単眼部分に癌化変異を起こすことが可能で、この変異ショウジョウバエに抗癌剤候補物質を接触させることにより、生態毒性と癌性変異の改善を計測することが可能である。このショウジョウバエ株の配備を完遂した。さらに、より複雑系として、ブラディオン遺伝子ノックアウトマウスの配備を完遂し、将来の実験に資する。

(5) ヒトセプチン４ブラディオンの血中計測による癌予防の実施（東海大・田中、弘前大・鬼島、産総研・田中）

癌治療は、対応できる進行度、浸潤以内で早期発見し、対外除去が最も効果的であり、自覚症状以前の検診レベルでいかに早期発見できるかが鍵となる、という結論は上記参照論文群と同じである。

本研究の最終目標である治療薬開発と同時進行で、早期発見かつ内視鏡／腹腔鏡下手術レベルで除去するという癌予防を推進することにより、本来の目的、癌撲滅へ貢献した。現在まで653例（男：409例、女：244例）行い、陽性率は24.7%（男：24.9%、女：24.2%）示した。大城ら（沖縄医学会雑誌、31, 51-53, 1993）が報告している人間ドックにおける大腸ポリープの発見率の類似性を示した（2013年2nd Biomarker Summit Europe, Zurichにて口頭発表）。陽性者のうち希望者26名が大腸内視鏡検査を受け、早期大腸癌１例（内視鏡下粘膜下層切除術にて治癒）、直腸カルチノイド１例（内視鏡下手術にて治癒）、大腸腺腫7例、大腸ポリープ（過形成または化生）4例を発見・摘出し、憩室症６例を発見した。我々は、積極的に大腸ポリープおよび大腸腺腫の切除を行っており、これはZauber等により早期ポリープ除去（大腸洗浄含む）が大腸癌発症予防、23年という延命効果があると報告され（NEJM, 366, 687-696, 2012）、本研究の先駆的意義が欧米においても同時進行で認められ始めたことに基づいている。Zurichでの学会発表により日本医薬企業との共同研

究を為し得なかった当技術が、Thermo Fisher Scientific Inc. の持つ診断技術Mass Spectrometric Immunoassay (MSIA) を用いた、我々の発見したブラディオン検出への応用の共同研究が進められている。またBongiovanni等は、我々の開発したヒトセプチン４ブラディオンGTPaseを標的としたRT-PCR技術 (Tanaka, M., *et. al.*, *Med. Sci. Monit.*, 9, MT61-68, 2003) を用いた膀胱癌の診断技術を追試し、その有効性を示した（*J. Urology,* 187, 2223-2227, 2012）。

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１件）

① T. Tanaka, Y. Kawamura, Y. Usui, T. Terachi, F. Kimura, T. Asano, M. Hayakawa, N. Sakai, S. Morimoto, Y. Mogi, H. Fujiwara, N. Yamamoto, K, Komori, and M. Tanaka. Bradeion Project: Monitoring and Targeting of Cancer: Molecular Marker Diagnosis of Cancer by Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS). The Open Conference Proceedings Journal, 1, 129-136, 2010.

〔学会発表〕（計３件）

① T. Tanaka, Prevention and Early Cure of Colorectal Cancer by Sept4/Bradeion Beta Serum Test. 2nd Biomarker Europe Summit, 2012. 9. 5., Zürich, Switzerland.

② M. Tanaka, T. Tanaka, F. Kimura, K. Komori, Y. Usui, T. Terachi, N. Yamamoto, S. Morimoto, Y. Sakai, and M. Fujiwara. Bradeion Project: Monitoring and targeting of cancer ---Successful molecular marker diagnosis of cancer by fluorescence correlation spectroscopy (FCS). 2nd International Conference on Drug Discovery and Therapy, Higher Colleges of Technology and Eureka Science, Ltd., 2011. 2.3.,Dubai, U. A. E.

③ M. Tanaka, H, Kijima, H. Masuda, S. Hori, M. Yamamoto, and T. Tanaka. BRADEION PROJECT: MONITORING AND TARGETING OF CANCER-CHARACTERIZATION OF TISSUE- AND CELL TYPE-SPECIFIC EXPRESSION OF A NOVEL HUMAN SEPTIN FAMILY GENE BARDEION. 2nd International Conference on Drug Discovery and Therapy., Higher Colleges of Technology and Eureka Science Ltd., 2011. 2.1-4., Dubai, U. A. E.

〔その他〕
ホームページ等
http://www.bradeion.com

６．研究組織
(1)研究代表者
田中　朝雄（TANAKA TOMOO）
東海大学・医学部・講師
研究者番号：５０１９２１７５

(2)研究分担者
鬼島　宏（KIJIMA HIROSHI）
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：９０２０４８５９

山口　政光（YAMAGUCHI MASAMITSU）
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号：８０１８８３４１

田中　真奈実（TANAKA MANAMI）
独立行政法人産業技術総合研究所・ブラディオン医用機器開発連携研究体・研究体長
研究者番号：８０１８８３４１
（平成２２年度→平成２３年度：連携研究者）