様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　６ 月　５ 日現在

機関番号：１５４０１
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ０１８２４

研究課題名（和文）CaMキナーゼホスファターゼを分子標的とする低毒性がん転移抑制剤創製の試み

研究課題名（英文）An attempt to develop novel CaM kinase phosphatase inhibitors that are effective for suppression of cancer metastasis with low cytotoxicity

研究代表者
石田　敦彦（Ishida, Atsuhiko）

広島大学・総合科学研究科・教授

研究者番号：９０２１２８８６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：タンパク質脱リン酸化酵素CaMキナーゼホスファターゼ(CaMKP/PPM1F/POPX2)は、がんの転移浸潤に関わる鍵酵素としても近年注目されつつある。本研究では、まず化合物ライブラリーの大規模スクリーニングによって、本酵素を特異的に阻害するいくつかの化合物を絞り込み、その阻害機構について検討した。次にヒト乳がん培養細胞を用いて、これらの化合物が、転移浸潤の重要なステップである細胞遊走を効果的に阻害することを見いだした。これらの化合物は殆ど細胞毒性を示さなかったことから、本酵素の阻害剤が、毒性の低い新しいタイプのがん転移阻害剤開発のためのリード化合物として有望であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：CaM kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F/POPX2) is a Ser/Thr protein phosphatase that belongs to PPM family. Accumulating evidence shows possible involvement of CaMKP in cancer metastasis. In this study, we carried out large-scale screening of chemical library to find CaMKP-specific inhibitors, and investigated a mechanism of action of the inhibition. Subsequently, we showed that some of these inhibitors effectively suppressed migration of breast cancer cells despite the fact that they had no significant toxic effects on the cells. These data suggest that these CaMKP inhibitors or the derivatives are promising lead compounds for the development of novel cancer metastasis inhibitors without significant cytotoxicity.

研究分野：生物化学

キーワード：プロテインホスファターゼ　阻害剤　スクリーニング　がん転移・浸潤　細胞遊走　細胞毒性　構造機能相関

１．研究開始当初の背景

本格的な高齢化社会の到来を迎え、進行がんの有効な治療法の開発は喫緊の課題である。がん治療を考える上で最も問題となるのは、がんの転移・浸潤であるが、現在のところ臨床上有効ながん転移抑制剤は得られていない。一方で、申請者らはかつて、多機能性カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ（CaM キナーゼ）の制御に関わると考えられる新しいプロテインホスファターゼをラット脳に見いだし、CaM キナーゼホスファターゼ(CaMKP)としてはじめて報告した[*JBC* ***273***:1904 (1998), *JB* 125:1022 (1999)]。後になって、他の研究グループからも、CaMKP のホモローグと考えられる酵素の報告(POPX2,PPM1F など)が相次いだが、その間、申請者らは一貫して CaMKP の酵素学的性状解析をはじめ、生理機能の解析、特異的阻害剤の開発など、本酵素に関する基礎的な生化学データを着実に積み重ねて来た。最近になって、この CaMKP(= PPM1F/POPX2)が、がん細胞の転移・浸潤に関与することが、二つの研究グループによりそれぞれ独立に報告された[*Cell Cycle* ***9***:179(2010), *MCB* ***32***: 633 (2012)]。すなわち、ヒト乳がん細胞株において CaMKP をノックダウンすると、がん転移の重要なステップである遊走・浸潤が抑制され、過剰発現すると亢進するというのである。これらの実験結果は、有効な CaMKP 特異的阻害剤があれば、がんの転移・浸潤を抑制する全く新しいタイプのがん治療薬として利用可能であることを強く示唆している。

ところで現行の抗がん剤の主流は、がん細胞特異的な細胞増殖阻害を標的としているが、その選択毒性はしばしば正常細胞をも蝕み、時として深刻な副作用を引き起こす。細胞毒性自体は低いものの、がん細胞に特徴的な過程である転移・浸潤のみを効果的に抑制するような化合物が見つかれば、それは現在用いられている副作用の強い抗がん剤を使用せずにがん転移を抑制し、他の療法と組み合わせることで、患者の生活の質を低下させずに生存率を向上させる新たながん治療の選択肢を提供することであろう。CaMKP は CaM キナーゼに特異性の高いホスファターゼであるので、その阻害剤は、他の基質特異性の広いプロテインホスファターゼの阻害剤に比べて正常細胞に及ぼす影響は限局的、すなわち細胞毒性は低いことが予測される。また実際、CaMKP の過剰発現がアポトーシスを誘導すること[*JBC* ***276***:44193 (2001)]、発現抑制がアポトーシスを抑制すること[*Cell Death Disease* ***8***:e3051(2017)]も示されているが、これらの報告も上記の予測を支持する。

申請者らは数年前から、CaMKP の特異的阻害剤のスクリーニングを始めており、その一部は既に論文[*BBRC* ***363***: 715(2007)] に発表し、また特許も取得している[*特許第 5105348 号*]。そこで本研究計画では、我々が見いだした CaMKP 特異的阻害剤 1-amino-8-naphthol-4-sulfonic acid (ANS)及び 1-amino-8-naphthol-2,4-disulfonic acid (ANDS)をまず手掛かりとして研究を進める。ANS/ANDS は CaMKP 活性を強く阻害するが、類縁酵素である PP2Cα(PPM1A)を殆ど阻害しない。また培養細胞を用いた実験から細胞膜透過性もあることが示唆された。従って、これらの ANS/ANDS またはそのアナログが、実際にがんの転移・浸潤を効率的に抑制するかどうかは極めて興味深い。そこで以下の研究を計画した。

２．研究の目的

ヒトがん細胞株を用いて、ANS/ANDS が、実際にがん転移における重要なステップである遊走及び浸潤の過程を阻害するかどうかについて定量的に調べる。また可能であればその阻害機構についても明らかにする。更に各種細胞株を用いて、細胞毒性についても調べる。次に ANS /ANDS のアナログを系統的に合成し、CaMKP 阻害活性を指標にして阻害剤の構造活性相関、すなわち化学構造と CaMKP 阻害活性との関係についての知見を集積する。また、これらの合成展開と並行して、同様の CaMKP 阻害活性を示す化合物の更なる大規模スクリーニングを進める。それらの知見に基づいてより強力で特異性の高い CaMKP 阻害剤の創製を目指す。更に、これらの過程で得られた ANS /ANDS アナログ或いはその他の化合物について、上記と同様にがん細胞の遊走・浸潤阻害効果と細胞毒性を調べる。このようにして、できる限り細胞毒性が低く且つ遊走・浸潤抑制効果の高い候補化合物を絞り込む。以上の戦略により、低毒性がん転移抑制剤、またはその開発のためのリード化合物の創製を目指す。

３．研究の方法

① インベージョンチャンバーを用いた Trans well migration assay により、既報の CaMKP 特異的阻害剤 ANS や ANDS の、ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 に対する遊走阻害効果を検定した。

②東大創薬機構より提供された約１０万種の大規模ケミカルライブラリーを用い、合成リン酸化

ペプチドを基質としたマラカイトグリーンによる高感度リン酸定量法に基づいたCaMKPアッセイ系を用いて、CaMKP特異的阻害剤の更なるスクリーニングを行った。コントロールとして近縁のホスファターゼであるPP2Cα（PPM1A）活性も調べ、PP2Cα活性を阻害しないが、CaMKP活性を顕著に阻害する化合物をCaMKP特異的阻害剤の候補としてピックアップした。

③ ②で得られた有望なCaMKP阻害剤及び、そのアナログについて、①の遊走阻害試験をおこない、ヒト乳がん細胞の遊走阻害活性を調べた。

④ 乳がん細胞遊走阻害活性を示す化合物について、更にMTTアッセイによる細胞毒性試験を行い、細胞毒性の低い化合物を絞り込んだ。

以上のような戦略で低毒性がん転移抑制剤、或いはその開発のためのリード化合物の創製を目指した基礎研究を行った。

４．研究成果

ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231を用い、市販のインベージョンチャンバーを利用した細胞遊走アッセイの条件を種々検討することにより、再現性のよい遊走アッセイ系を確立した。この系を用いて、既にCaMKP特異的阻害効果を検証済みのCaMキナーゼホスファターゼ阻害剤ANS，ANDS存在下に、ヒト乳がん細胞の遊走活性を調べたところ、これらの化合物は低濃度で顕著に遊走阻害活性を示すことが判明した。

次に申請当初の実験計画に従って、ANS，ANDSの構造を元に、様々なアナログの系統的合成に取り組んだ。これらのアナログのCaMKP阻害活性を調べて、CaMKP阻害剤の構造機能相関に関する知見を得る予定であったが、諸般の事情によりアナログの合成が予定通りに進まずにいたところ、並行して進めていた化合物ライブラリーの大規模スクリーニングが予想外に進展し、ANS，ANDSとは全く構造の異なる一群の化合物が、近縁のPP2Cαを殆ど阻害しない濃度でCaMKPを強く阻害するという興味深い結果が得られた。そこで、当初の方針を転換し、新しくスクリーニングで得られたこれらの化合物について、より詳しく検討することにした。これらの化合物の阻害活性と化学構造を精査したところ、大別して２種のコアとなる構造がCaMKP特異的阻害活性と強く相関していることが判明した。そのうちの代表的な化合物を選び、更に疎水性の異なる複数の誘導体を市販品より購入し、次に*in vitro*での阻害機構の検討を進めた。

まず、*in vitro*ホスファターゼアッセイなどの生化学的実験により、これらの化合物によるCaMKP阻害機構を調べたところ、通常の阻害剤とは異なり、酵素タンパク質の何らかの不可逆的な化学修飾を伴うものであることが分かった。種々の検討の結果、阻害剤とのインキュベーションによって酵素タンパク質のカルボニル化が生じているという予想外の事実が明らかとなった。このカルボニル化反応は興味深いことに、酵素活性を欠失した変異酵素では殆ど観察されず、触媒反応に依存的であったことから、従来知られている化学的・非特異的なものではなく、酵素反応依存的・特異的に反応が進んでいる可能性があり、CaMKP阻害剤の特異性向上に繋がる重要な手がかりとなるかもしれない。今後、カルボニル化を受けるCaMKPのアミノ酸残基を同定し、更にカルボニル化の詳細な機構を検討する予定である。

また、これらの化合物の構造を検討したところ、修飾可能なカルボキシル基が存在していたので、細胞膜透過性を考慮に入れて、このカルボキシル基を鎖長の異なるアルコールでエステル化した化合物を多数入手した。これらの化合物のCaMKP阻害活性を検討したところ、メチル、エチル、プロピルなどの比較的短鎖のエステル化合物は強い阻害活性を示したが、鎖長が長くなるにつれ、阻害活性・阻害特異性がともに低下する傾向がみられた。次に、阻害活性の強い化合物について、上記ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231を用いた細胞遊走アッセイによってがん細胞の遊走阻害活性を調べた。その結果、CaMKP阻害活性の強かったメチル、エチル、プロピルなどのエステル化合物が顕著な遊走阻害活性を示した。更にMTTアッセイによってこれらの化合物の細胞毒性を調べたところ、これらは遊走阻害を示す濃度で全く細胞毒性を示さなかった。従って、これらの化合物は、細胞毒性の低い新しいタイプの転移浸潤阻害剤の候補物質となることが期待される。

本研究により、申請者らは以下の点を明らかにすることが出来た。

１）近縁のPP2Cαを殆ど阻害しない濃度でCaMKPを強く阻害する新しい構造のCaMKP阻害剤を見い出した。

２）これらのCaMKP阻害剤のうちのいくつかは、酵素活性依存的な酵素タンパク質のカルボニル化反応を引き起こした。

３）これらの化合物、及び既報のCaMKP阻害剤であるANS，ANDSは乳がん細胞株の遊走を顕著に阻害したが、その濃度で細胞毒性は全く認められなかった。

今後は、これらの成果を元に、CaMKP阻害剤の構造機能相関を明らかにし、更に強力かつ特異性の高いCaMKP阻害剤の創製に努める。また、これらの化合物が細胞毒性の低い、がんの転移浸潤阻害剤になる可能性が示唆されたので、そのようなドラッグの開発に繋がる基礎研究の可能性を更に追求する予定である。

そのような化合物の有用性を示すことにより、がん細胞の完全撲滅ではなく、がんの転移・浸潤を効果的に抑制して、「がんと共存する」という新しいコンセプトに基づく“制がん剤”の可能性を提示していきたい。

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　7 件）

1. Characterization of CoPK02, a Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase in mushroom *Coprinopsis cinerea*. Yamashita M, Sueyoshi N, Yamada H, Katayama S, Senga Y, Takenaka Y, Ishida A, Kameshita I, Shigeri Y. *Biosci Biotechnol Biochem in press* 2018（査読有り）
2. Functions and dysfunctions of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F) and CaMKP-N/PPM1E. Ishida A, Sueyoshi N, Kameshita I. *Arch Biochem Biophys* **640,** 83-92, 2018（査読有り）
3. Facile preparation of highly active casein kinase 1 using *Escherichia coli* constitutively expressing lambda phosphatase. Akizuki K, Toyama T, Yamashita M, Sugiyama Y, Ishida A, Kameshita I, Sueyoshi N. *Anal Biochem* **549**, 99-106, 2018（査読有り）
4. Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F) interacts with neurofilament L and inhibits its filament association. Ozaki H, Katoh T, Nakagawa R, Ishihara Y, Sueyoshi N, Kameshita I, Taniguchi T, Hirano T, Yamazaki T, Ishida A. *Biochem Biophys Res Commun* **477**, 820-825, 2016（査読有り）
5. High-performance CaMKI: A highly active and stable form of CaMKIδ produced by high-level soluble expression in *Escherichia coli*. Senga Y, Akizuki K, Katayama S, Shigeri Y, Kameshita I, Ishida A, Sueyoshi N. *Biochem Biophys Res Commun* **475**, 277-282, 2016（査読有り）
6. Regulation of Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F) by protocadherin-gamma C5 (Pcdh-gamma C5), Onouchi T, Kishino-Kaneko Y, Kameshita I, Ishida A, Sueyoshi N. *Arch Biochem Biophys* **585**, 109-120, 2015（査読有り）
7. The phosphatase-resistant isoform of CaMKI, Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase Iδ (CaMKIδ), remains in its 'Primed' form without Ca^{2+}-stimulation. Senga Y, Ishida A, Shigeri Y, Kameshita I, Sueyoshi N. *Biochemistry* **54**, 3617-3630, 2015（査読有り）

〔学会発表〕（計　9 件）

１．“Interleukin-1αの線維芽細胞における細胞内局在制御機構”早弓 恵里香、田内 香帆、林 亜里香、山﨑 岳、石田 敦彦、平野 哲男 ConBio2017 神戸市・神戸国際会議場 2017 年

２.“λphosphatase を恒常的に発現する大腸菌株 BL21(DE3)pλPP を利用した高活性型 casein kinase 1の簡便な調製法”秋月 一駿、遠山 拓、石田 敦彦、亀下 勇、末吉 紀行　ConBio2017 神戸市・神戸国際会議場 2017 年

３.“非リン酸化型プロテインキナーゼの簡易調製法の開発とそれを活用した高活性型CK1の取得”　秋月一駿 山下雅史 遠山拓 石田敦彦 亀下勇　末吉紀行　第68回日本電気泳動学会総会　広島市・広島大学 2017年

４．“Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase phosphatase (CaMKP/PPM1F) interacts with neurofilament L and inhibits its filament association”Hana Ozaki, Tsuyoshi Katoh, Ryoko Nakagawa, Yasuhiro Ishihara, Noriyuki Sueyoshi, Isamu Kameshita, Takanobu Taniguchi, Tetsuo Hirano, Takeshi Yamazaki,

Atsuhiko Ishida The 12th International Conference on Protein Phosphatases 東大阪市・近畿大学 2016 年

5．“核内 Interleukin-1αの細胞質への再配置制御機構”早弓 恵里香、林 亜里香、山﨑 岳、石田 敦彦、平野 哲男 第 89 回日本生化学会大会　仙台市・東北大学 2016 年

6．“蛍光検出円二色性（FDCD）を利用した迅速かつ簡便なタンパク質高次構造解析の試み”伊藤弘音、根平達夫、石原郁、益田恵子、浮穴和義、松尾光一、泉俊輔、山﨑岳、石田敦彦　第 89 回日本生化学会大会　仙台市・東北大学 2016 年

7．“Protein conformational analysis by fluorescence-detected circular dichroism (FDCD)” Tatsuo Nehira, Kaoru Ishihara, Hirone Ito, Keiko Masuda, Kazuyoshi Ukena, Koichi Matsuo, Shunsuke Izumi, Takeshi Yamazaki, Atsuhiko Ishida　The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015 Honolulu, Hawaii, 2015

8．“CaMキナーゼホスファターゼはニューロフィラメントLと結合して重合を阻害する”尾崎華，加藤剛志，中川綾子，石原康宏，末吉紀行，亀下勇，谷口隆信，山﨑岳，石田敦彦　第88回日本生化学会大会　神戸市・神戸国際会議場　2015年

9．“蛍光検出円二色性(FDCD)分光法が可能にするタンパク質立体構造変化の検出”伊藤弘音、根平達夫、石原郁、益田恵子、浮穴和義、松尾光一、泉俊輔、山﨑岳、石田敦彦　第５６回日本生化学会中国四国支部例会　松江市・島根大学 2015 年

〔図書〕（計　1 件）

インゲルキナーゼ・ホスファターゼアッセイ法 石田敦彦、亀下勇　「材料表面の親水・親油の評価と制御設計」石井淑夫監修 第6節　pp.83-88　テクノシステム(東京) 2016年7月

〔産業財産権〕

○出願状況（計　1 件）

名称：カルモジュリン依存性タンパク質リン酸化酵素Ｉ由来ポリペプチド、リン酸化剤、および製造方法
発明者：千賀由佳子、茂里康、秋月一駿、片山将一、末吉紀行、亀下勇、石田敦彦
権利者：産業技術総合研究所、香川大学、広島大学
種類：特許
番号：特願 2016-095770
出願年月日：平成 28 年 5 月 12 日
国内外の別：国内出願

〔その他〕

ホームページ等
http://home.hiroshima-u.ac.jp/ishiyasu/

６．研究組織

(1)研究代表者
石田　敦彦（ISHIDA Atsuhiko）
広島大学大学院・総合科学研究科・教授
研究者番号：90212886

(2)研究分担者
根平　達夫（NEHIRA Tatsuo）
広島大学大学院・総合科学研究科・准教授
研究者番号：　60321692

(3) 研究分担者
石原　康宏（ISHIHARA Yasuhiro）
広島大学大学院・総合科学研究科・助教
研究者番号：80435073

(4) 連携研究者
秀　道広（HIDE Michihiro）
広島大学大学院・医歯薬保健学研究科・教授
研究者番号：50284188