

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 1 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460384

研究課題名(和文)ペプチドによる胃癌標的治療薬開発に関する研究

研究課題名(英文)Development of LIX1L target-peptide therapy in gastric cancer

研究代表者

中村 悟己 (NAKAMURA, Satoki)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：20377740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は様々な癌細胞に特異的に発現するLIX1L遺伝子・蛋白質を同定し、LIX1Lは癌細胞増殖促進に働く機能を持っていることを明らかにしました。LIX1LはROS1キナーゼによりリン酸化を受け、様々なmiRNAを含むRNAに結合し、癌細胞増殖を促進することが明らかになりました。また、LIX1Lの136番目のチロシンを含む10アミノ酸の相同性ペプチドに、LIX1Lのリン酸化を抑制し、その結果、抗腫瘍効果が誘導されることも明らかにしました。これらのことから、LIX1Lは様々な癌に発現する共通の蛋白質であり、それを標的としたペプチドにより、新しい治療薬開発に発展できる可能性が示されました。

研究成果の概要(英文)：We identified the LIX1L, which specifically expressed in various cancer cells, as a novel marker for cancer. Its function is unknown in detail. In this study, we revealed that LIX1L promoted cancer cell proliferation both in vitro and in vivo. ROS1 kinase phosphorylates 136th Tyrosin in LIX1L, and LIX1L subsequently induces proliferates cancer cells via binding to various RMA including miRNA. We also found peptide, which specifically inhibited the function of LIX1L, and the peptide inhibited gastric cancer cell proliferation as a decay. Therefore, we revealed that LIX1L was specifically expressed in various cancer cells, and the PY136 peptide, which targeted to LIX1L amino acid sequence including 136th Tyrosin, has a possibility as a new molecular targeted agent for cancer therapy in LIX1L expressed cancer cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：分子標的薬 LIX1L蛋白質 胃癌 miRNA

1. 研究開始当初の背景

近年、胃癌の予防と治療のために、その発生機構とその進展機構の解明が着実に進んでいます。進行胃癌の治療は困難を極めていますが、癌細胞に特異的に発現する分子を標的とする治療薬の開発は、より副作用が少なく、高齢な患者にも使用可能で、腫瘍縮小効果をもたらすと考えられ、様々な癌治療における分子標的治療薬の開発や臨床試験が行われ、その効果が徐々に報告されていますが、まだ、十分な治療効果が得られていないのが現状です。我々は、胃癌治療において胃癌細胞特異的に発現する遺伝子・蛋白質の同定とその機能解析、及び胃癌細胞特異的な分子標的治療薬の開発を目指しました。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、造血器腫瘍における未分化な急性骨髄性白血病の細胞株と正常成熟骨髄球を用いた網羅的な遺伝子発現解析を行い、未分化癌細胞にのみ優位に発現している遺伝子の一つである LIX1L (Lix1 homolog-Like) を初めて同定しました。LIX1L は 337 アミノ酸から構成され、遺伝子は 1 番染色体長腕 21.1 にありますが、その機能については不明でした。そこで、胃癌細胞株を用いて LIX1L 遺伝子・蛋白質の発現を検討したところ、胃癌細胞株においても LIX1L 遺伝子・蛋白質の過剰発現を認めました。そこで、胃癌細胞における LIX1L 遺伝子の発現解析とともに、LIX1L 蛋白質の分子生物学的な役割について検討することを目的としました。

胃癌細胞において特異的に発現する LIX1L 遺伝子の発現を抑制すると、胃癌細胞の増殖が抑制されることを見出しました。さらに、LIX1L 遺伝子のアミノ酸配列をもとに、LIX1L 蛋白質の機能を阻害する 10~11 アミノ酸の相同性ペプチドの合成を行い、そのペプチドの一つに抗腫瘍効果を確認しました。さらに LIX1L が発現していない癌細胞での細胞増殖抑制効果は認められず、LIX1L 発現胃癌細胞

特異的に抗腫瘍効果を示しました。これらの結果から、LIX1L 蛋白質発現胃癌細胞特異的な分子標的治療薬としてペプチドを用いた治療薬の開発の基礎的研究を目指し、LIX1L 蛋白質を標的とするペプチドによる *in vitro*、*in vivo* での抗腫瘍活性の評価、および LIX1L のシグナル経路の解明を行うことを目的とする。

以上の結果から、胃癌治療において LIX1L 蛋白質を発現する胃癌細胞特異的な分子標的治療薬の開発を目的としました。

3. 研究の方法

(1) 胃癌細胞株 (KATO-III、MKN45、OCUM-1、NUGC4) とヒト各種癌組織 (胃癌 n=540、膵臓癌 n=43、大腸癌 n=50、卵巣癌 n=50、腎細胞癌 n=58、乳癌 n=50、肺癌 n=64、肝細胞癌 n=47、食道癌 n=51、前立腺癌 n=53、甲状腺癌 n=50) における免疫組織染色と western blot による LIX1L 蛋白質の発現解析を行いました。

(2) siRNA を用いて LIX1L ノックダウンによる胃癌細胞株の増殖抑制効果の検討を行いました。

(3) LIX1L 蛋白質に対する相同性ペプチド (PY136) を用いた *in vitro* と *in vivo* における抗腫瘍効果の評価を行いました。

(4) LIX1L 蛋白質の癌細胞増殖促進メカニズムについてプロテオミクス解析を用いて行いました。

(5) 次世代シーケンサーを用いた LIX1L 蛋白質と結合する miRNA の同定とそれらの標的遺伝子の解析を行いました。

(6) プロテインキナーゼアッセイを用いた LIX1L 蛋白質の Tyr136 リン酸化キナーゼの同定を行いました。

4. 研究成果

LIX1L 蛋白質の各種癌組織における発現解析

様々な癌組織の大腸癌、肺癌、乳癌、甲状腺癌、食道癌、肝細胞癌、腎細胞癌、前立腺癌、膵臓癌、卵巣癌での LIX1L の発現を免疫

染色及び Western blot 法にて解析した。免疫染色では胃癌 (n=540) ; 61.9%, 膵臓癌 (n=43) ; 58.1%, 大腸癌 (n=50) ; 56%, 卵巣癌 (n=50) ; 52%, 腎細胞癌 (n=58) ; 50%, 乳癌 (n=50) ; 46%, 肺癌 (n=64) ; 45.3%, 肝細胞癌 (n=47) ; 38.3%, 食道癌 (n=51) ; 29.4%, 前立腺癌 (n=53) ; 24.5%, 甲状腺癌 (n=50) ; 24% で LIX1L の発現陽性が認められました (図 1)。また、Western blot 法においても各種癌組織における発現亢進が確認されました。

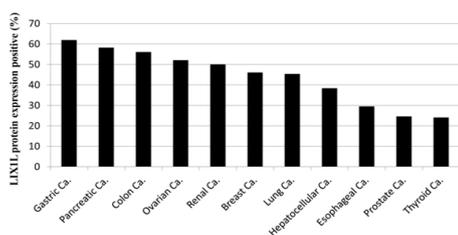


図 1

LIX1L ノックダウンによる胃癌細胞株増殖抑制効果

SiRNA を用いて LIX1L 遺伝子をノックダウンすると、胃癌細胞株 KATO-III、OCUM-1、MKN45 細胞は細胞増殖の抑制が認められ、LIX1L の発現がほとんどない NUGC-4 細胞では LIX1L 発現抑制による細胞増殖抑制効果は認められませんでした。

LIX1L 特異的ペプチド PY136 による in vitro と in vivo における胃癌細胞の増殖に与える影響

LIX1L 蛋白質の機能は不明であるが、アミノ酸配列などから機能の推測を行い、リン酸化の確率の高い 136 番目のチロシン (136Tyr) を同定し、136Tyr を含むアミノ酸配列に対しての相同性ペプチド PY136 と 136Tyr を含まないランダムに LIX1L アミノ酸配列に対しての相同配列のペプチド (連続するアミノ酸 10 個) を 20 種類合成し、胃癌細胞株の培養液中に添加し、癌細胞の増殖に与える影響を評価したところ、LIX1L 蛋白質を発現する KATO-III、OCUM-1、MKN45 細胞 (図 2) においてペプチドの濃度依存的に増殖抑制効果が認められました。その他の相同性ペプチド

では細胞増殖に変化は認められませんでした。一方、LIX1L 遺伝子を発現していない NUGC-4 細胞株では PY136 の細胞増殖抑制効果は認められませんでした。In vivo において、胃癌細胞株 MKN45 細胞を NOD/SCID ノドマウスに移植することにより担癌マウスを作成し、PY136 を腫瘍部位に直接投与することにより、DMSO のみの対照群 (n=3) と比較して有意に腫瘍形成を抑制しました (図 3)。

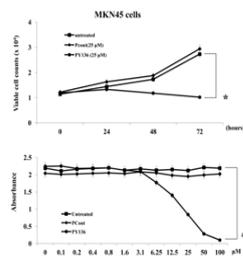


図 2

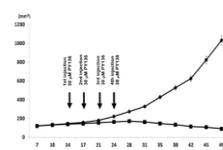


図 3

癌細胞における LIX1L 蛋白質の癌細胞増殖促進機序のメカニズムの解析

LIX1L 蛋白質のアミノ酸配列からシュミレーションにて予想リン酸化サイト (セリン、スレオニン、チロシン) を検索するとセリンでは 11 か所、スレオニンでは 3 か所、チロシンでは 2 か所のリン酸化候補部位を見出しました。各リン酸化抗体でウェスタンブロットを行い、チロシンのみにリン酸化が認められることが明らかとなりました。また、136Tyr の変異体を作成することにより 136Tyr が特異的にリン酸化されることが明らかになりました。興味深いことに、136Tyr は dsRNA 結合ドメインに含まれることから、RNA 結合を介して癌細胞増殖に関与している可能性が示されました。そこで、HEK293 細胞株に LIX1L を定常状態で安定発現する HEK293-FLG-LIX1L 細胞株を作成し、癌細胞増殖機構において LIX1L が RNA 結合を介してどのような蛋白質と関連しているのかを検討しました。FLAG を融合させた LIX1L 蛋白質を抗 FLAG 抗体で免疫沈降 (RIP アッセイ) 後、Western blot を行うことにより、核分画では Nucleolin、DHX9、hnRNPL と細胞質分画では

が結合するRNAを次世代シーケンサーにて解析した結果、8種類のmiRNAが同定され、それらの標的RNAも同時に同定することができました。これらのmiRNAやRNAは癌細胞増殖に働くことが報告されており、癌細胞増殖シグナル経路においてLIX1Lが重要な役割を担っていることが明らかとなりました。

(5) LIX1L蛋白質に対する相同性ペプチドPY136は136番目のチロシンを含む10アミノ酸であり、PY136を癌細胞に添加することによりLIX1Lのリン酸化が抑制され(PY136がデコイとして働くことにより)、癌細胞増殖が抑制されることが示されました。

以上の結果から、様々な腫瘍細胞において高発現するLIX1L蛋白質に機能を抑制するPY136は幅広い癌種に対する分子標的治療薬としての可能性があると考えられました。また、LIX1Lの癌細胞増殖シグナル経路に関与するキナーゼやmiRNA、RNA等を標的とする新規分子標的治療薬の開発に発展させることができるのではないかと考えられます。

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9件)

- ① Nakamura S, Kahyo T, Tao H, Shibata K, Kurabe N, Yamada H, Shinmura K, Ohnishi K, Sugimura H. Novel roles for LIX1L in promoting cancer cell proliferation through ROS1-mediated LIX1L phosphorylation. *Sci Rep*. 2015, 5:13474. 査読有
DOI: 10.1038/srep13474.
- ② Shinmura K, Kato H, Kawanishi Y, Goto M, Tao H, Inoue Y, Nakamura S, Sugimura H. NEIL1 p.Gln282Stop variant is predominantly localized in the cytoplasm and exhibits reduced activity in suppressing mutations. *Gene*. 2015, 571(1):33-42. 査読有
DOI: 10.1016/j.gene.2015.06.043.
- ③ Shinmura K, Kato H, Igarashi H, Inoue Y, Nakamura S, Du C, Kurachi K, Nakamura T, Ogawa H, Tanahashi M, Niwa H, Sugimura H. CD44-SLC1A2 fusion transcripts in primary colorectal cancer. *Pathol Oncol Res*. 2015, 21(3):759-64. 査読有
DOI: 10.1007/s12253-014-9887-2.

- ④ Shinmura K, Kato H, Matsuura S, Inoue Y, Igarashi H, Nagura K, Nakamura S, Maruyama K, Tajima M, Funai K, Ogawa H, Tanahashi M, Niwa H, Sugimura H. A novel somatic FGFR3 mutation in primary lung cancer. *Oncol Rep*. 2014, 31(3):1219-24. 査読有
DOI: 10.3892/or.2014.2984.
- ⑤ Shinmura K, Kiyose S, Nagura K, Igarashi H, Inoue Y, Nakamura S, Maeda M, Baba M, Konno H, Sugimura H. TNK2 gene amplification is a novel predictor of a poor prognosis in patients with gastric cancer. *J Surg Oncol*. 2014, 109(3):189-97. 査読有
DOI: 10.1002/jso.23482.
- ⑥ Shinmura K, Igarashi H, Kato H, Kawanishi Y, Inoue Y, Nakamura S, Ogawa H, Yamashita T, Kawase A, Funai K, Sugimura H. CLCA2 as a novel immunohistochemical marker for differential diagnosis of squamous cell carcinoma from adenocarcinoma of the lung. *Dis Markers*. 2014;2014:619273. 査読有
DOI: 10.1155/2014/619273.
- ⑦ Shinmura K, Kahyo T, Kato H, Igarashi H, Matsuura S, Nakamura S, Kurachi K, Nakamura T, Ogawa H, Funai K, Tanahashi M, Niwa H, Sugimura H. RSPO fusion transcripts in colorectal cancer in Japanese population. *Mol Biol Rep*. 2014 Aug;41(8):5375-84. 査読有
DOI: 10.1007/s11033-014-3409-x.
- ⑧ Shinmura K, Goto M, Tao H, Kato H, Suzuki R, Nakamura S, Matsuda T, Yin G, Morita M, Kono S, Sugimura H. Impaired 8-hydroxyguanine repair activity of MUTYH variant p.Arg109Trp found in a Japanese patient with early-onset colorectal cancer. *Oxid Med Cell Longev*. 2014;2014:617351. 査読有
DOI: 10.1155/2014/617351.
- ⑨ Nakamura S, Tan L, Nagata Y, Takemura T, Asahina A, Yokota D, Yagyu T, Shibata K, Fujisawa S, Ohnishi K. MjC-domain containing histone demethylase 1B-mediated p15(Ink4b) suppression promotes the proliferation of leukemic progenitor cells through modulation of cell cycle progression in acute myeloid leukemia. *Mol Carcinog*. 2013, 52(1):57-69. 査読有
DOI: 10.1002/mc.20878.

[学会発表] (計12件)

- ① 中村 悟己、腫瘍新規発現蛋白質を標的としたペプチド抗腫瘍薬、BioJapan2015、2015年10月14-16日、横浜
- ② 中村 悟己、腫瘍新規発現蛋白質を標的としたペプチド抗腫瘍薬、イノベーションジャパン、2015年8月27-28日、東京
- ③ 中村 悟己、がんの創薬標的としてのL

I X 1 Lおよびそのリン酸化阻害剤、D S A N J 疾患別商談会 (がん領域)、2 0 1 5 年 1 月 2 9 日、大阪

- ④ Satoki Nakamura, Lin Tan, Yasuyuki Nagata, Aya Asahina, Tomohiro Yagyū, Daisuke Yokota, Isao Hirano, Shinya Fujisawa, Haruhiko Sugimura, Kazunori Ohnishi. The FOXM1 transcriptional factor promotes the leukemia cell proliferation through modulation of cell cycle progression. 第5回 JSH 国際シンポジウム、2014年5月24日、浜松
- ⑤ Lin Tan, Satoki Nakamura, Yasuyuki Nagata, Aya Asahina, Tomohiro Yagyū, Daisuke Yokota, Isao Hirano, Shinya Fujisawa, Haruhiko Sugimura, Kazunori Ohnishi. Inhibition of JHDM1B expression suppresses the proliferation of leukemia cells through the cell cycle arrest. 第5回 JSH 国際シンポジウム 2014年5月24日 浜松
- ⑥ 山下 光司、牧田 礼子、藤江 三千男、中村 悟己、押川 達夫、山下 純子、平川 和貴、戸田 三津夫、田中 康隆、梶村 春彦、IER5/Cdc25B をターゲットとする新規な低分子量リン糖抗腫瘍剤：複素環化合物又は糖の化学修飾による調製及び前臨床評価、化学療法基盤支援活動 第3回シンポジウム 2014年5月11日；沖縄
- ⑦ 中村 悟己、腫瘍新規発現蛋白質を標的としたペプチド抗腫瘍薬、BioJAPAN2014、2014年10月15日～17日、横浜
- ⑧ 中村 悟己、新村 和也、梶村 春彦、胃癌細胞における LIX1L 蛋白質を標的とした阻害剤の開発、第72回日本癌学会学術総会、2013年10月5日、横浜
- ⑨ 中村 悟己、梶村 春彦、新規合成リン糖誘導体 TMPP の標的分子とその抗腫瘍効果のメカニズム、第17回日本がん分子標的治療学会学術集会 2013年6月14日、京都
- ⑩ 中村 悟己、腫瘍新規発現蛋白質を標的としたペプチド抗腫瘍薬、BioJapan2013、2013年10月9-11日、横浜
- ⑪ 中村 悟己、腫瘍新規発現蛋白質を標的としたペプチド抗腫瘍薬、JST 新技術説明会中部地区医療・バイオ系シーズ発表会、2013年12月12日、名古屋
- ⑫ 中村 悟己、がんの創薬標的としての L I X 1 L およびそのリン酸化阻害剤、D S A N J 疾患別商談会 (がん領域)、2 0 1 4 年 1 月 3 0 日、大阪

〔産業財産権〕

○出願状況 (計4件)

(1) 名称：LIX1L 高発現腫瘍細胞の増殖阻害方法、及び腫瘍細胞増殖抑制ペプチド

発明者：中村悟己、梶村春彦

権利者：浜松医科大学

種類：特許 (基礎出願)

番号：特願 2 0 1 3 - 0 8 2 2 7 2

出願年月日：平成 2 5 年 4 月 1 0 日

国内外の別：国内

(2) 名称：LIX1L 高発現腫瘍細胞の増殖阻害方法、及び腫瘍細胞増殖抑制ペプチド

発明者：中村悟己、梶村春彦

権利者：浜松医科大学

種類：特許 (優先権出願)

番号：特願 2 0 1 3 - 1 7 3 6 9 6

出願年月日：平成 2 5 年 8 月 2 3 日

国内外の別：国内

(3) 名称：Method for Inhibiting Proliferation of High Lix1L-Expressing Tumor cell, and Tumor Cell Proliferation-Inhibiting Peptide

発明者：Satoki Nakamura、Haruhiko Sugimura

権利者：National University Corporation Hamamatsu University School of Medicine

種類：Patent

番号：14/783,050

出願年月日：2014年4月2日

国内外の別：国外 (米国)

(4) 名称：Method for Inhibiting Proliferation of High Lix1L-Expressing Tumor cell, and Tumor Cell Proliferation-Inhibiting Peptide

発明者：Satoki Nakamura、Haruhiko Sugimura

権利者：National University Corporation Hamamatsu University School of Medicine

種類：Patent

番号：14782500.4

出願年月日：2014年4月2日

国内外の別：国外 (欧州)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 悟己 (NAKAMURA Satoki)

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：20377740

(2) 研究分担者

柴田 清 (SHIBATA Kiyoshi)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術専門員

研究者番号：90397372

(3) 研究分担者

藤江 三千男 (FUJIE Michio)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術補佐員

研究者番号：90397373