

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32660
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2014～2016
課題番号：26460310
研究課題名(和文) ネクロシスとアポトーシスを制御する因子を標的とした抗がん剤開発のための基礎研究

研究課題名(英文) Research on anticancer drug target that regulate two types of cell death, necrosis and apoptosis

研究代表者
佐藤 聡 (Sato, Akira)
東京理科大学・薬学部薬学科・講師

研究者番号：40530663
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、がん細胞のネクロシスとアポトーシスを制御する因子を同定して、その腫瘍生物学的な意義を明らかにすることで、がん分子標的として応用可能な因子を見出すことを目的としている。研究成果として、(1) プロテオミクス的手法を用いて、ネクロシスまたはアポトーシスを起こしている細胞から細胞外に漏出するタンパク質を明らかにした。(2) 細胞死モデル細胞の全エクソンシーケンス解析を行い、ネクロシスとアポトーシスの細胞死切替えに關与する変異遺伝子を同定した。(3) これまでの研究から見出している細胞死制御因子について、抗がん標的としての有効性を検証し、有望なマイクロRNAを見出した。

研究成果の概要(英文)：We aimed to find and characterize anticancer target(s) in regulators of cell death-mode, necrosis or apoptosis, by genomic and proteomic approach. (1) Extracellular leaked proteins in necrosis or apoptosis were detected by proteomic approach; (2) Gene mutations related cell-death switching were found by whole exon sequencing; (3) We investigated the anticancer effectiveness for the previously reported cell-death regulators, and identified a possible anticancer microRNA.

研究分野：細胞死制御

キーワード：ネクロシス アポトーシス マイクロRNA 細胞死制御因子 プロテオミクス 全エクソンシーケンス
がん分子標的 核酸化学

1. 研究開始当初の背景

細胞死の研究はがんを理解するうえで極めて重要である。細胞死はその形態学的特徴からネクローシスとアポトーシスの二つに大別される。アポトーシスを起こした細胞は縮小し、アポトーシス小体と呼ばれる細胞断片を形成する。その後、生体内で貪食細胞によって取り除かれる。がん細胞がアポトーシスを起こした場合にはがんの消失、あるいは減退がおこる。このようにアポトーシスを誘導することが多くの抗がん剤の作用機構となっている。一方、ネクローシスは以前から壊死と呼ばれており、細胞が膨張し、最終的に細胞内容物が細胞外に漏出することで周辺細胞(組織)に炎症を起こす。これは抗がん剤、放射線によるがん治療において副作用として認識されている。また、腫瘍内に存在する微小環境における壊死部位は抗がん剤、放射線による治療に対して抵抗性であり、腫瘍組織からの出血、浮腫の原因となるため、ネクローシスの制御は臨床においても不可避の課題となっている。

以前から申請者はマウス乳がん由来 FM3A 細胞に抗がん剤 5-fluorouracil のデオキシリボース体である FUdR が誘導する細胞死の分子機構の解析を行ってきた。FM3A 細胞に FUdR を作用させるとネクローシスを起こすが、継代培養を続けていたところ FUdR を作用させるとアポトーシスを起こす形質の異なる細胞が出現したためクローニングを行い、ネクローシスを起こす F28-7 株からアポトーシスを起こす F28-7-A 株を樹立した。アポトーシスは細胞死に伴う DNA のヌクレオソーム単位の断片化の出現、アポトーシス小体の形成、ミトコンドリアからの cytochrome c の放出などにより特徴付けられる。F28-7 株では FUdR 作用後ネクローシスに特徴的な細胞の膨張が見られ、F28-7-A 株ではアポトーシス小体が観察された。また、FUdR を作用させた F28-7-A 株ではアポトーシスに特有の DNA の断片化が検出できた。以上より、F28-7 株はネクローシスを、F28-7-A 株はアポトーシスを起こしていることが確認できる。このように人為的に遺伝子を導入していない状態で、一つの細胞株からアポトーシス及びネクローシスを起こす細胞株を樹立している例は他にない。これら細胞株を樹立したことで、細胞がネクローシスを起こすか、アポトーシスを起こすかを決定付ける因子の探索が可能となった。そこで細胞死を決定付ける候補因子の同定を目的として mRNA、タンパク質レベルの発現量を網羅的にトランスクリプトームとプロテオーム解析を行い調べた。その結果、候補因子として、ネクローシスを起こす細胞で発現量の多い核膜タンパク質である lamin-B1、細胞骨格タンパク質である cytokeratin-19、転写因子の ATF3 を同定した (Sato *et al. Genomics* 2008; Sato *et al. J Proteome Res* 2010)。得られた候補因子は、siRNA を用いてノックダウンし、FUdR が誘

導する細胞死の形態変化を調べた。lamin-B1、cytokeratin-19、ATF3 をそれぞれノックダウンすると、本来ネクローシスを起こす細胞が FUdR を作用させることによってアポトーシスに特徴的な形態変化を示すことから、これらタンパク質が細胞死の形態を決める因子であることを明らかにしている (Sato *et al. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2008; Sato *et al. Genomics* 2008; Sato *et al. J Proteome Res* 2010; Sato *et al. FEBS J* 2014)。

申請者は翻訳阻害や mRNA の分解を介して遺伝子発現制御に関与する microRNA (miRNA) に着目し、miRNA 発現アレイを用いて、ネクローシスを起こす細胞とアポトーシスを起こす細胞で発現量の異なる miRNA を見出している。これら miRNA について、miRNA inhibitor 及び miRNA mimic (合成 miRNA) を用いて、細胞死の表現型におけるその役割を検討した。その結果、アポトーシスを起こす細胞で発現量の多い miRNA について、ネクローシスを起こす細胞に miRNA mimic を導入し過剰発現させると、本来ネクローシスを起こす細胞が FUdR を作用させることによってアポトーシスに特徴的な形態変化を示すことを明らかにしている (Sato *et al. PLOS ONE* 2016)。

2. 研究の目的

本研究は、がん細胞のネクローシスとアポトーシスを制御する因子を特定し、その腫瘍生物学的な意義を明らかにすることで、がん治療標的として応用可能な因子を見出すことを目的としている。

3. 研究の方法

本研究課題では以下の手法を用いて研究を実施した。

- (1) ショットガンプロテオミクスの手法を用いて、細胞死モデル細胞 (FM3A 細胞 F28-7 細胞及び F28-7-A 細胞) において、ネクローシスまたは、アポトーシスを起こしている細胞から培地中に漏出されるタンパク質を調べた。また、同定したネクローシスまたは、アポトーシス細胞から特徴的に漏出するタンパク質について、ネクローシスとアポトーシスの細胞死制御における役割を解析した。
- (2) これまでの研究から見出している細胞死制御因子 (lamin-B1、cytokeratin-19、ATF3、microRNAs) について、各種データベースを用いて組織、がん種による発現有無、発現レベル、その機能などを調査して、がん治療標的としての有用性を評価した。また、細胞死制御因子に特異的な siRNA、miRNA mimic、miRNA inhibitor を用いて種々のヒトがん細胞に対する抗がん効果を評価した。
- (3) 細胞死モデル細胞 (FM3A 細胞 F28-7 細胞及び F28-7-A 細胞) の全エクソンシー

クエン酸解析を行い、ネクローシスとアポトーシスの細胞死切替えに關与する遺伝子の変異有無について解析した。また、これまでの研究から見出している細胞死制御因子(lamin-B1, cytokeratin-19, ATF3, HSP90) の変異有無についても詳細に調べた。

- (4) ネクローシスとアポトーシスの細胞死制御性 miRNAs について、データベースを利用して、見出した miRNA とその標的 RNA の結合を阻害する低分子化合物の探索を行った。また、miRNA と標的 RNA の結合を評価可能なスクリーニングシステムを構築して、miRNA-mRNA 結合阻害候補化合物の評価を行った。

4. 研究成果

本研究課題において、以下の研究成果を得た。

- (1) 細胞死モデル細胞 (FM3A 細胞 F28-7 細胞及び F28-7-A 細胞) において、ネクローシスを起こしている細胞または、アポトーシスを起こしている細胞から培地中に漏出する特徴的なタンパク質を明らかにした。また、これらタンパク質について、ネクローシスまたはアポトーシスの細胞死の表現型に与える影響を種々のヒトがん細胞株を用いて評価したところ、ネクローシス細胞から漏出するタンパク質を作用させるとネクローシス様の細胞死を起こすヒトがん細胞株があることを明らかにした。
- (2) これまでの研究から見出している細胞死制御因子(lamin-B1, cytokeratin-19, ATF3, microRNAs) について、siRNA, miRNA mimic, miRNA inhibitor を用いて種々のヒトがん細胞に対する抗がん効果を調べた結果、ネクローシスとアポトーシスの細胞死切替えに關与する miRNA に抗がん治療標的としての可能性を見出した。今後は、miRNA と標的 mRNA の結合評価スクリーニング系を用いて、該 miRNA と標的の RNA の結合を制御可能な低分子化合物の探索を進めたい。
- (3) 細胞死モデル細胞 (FM3A 細胞 F28-7 細胞及び F28-7-A 細胞) の全エクソシーケンズ解析の結果、ネクローシスとアポトーシスの細胞死制御に關与すると考えられる複数の遺伝子に特徴的な変異を見出した。今後、本研究から見出した変異遺伝子について、ネクローシスとアポトーシスの細胞死制御における役割を精査したい。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Hisamatsu Y., Suzuki N., Masum A.-A., Shibuya A., Abe R., **Sato A.**, Tanuma S., Aoki S. Cationic amphiphilic tris-cyclometalated iridium(III) complexes induce cancer cell death via interaction with

Ca²⁺-calmodulin complex. *Bioconjugate Chemistry*, 28(2), 507-523, 2017. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00627. **査読有**

2. Shindo M., **Sato A.**, Yamamoto Y., Arai T., Akasaki Y., Ichimura K., Tanuma S. Establishing a screening system for new O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase inhibitors to develop combination chemotherapy for temozolomide-resistant glioblastoma. *Tokyo Jikeikai Medical Journal*, 131(5), 141-147, 2016. **査読有**
3. **Sato A.**, Omi T., Yamamoto A., Satake A., Hiramoto A., Masutani M., Tanuma S., Wataya Y., Kim H.-S. MicroRNA-351 regulates two-types of cell death, necrosis and apoptosis, induced by 5-fluoro-2'-deoxyuridine. *PLOS ONE*, 11(4): e0153130, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0153130. **査読有**
4. Tanuma S., **Sato A.**, Oyama T., Yoshimori A., Abe H., Uchiyama F. New Insights into the Roles of NAD⁺-Poly(ADP-ribose) Metabolism and Poly(ADP-ribose) Glycohydrolase. *Current Protein & Peptide Science*, 17(7), 668-682, 2016. **査読有**
5. Fujimori H., **Sato A.**, Kikuhara S., Junhui W., Hirai T., Sasaki Y., Murakami Y., Okayasu R., Masutani M. A comprehensive analysis of radiosensitization targets; functional inhibition of DNA methyltransferase 3B radiosensitizes by disrupting DNA damage responses. *Scientific Reports*, 5, 18231, 2015. doi: 10.1038/srep18231. **査読有**
6. Sakagami H., Shimada C., Kanda Y., Amano O., Sugimoto M., Ota S., Soga T., Tomita M., **Sato A.**, Tanuma S., Takao K., Sugita Y. Effects of 3-styrylchromones on metabolic profiles and cell death in oral squamous cell carcinoma cells. *Toxicology Reports*, 2, 1281-1290, 2015. doi:10.1016/j.toxrep.2015.09.009. **査読有**
7. **Sato A.**, Itoh T., Imamichi S., Kikuhara S., Fujimori H., Hirai T., Saito S., Sakurai Y., Tanaka H., Nakamura H., Suzuki M., Murakami Y., Baiseitov D., Berikkhanova K., Zhumadilov Z., Imahori Y., Itami J., Ono K., Masunaga S., Masutani M. Proteomic analysis of cellular response induced by boron neutron capture reaction in human squamous cell carcinoma SAS cells. *Applied Radiation and Isotopes*, 106, 113-219, 2015. doi: 10.1016/j.apradiso.2015.08.001. **査読有**

[学会発表] (計 21 件)

1. **佐藤 聡**, 金 恵淑, 益谷美都子, 綿矢有佑, 田沼靖一. ネクローシスとアポトーシスの切替え制御機構の解析. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24 日-27 日, 仙台国際センター・東北大学川内地区, 宮

- 城・仙台。
2. 新藤実香, **佐藤 聡**, 小林杏輔, 山本洋平, 荒井隆雄, 赤崎安晴, 市村幸一, 田沼靖一. 神経膠腫に有効な HMGB1/RAGE 相互作用を標的とする新規制がん剤の創製. 日本薬学会第 137 年会, 2017 年 3 月 24 日-27 日, 仙台国際センター・東北大学川内地区, 宮城・仙台.
 3. 荒井隆雄, 新藤実香, **佐藤 聡**, 山本洋平, 赤崎安晴, 市村幸一, 田沼靖一. テモゾロミド耐性神経膠芽腫に対して有効な新規がん併用化学療法開発のための基盤研究. 第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会, 2016 年 12 月 4-6 日, 甲府富士屋ホテル, 山梨・甲府.
 4. 葛城肅貴, **佐藤 聡**, 荻野暢子, 柴崎由梨, 高井祐輔, 吉森篤史, 大山貴央, 阿部英明, 田沼靖一. NAD⁺ 生合成経路の key enzyme である NAMPT/NmPRT を標的とした新規制がん剤の創製研究. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日, パシフィコ横浜, 神奈川・横浜.
 5. 荻野暢子, **佐藤 聡**, 葛城肅貴, 柴崎由梨, 高井祐輔, 吉森篤史, 大山貴央, 阿部英明, 田沼靖一. Nicotinamide phosphoribosyltransferase 阻害剤に対する薬剤耐性メカニズムの解析. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日, パシフィコ横浜, 神奈川・横浜.
 6. **Akira Sato**, Shoji Imamichi, Hiroaki Fujimori, Mitsuko Masutani, Sei-ichi Tanuma. Analysis of cancer cell-death markers for necrosis and apoptosis. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association(第 75 回日本癌学会学術総会), 2016 年 10 月 6-8 日, パシフィコ横浜, 神奈川・横浜.
 7. Yoko Ogino, **Akira Sato**, Kiyotaka Katsuragi, Takahiro Oyama, Hideaki Abe, Sei-ichi Tanuma. Establishment of an NmPRT/NAMPT inhibitor-resistant human cancer cell line and its tumor biological characteristics. The 75th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association(第 75 回日本癌学会学術総会), 2016 年 10 月 6-8 日, パシフィコ横浜, 神奈川・横浜.
 8. **佐藤 聡**, 金 恵淑, 益谷美都子, 綿矢有佑, 田沼靖一. ネクローシスとアポトーシスの細胞死選択における microRNA351 の役割. 第 89 回日本生化学会大会, 2016 年 9 月 25-27 日, 仙台国際センター, 宮城・仙台.
 9. **佐藤 聡**. がん細胞のネクローシス/アポトーシス切替制御機構の解明と新規制がん戦略. 第 60 回日本薬学会関東支部大会, 2016 年 9 月 17 日, 東京大学本郷キャンパス山上会館, 東京・文京区.
 10. 荻野暢子, **佐藤 聡**, 田沼靖一. Nicotinamide phosphoribosyltransferase 阻害剤耐性ヒトがん細胞株の樹立と腫瘍生物学的特徴. 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2016 年 5 月 30 日-6 月 1 日, 別府国際コンベンションセンター, 大分・別府.
 11. **佐藤 聡**, 金 恵淑, 綿矢有佑, 益谷美都子, 田沼靖一. ネクローシスとアポトーシスの細胞死マーカーの探索. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜, 神奈川・横浜.
 12. 荻野暢子, **佐藤 聡**, 葛城肅貴, 柴崎由梨, 高井祐輔, 吉森篤史, 大山貴央, 阿部英明, 田沼靖一. Nicotinamide phosphoribosyltransferase 阻害剤に対する耐性がん細胞の樹立とその特性. 日本薬学会第 136 年会, 2016 年 3 月 26-29 日, パシフィコ横浜, 神奈川・横浜.
 13. 荻野暢子, 葛城肅貴, 柴崎由梨, 吉森篤史, 大山貴央, 阿部英明, **佐藤 聡**, 田沼靖一. Nicotinamide phosphoribosyltransferase を標的とする新規制がん剤の創製. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会)2015 年 12 月 1-4 日, 神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル, 神戸国際会議場, 神戸国際展示場, 神戸商工会議所), 兵庫・神戸.
 14. **佐藤 聡**, 荻野暢子, 柴崎由梨, 葛城肅貴, 吉森篤史, 大山貴央, 阿部英明, 田沼靖一. Nicotinamide phosphoribosyltransferase を標的とした新規抗腫瘍薬開発のための基礎的研究. BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会, 第 88 回日本生化学会大会合同大会)2015 年 12 月 1-4 日, 神戸ポートアイランド (神戸ポートピアホテル, 神戸国際会議場, 神戸国際展示場, 神戸商工会議所), 兵庫・神戸.
 15. 坂上 宏, 杉本昌弘, **佐藤 聡**, 田沼靖一, 高尾浩一, 杉田義昭. (E)-3-(4-Hydroxystyryl)-6-methoxy-4H-chromen-4-one のヒト口腔扁平上皮癌細胞に対する腫瘍選択性および誘導される細胞死の解析. 第 133 回日本薬理学会関東支部会, 2015 年 10 月 10 日, 柏の葉カンファレンスセンター, 千葉・柏.
 16. **Akira Sato**, Shoji Imamichi, Sota Kikuhara, Hiroaki Fujimori, Takahisa Hirai, Yasufumi Murakami, Sei-ichi Tanuma, Koji Ono, Shinichiro Masunaga, Mitsuko Masutani. Molecular mechanisms of the cell-death induced by boron neutron capture reaction (BNCR) in human squamous cancer cells. The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (第 74 回日本癌学会学術総会), 2015 年 10 月 8-10 日, 名古屋国際会議場, 愛知・名古屋.
 17. **佐藤 聡**, 大見拓也, 山本朗央, 金 恵淑, 益谷美都子, 田沼靖一, 綿矢有佑. ネクローシスとアポトーシスを制御する MicroRNA の探索研究. 日本薬学会第 135

年会, 2015年3月25-28日, 神戸学院大学, 兵庫医療大学, 神戸サンボホール, デザイン・クリエイティブセンター神戸, 兵庫・神戸.

18. **佐藤 聡**, 大見拓也, 山本朗央, 金 惠淑, 田沼 靖一, 綿矢 有佑. ネクローシスとアポトーシスの細胞死制御機構の解析. 第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月25-27日, パシフィコ横浜, 神奈川・横浜.
19. 今道祥二, 伊藤 祐, **佐藤 聡**, 菊原颯太, 藤森浩彰, 平井崇久, 新井康仁, 今堀良夫, 伊丹 純, 村上康文, 小野公二, 増永慎一郎, 益谷美都子. BNCTに対する口腔がん及び悪性黒色種細胞株の応答性の検討. 第73回日本癌学会学術総会, 2014年9月25-27日, パシフィコ横浜, 神奈川・横浜.
20. 今道祥二, **佐藤 聡**, 伊藤 祐, 菊原颯太, 藤森浩彰, 平井崇久, 今堀良夫, 伊丹 純, 村上康文, 小野公二, 櫻井良憲, 田中浩基, 増永慎一郎, 益谷美都子. BNCTに対するがん細胞応答の網羅的遺伝子発現解析及びプロテオーム解析. 第11回日本中性子捕捉療法学会学術大会, 2014年7月5-6日, 大阪大学(吹田キャンパス)コンベンションセンター, 大阪・大阪.
21. **Akira Sato**, Tasuku Itoh, Hiroaki Fujimori, Takahisa Hirai, Soichiro Saito, Yasuhito Arai, Yasufumi Murakami, Yoshio Imahori, Jun Itami, Hiroyuki Nakamura, Minoru Suzuki, Koji Ono, Shinichiro Masunaga, Mitsuko Masutani. Analysis of cell-death response and DAMPs after boron neutron capture reaction in human cancer cells. 16th International Congress on Neutron Capture Therapy, June 14-19, 2014, Helsinki, Finland.

〔図書〕(計 1 件)

1. Junhui Wang, **Akira Sato**, Hiroaki Fujimori, Yoshio Miki and Mitsuko Masutani. Chapter 5, PARP and Carcinogenesis; "PARP Inhibitors for Cancer Therapy" N. J. Curtin, R. A. Sharma (eds.) Cancer Drug Discovery and Development 83, Springer International Publishing Switzerland 2015, 99-124, 2015.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rs.tus.ac.jp/tanumalabhp/>

<https://www.tus.ac.jp/ridai/doc/ji/RIJIA01Detail.php?act=pos&kin=ken&diu=69fe>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 聡 (SATO, Akira)

東京理科大学・薬学部薬学科・講師

研究者番号: 40530663