

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07230

研究課題名(和文) ゴルジ阻害による抗がん効果を規定する細胞表面・分泌タンパク質の発現調節機構の解明

研究課題名(英文) Identification of cell surface/secreted proteins that affect antitumor activity upon treatment with a Golgi-disruptor, M-COPA

研究代表者

大橋 愛美 (Ohashi, Yoshimi)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子薬理部・主任研究助手

研究者番号：50727427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゴルジ体機能阻害剤M-COPAは、三次元培養下のヒト胃がん細胞株MKN-1に対し、効率的にスフェロイドを崩壊させる独自な特徴を持つ。M-COPAにより顕著に発現抑制される細胞表面分子をスクリーニングしたところ、特定のインテグリン分子を見出した。siRNAや中和抗体にて当該インテグリンの機能を阻害したところ、スフェロイド形成能を喪失した。また、M-COPA添加により当該インテグリンの特異的リガンドとなる細胞外マトリクス分子の分泌が抑制された。以上の結果から、上記インテグリン経路の阻害がM-COPAによる抗がん効果に重要であり、胃がん治療の標的候補として期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゴルジ体は、翻訳されたタンパク質が糖鎖修飾やプロセッシングを経て機能タンパク質として成熟し、細胞内・細胞外・細胞表面の予定された正しい部位に輸送される過程を調節している。スフェロイド培養は、単層培養と比較し、細胞接着が三次元に形成され、in vivoの腫瘍を模倣していると考えられる。本研究では、ゴルジ体阻害剤によって特定のインテグリンの細胞表面発現やそのリガンドとなる細胞外マトリクス分子の細胞外への分泌を抑制し、その結果、腫瘍塊が崩壊するというところを見出した。本研究の成果により、ゴルジ体阻害、ないし別の方法で当該シグナルを抑制することが、がん治療薬開発の新たな戦略となりうることが示された。

研究成果の概要(英文)： M-COPA, a Golgi disruptor that we previously developed, efficiently destroyed tumor spheroids of human gastric cancer cell line MKN1 under the 3-dimensional culture conditions. To clarify the antitumor mode of action of M-COPA in 3D culture condition, we screened cell surface proteins downregulated upon treatment with M-COPA by flow cytometry. As a result, we found one of the integrin family proteins significantly downregulated by M-COPA. Interestingly, functional inhibition of the integrin by the use of neutralizing antibody or siRNA efficiently suppressed sphere formation of MKN-1. Moreover, M-COPA downregulated one of the extracellular matrix proteins that serves as a specific ligand for the integrin identified above. These results indicated that integrin signal could be a potential target for gastric cancer therapy and M-COPA could be a promising candidate to this aim.

研究分野：腫瘍学

キーワード：ゴルジ体 Arf1

## 1. 研究開始当初の背景

ゴルジ体は、遺伝情報が DNA から RNA を経てタンパク質に翻訳された後、「糖鎖修飾やプロセッシングを経て機能タンパク質として成熟し、細胞内・細胞外・細胞表面の予定された正しい部位に輸送される過程」を調節している。がんにおいては、ゴルジ体に局在するタンパク質糖転移酵素の活性化、およびタンパク質の糖鎖修飾異常が報告され、異常糖鎖が腫瘍マーカーとして利用されている<sup>1,2</sup>。また、ゴルジ体機能を調節する ADP リボシル化因子 1 (ARF1) の活性化阻害剤として同定された Brefeldin A は、がん細胞の増殖を抑制することが知られており<sup>3</sup>、ARF1 が抗がん剤の分子標的として有望であると考えられていた。

当研究室ではこれまでに、2-メチルコプロフィリンアミド (M-COPA、別称 AMF-26) が Brefeldin A と同様に ARF1 を阻害してゴルジ体構造を破壊すること、*in vivo* マウスゼノグラフトモデルで一部のがん細胞に選択的な抗がん作用を示すことを明らかにした<sup>4</sup>。しかし、本化合物がどのようながんにどのような分子機序で抗がん効果を示すかは、完全に理解されてはいない。

がん細胞の多くは、遺伝子異常によりがん遺伝子産物である受容体チロシンキナーゼ (RTK) の機能亢進が起きている。これらのがん細胞の増殖・生存はがん細胞の表面に発現した RTK 分子に依存しており (オンコジーンアディクション)、これらを標的としたチロシンキナーゼ阻害剤や抗体薬が抗がん剤として開発され、大きな成果を挙げている。しかし長期間の投与により耐性化が起きることが知られている。我々はこれまでに、MET や FGFR2 などの RTK を過剰発現する複数の難治性胃がん由来細胞株や EGFR 阻害薬に耐性を獲得したヒト肺がん細胞株に対して、M-COPA が RTK 分子の細胞表面への輸送を抑制することにより選択的な抗がん活性を示すことを見出した<sup>5,6</sup>。一方、RTK に遺伝子異常が認められないがん細胞株でも、特に三次元培養下で M-COPA に高感受性を示すものがあり、RTK の輸送阻害に依存しない M-COPA による抗がんメカニズムの存在が示唆されていた。細胞表面分子の発現量は、*de novo* タンパク質がゴルジ体によるプロセッシング・輸送を受けて増加するだけでなく、細胞外ドメインがプロテアーゼにより切断 (シェディング) されたり、エンドサイトーシスにより細胞内に取り込まれ分解あるいはリサイクリングされたりすることにより減少し、複雑な調節を受けている。ゴルジ体阻害剤 M-COPA を用いることにより、がん細胞における各種表面タンパク質の細胞表面発現や分泌タンパク質の細胞外分泌におけるゴルジ体機能の関与を明らかにすることができれば、ゴルジ体を標的とする薬剤を用いた画期的ながんの新しい治療法の開発に重要な知見となると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゴルジ体機能阻害剤による RTK 非依存的な抗がん機構を明らかにする目的で、細胞表面・分泌タンパク質のプロセッシングや輸送に与えるゴルジ体阻害剤の影響を解析するとともに、

抗がん効果への関与を検討した。

### 3. 研究の方法

ヒト細胞表面分子アレイ (BD Bioscience) を用い、単層培養下がん細胞株における M-COPA 曝露前後の細胞表面発現をフローサイトメトリー (FCM) によりプロファイリングした。また、動物モデルにおける抗がん効果を模倣した三次元培養を、PrimeSurface 低吸着プレート (住友ベークライト) を用い実施し、薬剤曝露時の形状変化 (顕微鏡観察) や増殖阻害 (Celltiter-glo 3D Cell Viability Assay、Promega) を、M-COPA と一般的な抗がん剤 (Cisplatin、5-FU) で比較した。上記細胞表面発現変動を示した分子について、網羅的に三次元培養時の M-COPA 曝露による細胞表面発現変動を FCM により解析した。またこれらの分子の発現を siRNA (Silencer® Select、Thermo Fisher Scientific) にて発現抑制し、スフェロイド形成能に与える影響を評価した。また、当該分子の中和抗体を用いた機能阻害により、スフェロイド形成能に与える影響を評価した。細胞内シグナル伝達分子の活性化に対する影響は、抗リン酸化タンパク質抗体を用いたウエスタンブロット法にて評価した。また、分泌タンパク質の培地中への分泌量は ELISA 法にて評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) ゴルジ機能阻害剤により発現変動する細胞表面タンパク質の探索とその発現調節機構の解明

ヒト細胞表面分子アレイ (BD Bioscience 社) を用い、単層培養下 5 種類のヒトがん細胞株におけるゴルジ機能阻害剤 M-COPA 曝露前後の細胞表面分子の発現変動をフローサイトメトリー (FCM) により解析した。細胞表面に発現するタンパク質は、ゴルジ体を介して輸送小胞により細胞表面まで運搬されると考えられ、ゴルジ機能を阻害することにより、すべての表面分子の発現低下を期待した。ところが、意外なことに、細胞表面発現が顕著に抑制されたのは一部のタンパク質に限られ、残りの分子は発現低下が認められなかった。一例として、受容体チロシンキナーゼ (RTK) のうち MET や FGFR などは細胞表面発現が顕著に抑制された一方、ERBB2 などまったく抑制されない RTK も見出された。このことは、*de novo* に生産されたタンパク質が細胞表面まで運搬され、発現するまでの分子機構が、タンパク質ごとに異なることを反映しているものと考えられた。また細胞接着分子の発現低下も認められた。

#### (2) 三次元培養系を用いた細胞表面タンパク質発現と抗がん効果の関連分析

*in vivo* の微小環境を模倣するためのスフェロイド培養系を構築するために、当研究室で保持する JFCR39 がん細胞パネルについて低吸着 U 底プレートにてスフェア形成する細胞のスクリーニングを行い、23 細胞株を同定した。M-COPA 曝露後の変化を観察したところ、*in vivo* で M-COPA 感受

性を示すヒト胃がん細胞株 MKN1 スフェロイドの形状は、細胞増殖抑制を起こす濃度より低濃度の M-COPA 曝露により崩壊すること (図 1 MKN1 スフェロイド形状に対する M-COPA の効果)、その感受性はスフェア形成する細胞株の中で最も高いことを見出した。この現象は他の代表的な抗がん剤曝露では観察されなかったことから、M-COPA の抗がん効果の特徴と考えられた。そこでスフェロイド培養下 MKN-1 細胞表面に発現する細胞接着分子のうち M-COPA 曝露により発現低下する分子を FCM により探索した。その結果、特定のインテグリン分子のみスフェロイド崩壊濃度域で発現が低減されることを見出した (図 2

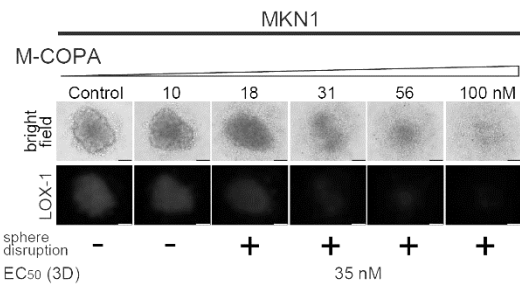


図 1 MKN1 スフェロイド形状に対する M-COPA の効果

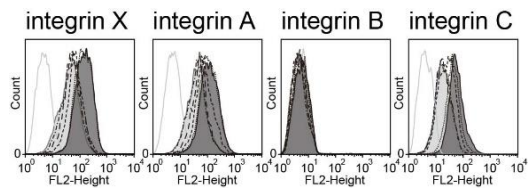


図 2 M-COPA による MKN1 スフェロイドのインテグリン X の細胞表面発現抑制

M-COPA による MKN1 スフェロイドのインテグリン X の細胞表面発現抑制)。M-COPA 曝露後のスフェロイド崩壊と上記インテグリンの表面発現低下の因果関係を検討するために、siRNA を用いて当該インテグリンを含む様々なインテグリン分子の発現を抑制した時のスフェロイド形成能を評価した。その結果、当該インテグリンおよびヘテロ 2 量体を形成するインテグリン Y の発現をノックダウンさせたときのみ、スフェロイド形成能が喪失した。また、上述のインテグリン X/Y の中和抗体を添加して分子の機能を阻害したところ、siRNA 処理時と同様にスフェロイドの形成を認めなかった (図 3 インテグリンの発現抑制または中和抗体による機能抑制が引き起こす MKN1 スフェロイド形成能の喪失)。以上の結果から、M-COPA は特定のインテグリンの表面発現抑制することにより、スフェロイド崩壊を起こすと示唆された。

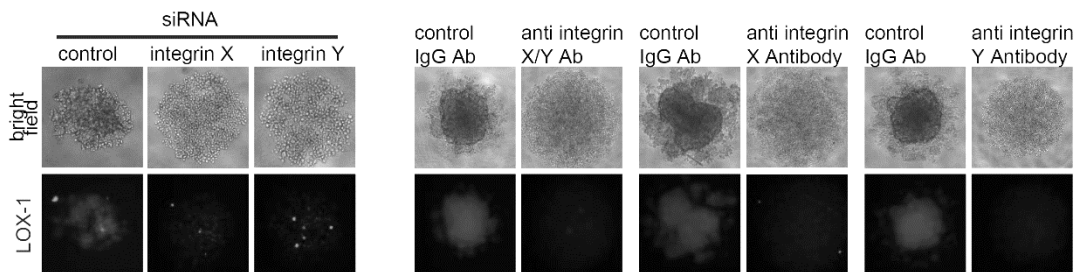


図 3 インテグリンの発現抑制または中和抗体による機能抑制が引き起こす MKN1 スフェロイド形成能の喪失

このインテグリン 2 量体 (X/Y) は、細胞外マトリクス分子の受容体として働き、増殖シグナルに関与することが知られている。そこでインテグリンシグナル伝達パスウェイ下流に位置する分子の活

性化状態を明らかにしようと試みた。ウェスタンブロット解析の結果、下流に位置する Src タンパク質が、単層培養（2D）下に比べて三次元培養（3D）下で著しく活性化（リン酸化）され、スフェロイド崩壊濃度域でそのリン酸化が抑制されること、さらにその下流の AKT-S6 経路と MEK-ERK 経路という2つの生存に重要なパスウェイ分子のリン酸化が低減されることを見出した。（図4 M-COPA によるインテグリン下流シグナル伝達分子の活性化抑制）。さらに MKN1 はインテグリン 2 量体のリガンドとなる細胞外マトリクス（ECM）分子を分泌することが知られていたため ELISA法で調べたところ、M-COPA によるリガンド分子の分泌阻害が認められた。

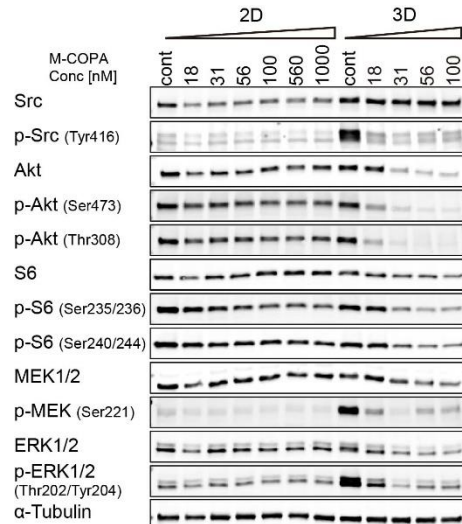


図4 M-COPA によるインテグリン下流シグナル伝達分子の活性化抑制

以上の結果から、ヒト胃癌細胞株 MKN-1 において、M-COPA は特定のインテグリン分子の細胞表面発現抑制ならびに ECM 分子の分泌抑制を介して抗がん効果を示すものと考えられた（図5 M-COPA によるインテグリンの表面発現阻害

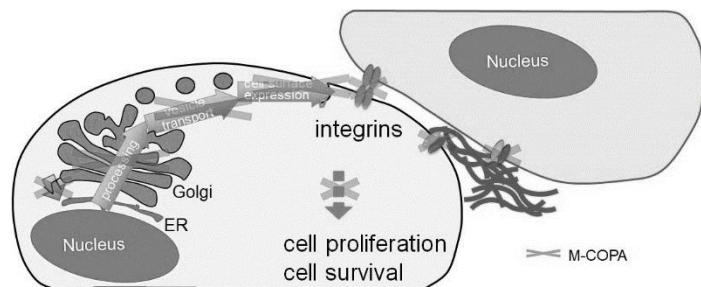


図5 M-COPA によるインテグリンの表面発現阻害を介した抗がん機構

を介した抗がん機構概念図)。また、これらのインテグリンシグナル伝達経路は、胃癌治療の標的候補として期待された。

（引用文献）

- 1 Zhao YY et al., Cancer Sci. 2008
- 2 Contessa JN et al., Clin Cancer Res. 2010
- 3 Sausville EA et al., Cancer J Sci Am. 1996
- 4 Ohashi Y et al., J Biol Chem. 2012
- 5 Ohashi Y et al., Cancer Res. 2016
- 6 Ohashi Y et al., Oncotarget 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 1件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Benabdi S, Peurois F, Nawrotek A, Chikireddy J, Caneque T, Yamori T, Shiina I, Ohashi Y, Dan S, Rodriguez R, Cherfils J, Zeghouf M.              | 4. 巻<br>56(38)          |
| 2. 論文標題<br>Family-wide Analysis of the Inhibition of Arf Guanine Nucleotide Exchange Factors with Small Molecules: Evidence of Unique Inhibitory Profiles. | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>Biochemistry (Mosc)  | 6. 最初と最後の頁<br>5125-5133 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.1021/acs.biochem.7b00706  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する            |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Ohashi Y, Okamura M, Katayama R, Fang S, Tsutsui S, Akatsuka A, Shan M, Choi HW, Fujita N, Yoshimatsu K, Shiina I, Yamori T, Dan S.    | 4. 巻<br>9(2)            |
| 2. 論文標題<br>Targeting the Golgi apparatus to overcome acquired resistance of non-small cell lung cancer cells to EGFR tyrosine kinase inhibitors. | 5. 発行年<br>2017年         |
| 3. 雑誌名<br>Oncotarget   | 6. 最初と最後の頁<br>1641-1655 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.18632/oncotarget.22895  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大橋愛美、岡村睦美、赤塚明宣、椎名勇、旦慎吾             |
| 2. 発表標題<br>スフェロイド培養下におけるゴルジ体阻害剤M-COPAによる抗がん効果 |
| 3. 学会等名<br>第23回 日本がん分子標的治療学会                  |
| 4. 発表年<br>2019年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大橋愛美、武内一真、岡村睦美、赤塚明宣、椎名勇、吉松賢太郎、旦慎吾  |
| 2. 発表標題<br>Potential antitumor effects of a Golgi disrupting agent, M-COPA, via targeting cell-extracellular matrix interaction under the spheroid culture conditions |
| 3. 学会等名<br>2019AACR Annual Meeting (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中伯享、山崎佳波、宇野佑子、大橋愛美、西村由美子、澤匡明、旦慎吾  |
| 2. 発表標題<br>Identification of a lung adenocarcinoma cell line addicted to ERBB4, an actionable target for cancer therapy |
| 3. 学会等名<br>2019AACR Annual Meeting (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中伯享、山崎佳波、宇野佑子、大橋愛美、西村由美子、澤匡明、旦慎吾  |
| 2. 発表標題<br>Identification of ERBB4 as an actionable target by using selective anticancer effect of EGFR family tyrosine kinase inhibitors |
| 3. 学会等名<br>第11回 日米がん合同会議 (国際学会)   |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中伯享、山崎佳波、宇野佑子、大橋愛美、西村由美子、澤匡明、旦慎吾               |
| 2. 発表標題<br>ゲフィチニブ感受性を起点としたErbB4依存性肺がん細胞株及びその増殖阻害薬の同定       |
| 3. 学会等名<br>2018年度新学術領域研究学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】成果発表会 |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>大橋愛美、武内一真、岡村睦美、赤塚明宣、椎名勇、吉松賢太郎、旦慎吾    |
| 2. 発表標題<br>スフェロイド培養下におけるゴルジ体阻害阻害剤M-COPAによる抗がん効果 |
| 3. 学会等名<br>第77回 日本癌学会                           |
| 4. 発表年<br>2018年                                 |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>田中伯享、山崎佳波、大橋愛美、西村由美子、旦慎吾                |
| 2. 発表標題<br>HER4依存性細胞株におけるHERファミリーチロシンキナーゼ阻害剤の抗がん効果 |
| 3. 学会等名<br>第77回 日本癌学会                              |
| 4. 発表年<br>2018年                                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>赤塚明宣、岡村睦美、大橋愛美、椎名勇、吉松賢太郎、旦慎吾 |
| 2. 発表標題<br>新規ゴルジ体阻害剤M-COPAに対する獲得耐性機構の解析 |
| 3. 学会等名<br>第22回 日本がん分子標的治療学会            |
| 4. 発表年<br>2018年                         |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>田中伯享、大橋愛美、旦慎吾                  |
| 2. 発表標題<br>ErbB4に依存した増殖を示す肺がん細胞株とその治療薬の同定 |
| 3. 学会等名<br>第22回 日本がん分子標的治療学会              |
| 4. 発表年<br>2018年                           |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大橋愛美、岡村睦美、片山量平、赤塚明宣、藤田直也、椎名勇、吉松賢太郎、矢守隆夫、旦慎吾 |
| 2. 発表標題<br>新規ゴルジ阻害剤M-COPAのEGFR阻害剤耐性肺がんに対する抗がん効果        |
| 3. 学会等名<br>第76回 日本癌学会                                  |
| 4. 発表年<br>2017年  |



|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>大橋愛美、岡村睦美、片山量平、赤塚明宣、藤田直也、椎名勇、吉松賢太郎、矢守隆夫、旦慎吾 |
| 2. 発表標題<br>新規ゴルジ阻害剤M-COPAのEGFR-TKI耐性がんに対する抗がん効果        |
| 3. 学会等名<br>第21回 日本がん分子標的治療学会                           |
| 4. 発表年<br>2017年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>赤塚明宣、岡村睦美、大橋愛美、椎名勇、吉松賢太郎、矢守隆夫、旦慎吾 |
| 2. 発表標題<br>新規ゴルジ体阻害剤M-COPAが抗腫瘍効果を示すがん細胞の探索   |
| 3. 学会等名<br>第21回 日本がん分子標的治療学会                 |
| 4. 発表年<br>2017年                              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|  |                           |                       |    |