

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：16301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0347

研究課題名（和文）上皮間葉相互転換システムを利用した細胞極性の形成と消失の可逆的制御機構の解析（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Epithelial and mesenchymal properties of mammary cells: role of kinase signaling and kinase inhibitor(Fostering Joint International Research)

研究代表者

福田 信治 (Shinji, Fukuda)

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号：70398238

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,200,000円

渡航期間： 25ヶ月

研究成果の概要（和文）：欧米の乳がん罹患率が低下している一方で、日本の乳がん患者数は増加を続けている。乳がんの治療成績を下げる大きな要因は転移であるため、転移能を司る分子の機能解析は抗がん剤の標的分子を考える上でも重要なポイントである。本研究では乳がんで高い発現量を示し、細胞運動に重要な役割を果たすリン酸化酵素RSK2に関する研究を行なった。これによりRSK2が核と細胞質をシャトルすることを示すと共に、新たなRSK阻害化合物を同定した。また、乳がん患者由来の正常乳腺細胞の三次元培養を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんの治療成績は他のがんと比べて比較的良好とされるが、転移した乳がんの治療は依然として難しく、転移を抑制できる化合物や、治療薬開発のための技術基盤は極めて重要である。本研究では化学合成したRSK阻害剤の特性を解析し、引き続き新規化合物の評価を続けている。また日本人の正常乳腺組織を使った三次元培養は我々の知る限りまだ報告がなく、将来的に薬の効果や副作用を確かめるために有用な実験系となることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The incidence of breast cancer has increased in Japan. Since metastasis is associated with poor therapeutic outcome, it is crucial to understand the molecular mechanism underlying cancer metastasis and study the druggable targets. In this study, we focused on a signaling kinase RSK2, which plays critical roles in cell growth and motility. We found that RSK2 shuttles between nuclei and cytoplasm. Several compounds that affect kinase activity of RSK were tested. We also tried 3D culture of normal mammary epithelial cells derived from Japanese breast cancer patients.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳腺細胞 キナーゼ阻害剤 RSK EGF受容体 シグナル伝達

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

欧米の乳がん罹患率が低下している一方で、日本の乳がん患者数は増加を続けている。乳がんの最大の問題は転移であるため、転移能を司る分子の機能解析は抗がん剤の標的分子を考える上でも重要なポイントである。申請者は EGF ファミリーに属する増殖因子 EGF と Amphiregulin (AREG) が不死化乳腺上皮細胞 MCF10A の運動能を制御すること、その分子基盤として EGF シグナル伝達経路が重要な役割を果たすことを報告した (Fukuda et al, Sci. Rep., 2016)。この研究の過程で焦点を当てたシグナル伝達分子 RSK2 は乳がんで高い発現を示し、がん転移に直結する細胞運動を担う。そこで、さらなる研究の展開を目指し、乳がんにおける RSK2 の機能解析、及び RSK 阻害剤開発を行なっている米国 Vanderbilt 大学 Lannigan 研究室との国際共同研究を開始した。

2. 研究の目的

RSK2 は 1990 年代を中心に研究が進んだ分子であり、EGF 受容体シグナル伝達経路で様々な下流因子をリン酸化されることが知られている。一方で、当時の実験技術は強制発現系が中心であり、内在性の RSK2 が真にどのような役割を担っているかは依然として不明な点が多い。また RSK は細胞増殖や細胞運動を促進することから、特異的な阻害剤が開発できれば抗がん剤として応用できる可能性がある。そこで本研究では内在性 RSK2 の挙動を解析することによって生理的機能を探るとともに、新たな RSK 阻害剤を開発することを目的とした。さらに Lannigan 研究室は手術後のヒト乳腺組織を使って *in vitro* の 3 次元培養を行う技術を確立しているため、本技術の習得を目指した。

3. 研究の方法

(1) 内在性 RSK2 の可視化

CRISPR-Cas9 技術を用いて、乳がん細胞株 MCF7 及び不死化乳腺細胞 MCF10A の RSK2 遺伝子座に緑色蛍光タンパク質(GFP) をコードする cDNA を挿入した。内在性 RSK2 の C 末に GFP を融合するタンパク質を発現するクローンを樹立し、蛍光顕微鏡を用いて、内在性 RSK2 の挙動を解析した。

(2) RSK 阻害剤の解析

Lannigan 研究室は独自の研究から植物由来天然化合物 SL0101 を RSK 阻害剤として同定している。本研究では SL0101 を基本骨格とした派生物を複数有機合成し、特性を解析した。

(3) ヒト乳腺細胞の三次元培養

アメリカでは乳房縮小手術が少なくなく、正常乳腺組織を得ることができる。この組織をマトリゲル上で培養することで三次元培養が可能であり、将来、薬剤評価や個別化医療に向けて重要な技術と考えられている。ただし技術的に難しい面もあるため、実験系を確立した Lannigan 研究室で手技を習得し、日本でも培養を試みた。

4. 研究成果

(1) 内在性 RSK2 の可視化

RISPR-Cas9 技術を用いて、内在性 RSK2 の C 末に GFP を融合した MCF7 及び MCF10A を樹立した。蛍光顕微鏡による観察から、内在性 RSK2 は EGF 刺激によって、細胞質から細胞膜周辺、そして核に移行することが確認できた。さらに核外移行阻害剤であるレプトマイシン B で処理すると RSK2 の核局在が亢進することが明らかになった。これは RSK2 が核と細胞質をシャトルしていることを示す。しかし核外移行シグナル候補配列はキナーゼドメイン内にあり、変異を導入すると RSK2 の発現量が著しく低下し、凝集も観察された。

(2) RSK 阻害剤の解析

植物由来化合物 SL0101 は RSK 阻害剤として市販されているが、有効性と特異性は引き続き改善する必要がある。米国内の有機化学を専門とする共同研究者に依頼して、SL0101 を基本骨格とする派生物を複数得た。これら化合物の阻害効果を解析するため、昆虫細胞発現系を用いて RSK2、RSK1、RSK4 を大量精製し、ELISA ベースのキナーゼアッセイを行なった。この結果、1 つの化合物(特許出願中につき構造は非公開)は、SL0101 と比較し、RSK2 に非常に強固に結合することが分かった (Fukuda et al, 論文執筆中)。また関連する可能物については共著者として論文発表した (Li et al, 2020)。

(3) ヒト乳腺細胞の三次元培養

Vanderbilt 大学においては、乳房縮小手術後の組織を凍結保存しておき、解凍後にコラーゲン処理等を行い、乳腺上皮細胞を分離した。適切なサイズになった細胞塊をマトリゲル上に乗せ、2 週間程度培養した。ホルマリン固定後にパラフィン切片を作製し、luminal cell, myoepithelial cell のマーカーであるケラチン 8, ケラチン 14 で染色を行うことで、確かに *in vitro* で細胞塊を維持できていることを確認した。問題点としては、染色ができたものから、全く増殖しなかったものまで、増殖能が著しく異なる点が挙げられ、組織を摘出した個人差が非常に大きく影響することが示唆された。

愛媛大学では、乳がん手術の際、全摘の患者さんに同意を取り、診断に使用しない非がん部を凍結保存した。上記と同等の処理を行い、細胞塊を得ることができた。しかし myoepithelial cell マーカーである p63 とケラチン 14 はそれぞれ核と細胞質が明確に染色されたものの、luminal cell マーカーであるケラチン 8 は染色されなかった。培地には EGF を使用したため、AREG を使用することで luminal cell の集団も増幅できる可能性が考えられる。

(4) その他

RSK2 と相互作用する因子の同定を試みた。まずは上記の GFP ノックイン細胞を用いて抗 GFP 抗体による共免疫沈降と沈降物の質量分析を行なった。SILAC 法による定量的な解析を行なったところ、質量分析では共沈したタンパク質が同定されたが、ネガティブコントロール(親株)と比較して、RSK2 特異的に結合しているタンパク質の同定には至らなかった。これは RSK2 がリン酸化酵素であり、他のタンパク質と一過的に相互作用し、安定な複合体を形成しない可能性もある。そこで RSK2 とビオチン付加酵素 BirA 及び TurboID を融合したタンパク質を MCF10A に強制発現する実験を行なった。しかし BirA ではビオチン化が弱く、TurboID では非特異的なビオチン化が顕著であり、引き続き、条件検討を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yu Li, Zachary M Sandusky, Rajender Vemula, Qi Zhang, Bulan Wu, Shinji Fukuda, Mingzong Li, Deborah A Lannigan, George A O'Doherty	4. 巻 22
2. 論文標題 Regioselective Synthesis of a C-4' Carbamate, C-6' n-Pr Substituted Cyclitol Analogue of SL0101	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Organic Letters	6. 最初と最後の頁 1448-1452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.orglett.0c00042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shinji Fukuda, Hisayo Nishida-Fukuda, Subaru Sakamoto, Deborah A. Lannigan, Shigeki Higashiyama
2. 発表標題 Regulation of the intracellular localization of Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) by EGF
3. 学会等名 プロテインアイランド松山2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田 信治、福田 尚代、Deborah A. Lannigan、東山 繁樹
2. 発表標題 増殖因子によるRibosomal S6 Kinase 2 (RSK2)の細胞内局在制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田信治、福田尚代、Deborah A. Lannigan、東山繁樹
2. 発表標題 Intracellular localization of Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) and its effects on cell-cell adhesion
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田信治、福田尚代、Deborah A. Lannigan、東山繁樹
2. 発表標題 Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) は核外移行シグナルによって核と細胞質をシャトルする
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	Lannigan Deborah (Lannigan Deborah)	Vanderbilt University・Department of Pathology, Microbiology & Immunology・Assistant Professor	