

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：34306

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10585

研究課題名(和文) 私達が同定した新規細胞増殖因子に対するペプチド型抗がん剤の開発

研究課題名(英文) Development of peptide type anti cancer drugs against a novel cell growth factor identified by ourselves

研究代表者

吉貴 達寛 (Yoshiki, Tatsuhiro)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：80230704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、膀胱がん組織のプロテオーム解析から高発現しているC7orf24を発見した。同蛋白質は、その後、OakleyらによってC7orf24とγ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT)の遺伝子配列が同じであることが報告された。GGCTは、グルタチオンの恒常性に関わる酵素であり、様々ながんで発現が高い。しかし、がん細胞の増殖制御にどのようにGGCTが関与しているかは不明である。よって本研究では、GGCTノックダウン細胞におけるがん細胞増殖抑制機構と新規ペプチド型GGCT阻害剤を用いた抗腫瘍活性を明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要(英文)：We discovered that the C7orf24 protein is highly expressed in bladder cancers. Later, Oakley et al. reported that C7orf24 exhibits functions that are related to those of γ-glutamylcyclotransferase (GGCT). GGCT is one of the major enzymes that is considered having a critical role in glutathione metabolism and it was demonstrated that GGCT is expressed in a variety of cancer cell lines and human cancer tissues. However, whether the enzymatic activity of GGCT plays a role in cancer cell proliferation or tumor progression remained unclear. In this study, we clarified the mechanism of anti-proliferation in GGCT-knockdown cells and anti-cancer activity by a peptide type GGCT inhibitor named pro-GA.

研究分野：泌尿器系の腫瘍に対する新規分子標的薬および腫瘍マーカーの探索

キーワード：C7orf24 γ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ 抗がん剤 ペプチド型阻害剤

1. 研究開始当初の背景

C7orf24 (product of chromosome 7 open-reading frame 24) は、膀胱尿路上皮癌に対するプロテオミクス解析により、癌細胞で高発現している蛋白質として私達の研究グループが同定した腫瘍関連分子である。様々な実験の結果と文献的考察から、この蛋白質は膀胱癌だけでなく、多くのヒト腫瘍細胞（肺癌、乳癌、胃癌、大腸癌、子宮癌、骨肉腫）でも高発現していることが判明した。各種がん細胞株においても、メッセンジャーRNA および蛋白質量ともに高発現していることが確認されている。同分子の機能については未だ不明な部分が多いが、細胞への当該遺伝子導入実験によって、いわゆる癌化能を示すことなく細胞増殖に関係することが明らかになった。そこで、C7orf24 の機能を阻害することは多くの抗がん治療における新たな選択肢の一つになるのではないかと考え、RNA 干渉を利用して同分子の発現を阻害し、子宮癌や乳癌、肺癌、骨肉腫などで腫瘍株細胞に対して増殖抑制効果があることを確認した。特に肺癌細胞株については、マウス皮下移植腫瘍モデルにおいて RNA 干渉によって腫瘍サイズの縮小効果が認められた。また、C7orf24 阻害による細胞死は、核や細胞の形態変化、細胞周期解析、アポトーシス関連因子に関する検討から、多くの抗がん剤が誘導するアポトーシスとは異なる機序によると推測された。そのため、アポトーシスとは異なる新規細胞死機構を標的にすることによって既存の抗がん剤との相乗効果を可能とし、アポトーシスを企図する従来の薬剤開発とは一線を画す画期的抗がん剤を開発できると考えられた。

2. 研究の目的

私達が同定した C7orf24 は、その遺伝子発現抑制によりがん細胞の増殖抑制が見られることや、担癌マウスでの抗腫瘍効果が報告されている。一方、C7orf24 はγ-グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT) と同一分子であることが判明したが、その酵素活性が果たすがん細胞における役割は不明である。本研究では RNA 干渉により C7orf24 をノックダウンしたがん細胞における細胞増殖抑制機構の解明、C7orf24 阻害剤 = GGCT 活性阻害剤の抗がん作用の検討、GGCT 活性阻害を担癌マウスに経静脈的投与または経口投与し、抗腫瘍効果および副作用に関する検討、を目的とした。

3. 研究の方法

(1) C7orf24 ノックダウン細胞における細胞増殖抑制機構に関する検討

RNA 干渉:

C7orf24 の siRNA は、RNAi Inc (Tokyo) の提供するデザインソフトを用い、合成したものと Qiagen 社で販売されているものを用いた。配列は、下記に示す。

control siRNA,

5'-GUACCGCACGUCAUUCGUAUC-3'

(sense) and 5'-

UACGAAUGACGUGCGGUACGU-3'

(antisense);

anti C7orf24-siRNA,

5'-GAUAGGAGUUAGACAAUUUAA-3'

(sense) and

5'-AAAUUGUCUAAACUCCUAUCCC-3'

(antisense);

これらの siRNA を用い、C7orf24 ノックダウンがん細胞を作製し、それらの細胞死機構にアポトーシス、オートファジー、細胞老化が関与しているのか検討した。

(2) GGCT 活性阻害剤の細胞膜透過性向上の工夫および生細胞における GGCT 活性阻害剤の評価とその抗腫瘍活性の検討:

私達のグループが設計・合成した僅か 2 個のペプチドからなるグルタリルアラニン (GA) が最も強い GGCT 阻害活性を持つことを見出したが、その細胞膜透過性は低いことが判明した。したがって私達は、細胞膜の透過性を上げるための修飾を行ったいくつかのエステルに変換した GA のプロドラッグ候補化合物を蛍光標識し、膜透過性を評価した。そして、acetoxymethyl ester 型の化合物が細胞内で効果あることを見出した。最終的に、それを基本構造とした GA のプロドラッグ (pro-GA ; methyl-acetoxymethyl ester of GA) を開発し、高い GGCT 活性を持つがん細胞に対する細胞増殖抑制効果を検討した。さらに、*in vivo* での GGCT 活性阻害剤の抗腫瘍活性に関する検討も行った。

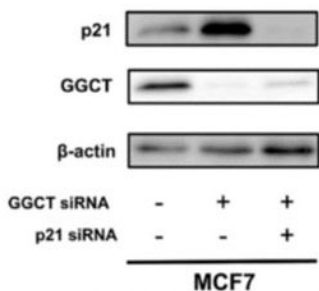
4. 研究成果

(1) C7orf24/GGCT の発現低下はがん細胞にオートファジーを介して細胞老化を誘導する;

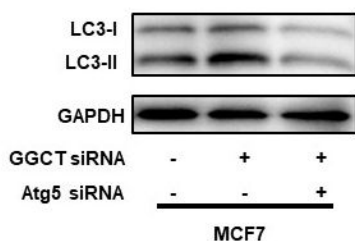
GGCT の発現低下は *in vitro* および *in vivo* で抗腫瘍効果を示し、新規のがん治療標的として期待されている。私達は、GGCT のノックダウンが、p21, p16 といったサイクリン依存性キナーゼインヒビターの発現誘導に依存した細胞老化および非アポトーシス性細胞死を引き起こすことを解明した。また、GGCT ノックダウンは乳がん細胞 MCF7・前立腺がん細胞 PC3 にオートファジーを引き起こすことを示した。反対に、NIH3T3 繊維芽細胞に GGCT を強制発現させると、培養液中の血清欠乏で誘導されたオートファジーが阻害され、抑制された細胞増殖も回復した。オートファジー関連タンパク質-5 のノックダウンによるオートファジー阻害は、GGCT 発現低下による p21, p16 の発現誘導・細胞老化・細胞増殖抑制といった現象を有意に減弱させた。さらに、GGCT ノックダウンによって、オートファジーを促進するシグナル伝達系である AMPK-ULK1 経路の活性化、抑制するシグナル伝達系である mTORC2-Akt 経路の

不活性化, といった, オートファジー誘導を示す二つの現象のいずれかが細胞種依存的に観察された. 以上の結果より, GGCT ノックダウンによってがん細胞にオートファジーが誘導され, それに引き続いてオートファジー依存的に細胞老化・がん細胞増殖抑制が引き起こされていることが示唆された(図1).

図1. GGCT ノックダウンにより p21 の誘導とオートファジーの誘導



(Matsumura et al., BMC Cancer, 2016)



(Taniguchi et al., Am J Cancer Res, 2018)

(2) GGCT との新規相互タンパク質であるプロヒビチン 2 は p21 の発現を調節する: 私達は, GGCT のノックダウンが, サイクリン依存性キナーゼインヒビターである p21 の発現誘導を介して, 乳がん細胞 MCF7 に細胞周期停止・細胞老化に続く細胞死を引き起こすことを報告したが, どのようなメカニズムで p21 が誘導されているのかは不明であった. そこで, 酵母ツーハイブリッド法および共免疫沈降法により, GGCT との新規相互作用タンパク質としてプロヒビチン 2 (Prohibitin-2, PHB2) を見出した. PHB2 は様々な標的遺伝子の転写抑制因子であることが報告されている. GGCT ノックダウンによって MCF7 細胞の核内 PHB2 の発現が低下し, PHB2 を強制発現すると, GGCT ノックダウンによる p21 の発現誘導が減弱した. また, クロマチン免疫沈降法によって, 核内 PHB2 が p21 のプロモーター領域に結合し, その結合が GGCT ノックダウンによって顕著に弱められることが示された. さらに, PHB2 の単独ノックダウンは p21 の発現を誘導し, p21 依存性の細胞周期停止・細胞老化・がん細胞増殖抑制といった, GGCT ノックダウンによるものと同様の現象を引き起こした. 以上より, PHB2 は GGCT ノックダウンによる p21 の発現誘導に中心的役割を果たしており, p21 の発現を抑制することによってがん細胞の異常増殖を促進している可能性が示唆された.

(3)がん細胞での高い GGCT 活性と GGCT 蛋白質高発現:

正常細胞とがん細胞での GGCT 活性の比較をするにあたり, まずは, GGCT 強制発現細胞とその親株細胞での GGCT 酵素活性の比較を, 私達が開発した人工基質「LISA101」を用いた GGCT 活性測定法を用いて検討した. 結果, 親株細胞と比較し GGCT-NIH3T3 細胞で, 高い GGCT 活性を示した. また, ウェスタンブロット法でも GGCT 蛋白質の発現が高いことも明らかであった. また同方法で, 正常ヒト乳房上皮細胞 (HMEC), 正常末梢血単球 (PBM), 正常ヒト前立腺上皮細胞 (prEC) などの正常細胞と MCF7 乳癌細胞, HL-60 白血病細胞, PC3 前立腺癌細胞などのがん細胞での GGCT 活性と蛋白質発現量を比較した. GGCT 活性の測定結果, いずれの種類のがん細胞と正常細胞を比較しても, がん細胞において GGCT 活性が高かった (MCF7 乳癌細胞では, 正常ヒト乳房上皮細胞に比し 1.4 倍, HL-60 白血病細胞では, 正常末梢血単球と比し 4.76 倍, PC3 前立腺癌細胞では 1.5 倍).

(4)GA は細胞ホモジネートに対しては GGCT 阻害活性を示すが, 培養細胞系では阻害活性を示さない:

これまでに, 私達は, GA が大腸菌で作製した GGCT リコンビナント蛋白質に対して, 阻害活性を最も強く示すことを報告した. 次に親株もしくは, GGCT 強制発細胞のホモジネートを用いて哺乳類の細胞由来の GGCT に対する効果を確認した. 結果, GA は GGCT 強制発細胞由来の GGCT 活性をコントロール細胞レベルまで抑制していた. また, GA は, MCF7 由来の細胞ホモジネートに対しても明らかな GGCT 阻害活性を示した. しかし, GA を培養液中に添加しても MCF7 培養細胞に対して GGCT 阻害活性が見られなかった. この結果は, GA は, 哺乳類細胞由来の GGCT 活性を阻害するが, 細胞膜を透過しないことを示していると考えられた.

(5)NBD 標識 GA とそのプロドラッグの細胞膜透過性の評価:

GA とその適切なプロドラッグ開発のために, 私達は, glutaryl-Lys(NBD) (gKFA) と数種類のモノ/ジエステル体 NBD 標識 GA 誘導体を合成した. gKFA のプロドラッグ候補化合物としては, mono-methyl ester (mixture of Me-gKFA and gKFA-Me), di-methyl ester (Me-gKFA-Me), mono-picolyl ester (mixture of Pic-gKFA and gKFA-Pic), di-picolyl ester (Pic-gKFA-Pic), methyl-medoximil ester (Me-gKFA-MED), and methyl-acetoxymethyl ester (Me-gKFA-AM) をデザインし合成した. まず, gKFA とプロドラッグ候補化合物を用いて, 蛍光で化合物細胞膜透過性を評価した. 予想通り 100 μM の gKFA を MCF7 細胞に添加 30 分後, 蛍光は見られなかった. 同様に, 100 μM のモノエステル化合物

(Me-gKFA/gKFA-Me, Pic-gKFA/gKFA-Pic) を添加した細胞ではわずかな蛍光しか検出されなかった。しかし、これらの化合物を高濃度 (1 mM) 添加すると、蛍光が観察できた。一方、100 μ M のジエステル化合物 (Me-gKFA-Me, Pic-gKFA-Pic, Me-gKFA-MED, Me-gKFA-AM) を添加した細胞では強い蛍光が検出できた。これらの結果からジエステルタイプの GA プロドラッグ化合物が効率よく細胞膜を透過すると期待できた。

次に、細胞内でのジエステル型のプロドラッグが親化合物である gKFA に変換されるか、MCF7 培養細胞にジエステル体のプロドラッグを添加し 1 時間後、細胞のホモジネートを用いて HPLC で評価した。Me-gKFA-Me 添加では、94% が、gKFA-Me の構造であった。この結果は、Lys(NBD) が結合している側のメチルエステルが細胞内で加水分解されにくいことを示唆していると考えた。一方、ピコリルエステル (Pic) は、gKFA に加水分解されにくく、培養中に添加して 1 時間後でもまだ、そのままの化合物の構造であった (細胞内で存在しうるすべての化合物の構造中の 94% が Pic-gKFA-Pic のままであった)。Me-gKFA-MED Me-gKFA-AM の場合は、グルタリル側のメチルエステルと同様に Lys(NBD) が結合している側の medoxomil (MED) and acetoxymethyl (AM) esters MED または AM はが細胞内で素早く加水分解され gKFA を遊離させた。さらに、Me-gKFA-AM の方が Me-gKFA-MED よりも 1.7 倍多くの gKFA に変換されることが分かった。そして、最終的に Me-gKFA-AM が細胞内で親化合物である gKFA に変換される観点から一番良いプロドラッグだと考えられた。

(6) GGCT 強制発現細胞、正常細胞、がん細胞に対する Pro-GA の細胞増殖抑制効果：

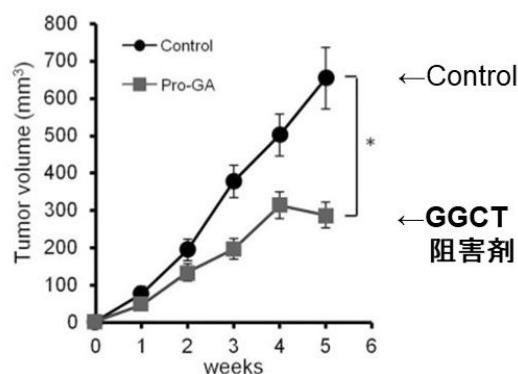
GGCT-NIH3T3 細胞とその親株細胞において細胞増殖抑制効果を比較した。結果、pro-GA は、低血清培養条件で見られる GGCT 発現増大による細胞増殖亢進効果に対し抑制効果を示した。しかし、その際、親株細胞に対しては、明らかな細胞毒性は示さなかった。このことは pro-GA の標的特異性を支持していると考えられた。また、がん細胞における pro-GA の細胞増殖抑制効果を、各種の正常細胞に同じ濃度の pro-GA を添加し、WST-8 アッセイにより比較評価した。つまり、MCF7 細胞への効果は、HMEC 細胞と比較し、HL-60 細胞への効果は PBM と比較し、PC3 細胞への効果は PrEC と比較した。pro-GA は正常細胞よりもがん細胞により強い効果を発揮することが示された。

(7) 担癌マウスにおける pro-GA の抗腫瘍効果：

私達は、次に、pro-GA の抗腫瘍効果を PC3 担癌マウスにおいて検討した。5 mg/kg の pro-GA を一週間に 2 回腹腔内投与し、5 週間

抗腫瘍効果を検討した。結果、pro-GA による有意な抗腫瘍効果が示された (図 2 : $p < 0.05$)。また、pro-GA 投与群のマウスの体重に変化は見られなかった。ことから、明らかな全身性の毒性はなかったと考えられた。これらの結果から pro-GA は、新規抗がん剤の有望な候補だと思われる。

図 2. PC3 細胞担癌マウスにおける pro-GA の抗腫瘍効果



(li et al., Chem Med Chem, 2018)

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 9 件)

Hiromi Ii, Taku Yoshiya, Susumu Nakata, Keiko Taniguchi, Koushi Hidaka, Shugo Tsuda, Masayoshi Mochizuki, Yuko Tsuda, Yuji Nishiuchi, Kosei Ito, Susumu Kageyama, Tatsuhiro Yoshiki, A novel prodrug of a γ -glutamylcyclotransferase inhibitor suppresses cancer cell proliferation in vitro and inhibits tumor growth in a xenograft mouse model of prostate cancer, ChemMedChem, 査読有、13、2018、155-163

DOI: 10.1002/cmdc.201700660.

Keiko Taniguchi, Kengo Matsumura, Susumu Kageyama, Hiromi Ii, Eishi Ashihara, Tokuhiro Chano, Akihiro Kawauchi, Tatsuhiro Yoshiki, Susumu Nakata, Prohibitin-2 is a novel regulator of p21WAF1/CIP1 induced by depletion of γ -glutamylcyclotransferase, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有、496、2018、218-224

DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.01.029.

Taku Yoshiya, Hiromi Ii, Shugo Tsuda, Masayoshi Mochizuki, Susumu Kageyama, Tatsuhiro Yoshiki, Design of fluorogenic probes and fluorescent-tagged inhibitors for

-glutamylcyclotransferase,
J Pept Sci., 査読有、23、2017、618-623
DOI: 10.1002/psc.2984.
Kengo Matsumura, Susumu Nakata, Keiko
Taniguchi, Hiromi Ii, Eishi Ashihara,
Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi,
Tatsuhiko Yoshiki, Depletion of
-glutamylcyclotransferase inhibits
breast cancer cell growth via
cellular senescence induction mediated
by CDK inhibitor upregulation.,
BMC Cancer, 査読有、16、2016、748-756
DOI: 10.1186/s12885-016-2779-y
Susumu Kageyama, Takahiro Isono,
Hideaki Iwaki, Eiki Hanada, Keiji
Tomita, Tetsuya Yoshida, Tatsuhiko
Yoshiki, Akihiro Kawauchi, Proteome
research in urothelial carcinoma,
Int J Urol, 査読有、22、2015、621-628
DOI: 10.1111/iju.12793
Susumu Kageyama, Eiki Hanada, Hiromi Ii,
Keiji Tomita, Tatsuhiko Yoshiki, Akihiro
Kawauchi,
Gamma-Glutamylcyclotransferase: A Novel
Target Molecule for Cancer Diagnosis and
Treatment, Biomed Res Int, 査読有、2015、
2015、345219
DOI: 10.1155/2015/345219
Taku Yoshiya, Hiromi Ii, Shugo Tsuda,
Susumu Kageyama, Tatsuhiko Yoshiki,
Yuji Nishiuchi, A GGCT fluorogenic
probe: design, synthesis and
application to cancer-related cells,
Org Biomol Chem, 査読有、13、2015、
3182-3185
DOI: 10.1039/c5ob00086f

[学会発表](計 21 件)

谷口 恵香, 松村 健吾, 飯居 宏美, 影山
進, 芦原 英司, 河内 明宏, 吉貴 達寛,
中田 晋,
Gamma-glutamylcyclotransferase (GGCT)
の発現低下はがん細胞にオートファジー
を介して細胞老化を誘導する、日本薬学会
第 138 年会、2018
高木 寛子, 飯居 宏美, 中田 晋, 谷口
恵香, 吉矢 拓, 津田 修吾, 望月 雅允,
影山 進, 吉貴 達寛, -グルタミルシク
ロトランスフェラーゼ阻害剤の細胞老化
を介した細胞増殖抑制効果と抗がん剤併
用によるその効果の増強、日本薬学会第
138 年会、2018
飯居 宏美, 中田 晋, 谷口 恵香, 吉矢
拓, 津田 修吾, 望月 雅允, 影山 進, 吉
貴 達寛, 新規 -グルタミルシクロラン
スフェラーゼ阻害剤の抗腫瘍効果の検討、
日本薬学会第 138 年会、2018
谷口恵香, 中田晋, 松村健吾, 飯居宏美,
影山進, 河内明宏, 吉貴達寛, -グルタ
ミルシクロトランスフェラーゼ(GGCT)の

発現低下はオートファジーを介して細胞
老化を誘導する、第 76 回 日本癌学会学術
総会、2017

飯居宏美, 中田晋, 谷口恵香, 影山進,
吉貴達寛, 担癌マウスにおける -グルタ
ミルシクロトランスフェラーゼ阻害剤の
抗腫瘍効果、第 76 回 日本癌学会学術総会、
2017

谷口恵香, 中田晋, 松村健吾, 飯居宏美,
影山進, 河内明宏, 吉貴達寛,

Gamma-glutamylcyclotransferase (GGCT)
の発現低下は乳癌細胞にオートファジー
を誘導する、日本薬学会第 137 年会、2017
Kengo Matsumura, Susumu Nakata, Keiko
Taniguchi, Hiromi Ii, Eishi Ashihara,
Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi,
Tatsuhiko Yoshiki, The depletion of
-glutamylcyclotransferase induces
cellular senescence and cell death via
CDK1s upregulation.

The 5th International Symposium of
Training Plan for Oncology
Professionals (国際学会) 2017

Kengo Matsumura, Susumu Nakata, Keiko
Taniguchi, Hiromi Ii, Eishi Ashihara,
Susumu Kageyama, Akihiro Kawauchi,
Tatsuhiko Yoshiki, Depletion of
-glutamylcyclotransferase inhibits
cancer cell growth through
cellular senescence induction.

2016 American Society of Cell Biology
(ASCB) Annual Meeting (国際学会) 2016
松村健吾, 中田晋, 飯居宏美, 芦原英司,
影山進, 河内明宏, 吉貴達寛, CDK1 誘導
を介した -グルタミルシクロトランスフ
ェラーゼの抑制による細胞老化誘導、第 75
回日本癌学会学術総会、2016

Kengo Matsumura, Susumu Nakata, Hiromi
Ii, Eishi Ashihara, Susumu Kageyama,
Akihiro Kawauchi, Tatsuhiko Yoshiki,
Depletion of -glutamylcyclotrans-
-ferase inhibits cancer cell growth via
cellular senescence caused by CDK
inhibitor induction. 24th Biennial
Congress of the European Association for
Cancer Research (国際学会) 2016

吉矢拓, 飯居宏美, 津田修吾, 影山進,
吉貴達寛, 西内祐二, -グルタミルシク
ロトランスフェラーゼ (GGCT) 基質
"LISA101"の開発と応用、第 38 回日本分子
生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会
合同大会、2015

吉矢拓, 飯居宏美, 津田修吾, 影山進,
吉貴達寛, 西内祐二, -グルタミルシク
ロトランスフェラーゼ: 蛍光基質 LISA-101
の開発とインヒビター探索、第 20 回日本
病態プロテアーゼ学会学術集会、2015

[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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉貴 達寛 (YOSHIKI, Tatsuhiko)
京都薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：80230704

(2) 研究分担者

花田 英紀 (HANADA, Eiki)
滋賀医科大学・医学部・助教
研究者番号：40555067

影山 進 (KAGEYAMA, Susumu)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号：50378452

(3) 連携研究者

()
研究者番号：

(4) 研究協力者

()