

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870287

研究課題名(和文) プロテインジスルフィドイソメラーゼP5の人為的制御による新たな分子標的療法の開発

研究課題名(英文) Functional analysis of protein disulfide isomerase P5 as anti-cancer target

研究代表者

堀部 智久 (HORIBE, TOMOHISA)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20467468

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プロテインジスルフィドイソメラーゼ(PDI)関連タンパク質の一つであるPDI P5(P5)の活性阻害剤の低分子化合物スクリーニングを行い、これまでに得られた候補化合物の関連および類似骨格を有する低分子化合物のP5の還元酵素活性への影響を調べた。また、候補化合物の癌細胞におよぼす影響さらには、既存の抗癌剤との併用効果の検討を行った。

研究成果の概要(英文)：We performed the functional analysis of protein disulfide isomerase (PDI) P5 in cancer cells using inhibitors to reductase activity of P5, which we previously screened and identified using a chemical compound library. It was found that one of these inhibitors could decrease the secretion levels of soluble MICA from cancer cells. We also examined the effect of the inhibitors on the cancer cells viability, and found that the inhibitors had cytotoxic activity to cancer cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：ケミカルバイオロジー タンパク質 分子シャペロン

1. 研究開始当初の背景

プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) は、細胞内の新生タンパク質の正しい折りたたみに重要なジスルフィド結合 (S-S 結合) の形成、還元、異性化を触媒する酵素であり、また、構造形成が誤ったタンパク質を特異的に認識してその正しい構造形成を助けるシャペロンとしても機能する多機能性タンパク質であることが分かっている。このジスルフィド結合の形成、還元、異性化を行うための活性部位には、-Cys-X-X-Cys- (CXXC) モチーフと呼ばれる特徴的なアミノ酸配列を有し、この活性部位を有する領域は、チオレドキシシン様ドメインと呼ばれ、この特徴的な配列および構造を有する PDI 関連タンパク質に関して、現在までに、哺乳類細胞から 21 種類の PDI 関連タンパク質が同定され、その全アミノ酸配列が決定されているが、個々の細胞内における詳細な機能的な役割は未だ不明である。現在のところ、同様なドメイン構造を有するこれら PDI 関連タンパク質が”なぜ複数”細胞内に存在するかという疑問に対して、明確な答えは存在せず複数の新生タンパク質に対する基質特異性が示唆されている。一方、癌細胞は、その異常な増殖速度から細胞内に多くの新生タンパク質を合成し、正しくフォールディングする必要があるためにオルガネラ特異的な品質管理機構を巧みに利用し、自身の細胞の生存を制御していることが近年明らかとなっている。このため、癌細胞内において、新生タンパク質のフォールディングを助けるタンパク質を人為的に制御することは、新たな抗癌標的療法の可能性として期待される。PDI 関連タンパク質の一つである PDI P5 (P5) は、これまでに、*in vitro* において PDI と同様にイソメラーゼ活性およびシャペロン活性を有し、PDI と比較するとその活性は低いことが確認されているが、細胞内における詳細な機能的な役割はわかっていない。近年、この P5 は、免疫細胞が癌細胞を認識し、細胞障害活性を発揮する際に重要な MHC class I chain-related gene A (MICA) と癌細胞表面で結合し、癌細胞からの可溶性 MICA の分泌に重要な働きをすることが判明した。また、P5 はミトコンドリアにも局在し、ミトコンドリアに安定的に発現させた細胞は、過酸化水素あるいはロテノンで誘導される細胞死に抵抗性を示すなど重要かつ興味深い結果が報告されている。以上の結果を含め、癌細胞内における P5 の人為的な制御は、新たな抗癌療法の標的としての可能性が期待される。そこで我々は、P5 の人為的な制御を目的としてケミカルバイオロジーの手法による低分子化合物のスクリーニングを行い、P5 および PDI 関連タンパク質に対する活性阻害剤の 2 つの候補化合物を同定した。

2. 研究の目的

本研究では、プロテインジスルフィドイソメラーゼ (PDI) 関連タンパク質の一つである PDI P5 (P5) の活性阻害剤として低分子化合物スクリーニングから得られた候補化合物を用いて、癌細胞における P5 の機能的役割を解明すること、また、候補化合物の癌細胞におよぼす影響、殺細胞効果を調べ、さらには、既存の抗癌剤との併用効果の検討を行うことで、癌細胞における P5 の活性阻害による新たな抗癌標的療法の有用性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PDI、P5 および ERp57 タンパク質の発現および精製
大腸菌発現システム pET15 ベクターに PDI、P5 および ERp57 の cDNA を組み込んだ発現プラスミドを用いて、大腸菌内に発現させた後、FPLC を用いて Ni カラム (HisTrap) によるアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。精製後のタンパク質は、SDS-PAGE およびウェスタンブロッティングにより確認した。

(2) フローサイトメトリーによる P5 の発現量の解析
アフィニティー精製したウサギ抗 P5 抗体を PDI および ERp57 等の PDI 関連タンパク質とクロス反応しないことを確認した後、6-(fluorescein-5-carboxamido) hexanoic acid succinimidyl ester (FAMX) でラベルし、フローサイトメトリーにより癌細胞および正常細胞表面の P5 の発現量を測定した。

(3) P5 および PDI 関連タンパク質の活性測定
P5 および PDI 関連タンパク質のインスリン還元活性は、96well プレート上のインスリン比濁法により吸光度 (OD 620nm) を 30 分ごとに測定することで評価した。

(4) 化合物ライブラリーを用いた候補化合物のスクリーニング
京都大学・医学研究支援センターの構造および機能既知低分子化合物ライブラリーを用いて、96well プレート上での P5 の還元活性を阻害する化合物のスクリーニングを行った。一次スクリーニングで得られた陽性化合物に対しては、さらに二次、三次スクリーニングを行い、候補化合物を決定した。

(5) 相互作用の測定
候補化合物と P5 の相互作用の測定は、Biacore T100 system を用いて行った。(1) で精製した P5 をセンサーチップ上にアミンカップリングにより固定化した後、候補化合物を流路にインジェクトして測定した。

(6) 候補化合物の関連および類似骨格を有

する化合物の検索

低分子化合物スクリーニングで得られた候補化合物の関連および類似骨格を有する化合物の検索を Scifinder、Pubchem、Integrity 等を用いて行った。これら候補化合物の関連および類似骨格を有する化合物の P5 の活性におよぼす影響を調べることで、重要な骨格、側鎖の検討を行った。

(7) 細胞生存率の評価

96 well プレートに細胞を 2000-3000 個/well で播種した後、細胞を接地させ、候補化合物および薬剤を添加後、48 時間後に生細胞測定試薬を添加して、生細胞数依存的な発色をプレートリーダーを用いて、吸光度 450nm で測定することにより、細胞生存率ならびに殺細胞効果を評価した。

(8) 可溶性 MICA の測定

癌細胞からの可溶性 MICA の測定は、ELISA により抗 MICA 抗体を用いて行った。

(9) MICA 発現量の測定

癌細胞表面の MICA 発現の測定は、抗 MICA-PE 抗体を用いて FACS により行った。

(10) GSH アッセイ

癌細胞内の GSH の定量は、GSH-Glo アッセイキットを用いて、ルミノメーターによる発光強度を測定することで行った。

(11) 既存抗癌剤との併用効果の検討

候補化合物と既存の抗癌剤 (5-FU、テモゾロミド、パクリタキセル等) の併用効果は、これら化合物存在下における癌細胞に対する殺細胞効果を評価することで行った。

4. 研究成果

(1) P5 の発現、精製および抗 P5 抗体の特異性の確認

pET ベクターを用いた大腸菌発現システムにより、ヒト P5 タンパク質を発現させた後、FPCL により精製を行い、抗 P5 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより精製および抗体の特異性の確認を行った (図 1)。その結果、P5 タンパク質の精製および抗 P5 抗体がクロス反応しないことが確認された (図 1)。

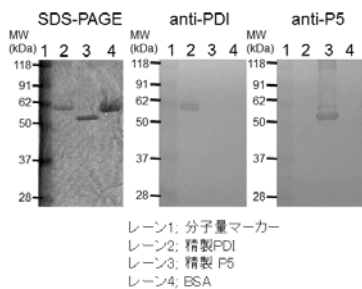


図 1 SDS-PAGE および抗 PDI および P5 抗体を用いたウェスタンブロッティング

(2) フローサイトメトリーによる P5 の発現量の解析

(1) で特異性が確認された抗 P5 抗体を用いていくつかの正常、癌細胞株を用いてフローサイトメトリーによる細胞表面の P5 の発現量の比較を行った。その結果、正常細胞株と比較して癌細胞株表面における P5 の発現量が増加していることが確認された (図 2)。

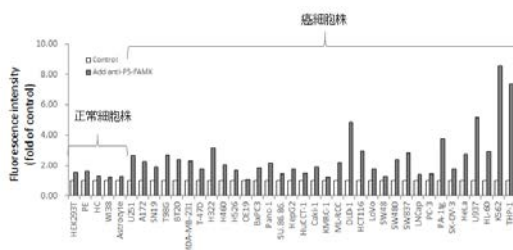


図 2 フローサイトメトリーによる正常および癌細胞株表面における P5 の発現量の解析

(3) 化合物ライブラリーを用いた候補化合物のスクリーニング

構造および機能既知化合物ライブラリーを用いて、精製 P5 のインスリン還元活性を阻害する化合物のスクリーニングを 96well プレート上のインスリン比濁法により行った。一次スクリーニングで得られた候補化合物に関してさらに複数回確認を行い、活性阻害剤の候補化合物とした (図 3)。

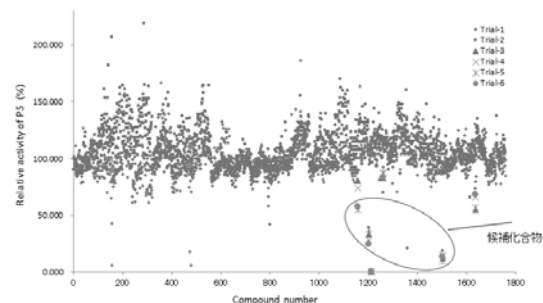


図 3 インスリン比濁法による P5 の還元酵素活性を阻害する化合物のスクリーニング

(4) 候補化合物の PDI 関連タンパク質への影響

化合物ライブラリーを用いたスクリーニングにおいて得られた候補化合物のうち、P5 の還元活性を濃度依存的に阻害する化合物 2 つ (Anacardic acid および NSC74859) を用いて、P5 および PDI 関連タンパク質 (PDI、ERp57 およびチオレドキシン) の還元活性への影響を検討した (図 4)。その結果、Anacardic acid は、これらタンパク質のうち P5 の還元活性を濃度依存的に阻害するが、NSC74859 は、これらタンパク質の酵素活性すべてに影響することが判明した (図 4)。

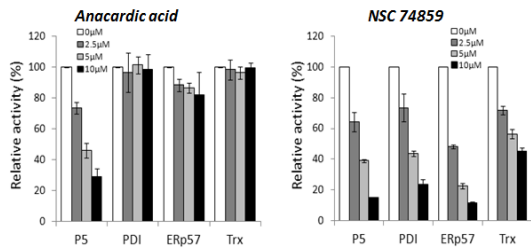


図4 Anacardic acidおよびNSC74859のP5、PDI、ERp57 およびチオレドキシンのインスリン還元活性におよぼす影響

(5) 相互作用の測定

Biacore T100 system を用いて精製 P5 タンパク質をセンサーチップに固定化した後、Anacardic acid および NSC74859 を流路に流すことで相互作用の確認を行ったところ、濃度依存的なセンサーグラムの上昇が確認された (図 5)。

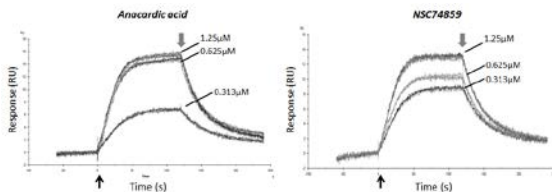
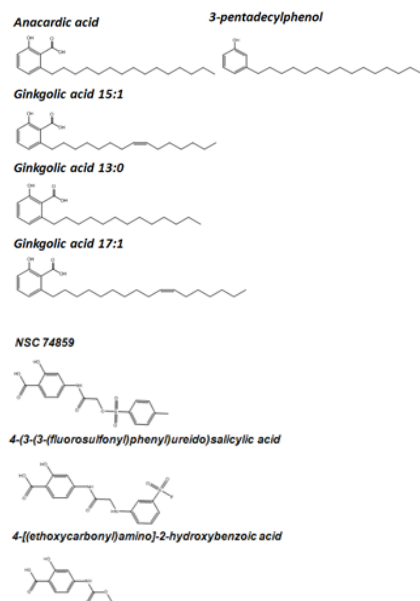


図5 Anacardic acid および NSC74859 と精製 P5 タンパク質との相互作用

(6) 候補化合物の関連および類似骨格を有する化合物の P5 および PDI の還元活性への影響

候補化合物である、Anacardic acid および NSC74859 の類似および関連骨格を有する化合物 (図 6A) を用いてこれら化合物の P5 および PDI の活性におよぼす影響を調べたところ、これら酵素の還元活性の阻害には、基本骨格および側鎖の長さが重要であることが示唆された (図 6B)。

(A)



(B)

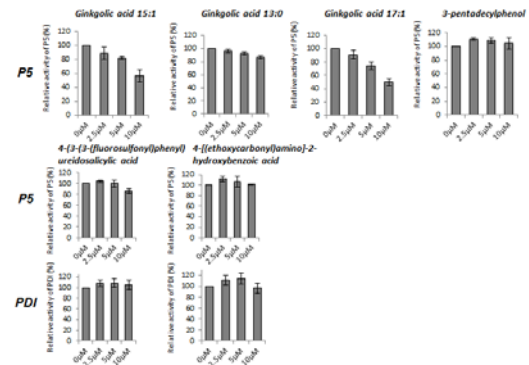


図6 (A)Anacardic acid および NSC74859 の関連化合物の構造および(B)これら化合物の P5 および PDI の還元活性への影響

(7) 候補化合物の癌細胞への影響

Anacardic acid および NSC74859 の癌細胞への影響を確認したところ、Anacardic acid および NSC74859 の癌細胞への殺細胞効果を調べた結果、いずれの化合物も癌細胞への殺細胞効果を有し、IC50 値 (細胞生存率の 50%阻害する化合物の濃度) は、正常細胞よりも低いことが確認された (図 7)。

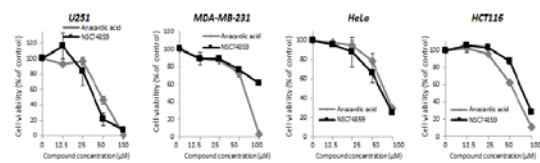


図7 Anacardic acid および NSC74859 の悪性脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌および大腸癌細胞株への影響

(8) 可溶性 MICA への影響

P5 の還元活性を優位に阻害することが確認された Anacardic acid に関して、可溶性 MICA への影響を調べた結果、癌細胞からの可溶性 MICA が減少することが確認された (図 8)。また、フローサイトメトリーによる癌細胞表面の MICA の発現量には顕著な影響を与えていないことから、Anacardic acid は、癌細胞からの可溶性 MICA の分泌に影響をおよぼしていることが示唆された (図 8)。

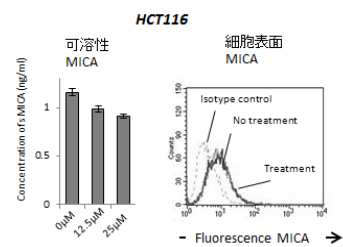


図8 大腸癌細胞株を用いた Anacardic acid の可溶性 MICA および癌細胞表面の MICA 発現におよぼす影響

(9) 癌細胞内のグルタチオン濃度への影響
 グルタチオンは、3つのアミノ酸からなるトリペプチドであり細胞内のチオール環境の維持を含む多様な機能を有し、いくつかの抗癌剤処理時において細胞内の濃度が上昇することが知られており、その結果、薬剤耐性との因果関係も報告されている。そこで、Anacardic acidの癌細胞内のグルタチオン濃度への影響を確認したところ、Anacardic acid処理時では、顕著な影響は確認できなかったが、Hsp90阻害剤として知られる17-AAG処理時に上昇した癌細胞内のグルタチオン濃度を減少させることが確認された。

(10) 既存抗癌剤との併用効果

Anacardic acidの既存抗癌剤の効果への影響を調べた。悪性脳腫瘍細胞株を用いてテモゾロミドとの併用においては、殺細胞効果のわずかな増強が見られ、さらにPDIのシャペロン活性を阻害すると報告されているアミノグリコシド系抗生物質存在下では、さらに増強が見受けられた(図9)ことから、P5のイソメラーゼおよびシャペロン活性を阻害することが、癌細胞において影響を与えることが示唆される。このことは、siRNAを用いて悪性脳腫瘍細胞株においてP5をノックダウンした際に癌細胞の増殖に影響を与えたことから、癌細胞において重要な役割を担っていることが示唆される。

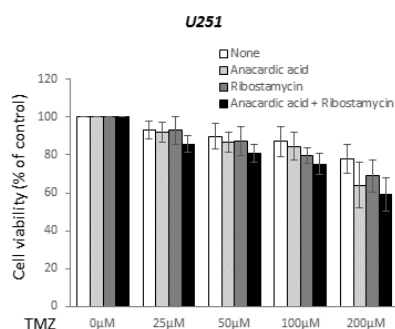


図9 悪性脳腫瘍細胞株を用いた Anacardic acid 存在下におけるテモゾロミドの効果への影響

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

1. Horibe, T., Torisawa, A., Okuno, Y., and Kawakami, K.
 Discovery of protein disulfide isomerase P5 inhibitors that reduce the secretion of MICA from cancer cells.
ChemBioChem 15, 1599-1606, 2014. DOI:

[学会発表] (計5件)

1. Horibe, T. and Kawakami, K.

Screening and identification of protein disulfide isomerase P5 inhibitors which reduce the secretion of MICA.

第73回日本癌学会学術集会 (2014年9月25日-27日 パシフィコ横浜)

2. 堀部 智久

癌細胞からのMICA分泌を減少させるP5活性阻害剤のスクリーニング

第1回 バイオ・フロンティア・プラットフォームシンポジウム「京滋地域アカデミア連関における研究支援体制の整備」(2014年12月1日 京都大学 医学部・記念講堂)

3. 堀部智久、鳥澤亜矢、川上浩司

P5活性阻害剤のスクリーニングおよび癌細胞からのMICAの分泌に与える影響

第62回日本生化学会 近畿支部例会 (2015年5月16日 立命館大学びわこ・くさつキャンパス)

4. Horibe, T., Torisawa, A., and Kawakami, K.

Functional analysis of protein disulfide isomerase P5 in cancer cells by simultaneous observation method of both bioluminescence and fluorescence imaging at single cell level

World Molecular Imaging Congress (WMIC) 2015 (2015年9月2日-5日 Honolulu, USA)

5. Horibe, T. and Kawakami, K.

Functional analysis of protein disulfide isomerase P5 as a potent anti-cancer target

第74回日本癌学会学術集会 (2015年10月8日-10日 名古屋国際会議場)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀部 智久 (HORIBE TOMOHISA)

京都大学・大学院医学研究科・特定講師

研究者番号: 20467468