

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：34204

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24300343

研究課題名(和文)がん特異的タンパク質dynAP：新規がん治療標的としての検証

研究課題名(英文)Oncogenic properties of human dynactin-associated protein (dynAP)

## 研究代表者

水上 民夫 (Mizukami, Tamio)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：80367896

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、開発した“ヒト化酵母”技術によりヒトタンパク質dynAPを同定した。dynAPを発現させたNIH3T3/dynAP細胞は、in vitro系で軟寒天中のコロニー形成能、スフェロイド形成能を示す。マウス移植実験では、NIH3T3/dynAPは豊富な血管を持ち、細胞間の接着が緩んだ独特の腫瘍組織を形成する。その腫瘍の特徴は、dynAPがAktのリン酸化を亢進し、アンジオポエチン1の発現を上昇させ、そして接着因子E-cadherinの発現レベルを低下させることに基づくと思われる。以上の結果は、dynAPが細胞のがん化と悪性化に関与し、有望な新規創薬標的分子であることを示している。

研究成果の概要(英文)：Human dynactin-associated protein (dynAP) is a transmembrane protein that promotes AktSer473 phosphorylation. In contrast to control NIH3T3 cells expressing LacZ, NIH3T3dynAP cells vigorously formed colonies on soft agar, and spheroids in anchorage-deficient three-dimensional culture. NIH3T3dynAP cells injected into nude mice produced tumors with abundant blood vessels and weak cell-cell contacts. Expression of dynAP elevated the level of rictor (an essential subunit of mTORC2). Knockdown of rictor in NIH3T3dynAP cells reduced AktSer473 phosphorylation and formation of colony in soft agar and spheroid, indicating that dynAP-induced activation of the mTORC2/AktSer473 pathway for cell survival contributes to cell transformation. E-cadherin and its mRNA were markedly reduced upon expression of dynAP, giving rise to cells with higher motility, which may be responsible for the weak cell-cell adhesion in tumors. Thus, dynAP could be a new oncoprotein and a target for cancer therapy.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：分子標的治療

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究は新世代の画期的な抗がん剤の開発によるがん治療への貢献を最終目的としている。過去 10 数年、がんの薬物療法は分子標的抗がん剤の登場により大きな進展を見せたが、その成功の要因は、がんの原因分子を標的とした創薬戦略にある。分子標的抗がん剤の創薬にとり、スクリーニング標的の発見は最重要課題となっている。本研究課題の目的は、申請者が新たに発見したがん特異的発現タンパク質 dynAP の新規がん治療標的分子としての妥当性を証明し、抗体、低分子阻害剤開発など、具体的な創薬過程への道を開くことにある。

(2) 申請者は、“ヒト化酵母”技術により、酵母の増殖を指標として、機能未知のヒトタンパク質群から創薬標的タンパク質を効率よく探索すると同時に、該タンパク質に作用する創薬シード化合物を簡便にスクリーニングする系を確立した (Sekigawa M. et al. J Biomol Screen. 15, 368, 2010)。この技術をさらに深化させ、特異な酵母変異株を利用することにより、機能未知のタンパク質 C18orf26 (dynAP(dynactin-associated protein)と命名)が有望な抗がん剤創薬標的であることを証明し (Kunoh T. et al. Mol Cancer Ther. 9, 2934, 2010)、さらにその新規阻害剤 (Ergostane 類縁体) を発見した (Ueda JY. et al. J. Antibiot. 63, 139, 2010)。dynAP は細胞膜およびゴルジ体に局在する膜貫通型タンパク質であり、調べた限りではヒトがん細胞に特異的に発現している。dynAP の発現を shRNA によりノックダウンすると細胞の増殖が抑えられ、dynAP は細胞の増殖に重要な役割を果たしていることが判明した。dynAP の機能を解明するために解析を行った結果、dynAP は細胞の生存・増殖を促進する Akt の Ser473 のリン酸化を亢進し、活性化していることがわかった。shRNA による dynAP のノックダウンにより、Akt の活性化は消失し、さらにはがん遺伝子産物 Hdm2 の分解を促進することによりがん抑制遺伝子産物である p53 および p21 が蓄積した。また、dynAP 阻害剤 (ergostan 類縁体) は Hdm2 の分解を促進し、p53 および p21 を蓄積させ、がん細胞の増殖抑制とアポトーシスを誘導する。すなわち、dynAP は Akt を活性化することにより Hdm2 レベルを上昇させ、その結果、細胞増殖抑制に働く因子 (p53, p21) のレベルは低下し、細胞の増殖が促進されることを明らかにした。また dynAP ノックダウンは E-cadherin の発現を亢進する。その分子機構は不明であるが、E-cadherin はがん細胞の浸潤・転移に関わる第一義的因子である。以上の結果は、dynAP ががん細胞の生存・増殖、さらにはがんの転移にも関係していることを支持しており、有望な新規創薬標的分子といえる。

### 2. 研究の目的

(1) dynAP 発現細胞株を移植したマウスモデルにおける dynAP の造腫瘍能の検証

(2) dynAP によるがん化の分子機構の解明：dynAP を介する Akt 活性化キナーゼの同定を中心として

これらの検討により、dynAP の新規がん治療標的分子としての妥当性を証明し、がん分子標的治療分野に画期的な新規標的を提供することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) dynAP 発現細胞株を移植したマウスモデルにおける dynAP の造腫瘍能の検証

マウス NIH3T3 に dynAP を安定発現させ (NIH3T3/dynAP 細胞)、ヌードマウスに移植して、担がんマウスモデルを作成した。本系において、dynAP が造腫瘍作用、腫瘍形成促進作用を持つがんタンパク質であることを検証した。

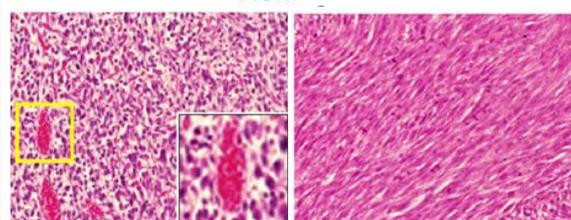
(2) dynAP によるがん化の分子機構の解明：dynAP を介する Akt 活性化キナーゼの同定を中心として

Akt のリン酸化による活性化には、mTORC2 他複数のキナーゼの関与が報告されているが、dynAP が如何なるキナーゼを介して Akt を活性化しているかは不明である。そこで、NIH3T3/dynAP 細胞を用いて、mTORC2 等の Akt 活性化候補キナーゼを shRNA ノックダウンすることにより、Akt のリン酸化の抑制を指標として活性化キナーゼの同定を試みた。

### 4. 研究成果

(1) dynAP 発現細胞株を移植したマウスモデルにおける dynAP の造腫瘍能の検証

NIH3T3/dynAP 細胞は in vitro 系でのがん細胞の特徴であるフォーカス形成能、軟寒天中のコロニー形成能、そしてスフェロイド形成能 (3 次元培養) を示す結果を得た。これらの contact inhibition の解除、anchorage-independency の獲得、スフェロイド形成能の獲得といった結果から、dynAP ががん遺伝子としての性質を有することが示唆された。さらにヌードマウスに移植すると、NIH3T3/dynAP 細胞は豊富な血管を持ち、細胞間の接着が緩んだ独特の腫瘍組織を形成することが明らかとなった (下左図が NIH3T3/dynAP 細胞、下右図が NIH3T3/H-Ras 細胞由来の腫瘍組織の HE 染色像)。



dynAP

H-Ras

NIH3T3/dynAP 細胞による上記の特徴ある腫瘍形成は、dynAP が Akt のリン酸化を亢進し、血管新生促進因子の発現を上昇させ、そして接着因子 E-cadherin の発現レベルを低下させることによるのではないかと考え、次項で詳細に解析した。

なお、ヒト細胞 KMST-6( dynAP 非発現細胞 ) 宿主でも dynAP はがん化能を持つ。すなわち、KMST-6 に dynAP を発現すると、Akt のリン酸化を亢進し、in vitro 及び in vivo 両系で腫瘍性を示すことも明らかにした。

## (2) dynAP によるがん化の分子機構の解明

dynAP は Akt の Ser473 のリン酸化を亢進することから、Akt パスウェイのシグナル変動を検討したところ、まず mTORC2 による AktSer473 のリン酸化の必須サブユニットである Rictor が、NIH3T3/dynAP 細胞で、タンパク質、mRNA の両方のレベルで、亢進していることを見出した。AktSer473 がリン酸化されると Akt の基質特異性が変化し、アポトーシスを促進する転写因子である FOXO3a をリン酸化することが知られている。なお FOXO3a はリン酸化されると核外に係留され、アポトーシスの促進活性が阻害される。事実、dynAP 発現細胞では、FoxO3a の Ser253 のリン酸化が亢進しており、細胞の生存が促進されるものと考えられた。

NIH3T3/dynAP 細胞における Rictor の亢進の意義を調べるために、本細胞で Rictor の発現をノックダウンしたところ、AktSer473 のリン酸化が阻害され、フォーカス形成、軟寒天中のコロニー形成、スフェロイド形成のいずれもが抑制を受けることが明らかとなり、dynAP によるがん化機構において、Rictor は重要な役割を担うことが示唆された。

これらの知見より、dynAP によるがんの生存・増殖モデルとして、dynAP の発現亢進 mTORC2 の必須サブユニットである Rictor の発現亢進 AktSer473 のリン酸化亢進 FoxO3a のリン酸化亢進によるアポトーシス阻害・細胞生存の経路の存在が示唆された。

NIH3T3/dynAP 細胞で血管形成の必須因子であるアンジオポエチン 1 (Angpt1) mRNA の発現が亢進していることを見出した。Angpt1 は dynAP の血管新生作用の原因分子になっていることが強く示唆された。

NIH3T3/dynAP 細胞で、細胞間接触が低下するメカニズムに関して解析を行い、本細胞においても、E-cadherin の発現レベルが、タンパク質、mRNA の両方のレベルで、低下していることを確認した。またそれに伴い、wound healing assay により cell motility が dynAP 発現細胞で亢進していることも確認した。これらの知見は、NIH3T3 宿主だけでなく、ヒトの乳腺上皮由来細胞の MCF10A においても確認できた。

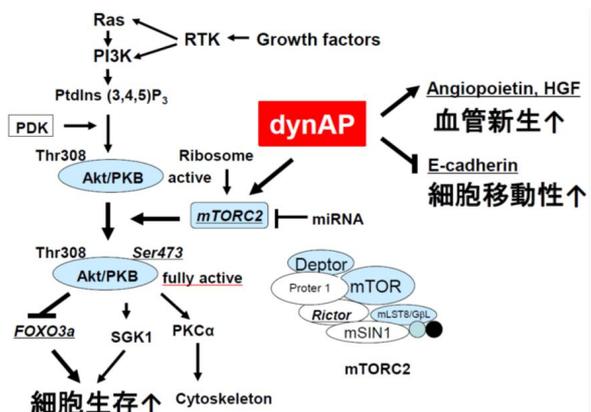
上記の研究より、dynAP による腫瘍形成の分子機構を下図にまとめた。すなわち、

dynAP 発現 Rictor 発現上昇 (mTORC2 活性上昇) AktSer473 リン酸化亢進 FOXO3aSer253 リン酸化亢進(細胞の生存)

dynAP 発現 血管新生促進因子 mRNAs (Angiopoietin、HGF) の発現上昇(血管新生)

dynAP 発現 E-cadherin の発現レベル低下(細胞の移動性)

のパスウェイが活性化される可能性を示すことができた。



なお今後の課題を整理すると、(1) dynAP 発現 血管新生促進因子 mRNAs (Angiopoietin) の発現上昇(血管新生) パスウェイに関しては、Angiopoietin1、HGF のノックダウンにより、血管形成の少ない腫瘍が形成されることを示すことが重要と考えている。(2) dynAP 発現 E-cadherin の発現レベル低下(細胞の移動性) パスウェイに関しては、E-cadherin の過剰発現により、腫瘍組織での細胞接着の変化(強い接着)を検証する、E-cadherin 低下による EMT(epithelial mesenchymal transition)では、常に N-cadherin が上昇すると考えられているが、mRNA、タンパク質レベルでの N-cadherin の変化を調べる、E-cadherin 低下 遊離 -catenin の上昇 cyclin D1 あるいは Myc の転写促進 細胞増殖亢進のパスウェイが想定されるため、これらの因子の転写誘導を検証する、の3点を検討する必要があると考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

水上民夫、久能樹、佐々木隆造、“ヒト化酵母技術”による新規がんタンパク質の発見  
I. Dynactin-associated protein (dynAP)は造腫瘍能を持つ (Discovery of a novel oncoprotein by “humanized yeast project”  
I. Dynactin-associated protein (dynAP) is oncogenic) 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

佐々木隆造、久能樹、水上民夫、“ヒト化酵母技術”による新規がんタンパク質の発見  
II. dynAPによる腫瘍形成の分子メカニズム (Discovery of a novel oncoprotein by “humanized yeast project” II. Molecular mechanisms by which dynAP forms tumor.) 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称：新規抗がん剤およびそのスクリーニング方法

発明者：水上民夫、久能樹、和田修一、向由起夫、太田伸二、夏目徹、家村俊一郎、新家一男、五島直樹、高木基樹、佐々木隆造

権利者：学校法人関西文理総合学園、独立行政法人産業技術総合研究所、社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、株式会社フロティアファーマ

種類：特許

番号：特願 2015-089559

出願年月日：2015年5月22日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nagahama-i-bio.ac.jp/research/h/%E6%95%99%E5%93%A1%E3%81%AE%E7%B4%B9%E4%BB%8B%EF%BC%88%E6%B0%B4%E4%B8%8A-%E6%B0%91%E5%A4%AB%EF%BC%89/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

水上 民夫 (MIZUKAMI, Tamio)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：80367896

### (2)研究分担者

高橋 玲 (TAKAHASHI, Rei)

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：60144565

### (3)連携研究者

永井 信夫 (NAGAI, Nobuo)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：90260281

中村 肇伸 (NAKAMURA, Toshinobu)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・准教授

研究者番号：80403202

長谷川 慎 (HASEGAWA, Makoto)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：10367899

鶴山 竜昭 (TSURUYAMA, Tatsuaki)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00303842

佐々木 隆造 (SASAKI, Ryuzo)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・客員教授

研究者番号：60077378