

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870527

研究課題名(和文)新規抗がん剤としてのリボヌクレアーゼの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of RNases as novel anti-cancer drugs

研究代表者

立田 岳生 (TATSUTA, Takeo)

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：70438563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：ウシガエル卵由来シアル酸結合性レクチン(SBL)は、レクチン活性とリボヌクレアーゼ活性を併せ持ち、さらに抗腫瘍効果を示すことが明らかになっている。今回、SBL および他の抗腫瘍性リボヌクレアーゼを作製し、それらのレセプター様分子の探索を行った。さらに悪性中皮腫細胞に対する抗腫瘍効果について解析を行った。

その結果、レセプター様分子候補としてアクチンが同定された。また、SBL は既存薬剤であるペメトレキセドなどと比較しより広範囲かつがん細胞選択的な抗腫瘍効果を示すことが明らかになり、さらに SBL とペメトレキセドの併用では相乗効果が得られ、SBL が新規抗がん剤になる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：A sialic acid-binding lectin derived from Bullfrog eggs (SBL) has both lectin and ribonuclease activity. It has been revealed that SBL demonstrates anti-tumor effect. In this time, we constructed recombinant proteins of SBL and other antitumor ribonucleases and performed cross-link experiments to identify their receptor-like molecules. Furthermore, we assessed anti-tumor effect of SBL against several malignant mesothelioma cell lines.

As a result, the actin has identified as the receptor-like molecule candidate. Furthermore, SBL exhibited more wide-ranging and cancer cell selective anti-tumor effect compared to existing drug such as pemetrexed. And also, combination treatment of SBL and pemetrexed showed synergistic anti-tumor effect. These results indicate that SBL could be a novel kind of anti-cancer drug.

研究分野：生物系薬学

キーワード：リボヌクレアーゼ レクチン 抗腫瘍作用

1. 研究開始当初の背景

本研究室で発見されたウシガエル卵由来シアル酸結合性レクチン (SBL) は、レクチン活性とリボヌクレアーゼ (RNase) 活性を併せ持つ多機能タンパク質である。SBL は、*in vitro*、*in vivo* 両方において抗腫瘍効果が報告され、その効果は悪性細胞選択的なことから、新規抗がん剤として期待されている。しかし、その作用機序、特に悪性細胞選択性に関しては不明な点が多い。また他の RNase や既存薬剤との比較研究も十分ではなくそれらの解析が必要であった。

2. 研究の目的

SBL や他の RNase の新規抗がん剤としての応用を目標に

- (1) 種々の RNase リコンビナントタンパク質作製の効率化
- (2) SBL および他の RNase の抗腫瘍作用に関わるレセプター様分子の探索
- (3) アスベスト禍の問題で注目される悪性中皮腫細胞に対する抗腫瘍効果について解析する。

3. 研究の方法

上記研究目的を達成するため、それぞれ以下の方法により研究を行った。

(1) 本研究室ではこれまでに、SBL リコンビナントタンパクの発現誘導に関し、ペリプラズム移行シグナルを付加したタンパク質発現系によりリコンビナントタンパク質の作製に成功している。今回、野生型 cDNA 配列に変異を導入し、新たなシステイン残基を導入することで種々の試薬でラベル可能な変異体を作製した。また、ヒョウガエル卵由来 Onconase (ONC) も同様に野生型およびシステイン変異体を作製した。大腸菌により発現されたそれぞれのタンパク質はその精製条件を詳細に検討し、SBL に関しては大腸菌培養液を硫酸沈殿後、スルホプロピルカラム、ハイドロキシアパタイトカラム、ゲル濾過カラムを用いて精製した。ONC は不溶性画分に発現したものを变性・リフォールドし、スルホプロピルカラム、ゲル濾過カラムにより精製した。

(2) SBL および ONC のがん細胞膜上のレセプター様分子を探索するため、Mts-Atf-Biotin 試薬を用いたビオチントランスファー実験を行った。SBL および ONC のシステイン変異体を上記試薬でラベルし、SBL 高感受性悪性中皮腫細胞株である H28 細胞に処理した (4°C、30 分)。細胞に UV を照射後、細胞溶解液を調製し、アビジンカラムによるビオチン化タンパク質の精製を行った。精製されたビオチン化タンパク質はアビジン検出系を用いたウェスタンブロットにより確認され、ビオチントランスファーが確認されたタンパク質を SDS-PAGE 後、ゲル

から切り出し MS 分析によりタンパク質の同定を行った。

(3) 種々の悪性中皮腫細胞株に対する対するリボヌクレアーゼの抗腫瘍効果を検討した。細胞の生存率は WST-1 アッセイにより測定し、その生存率低下作用は既存の悪性中皮腫治療薬であるペメトレキセド、シスプラチンと比較検討した。また同時に、SBL とそれら薬剤との併用効果を解析し、拮抗、相加または相乗効果の判定は combination index の算出により行った。アポトーシス誘導の確認はウェスタンブロットによるカスパースの活性化やフローサイトメーターによるホスファチジルセリンの細胞膜外層側への移行を検出することにより行った。

4. 研究成果

(1) SBL と ONC のリコンビナント作製条件を最適化し、ともにペリプラズム移行シグナルを用いた発現系が適していること、また SBL は発現用大腸菌として BL21 (DE3) pLysS 株を利用し、培地画分から可溶性体を回収することが最も効率が良い一方で、ONC は BL21 (DE3) 株を利用し、不溶性画分から変性・リフォールドすることが最も効率が良いことを明らかにした。さらに、RNase をラベルするためのシステイン変異体の作製も検討し、それぞれ同様の発現系が最適であることが分かった。カラム精製後の回収率は SBL で ~1 mg / L (大腸菌培養)、ONC で ~10 mg / L となり、研究材料確保の観点から、SBL 作製のさらなる効率化は今後の検討課題と考える。

(2) ビオチントランスファー実験によるレセプター様分子の探索を行った。その結果、ウェスタンブロットにより強くビオチン化されたタンパク質が 42 kDa 付近に検出された (Fig. 1 左)。そこで、SDS-PAGE 後にそのバンドを切り出し (Fig. 1 右)、MS 分析を行った。

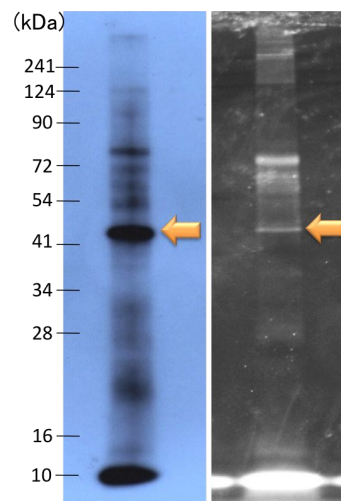


Fig. 1 ビオチントランスファー実験の確認
左; ウェスタンブロット、右; SDS-PAGE

その結果、アクチンがその候補分子として同定され、*in vitro* における実験でもその結合が確認された。近年、細胞表面のアクチンは、抗腫瘍性リボヌクレアーゼである T2 リボヌクレアーゼのレセプターとして報告され、新規のがん標的になる可能性が議論されており、アクチンが SBL や ONC の抗腫瘍性に関わる可能性が示唆された今回の結果は非常に興味深いものになった。今後、詳細な機構を精査する必要があると考えられる。

(3)

現在、悪性中皮腫に対する化学療法は限られており、本邦においてはペメトレキセドとシスプラチンの併用療法のみ適応が認められているが、奏効率の低さや耐性の出現が問題になっており、新規薬剤の開発が期待されている。今回、悪性中皮腫に対する SBL の抗腫瘍効果をペメトレキセドおよびシスプラチンと比較し、また、SBL とそれらの薬剤との併用効果について検討した。

5 種の悪性中皮腫細胞株および 1 種の正常中皮由来細胞株を用い各薬剤の IC_{50} 値を算出したところ、SBL は 5 種の全ての悪性中皮腫細胞株に対し、正常中皮由来細胞に毒性を示さない濃度において、強い生存率低下作用を示した。一方でペメトレキセドやシスプラチンでは正常中皮由来細胞に毒性を示す濃度においても、それらに対して抵抗性示すがん細胞株が数種観察された (Table 1)。なお SBL の生存率低下作用は SBL のアポトーシス誘導効果によるものであることを明らかにしている。これらのことから、SBL がペメトレキセドやシスプラチンと比較してより広範囲およびがん細胞選択的な抗腫瘍効果を示すことが示唆された。

Drugs	MeT5A	H28	H2452	MESO-1	MESO-4	MSTO
Pemetrexed	129.4 (24.11 - 694.7)	11.27 (5.674 - 22.39)	353.1 (208.7 - 597.3)	2277 (1403 - 3694)	2077 (1635 - 2639)	0.2779 (0.2280 - 0.3388)
Cisplatin	11.24 (8.059 - 15.68)	17.18 (15.14 - 19.50)	47.62 (41.23 - 55.00)	44.18 (38.37 - 50.87)	4.539 (3.868 - 5.327)	2.232 (1.626 - 3.065)
cSBL	22.31 (16.66 - 29.86)	0.4852 (0.3450 - 0.6825)	0.5222 (0.4114 - 0.6630)	5.511 (4.669 - 6.504)	1.540 (1.096 - 2.165)	0.4623 (0.3732 - 0.5728)

Table 1 各種細胞に対する各薬剤の IC_{50} 値

さらに、各薬剤を同時に 2 剤併用処理し、その際の生存率低下作用を、Combination index を用いて解析を行い、その相乗性を判断した。その結果、SBL とペメトレキセドを併用した場合、相乗的な抗腫瘍効果が観察され、その相乗性は既存療法であるペメトレキセドとシスプラチンの併用と同等以上であることが示された (Fig 2)。

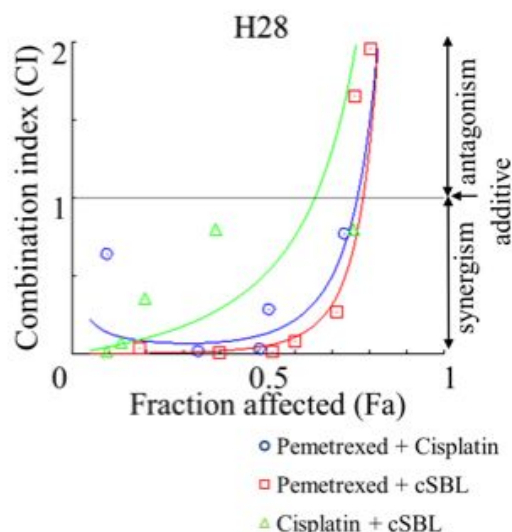


Fig. 2 相乗効果解析

CI は >1 で拮抗的、 $=1$ で相加的、 <1 で相乗的、を示す。

CI が低い程相乗性が高いことを示す。Fa は影響を受ける細胞の割合で、Fa=0.5 は 50% の生存率が低下する点を示す。

注: SBL とペメトレキセドの併用は高い相乗性が示された。

これらのことから、SBL が新規の悪性中皮腫治療薬になる可能性が示唆された。今後 *in vivo* における SBL の有効性および安全性の検証など、臨床応用を目標とした研究が必要と考える。

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 2 件)

Tatsuta Takeo, Sugawara Shigeki, Takahashi Kohta, Ogawa Yukiko, Hosono Masahiro, Nitt, Kazuo, Cancer-selective induction of apoptosis by leczyne, *Frontiers in oncology*, 査読有, 2014, DOI:10.3389/afonc.2014.00139

細野雅祐, 立田岳生, 抗腫瘍性リボヌクレアーゼの現状と展望、東北薬科大学研究誌、査読無、61 巻、2014、11-25、

https://tohoku-pharm.repo.nii.ac.jp/index.php?active_action=repository_view_main_item_detail&page_id=13&block_id=23&item_id=586&item_no=1

〔学会発表〕(計6件)

佐藤稔之、立田岳生、菅原栄紀、菅野秀一、細野雅祐、悪性中皮腫に対し cSBL とペメトレキセドの併用は相乗的に抗腫瘍効果を示す、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Tatsuta Takeo, Sato Toshiyuki, Sugawara Shigeki, Kanno syu-ichi, Hosono Masahiro, Anti-cancer effect induced by cSBL possessing lectin and ribonuclease activities, 7th Asia community of Glycoscience and Glycotechnology, Conference 2015 年 11 月 13 日、ホテル松島大観荘 (宮城県宮城郡松島町)

立田岳生、高橋耕太、細野雅祐、レクチン活性とリボヌクレアーゼ活性を併せ持つ cSBL による抗腫瘍効果の作用機序解析、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

佐藤稔之、立田岳生、菅原栄紀、菅野秀一、細野雅祐、悪性中皮腫に対するウシガエル卵由来シアル酸結合性レクチン(cSBL)とペメトレキセドの併用効果について、第9回東北糖鎖研究会、2015年9月5日、東北薬科大学(宮城県仙台市)

立田岳生、高橋耕太、細野雅祐、レクザイムによるがん細胞選択的なアポトーシス誘導効果について、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月26日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Tatsuta Takeo, Sugawara Shigeki, Takahashi Kohta, Hosono Masahiro, A leczyne which has both lectin and ribonuclease activity causes a cancer-selective induction of apoptosis, 19th World Congress on Advances in Oncology and 17th International Symposium on Molecular Medicine, 2014-10-11, Athens (Greece)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立田岳生 (TATSUTA, Takeo)
東北薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：70438563