

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K16634

研究課題名(和文)新規阻害剤に基づく酸化還元調節酵素を介した発癌分子機序解明

研究課題名(英文)Elucidation of oncogenic molecular mechanism mediated by redox regulatory enzyme based on novel inhibitor

研究代表者

野村 尚生(NOMURA, Takao)

北海道大学・薬学研究院・特任助教

研究者番号：90597840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体ストレスタンパク質の一種である標的とした酸化還元調節酵素は、正常細胞に比べ種々の癌細胞株で高発現している。過剰発現系およびRNA干渉を用いたノックダウン解析から、癌化、さらに癌幹細胞形成に重要な役割を果たしていることが判明した。この酵素誘導性の癌化および癌幹細胞形成は各組織で普遍的に起きている可能性が高く、この癌化および癌幹細胞形成メカニズムの解明により新しい創薬シーズの発見や、最終的には癌幹細胞の撲滅・癌根治につながることを期待される。また、次世代シーケンサーを用いた解析から、分化に関与する転写因子だけでなく、複数のミトコンドリア関連タンパク質を制御していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We focused on the oxidation-reduction regulatory protein which is one of the endoplasmic reticulum stress protein. This protein was highly expressed in various cancer cell lines as compared with normal cells. From overexpression analysis and knockdown analysis using RNA interference, it plays an important role in tumorigenesis and furthermore, cancer stem cell formation. It is highly probable that these effects caused by our target protein are universally occurring in each tissues. by elucidating the mechanisms of these effects, it is expected to generate novel anticancer drugs or therapies. Moreover, we found the transcription factors involved in the differentiation, such as FOX and RUNX, and several mitochondrial related proteins by using next generation sequencer analysis.

研究分野：タンパク質・ペプチド化学

キーワード：癌 癌幹細胞 酸化還元 小胞体ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

標的とした酸化還元調節酵素は酸素を消費して、様々なタンパク質のジスルフィド結合形成を触媒する酸化還元酵素の調節タンパク質として働き、小胞体内でのタンパク質の成熟に重要な役割を担っている。正常組織と比較して酸化還元調節酵素が種々の癌細胞株および癌組織において高発現していることを確認した。一方で、RNA 干渉による酸化還元調節酵素のノックダウンによって腫瘍増殖能の減少が見られたことから、腫瘍形成において酸化還元調節酵素の重要性が明確となり、酸化還元調節酵素の高発現によって腫瘍増殖能が亢進することが明らかとなった。当初、この酸化還元調節酵素は腫瘍増殖において、ジスルフィド結合を有する血管内皮増殖因子 VEGF などの増殖因子産生制御に直接的役割を果たしていると考えていたが、共同研究グループの田村らがケモカインの産生に関与していることを報告し、免疫系に働き血管新生を誘導していることを示した [1]。酸化還元調節酵素の制御は薬剤耐性・転移に関与する癌幹細胞への制癌効果も大いに期待できる。腫瘍は恒常的な低酸素環境に曝されていることを考えると、酸化還元調節酵素の発現増強による新生血管の誘導は理にかなっているが、一方で酸化還元調節酵素の発現に依存性が高い腫瘍にとってはアキレス腱となる。つまり、酸化還元調節酵素の機能発現を抑制することで腫瘍増殖・転移を制御でき、癌の根治につながることを示唆している。

### 2. 研究の目的

現在まで多数の酸化還元調節酵素機能についての報告がなされているが、癌への関与を示す研究報告は他のグループからはほとんどなされていない。2005 年に Kesshet らによってこの酸化還元調節酵素が仲介する Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) による血管新生；発癌メカニズムがただ一報のみ提唱されている [2]。これは酸化還元調節酵素の過剰発現により基質である細胞内の酸素が過剰消費され低酸素状態を誘導し、転写因子である HIF-1 が活性化され、VEGF の誘導を介して新生血管が癌細胞に張り巡らされ癌増殖能に著しい亢進を引き起こす経路である。申請者は酸化還元調節酵素を有用な創薬標的と見なし、現在報告されている阻害剤を探索したところ、Ron らによって酸化還元調節酵素阻害剤の報告がなされていた [3]。この報告は酸化還元についてのみ言及しており、さらに低阻害能、高細胞毒性なために有効な阻害剤とは言い難かった。そこで、申請者は 1 万化合物ライブラリーからスクリーニングを行い、新規阻害化合物を同定し、それらの構

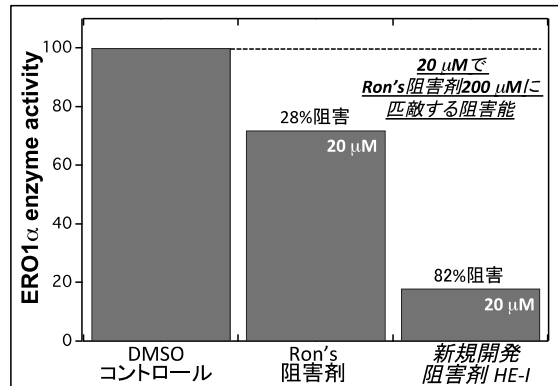


図 1 新規 ERO1α阻害剤の阻害能比較

造展開から Ron らの化合物よりも高い阻害活性および溶解性を有する阻害化合物 HE-I を得た。現在までに、癌幹細胞化は言うまでもなく、癌化についても田村らの提示するケモカイン経路および HIF-1 経路の双方について、その過程の詳細な分子機序は解明されておらず、癌根治のためにはこの酸化還元調節酵素誘導性の発癌分子機序解明が重要である。そこで本研究では、我々が開発した新規酸化還元調節酵素阻害化合物 HE-I (図 1) を用いて ERO1α 酸化還元調節酵素誘導性の癌化および癌幹細胞化の分子機序の解明を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 酸化還元調節酵素関連タンパク質の同定  
—次世代シーケンサーと質量分析計によるタンパク質解析—

酸化還元調節酵素による発癌メカニズムの分子機構解明のために、次世代シーケンサーおよび質量分析装置を用いて酸化還元調節酵素と関連のあるタンパク質の同定を目指す。細胞は酸化還元調節酵素の発現量の多いヒト大腸癌 SW480 細胞株を用いてセルソーターによって調製した癌幹細胞を用いる。蛍光試薬を用いて薬剤排泄能を指標に癌幹細胞様細胞と考えられる細胞を分取し、濃縮した [4]。さらに、この非常に量の少ない細胞群から幹細胞マーカーを用いて分画・培養することで癌幹細胞を得る (使用セルソーター: SH800 (Sony)、細胞系確立済)。この癌幹細胞、HE-I 添加癌幹細胞、および通常の癌細胞から調整された RNA の品質チェック後ラベル化し、CAGE 法によりタンパク質の発現パターン変動を解析することで、HE-I 添加時に細胞内タンパク質発現量などの変化を引き起こしたタンパク質を同定する。用いる解析セットはヒト遺伝子発現用のチップを用いて CAGE 法を行う。また、直接的に酸化還元調節酵素と相互作用しているタンパク質を解析するために、HE-I 添加および無添加の癌幹細胞抽出液から酸化還元調節酵素を免疫沈降後、二次元電気泳動により分画し、

HE-I の有無で変化のあったタンパク質バンドを切り出す。タンパク質を含むゲルをトリプシンによる消化後、ゲルからペプチド断片を抽出する。ペプチド断片を UPLC-MS/MS により解析することで、データベース( Mascot, NCI, NIH ) から相互作用タンパク質を同定する。

関連タンパク質の発現量および親和性は HE-I 添加後から細胞抽出を行う時間によって大きく変化することが考えられる。そこで、酸化還元調節酵素阻害により発現量が変化する VEGF をその目安とし、既に VEGF 量が減少する時間を ELISA により解析している ( HE-I 40  $\mu$ M、14 時間で平衡化 )。

### (2) 酸化還元調節酵素ノックアウト細胞の作成

この酸化還元調節酵素による癌化のメカニズム解析のため、すでにノックダウン細胞株を RNA 干渉を用いて作成しているが、最も効率よくノックダウンしている細胞株でも 70%程度、この酸化還元調節酵素の発現を抑制しているに留まっている。そこで、完全にこの酸化還元調節酵素の発現を抑えるため、Crispr/Cas9 を用いたノックダウン細胞を作成し、次世代シーケンサー解析のコントロールとするとともに、癌幹細胞形成能について解析を行った。細胞系はこの酸化還元調節酵素が過剰発現している大腸癌細胞株 SW480 および乳癌細胞株 MDA-MB-231 を用いて、ノックアウト細胞を作成した。また、SW480 はすでに癌幹細胞様細胞を分取しているが、MDA-MB-231 から同様な癌幹細胞様細胞を分取するべく、セルソーターを用いて上述のフローサイトメトリー・セルソーティングを行い、癌幹細胞様細胞を分取した。

### (3) 酸化還元調節酵素阻害剤 HE-I による癌幹細胞形成能解析

作成した癌幹細胞並びにノックアウト細胞を用いてセルソーターによる癌幹細胞形成能解析を行った。この解析では、上述の解析だけでなく、細胞表面マーカーを用いて癌幹細胞を定量した。SW480 系の細胞を用いた場合、癌幹細胞マーカーとして、CD133 および CD26 を用いた。さらに乳癌における幹細胞マーカーとして、CD44 および CD24 を用いて、蛍光標識抗体により複合的に癌幹細胞形成能を解析した。また、細胞生存アッセイを行い HE-I による効果が癌幹細胞にも作用するか解析した。

## 4 . 研究成果

### (1) 酸化還元調節酵素関連タンパク質の同定-次世代シーケンサーと質量分析計によるタンパク質解析-

まず、直接的に酸化還元調節酵素と相互作用するタンパク質を同定するため、SW480 細胞を用いて細胞抽出液に His タグをもつ精製した酸化還元調節酵素を添加し、インキュベーション後、Ni-NTA 樹脂である HisTrap により酸化還元調節酵素を回収し、それに結合しているであろうタンパク質を用いて、電気泳

機能クラスター	タンパク質数
転写因子	3
トランスポーター関連	4
ミトコンドリア関連	7

\* 有意差高い30種のタンパク質中

### 表1 ERO1 $\alpha$ 阻害によるタンパク質変動

動し、その後、自作の等電点電気泳動ゲル自作の SDS-PAGE ゲルにより、二次元電気泳動を行なった。その結果、非常に多くのタンパク質が含まれていることが判明し、分離が難しいことがわかった。そこで、SDS-PAGE ゲルを市販の 5-20% のグラジエントゲルに変更して再度 SDS-PAGE を行なったところ、ある程度分離可能なタンパク質バンドを検出可能であることが判明した。そこで、比較対象サンプルとして、すでに作成している癌幹細胞様細胞を用いて、同様の解析を行ったところ、分離可能な領域に変化はなかった。HisTrap を磁気ビーズに変更し、洗浄を入念に行うことで、非結合のタンパク質を除去したが、同条件ではコントロールと比較可能なバンドは検出できなかった。また、二次元電気泳動の結果から、まだ分離が困難であり、非常に多くのタンパク質と相互作用していることが判明した。そこで、内在性の酸化還元調節酵素を分取可能な系を構築中である。

次世代シーケンサーを用いた CAGE 法による解析では、初めに RNeasy mini kit ( Qiagen ) を用いて、通常の SW480 および癌幹細胞様細胞から RNA の抽出を行った。品質チェック後、CAGE 法を行った。その結果、癌幹細胞様細胞では SW480 に比べて FOX や RUNX といった複数の転写因子が活性化しており、また、ミトコンドリアに局在する複数のタンパク質において発現量に変化が見られることが判明した ( 表 1 )。さらに、糖鎖関連タンパク質や解糖系に関与する分解酵素や興味深いことに染色体の安定化に関与するタンパク質にも発現変化が起きていることがわかった。

また、癌幹細胞様細胞を用いて、酸化還元調節酵素阻害剤である HE-I を添加した場合、これらの変化のあったタンパク質の多くは逆の発現変化を示したことから、この酸化還

元調節酵素の有無によって発言変化が制御されていることが考えられ、癌幹細胞形成において、この酸化還元調節酵素が重要な役割を示していることが示唆された。

### (2) 酸化還元調節酵素ノックアウト細胞の作成

ノックダウン細胞では比較に不足が出るため、ノックアウト細胞を作成した。Crispr/Cas9 システムを用いて大腸癌細胞株 SW480 から酸化還元調節酵素が発現しない細胞を作成した。また、同様に酸化還元調節酵素が過剰発現している乳癌細胞株 MDA-MB-231 からノックアウト細胞を作成した。さらに、これらのノックアウト細胞を用いて、癌幹細胞形成能解析をフローサイトメトリーにより行なったところ、ノックアウト細胞はその元になった通常のがん細胞に比べて幹細胞数が極めて少ないことが判明した。また、その過程で検出した MDA-MB-231 の癌幹細胞様細胞を抽出し、濃縮することで乳癌幹細胞系を確立した。

### (3) 酸化還元調節酵素阻害剤 HE-I による癌幹細胞形成能解析

作成した癌幹細胞様細胞の HE-I 添加時・非添加時における癌幹細胞形成能解析を解析した。その結果、低濃度の HE-I 存在下では癌幹細胞だと考えられるフラクシオンの量が減少することがわかった。また、この癌幹細胞様細胞の詳細な幹細胞解析のため、細胞表面マーカーである CD133、CD26、CD44 および CD24 を用いてそれぞれ解析を行った。SW480 から分取した癌幹細胞様細胞ではそのマーカーである CD133、CD26 の陽性細胞は増加していることが判明した。しかしながら、MDA-MB-231 から分取した癌幹細胞様細胞では、その幹細胞マーカーであると報告のあった CD44+/CD24-の細胞は増加しておらず、どちらも陰性の細胞しか検出することができなかった。現在、このフローサイトメトリー結果の真偽を確かめるべく、それぞれの抗体が陽性を示す細胞系の準備を行っており、作成次第、解析を進める。また、MDA-MB-231 の癌幹細胞様細胞は他の幹細胞マーカーとして知られるタンパク質も発言が見られなかったことから、MDA-MB-231 の性質であることも考えられ、別の乳癌細胞株である MCF7 を用いて、同様の癌幹細胞様細胞を分取する準備を行っている。

### 引用論文

- [1] Tanaka *et al.* *J. Immunol.* 194, 2004-10, (2015)
- [2] May *et al.* *Oncogene*, 24, 1011-20, (2005)
- [3] Blais *et al.* *J. Biol. Chem.* 285, 20993-1003,

(2010)

- [4] Takubo *et al.* *Cell Stem Cell*, 2, 170-82, (2008)

### 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 5 件)

1. Tokuda E, Nomura T, Ohara S, Watanabe S, Yamanaka K, Morisaki Y, Misawa H, Furukawa Y, A copper-deficient form of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase as an early pathological species in amyotrophic lateral sclerosis., *Biochim. Biophys. Acta.*, 査読あり、Vol.1864, No.6, 2018, pp. 2119-2130, DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.03.015

2. Furukawa A, Kakita K, Yamada T, Ishizuka M, Sakamoto J, Hatori N, Maeda N, Ohsaka F, Saitoh T, Nomura T, Kuroki K, Nambu H, Arase H, Matsunaga S, Anada M, Ose T, Hashimoto S, Maenaka K, Structural and thermodynamic analyses reveal critical features of glycopeptide recognition by the human PILR $\alpha$  immune cell receptor., *J. Biol. Chem.*, 査読あり、Vol.292, No.51, 2017, pp.21128-21136, DOI: 10.1074/jbc.M117.799239.

3. Matsumaru T, Inai M, Ishigami K, Iwamatsu T, Maita H, Otsuguro S, Nomura T, Matsuda A, Ichikawa S, Sakaitani M, Shuto S, Maenaka K, Kan T, Divergent synthesis of kinase inhibitor derivatives, leading to discovery of selective Gck inhibitors., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 査読あり、Vol.27, No.10, 2017, pp.2144-2147, DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.03.055.

4. Tokuda E, Anzai I, Nomura T, Toichi K, Watanabe M, Ohara S, Watanabe S, Yamanaka K, Morisaki Y, Misawa H, Furukawa Y, Immunochemical characterization on pathological oligomers of mutant Cu/Zn-superoxide dismutase in amyotrophic lateral sclerosis., *Mol. Neurodegener.*, 査読あり、Vol.12, No.1, 2017, DOI: 10.1186/s13024-016-0145-9.

5. Kamada R, Toguchi Y, Nomura T, Imagawa T, Sakaguchi K, Tetramer formation of tumor suppressor protein p53: Structure, function, and applications., *Biopolymers.*, 査読あり、Vol.106, No.4, 2016, pp.598-612, DOI: 10.1002/bip.22772.

[学会発表](計 5 件)

1. 野村尚生 他、日本薬学会第 138 年会( 金沢 ) HSV-1 感染における糖ペプチドと免疫受容体 PILRa 相互作用解析、2018
2. 野村尚生 他、第 5 4 回ペプチド討論会、Interaction Detail between Sugar Chain on HSV1 Glycoprotein with Immune Receptor PILRa、2017
3. 野村尚生 他、日本薬学会第 137 年会( 仙台 ) 抗がん剤を目指した若手研究者連携による創薬スクリーニング、2017
4. 野村尚生 他、第 5 3 回ペプチド討論会、Effect of Sugar Chain on Interaction of HSV1 Glycoprotein with Immune Receptor PILRa、2017
5. 野村尚生 他、ケミカルバイオロジー学会第 1 1 回年会、小胞体ストレス応答性酸化還元調節酵素を標的とした抗癌剤スクリーニング、2017

〔図書〕(計 1 件)

Senda, T. (EDT), Maenaka, K. (EDT); Furukawa, A., Maenaka, K., Nomura, T., Springer, Purification Using Affinity Tag Technology、2016、pp. 67-81、DOI: 10.1007/978-4-431-56030-2\_4

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 尚生 (NOMURA, Takao)

北海道大学・大学院薬学研究院・特任助教  
研究者番号：90597840

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし

(4) 研究協力者  
なし