

令和 3 年 5 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07263

研究課題名（和文）LIX1L蛋白質発現癌細胞でのRNA翻訳伸長反応制御による標的治療薬開発研究

研究課題名（英文）Research and development of targeted therapeutic agents by controlling RNA translation elongation reaction in LIX1L protein-expressing cancer cells

研究代表者

中村 悟己（NAKAMURA, SATOKI）

浜松医科大学・医学部・特任研究員

研究者番号：20377740

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）： 癌細胞特異的に発現するLIX1L蛋白質と翻訳伸長因子EEF1G蛋白質の結合を特異的に阻害する、LIX1L発現癌特異的な新規治療薬開発の基礎的研究を行いました。LIX1LとEEF1Gの結合は様々な癌細胞増殖に関与する蛋白質の翻訳に関与しており、両蛋白質の結合阻害が、がん細胞増殖に必要な蛋白質の翻訳の制御を介して、癌治療に有効であると示されました。

また、LIX1Lおよび EEF1Gの2種の蛋白質の結合を、NanoBitシステムを用いてcell baseで解析可能な発現細胞株を樹立し、HTSスクリーニング系の構築ができました。今後、化合物ライブラリーを用いた候補化合物の探索を行う予定です。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌特異的に発現する蛋白質LIX1Lを我々が同定し、様々な癌でLIX1L蛋白質の発現が確認されました。また、その機能解析からLIX1Lと結合する翻訳伸長因子EEF1Gとの結合が癌細胞の増殖に重要であることが明らかとなりました。以上のことから、両蛋白質の結合阻害が癌細胞における翻訳伸長反応の制御を介した新しい癌治療薬の開発に展開できると考えられます。また、候補化合物を探索するためのスクリーニング系の構築も作成しました。今後新しい作用機序を持つ癌治療薬が癌治療の一つに選択肢として加わる可能性が推測されます。

研究成果の概要（英文）： We performed the basic research on the development of new therapeutic agents specific to LIX1L-expressing cancer by specifically inhibiting the binding between the LIX1L protein, which specifically expressed in cancer cells, and the translation elongation factor EEF1G protein. The binding of LIX1L and EEF1G is involved in the translation of proteins involved in various cancer cell proliferation, and inhibition of the binding of both proteins is effective for cancer treatment through the control of the translation of proteins required for cancer cell proliferation.

In addition, we established expression cell lines, which can analyze the binding of two proteins, LIX1L and EEF1G, on a cell base using the NanoBit system, and constructed an HTS screening system. In the future, we plan to search for candidate compounds using the compound library.

研究分野：腫瘍病理

キーワード：がん特異的遺伝子 翻訳伸長反応 スクリーニング系

1. 研究開始当初の背景

癌の発生機序の解明、新たな治療薬や治療方法に関する様々な研究が行われています。発癌機序の解明領域では、分子生物学的手法の著しい進歩により癌細胞の増殖、アポトーシス耐性化等をつかさどる様々な driver oncogene が発見され、癌治療分野では、driver oncogene に対する分子標的治療薬や、免疫機能を活性化する治療薬、癌遺伝子解析に基づくゲノム医療への展開が期待されています。分子標的治療薬により標的遺伝子や蛋白質を有した癌は著明に縮小し、延命効果が得られますが、標的治療薬による癌治療の成功例はまだ特定の遺伝子、エピジェネティックや代謝等を原因とする癌に限られています。我々は、多種類の癌に共通して癌特異的に発現する LIX1L(Lix1 homolog-Like)蛋白質を見出し、LIX1L 蛋白質の癌細胞における分子生物学的な役割を明らかにするとともに、その阻害剤として相同性ペプチド PY136 を合成し、LIX1L 蛋白質を発現する癌において抗腫瘍効果を初めて明らかにしました (Nakamura S. *et al.*, Scientific Reports. 5:13474, 2015)。

胃癌(n=540)、膵臓癌(n=43)、大腸癌(n=50)、卵巣癌(n=50)、腎臓癌(n=58)、乳癌(n=50)、肺癌(n=64)、肝細胞癌(n=47)、食道癌(n=51)、前立腺癌(n=53)、甲状腺癌(n=50)を用いた免疫学的組織染色では、LIX1L 発現陽性はそれぞれ、61.9%、58.1%、56%、52%、50%、46%、45.3%、38.3%、29.4%、24.5%、24%でした。一方、正常組織での発現は認められませんでした。

癌細胞増殖には LIX1L 蛋白質の 136 番目のチロシンのリン酸化が細胞増殖に重要な役割を果たしているため、チロシンのリン酸化を阻害する目的で、“Decoy(おとり)”として LIX1L の 136 番目のチロシンを含む 10 アミノ酸からなる相同性ペプチド PY136 を合成し、25 μ M の濃度で胃癌細胞株 MKN45 において優位な細胞増殖抑制効果が認められました。また、ヌードマウスに胃癌細胞株 MKN45 細胞を移植した担癌マウスでも PY136 投与による腫瘍縮小効果が認められました。

更に、LIX1L 蛋白質の 136 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した変異型(MT)と野生型(WT)を用いてチロシンキナーゼアッセイを行い、ROS1、HCK、ABL1、ABL2、JAK3、LCK、TYR03 の 7 種類の候補キナーゼを同定し、ROS1 のノックダウンにより、LIX1L のリン酸化と癌細胞増殖が抑制され、ROS1 が LIX1L のチロシンリン酸化に関与していることが明らかとなりました。また、LIX1L は RNA 結合ドメインを含むため、RNA と結合することが推測され、LIX1L 抗体で免疫沈降(RIP)後、次世代シーケンサーによる結合 RNA 解析(RIP-RNA assay)を行った結果、いくつかの候補 miRNA との結合が示唆され、さらに、これらの miRNA の標的候補遺伝子もそれぞれ同定する成果が得られました。

以上の結果から、LIX1L 蛋白質は ROS1 チロシンキナーゼによるリン酸化を受け、miRNA との結合を介して癌細胞増殖に必要な遺伝子発現を制御することが推測され、LIX1L 蛋白質の機能を制御することが新しい癌治療の標的となる可能性が示唆されました。

2. 研究の目的

これまでの研究からは、LIX1L 蛋白質がどのような miRNA や mRNA に結合しているかの詳細は不明であり、LIX1L 蛋白質と結合する蛋白質についても不明です。LIX1L 蛋白質を介して、RNA 結合から転写・翻訳を含めた癌細胞内での癌遺伝子の発現制御過程を明らかにする研究が必要であると考えられました。

癌特異的に発現する LIX1L 蛋白質と複合体形成する翻訳伸長因子 EEF1G は様々な RNA と結合することにより RNA の翻訳伸長反応を制御しています。LIX1L 蛋白質の癌細胞増殖促進効果は EEF1G と結合することにより、癌細胞増殖に関連する遺伝子の翻訳伸長反応を介していることが推測されます。従って、LIX1L 発現癌細胞で LIX1L 蛋白質と EEF1G 蛋白質の結合を抑制することにより、癌細胞の増殖抑制効果が期待できると考えられます。

そこで、LIX1L 蛋白質と EEF1G 蛋白質の結合を阻害するペプチドや低分子化合物を合成・探索することにより、新規の標的治療薬を開発する基礎的研究を行うことを目的とします。

翻訳伸長因子 EEF1G を標的とする治療薬はこれまでに報告はなく、EEF1G を標的とする治療薬開発については我々が初めてであり、様々な種類の癌に対して有効な新規標的治療薬となる可能性があります。

3. 研究の方法

LIX1L 蛋白質発現細胞で、LIX1L 蛋白質発現腫瘍における EEF1G/LIX1L 複合体を標的とし、RNA 翻訳伸長反応制御による新規分子標的治療薬開発の基礎的研究を目的とします。翻訳伸長因子 EEF1G と LIX1L 蛋白質の結合を阻害する候補化合物として、EEF1G 蛋白質の LIX1L 蛋白質との結合に関与するドメインに対する相同性ペプチドによる阻害効果を介した癌細胞増殖抑制効果の評価を *in vitro* と *in vivo* において行い、更に、ペプチドと同様の効果を示す低分子化合物の探索とともに、新規標的治療薬開発を目指した基礎的研究を行いました。

(1) LIX1L 蛋白質発現癌細胞株における EEF1G 蛋白質発現解析

これまでの研究成果で、癌細胞での LIX1L 蛋白質の発現の解析は、胃癌細胞株 KATO-III、OCUM-1、MKN45、NUGC4 細胞で行ってきました。対照として LIX1L を発現していない細胞として多発性骨髄腫細胞 RPMI8226 細胞を用いてきました。EEF1G 蛋白質発現についてもこれらの細胞株とその他の癌細胞株を用いて、免疫染色及び western blot 法にて検討し、LIX1L 発現との関連性を明らかにします。

(2) 癌臨床検体における EEF1G 蛋白質発現解析

様々な癌組織の大腸癌、肺癌、乳癌、甲状腺癌、食道癌、肝細胞癌、腎細胞癌、前立腺癌、膵臓癌、卵巣癌での LIX1L の発現を免疫染色及び Western blot 法にて解析しました(図 1)。同様に LIX1L 蛋白質発現腫瘍組織における EEF1G の発現を免疫染色及び western blot 法にて解析し、両者の関連を明らかにします。

(3) EEF1G 蛋白質に対する相同性ペプチド合成とその抗腫瘍効果

EEF1G を siRNA を用いてノックダウンすると LIX1L と EEF1G が共発現している胃癌細胞株 MKN45、KATO-III 細胞で細胞増殖抑制効果が認められました。そこで、EEF1G と LIX1L 蛋白質の結合を阻害する方法として、EEF1G のアミノ酸配列から 10 アミノ酸を選び、相同性ペプチドを作製し、EEF1G と LIX1L の結合阻害効果を検討する。

- 1) EEF1G のアミノ酸配列からセリン、スレオニン、チロシン残基の中でリン酸化候補残基を NetPhosK2.0 server を用いて選択し、候補アミノ酸を中心に前後のアミノ酸を含む 10 アミノ酸配列を相同性ペプチドとして合成します。これまでに作成した LIX1L を阻害するペプチド作成方法と同様に行います。相同性ペプチドとしてはアミノ酸の長さには依存しないため、最も効率よく、経済的に作成できるアミノ酸の長さが 10 個であることがわかっています (Nakamura S. *et al.*, Scientific Reports. 5:13474, 2015)。
- 2) 合成した相同性ペプチドを投与し、LIX1L 発現癌細胞株を用いて MTT アッセイと細胞数による、細胞増殖抑制効果の評価を行います。同時に EEF1G に対するペプチドが LIX1L 蛋白質との結合を阻害していることを確認します。
- 3) 癌細胞増殖に LIX1L/EEF1G 複合体がどのように関与しているかを明らかにするために、RIP-Seq を行い、LIX1L/EEF1G 複合体が結合する RNA を同定し、細胞増殖での LIX1L/EEF1G 複合体の働きを明らかにします。

(4) in vivoでの相同性ペプチドの抗腫瘍効果について明らかにする

胃癌細胞株 MKN45 細胞を NOD/SCID ノド マウスに移植することにより担癌マウスを作製します。in vivo における相同性ペプチドの抗腫瘍効果の評価は我々が既に確立してある手技を用いて (Nakamura S, *et al.* COX-2 independent induction of apoptosis by etodolac in leukemia cells *in vitro* and growth inhibition of leukemia cells *in vivo*. Cancer Therapy Vol 2, 153-166, 2004)、胃癌細胞移植マウスを作成して行なう予定です。

MKN45 細胞を NOD/SCID ノド マウスの背部に適当数移植し、腫瘍塊を作成します。[(width)² X length]/2 から腫瘍容積を算出し、腫瘍の増大、縮小を評価します。

相同性ペプチドを DMSO に溶解後、生理食塩水で希釈して、腫瘍体積が 100mm³ を超えた時点で、マウスの腫瘍部位に直接、または尾静脈より注射投与します。投与濃度、投与回数や投与間隔を変えながら、腫瘍容積にて抗腫瘍効果を評価します。

また、NOD/SCID ノド マウスの腹腔内に胃癌細胞株 MKN45 細胞を適当数投与し、その後、上記の腫瘍縮小効果の認められた濃度で相同性ペプチドを尾静脈から投与し、マウスの生存率を経時的に解析します。同時に、死亡マウスと生存マウスにおける肝臓、肺、心臓等各種の臓器を摘出し、ペプチド 2130 投与による副作用や臓器への影響の有無を確認します。

(5) EEF1G と LIX1L 蛋白質の分子構造から結合部位の同定と結合阻害物質の探索

EEF1G と LIX1L の正確な立体構造を確定します。両蛋白質の立体構造を確定させた後に、ドッキングシミュレーションを行うことにより結合部位を同定する予定です。その後、LIX1L 発現癌細胞に対する分子標的治療薬の開発を行うために、(1)EEF1G 蛋白質と LIX1L 蛋白質の結合を阻害する化合物のスクリーニング GST-LIX1L 融合蛋白質と EEF1G 蛋白質が GST カラム内で結合する系を用いて、化合物ライブラリー (FDA Approved Library 等) から LIX1L と EEF1G の結合を阻害する化合物を検索します。(2)同定した化合物を用いて、癌細胞での抗腫瘍効果を *in vitro* 及び *in vivo* で評価します。(3)EEF1G と LIX1L の結合を阻害し、複合体形成を抑制することによる RNA 翻訳への影響を抗腫瘍効果と関連づけて評価します。

4. 研究成果

(1) LIX1L 蛋白質発現癌細胞株における EEF1G 蛋白質発現解析

(2) 癌臨床検体における EEF1G 蛋白質発現解析

LIX1L 蛋白質と EEF1G 蛋白質の結合を阻害する新規の標的治療薬を開発する基礎的研究を行うことを目的としました。LIX1L 蛋白質発現の有無については胃癌細胞株 KATO-III(+), OCUM-1(+), MKN45(+), NUGC4(-), 膵臓癌細胞株 PK2(+), TCC-PAN2(+), 大腸癌細胞株 LoVo(+), SW948(+), 急性骨髄性白血病細胞株 HL-60(+), U937(+), CCRF-CEM(+), 慢性骨髄性白血病細胞株 K562(+), 多発性骨髄腫 RPMI8226(-)であり、一方 EEF1G 蛋白質の発現はすべての細胞株において細胞質に優位に発現が認められました。また、癌組織の大腸癌、肺癌、乳癌、甲状腺癌、食道癌、肝細胞癌、腎細胞癌、前立腺癌、膵臓癌、卵巣癌、及び正常組織での EEF1G 蛋白質の発現もすべてにおいて認められました。これらの結果から、LIX1L は癌細胞特異的に発現する一方で、翻訳伸長因子 EEF1G は癌細胞や正常細胞においても発現が認められ、細胞の生存に必須の蛋白質であることが推測されました。

(3) EEF1G 蛋白質に対する相同性ペプチド合成とその抗腫瘍効果

EEF1G と LIX1L 蛋白質の結合を阻害する方法として、EEF1G のアミノ酸配列から相同性ペプチド (PK294/296) を作製し、そのペプチドによる EEF1G と LIX1L の結合阻害効果を検討しました。作成した様々なペプチドの中から PK294/296 ペプチド (294 番目と 296 番目のリジンを含む) において、LIX1L 発現胃癌細胞株 KATO-III, OCUM-1, MKN45, 膵臓癌細胞株 PK2, TCC-PAN2 で細胞増殖抑制効果が確認されました。LIX1L 蛋白質と EEF1G 蛋白質の結合阻害効果も同時に見出しました。以上から、LIX1L 発現癌細胞において EEF1G との結合を阻害することにより癌細胞の増殖が阻害できるペプチド候補を見出すことができました。

LIX1L 蛋白質と EEF1G 蛋白質の結合を阻害する新規の標的治療薬を開発する基礎的研究を行うため、以下の点につき検討を行いました。i) LIX1L と EEF1G の相互作用の意義を検討する。: LIX1L と EEF1G の結合を解離させること (PK294/296 添加) で *in vitro* にて癌細胞の増殖抑制を確認しました。MKN45 (LIX1L 陽性) と NUGC-4 細胞 (LIX1L 陰性) をペプチド PK294/296 処理したところ、MKN45 細胞において癌細胞増殖抑制を認め、NUGC-4 細胞では細胞増殖抑制作用は認められず、両者の結合が癌細胞の増殖に関与していることが示唆されました。ii) Selection biomarker の候補を見出す。: 解析対象として 293FLG 細胞と 293FLG-LIX1L 細胞の 2 種類を用い、ペプチド PK294/296 処理前後にて、細胞内の翻訳後修飾の解析をアセチル化、ユビキチン化、スクシニル化について行ったところ、ペプチド PK294/296 添加により細胞内の様々な機能性蛋白質の翻訳後修飾に変化を与えることが明らかとなりました。これらの結果から、LIX1L と EEF1G 蛋白質の結合を抑制することは様々な蛋白質の翻訳後修飾に影響を与えることが明らかとなりました。

さらに、追加検討として以下を行いました。i) LIX1L と EEF1G の相互作用の意義を検討する。: LIX1L と EEF1G の結合を阻害すること (ペプチド PK294/296 添加) で *in vitro* にて癌細胞の増殖阻害効果の機序をマルチオミクス解析から検討しました。LIX1L 発現 HEK293 細胞と LIX1L 非発現 HEK293 細胞を用いて PK294/296 処理の有無で解析したところ、蛋白質 LIX1L 発現 HEK293 細胞内で 9 種類の蛋白質の発現量の有意な変化を見出し、これらがペプチドによる細胞増殖抑制に関与していることが推測されました。ii) Selection biomarker の候補を見出す。: マルチオミクス解析対象として HEK293 細胞と LIX1L 発現 HEK293 細胞の 2 種類を用い、LIX1L と EEF1G 蛋白質の結合阻害ペプチド (PY136) への高感受性株と低感受性株の 2 種類ずつを用いて、Selection biomarker の候補の検討を行いました。阻害剤に対する高感受性株と低感受性株で selection biomarker としての候補となる 6 つの蛋白質を見出しました。これらの結果から、LIX1L と EEF1G 蛋白質の結合を抑制することは様々な蛋白質の翻訳後修飾に影響を与えることが明らかとなりました。

(4) *in vivo*での相同性ペプチドの抗腫瘍効果について明らかにする

胃癌細胞株 MKN45 細胞で作成した担癌マウスにおいて、EEF1G 蛋白質に対する相同性ペプチド PK294/296 において腫瘍形成抑制効果が認められました。

(5) EEF1G と LIX1L 蛋白質の分子構造から結合部位の同定と結合阻害物質の探索

HTS screening 系を樹立する。: LIX1L および EEF1G の 2 種の蛋白質の相互作用を NanoBiT システムを用い、蛋白質結合阻害剤探索のためのスクリーニング系構築を行いました。293 細胞株に LIX1L と EEF1G のリコンビナント蛋白質を発現させ、両蛋白質の結合により発光を検出するシステムにおいて、その組み合わせの最適化を行い、最適化ペアを用いて、蛋白質 LIX1L および EEF1G の 2 種の蛋白質の結合を NanoBit システムにより解析できる cell base での発現細胞株、2 クローンのスクリーニング細胞株、を樹立し、両蛋白質の結合阻害効果を確認できるスクリーニング系が構築できました。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	梶村 春彦 (SUGIMURA HARUHIKO) (00196742)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関