

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830120

研究課題名(和文)新規ゴルジ阻害剤M-COPA誘導性の細胞死に関する小胞体ストレス分子機序の解明

研究課題名(英文) Study of ER stress mechanism which involved in cell death induced by a novel Golgi inhibitor M-COPA

研究代表者

赤塚 明宣 (Akatsuka, Akinobu)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・研究員

研究者番号：30649364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は新規の抗がん物質M-COPAについて、独自の薬剤データベースを用い、ゴルジ体阻害剤BFAと類似した作用を示すと予測した。BFAは細胞に小胞体(ER)ストレスを起こす。M-COPAも同様に、培養がん細胞に対してERストレスを誘導した。担がんマウスを用いた実験では、M-COPAが良く効くヒト乳がん細胞株BSY-1に対し、M-COPAはERストレスを顕著に誘導した。さらに、M-COPAが効かないヒト結腸がん細胞株HT-29について、ERストレス抑制因子の発現を低下させると、M-COPA感受性となった。以上の結果から、M-COPAの抗がん作用にERストレス経路が関与することが示された。

研究成果の概要(英文)：We previously identified M-COPA as a novel antitumor compound that seemed to have similar biological activities to Brefeldin A (BFA), a prototypic Golgi inhibitor, by using our original drug database screening system. Like BFA, M-COPA disrupted the Golgi apparatus and finally suppressed tumor cell proliferation in vivo. However, we have not yet elucidated the mechanism by which M-COPA exerts antitumor effect. Since BFA was shown to induce ER stress, we examined the activation of ER stress signals after exposure to M-COPA in vitro. Expectedly, M-COPA upregulated ER stress in tumor cells. On the other hand, human breast cancer BSY-1 cells, a M-COPA sensitive cell line, showed intensive ER stress response in vivo. In addition, shRNA knockdown of a ER stress suppressor BiP on human colon adenocarcinoma HT-29 cells, a M-COPA resistant cell line, induced sensitization to M-COPA. These results suggested the involvement of ER stress signal in the in vivo antitumor activity of M-COPA.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：分子標的治療 ゴルジ体 小胞体ストレス 抗がん剤

1. 研究開始当初の背景

当研究室ではこれまでに、独自に構築した薬剤感受性データベース(文献1)を用い、ゴルジ阻害剤 Brefeldin A (BFA)と相溶性が高い薬剤として、新規低分子化合物 M-COPA を同定した。M-COPA は BFA と同様に、ゴルジ体を阻害する一方、強力な抗腫瘍活性を示した(文献2)。

本研究に先立ち我々は、BFA が小胞体(ER)ストレスを誘導することに着目し、M-COPA も BFA と同様に ER ストレスを引き起こすことを見出した。一方、*in vivo*における M-COPA の抗がん効果は細胞種選択的であったが、この選択性に関わる分子機構については明らかとなっていない。

そこで本研究では、ER ストレス経路に着目し、M-COPA がもたらす細胞死の誘導に関与する機構についての解明を目的とした。

<引用文献>

- 1, Yamori T et al., Cancer Res. 59:4042-4049, 1999.
- 2, Ohashi Y. et al., J. Biol. Chem. 287:3885-3897, 2012.

2. 研究の目的

ヒト細胞では、遺伝子変異などにより小胞体に異常なタンパク質が蓄積する(ER ストレスが生じる)と、Unfolded protein response (UPR)と呼ばれる応答が生じ、異常タンパク質の排除を介して、細胞生存が図られる。

一方で、過剰な ER ストレス下では、UPR は細胞死を誘発する。この「ER ストレスの解消による細胞生存」と、「過剰な ER ストレスによる細胞死」という異なる運命が、どのように決定されるかについては、不明な点が多い。

これまでに我々は、新規ゴルジ阻害剤 M-COPA が、特定の細胞株に対して顕著な細胞死を誘発すること、さらに、この細胞死が UPR 経路を介することを発見した。本研究は、M-COPA 誘導性の細胞死に関わる UPR 分子機序のさらなる解明を目的として、M-COPA 感受性株であるヒト乳がん細胞株 BSY-1、および、耐性株であるヒト結腸がん細胞株 HT-29 を用いて以下の研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1) PERK を中心とした ER ストレス関連分子の変動解析

UPR は IRE1 α 経路、PERK 経路、ATF6 経路からなる。我々はこれまでに、M-COPA による BSY-1 細胞死が、PERK に対する阻害剤との併用により、大幅に抑制されることを見出した。

そこで、M-COPA がもたらす UPR について、PERK を中心に検討するため、a) GeneChip やウェスタンブロット法による、*in vitro* での M-COPA 添加時における UPR シグナル変動の解析、b) ウェスタンブロットや免疫組織化学染色法による、マウスゼノグラフトモデルを用いた、*in vivo*における ER ストレス応答分子の発現解析、c) 遺伝子導入やノックダウンなどによる、UPR シグナル分子の変化が M-COPA 感受性に及ぼす影響の解析を行った。

(2) M-COPA 耐性細胞の作製と耐性機序の解明

M-COPA による抗がん作用機序を解明するため、M-COPA 感受性細胞である BSY-1 に対して M-COPA を継続的に暴露させることで M-COPA 耐性 BSY-1 細胞を得る。樹立した耐性株を親株と比較することによって、M-COPA 感受性に寄与する分子メカニズムの同定を目指す。

4. 研究の成果

(1) PERK を中心とした ER ストレス関連分子の変動解析

(a) in vitro での解析

M-COPA 感受性株である BSY-1、および、耐性株である HT-29 細胞に対して in vitro で M-COPA を添加した後、ウェスタンブロット法で ER ストレス関連分子について解析した。その結果、どちらの細胞でも ER ストレスセンサー分子である PERK や IRE1 α について、時間・濃度依存的にリン酸化が誘導され、M-COPA が ER ストレスを誘導する事が示された(図 1)。

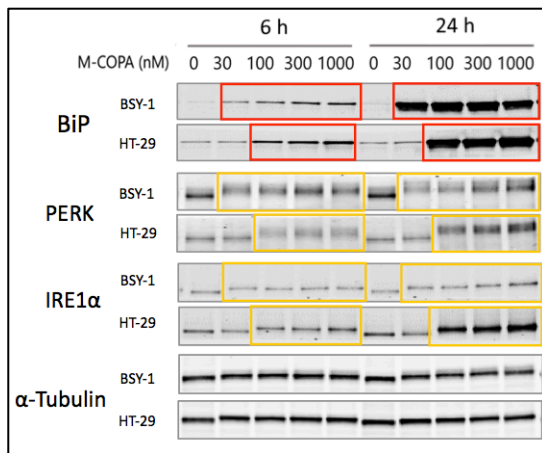


図 1 M-COPA による ER ストレス誘導 (in vitro) 赤四角が発現の上昇、黄四角がリン酸化の上昇を示す。

また、M-COPA が誘導する遺伝子発現変動を GeneChip で解析し、パスウェイ解析したところ、最も関連性の高かったのは ER ストレス応答となった。この結果から、M-COPA が有する主たる生理活性は、ER ストレス応答であることが示唆された。

(b) in vivo での解析

一方、マウスゼノグラフトモデルを用いた試験では、BSY-1 では M-COPA の経口投与によって、ER ストレス経路下流に位置し、細胞死を誘導する PERK-CHOP シグナルが顕著に亢進したものの、HT-29 ではほとんど活性化は認

められなかった(図 2)。同様の結果は、腫瘍組織切片を用いた免疫染色法によっても確認された。

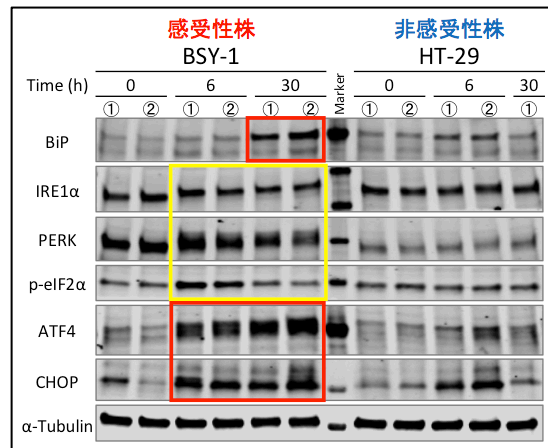


図 2 M-COPA による ER ストレス誘導 (in vivo) 赤四角が発現の上昇、黄四角がリン酸化の上昇を示す。

さらに、非感受性株 HT-29 に対してレンチウイルスを用いて ER ストレス抑制因子 BiP の shRNA を導入すると、in vivo で M-COPA に感受性化することを明らかにした(図 3)。

以上の結果より、in vitro だけでなく、in vivo においても、M-COPA の抗がん作用には ER ストレス経路が関与することが明らかとなった。

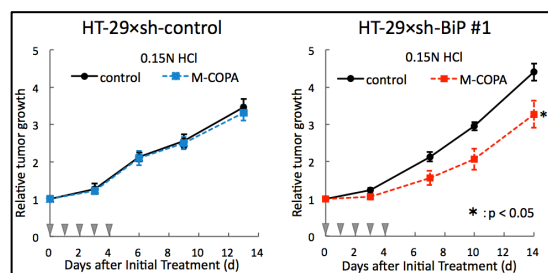


図 3 BiP shRNA 導入による M-COPA 感受性化 コントロール shRNA 導入 HT-29 (左) では M-COPA 投与時(青点線)に腫瘍の退縮が見られないが、BiP shRNA 導入 HT-29 (右) では、M-COPA 投与時(赤点線)に腫瘍の退縮が認められる。

(2) M-COPA 耐性細胞の作製と耐性機序の解明 BSY-1 ゼノグラフトを持つ担がんマウスに

対して M-COPA を投与すると、BSY-1 は一度退縮するが、一部の個体では 20 から 40 日後に再増殖が見られた。再増殖した BSY-1 に対して M-COPA を連続投与し、in vivo で M-COPA 耐性 BSY-1 を樹立した。

一方、in vitro で BSY-1 に対して M-COPA を反復投与することで、親株と比較して M-COPA に 100 倍以上の耐性を持つ BSY-1 の樹立に成功した。この in vitro で作製した M-COPA 耐性 BSY-1 について、全エクソンシーケンス解析を行い、親株と比較した結果、M-COPA の作用点であり、輸送小胞の出芽に関わる Guanine nucleotide exchange factor (GEF) の一つである GBF1 について、1 アミノ酸変異を見出した。変異がみられたアミノ酸は、GBF1 の GTPase 活性に重要な Sec7 ドメイン内に存在し、酵母からヒトまで高度に保存されたアミノ酸であった。また、このアミノ酸の変異は、Brefeldin A に対する耐性化を引き起こすことが報告されている。これらの知見から、GBF1 のアミノ酸変異が M-COPA に対する親和性の低下を引き起こし、耐性化の原因となることが考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① [Akatsuka A](#), Kojima N, Okamura M, Dan S, Yamori T. A novel thiophene-3-carboxamide analog of annonaceous acetogenin exhibits antitumor activity via inhibition of mitochondrial complex I. *Pharmacology Research & Perspectives* (in press)
- ② Ohashi Y, Okamura M, Hirosawa A, Tamaki N, [Akatsuka A](#), Wu KM, Choi HW, Yoshimatsu K, Shiina I, Yamori T,

Dan S. M-COPA, a Golgi disruptor, inhibits cell surface expression of MET protein and exhibits antitumor activity against MET-addicted gastric cancers. *Cancer Res.* 2016;76 (12) (Epub ahead of print)

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-2220

- ③ Kojima N, Suga Y, Matsumoto T, Tanaka T, [Akatsuka A](#), Yamori T, Dan S, Iwasaki H, Yamashita M. Synthesis of dansyl-labeled probe of thiophene analogue of annonaceous acetogenins for visualization of cell distribution and growth inhibitory activity toward human cancer cell lines. *Bioorg Med Chem.* 2015;23(6):1276-1283.

DOI: 10.1016/j.bmc.2015.01.037.

- ④ Kojima N, Fushimi T, Tatsukawa T, Tanaka T, Okamura M, [Akatsuka A](#), Yamori T, Dan S, Iwasaki H, Yamashita M. Thiophene-3-carboxamide analogue of annonaceous acetogenins as antitumor drug lead. *Eur J Med Chem.* 2014;86C:684-689.

DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.09.026.

[学会発表] (計 9 件)

- ① [赤塚明宣](#)、岡村睦美、大橋愛美、椎名勇、吉松賢太郎、矢守隆夫、旦慎吾. 新規ゴルジ阻害剤 M-COPA による In vivo 抗がん効果と POC 研究. 第 19 回 日本がん分子標的治療学会. 2015/6/10-12 (松山)
- ② [赤塚明宣](#)、岡村睦美、大橋愛美、椎名勇、吉松賢太郎、矢守隆夫、旦慎吾. 新規ゴルジ阻害剤 M-COPA の PD マーカーの同定. 第 74 回日本癌学会. 2015/10/8-10 (名古屋)

- ③大橋愛美、岡村睦美、玉城尚美、椎名勇、吉松賢太郎、赤塚明宣、矢守隆夫、且慎吾。新規ゴルジ阻害剤 M-COPA の MET 依存がんに対する抗がん効果。第 19 回 日本がん分子標的治療学会。2015/6/10-12 (松山)
- ④大橋愛美、岡村睦美、赤塚明宣、廣澤亜佐夏、椎名勇、吉松賢太郎、矢守隆夫、且慎吾。新規ゴルジ阻害剤 M-COPA の受容体チロシンキナーゼ依存がんへの抗がん効果。第 74 回日本癌学会。2015/10/8-10 (名古屋)
- ⑤樋口雄一、赤塚明宣、玉城尚美、廣澤亜佐夏、岡村睦美、大橋愛美、吉松賢太郎、椎名勇、矢守隆夫、且慎吾。GeneChip による新規ゴルジ阻害剤 M-COPA の誘導する抗がんメカニズム解析。第 74 回日本癌学会。2015/10/8-10 (名古屋)
- ⑥岡村睦美、赤塚明宣、大橋愛美、廣澤亜佐夏、椎名勇、吉松賢太郎、矢守隆夫、且慎吾。In vivo antitumor activity of M-COPA, a novel Golgi disruptor, and proof of concept study of Golgi dysfunction. 第 10 回 (2015 年) 日米がん合同会議 AACR-JCA Joint Conference. 2016/2/16-20 (アメリカ・ハワイ)
- ⑦赤塚明宣、岡村睦美、大橋愛美、廣澤亜佐夏、椎名勇、吉松賢太郎、矢守隆夫、且慎吾。新規ゴルジ阻害剤 M-COPA による in vivo 抗がん効果と POC 研究。第 73 回 日本癌学会。2014/9/25-27 (横浜)
- ⑧廣澤亜佐夏、赤塚明宣、大橋愛美、岡村睦美、椎名勇、吉松賢太郎、矢守隆夫、且慎吾。新規ゴルジ阻害剤 M-COPA の誘導する抗がん作用における PERK シグナルの関与。第 73 回 日本癌学会。2014/9/25-27 (横浜)
- ⑨大橋愛美、岡村睦美、廣澤亜佐夏、赤塚明宣、椎名勇、吉松賢太郎、矢守隆夫、且慎吾。新規ゴルジ阻害剤 M-COPA の MET 依存がんに対する抗がん効果。第 73 回 日本癌学会。2014/9/25-27 (横浜)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤塚明宣(AKATSUKA, Akinobu)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子薬理部・研究員

研究者番号：30649364