様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　 元 年　 5 月 30 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｈ０４７１０

研究課題名（和文）癌幹細胞性を担うPRDM14分子の蛋白質相互作用に基づく機能解明と抗腫瘍薬の開発

研究課題名（英文）Functional analysis and development for anti-tumor compounds targeted PRDM14 relating to cancer stemness based on protein-protein interaction

研究代表者
谷口　博昭（Taniguchi, Hiroaki）

東京大学・医科学研究所・特任研究員

研究者番号：９０５６３２８９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　13,000,000円

研究成果の概要（和文）：PRDM14と相互作用する可能性があるタンパク質を網羅的に洗い出した。さらに、表面プラズモン共鳴（SPR）法、後者はBioluminescence RET(BRET)法により検証した。多くの候補分子がSPR法で陽性の判定となった。BRET法により厳格に相互作用を評価したところ、そのうちの一部候補蛋白で特異的陽性反応が得られた。その結果、PRDM14とHSP90, GRP78との相互作用が明らかとなり論文報告を行った。その他の相互作用する蛋白とPRDM14蛋白の関係性についても判明しており、それらの創薬に向けたスクリーニング系の樹立を開始している。

研究成果の学術的意義や社会的意義
PRDM14分子は正常細胞に発現がなく、ES細胞と腫瘍細胞に発現が限られる。一方、相互作用を呈するタンパク質には多くの分子標的となるoncogeneが含まれるものの、それらは正常細胞にも発現があるため、その発現を抑制することは副作用に繋がる。PRDM14との相互作用でがん細胞の幹細胞性が担われている可能性が高いため、その抑止により分化誘導の可能性が生じ、抗がん剤の感受性も高くなると考えられる。更には、すでに核酸創薬でPRDM14の発現を抑えることで、乳がん、膵がんに効果があることが判明しているため、本研究により導出される低分子化合物はこれらの疾患に有効な可能性が高い。

研究成果の概要（英文）：Inhibiting PRDM14 expression in breast and pancreatic cancers has been reported to reduce cancer stem-like phenotypes, which are associated with aggressive tumor properties. To develop a pharmaceutical treatment, the mechanism and interacting partners of PRDM14 need to be clarified. We obtained several candidates that were pulled down with PRDM14 in TNBC cells and identified them by mass spectrometry. Two candidates, GRP78 and HSP90a,were confirmed by immunoprecipitation assay. Surface plasmon resonance analysis using GST-PRDM14 showed that these two proteins directly interacted with PRDM14 and that the interactions required the C-terminal region of PRDM14. We also confirmed the interactions in living cells by NanoLuc luciferase-based bioluminescence resonance energy transfer (NanoBRET) assay. We also found out other candidates interacted with PRDM14 via SPR assay and NanoBRET assay, then we started to construct screening system for new drug discovery.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん幹細胞性　タンパク質相互作用　創薬スクリーニング系

１．研究開始当初の背景

我々は PRDM14 遺伝子産物が、固形がん組織に特異的に発現亢進し、がんの悪性形質の獲得に重要な作用を担っていることを解明した。それを基盤とした同遺伝子を標的とした核酸創薬の開発に着手し成果をあげている。研究を推進する過程で、同遺伝子産物の機能には蛋白質複合体が必要になる可能性が強く示唆されたため、本研究を立案するに至った。

２．研究の目的

① PRDM14 遺伝子産物と相互作用 (PPI: Protein – Protein Interaction) する蛋白の同定に立脚した研究を推進し、悪性腫瘍における PRDM14 遺伝子産物の分子機能を詳細に解明する。

② 相互作用をする蛋白の候補にがんで重要な遺伝子産物が含まれるが、それらの発現は正常細胞の恒常性の維持にも関わる。すなわち、単純な阻害剤では副作用を生じる。PRDM14 遺伝子産物は正常細胞に発現しないため、その相互作用の阻害剤は副作用を回避できる可能性が高い。そこで、難治性がんを対象とした PRDM14 遺伝子産物との PPI を阻害する薬剤（新規の抗腫瘍低分子化合物）の開発基盤の樹立を目指す。

３．研究の方法

我々はPRDM14遺伝子産物が、がん組織に特異的に発現亢進し、がんの悪性形質の獲得に重要な作用を担うことを解明した。研究を推進する過程で、同遺伝子産物の機能には蛋白質複合体が必要になる可能性が強く示唆された。すでに、免疫沈降法＋質量分析(MS)法、及び、簡易的な表面プラズモン共鳴法によるスクリーニングを実施し、PRDM14 遺伝子産物と相互作用するタンパク質の候補を得た。そこで、相互作用するタンパク質候補の絞り込みを、(1) 非細胞系での表面プラズモン共鳴装置を用いた手法、(2) 生細胞を用いた蛍光共鳴エネルギー転移法を応用した BRET 法による解析、の2通りで行った。

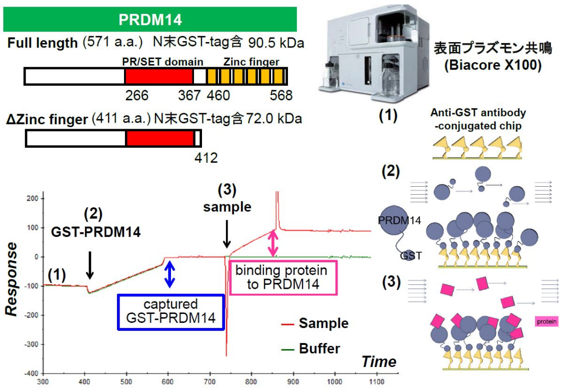

図1. PRDM14結合蛋白の表面プラズモン共鳴法による検証

具体的には、大腸菌、小麦による無細胞発現系で PRDM14 の全長、及び欠損体リコンビナント蛋白の作成に着手した。合成が達成できたものに関して SPR 法を用いて上記スクリーニングで得られた候補のリコンビナント蛋白と獲得が叶った PRDM14 の全長、及び、Zn ドメインの欠損体の相互作用を検証した(図 1)。

ついで、SPR 法で反応が得られた候補蛋白の N 末端、C 末端に NanoLuc を融合した蛋白、Halo tag を付した PRDM14 蛋白を細胞内に発現させるためのベクターを構築する。

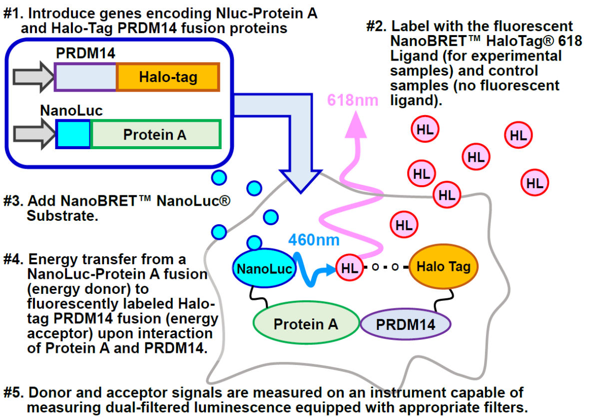

図2. Nano BRET法による生細胞のタンパク質相互作用の解析

これらを用いて、BRET (Bioluminescence RET) 法（Xi, et al. PNAS, 1999）を実施した。FRET のエネルギードナーをルシフェラーゼ(NanoLuc) に置き換えることで励起光を用いることが無く、また、エネルギーアクセプターを Halo-tag ligand の NanoBRET618 とすることでスペクトルのオーバーラップを回避し高いシグナル/ノイズ比を確立する方法である(図 2)。ただし、ドナーアクセプターの蛋白間のスワップや N 末端、C 末端の Tag 化の組み合わせを比較検討し、系の最適化を実施した。この際に放出される 610nm の波長を検出できるかどうかで、生細胞において、スクリーニングで得られた候補遺伝子産物と PRDM14 遺伝子産物の相互作用の確証で評価を行った。

４．研究成果

PRDM14mRNA を分解する siRNA による核酸医薬品開発の非臨床試験を完了し、抗腫瘍効果を認めると共に、毒性試験において大きな問題となる所見は認められなかった。一方で低分子化合物による創薬と比較すると核酸医薬品は高価となるため、分子標的に関する核酸創薬で得られている POC を基盤に、PRDM14 分子を阻害する低分子化合物の開発を本事業により開始・推進した。はじめに PRDM14 と相互作用する可能性があるタンパク質を免疫沈降—質量分析法等で網羅的に候補を洗い出した。その結果を無細胞系アッセイ、細胞系アッセイで評価した。前者は表面プラズモン共鳴（SPR）法、後者は Bioluminescence RET(BRET) 法である。PRDM14 の全長蛋白、全長ベクターを用いて候補分子を評価したところ、多くの候補分子が SPR 法で陽性の判定となったが、今年度、BRET 法による assay を詳細に検証し、厳格に相互作用を評価する手法により評価を実施したところ、そのうち約 1/3 程度の候補蛋白で陽性反応が得られた。さらに詳細に PRDM14 の結合部位を同定する目的で PRDM14 の欠損体蛋白の作成に着手した。しかしながら、PRDM14 の欠損体蛋白は大腸菌による合成が

難しく目的蛋白を得ることができなかったため、別のタンパク合成法で得ることにより解決を図った。欠損体のうち合成が達成できたものに関して SPR 法で評価を行った。その結果、PRDM14 とヒートショックプロテインである HSP90, GRP78 との相互作用が明らかとなり論文報告を行った (図 3)。その他の相互作用する蛋白と PRDM14 蛋白の関係性についても判明しており、論文化及び知財化予定であるため詳細な記載はできないが、それらの創薬に向けたスクリーニング系の樹立を開始するとともに、別のタンパク合成法によるタンパク合成を開始している。

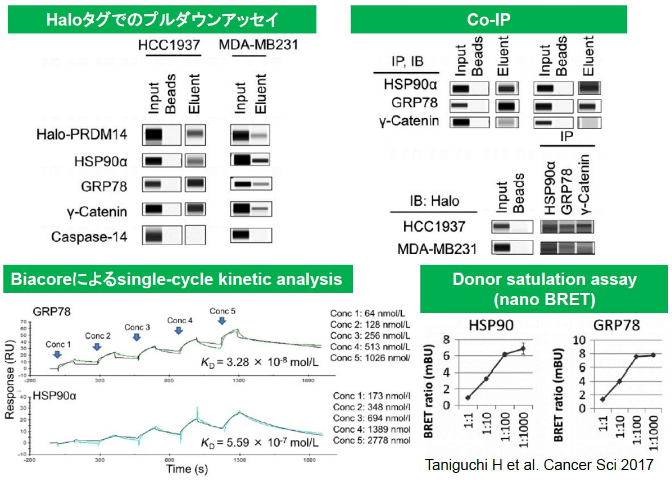

図3. TNBC株においてPRDM14蛋白はHSP90a, GRP78, γカテニンと結合する

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 9 件）

1. Yoshida K, Nagatoishi S, Kuroda D, Suzuki N, Murata T ,Tsumoto K. Phospholipid Membrane Fluidity Alters Ligand Binding Activity of a G Protein-Coupled Receptor by Shifting the Conformational Equilibrium. Biochemistry：58, 504-508, 2019.
2. Moriya C, Imai K, Taniguchi H. PRDM14 is overexpressed in chronic pancreatitis prior to pancreatic cancer. FEBS Open Bio. 17; 8(10): 1733-1741, 2018.
3. Taniguchi H (corresponding author), Imai K.　PRDM14, a Zinc Finger Protein, Regulates Cancer Stemness. Methods Mol Biol. 1867: 3-13, 2018.
4. Moriya C, Taniguchi H, Nagatoishi S, Igarashi H, Tsumoto K, Imai K. PRDM14 directly interacts with heat shock proteins HSP90α and GRP78. Cancer Sci. 109(2): 373-383, 2018.
5. Nagatoishi S, Yamaguchi S, Katoh E, Kajita K, Yokotagawa T, Kanai S, Furuya T, Tsumoto K. A combination of 19F NMR and surface plasmon resonance for site-specific hit selection and validation of fragment molecules that bind to the ATP-binding site of a kinase. Bioorg Med Chem. 26(8). 1929-1938, 2018.
6. Senoo A, Nagatoishi S, Moberg A, Nygren B L, Mitani T, Tashima T, Kudo S, Tsumoto　K. Inhibition of homophilic dimerization anddisruption of cell adhesion by P-cadherin-specific small molecules from SPR-based assays. Chem. Commun. 54, 5350-5353, 2018.
7. Tashiro S, Caaveiro JMM, Nakakido M, Tanabe A, Nagatoishi S, Tamura Y, Matsuda N, Liu D, Hoang QQ, Tsumoto K .Discovery and Optimization of Inhibitors of the Parkinson's Disease Associated Protein DJ-1. ACS Chem Biol：13(9), 2783-2793, 2018.
8. Moriya C, Taniguchi H, Miyata K, Nishiyama N, Kataoka K, Imai K. Inhibition of PRDM14 expression in pancreatic cancer suppresses cancer stem-like properties and liver metastasis in mice. Carcinogenesis. 38(6): 638-648, 2017.
9. Taniguchi H, Hoshino D, Moriya C, et al. Silencing PRDM14 expression by an innovative RNAi therapy inhibits stemness, tumorigenicity, and metastasis of breast cancer. Oncotarget. 8:46856-46874, 2017.

〔学会発表〕（計 14 件）

平成 30 年度

1. 大西 亮輔、長門石 曉、谷口 博昭、津本 浩平 「転写調節因子 PRDM14 の天然変性領域と EED 間における物理化学的相互作用解析」 第 41 回 日本分子生物学会年会 11/29/2018 パシフィコ横浜
2. 谷口博昭、森谷千春、今井浩三 「乳がん細胞株において PRDM14 はﾋｰﾄｼｮｯｸ蛋白 HSP90α と GRP78 と直接的に相互作用する」 第 76 回日本癌学会学術総会 09/29/2018 大阪国際会議場
3. 谷口博昭 「革新的ナノマシンとｷﾒﾗ型 siRNA による悪性腫瘍治療法: 基礎研究から研究開発まで」 シンポジウム 第 27 回日本がん転移学術集会･総会 07/19/2018 メルパルク横浜
4. Taniguchi H, Moriya C, Akinaga S, Kataoka K, and Imai K. PRDM14 silencing by siRNA combined with an innovative nanoparticle reduced breast tumor formation and metastasis in vivo. AACR Annual Meeting 2018, Chicago, Illinois. Apr 17, 2018.

平成 29 年度

1. 森谷千春、谷口博昭、今井浩三 「膵臓がんの癌幹細胞様形質を調節する PRDM14 は慢性膵炎によって発現誘導される」 ポスター 第 76 回日本癌学会学術総会 09/29/2017 パシフィコ横浜

2. 谷口博昭、森谷千春、山本博幸、今井浩三 「乳がん細胞株における PRDM14 分子による遺伝子発現のエピジェネテックな制御」ポスター 第 75 回日本癌学会学術総会 10/07/2017 パシフィコ横浜
3. 森谷千春、谷口博昭、今井浩三 「癌幹細胞様形質に関わる PRDM14 を標的とした siRNA 投与によるすい臓癌細胞株の皮下腫瘍･肝転移抑制効果」 ポスター 第 26 回日本がん転移学術集会･総会 07/27/2017 大阪国際会議場
4. 谷口博昭、森谷千春、山本博幸、今井浩三 「遺伝子改変マウスによる転写因子 Prdm14 の分子標的としての有効性評価」 ポスター 第 26 回日本がん転移学術集会･総会 07/27/2017 大阪国際会議場

平成 28 年度

1. 五十嵐央祥、谷口博昭、森谷千春、斎藤杏里 「転写因子 X は大腸癌の幹細胞性を誘導し悪質形質を促進する」 ポスター 第 75 回日本癌学会学術総会 10/06/2016 パシフィコ横浜
2. 森谷千春、谷口博昭、今井浩三 「PRDM14 標的 SiRNA は膵管癌のがん幹細胞様形質を抑制し、肝転移を減少させる」 ポスター 第 75 回日本癌学会学術総会 10/06/2016 パシフィコ横浜
3. 谷口博昭、森谷千春、山本博幸、今井浩三 「PRDM14 発現抑制による乳腺腫瘍の形成･転移の抑制と PRDM14 新規腫瘍マーカーとしての可能性」ポスター 第 75 回日本癌学会学術総会 10/07/2016 パシフィコ横浜
4. 森谷千春、谷口博昭、今井浩三 「PRDM14 を標的とした siRNA 投与による膵臓癌悪性形質抑制と miRNA 発現調整の関与」 ワークショップ 第 25 回日本がん転移学術集会･総会 07/21/2016 米子コンベンションセンター
5. 谷口博昭、森谷千春、山本博幸、今井浩三 「PRDM14 分子のがん形質への関与と核酸製剤による分子標的治療法」 ポスター 第 25 回日本がん転移学術集会･総会 07/21/2016 米子コンベンションセンター
6. 谷口博昭 「転写因子 PRDM14 分子の乳がん形質への関与と核酸製剤による分子標的治療への応用」 ポスター 第 53 回日本臨床分子医学会 04/15/2016 東京国際フォーラム

〔図書〕（計 1 件）

谷口博昭．「革新的核酸創薬を用いた難治性がんの治療と小児固形腫瘍への展望」日本小児血液・がん学会学会誌　54 巻 3 号 p．187-193　(2017)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 2 件）

名称：PRDM14 発現を確認する方法
発明者：今井浩三、前佛均、谷口博昭、宮城洋平
権利者：東京大学、発明者
種類：特許
番号：特願 2017-185200
出願年：平成 29 年
国内外の別： 国内

○取得状況（計 1 件）

名称：がん幹細胞分子マーカー
発明者：谷口博昭、今井浩三、片岡一則、西山伸宏、宮田完二郎、前田芳周
権利者：東京大学、発明者
種類：特許
番号：特願 2015-033381
出願年：平成 26 年
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等 なし

６．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：長門石　曉

ローマ字氏名：Satoru Nagatoishi

所属研究機関名：東京大学

部局名：医科学研究所
職名：特任准教授
研究者番号（8 桁）：30550248

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。