

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08174

研究課題名(和文) クリニカルプロテオミクス解析による悪性胸膜中皮腫の新規分子治療法の開発基盤構築

研究課題名(英文) Clinical proteomics for development of novel therapy of malignant pleural mesothelioma

研究代表者

柳澤 聖 (Yanagisawa, Kiyoshi)

名城大学・薬学部・教授

研究者番号：20372112

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)：疾患特異的分子の一つである小胞体膜上に存在するCKAP4が、細胞質に存在するキナーゼと結合し、ストレス応答分子であるeIF2 のリン酸化を制御する新たな分子機構を明らかとするとともに、eIF2 の脱リン酸化を制御するホスファターゼを同定した。並行して悪性胸膜中皮腫細胞から過剰に分泌発現されるOSF2の機能解析を、質量分析技術を応用したリン酸化プロテオーム解析により推進した。シグナル伝達経路の詳細な解明を目指した解析からは、OSF2の下流で機能する分子群を複数同定するに至り、これらの阻害効果を有する低分子化合物処理により、悪性胸膜中皮腫培養細胞株の増殖抑制を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、今後30年以上持続的な増加が見込まれているにも関わらず、有効な標準的治療法が確立されておらず、また新たな診断法・治療法の創出につながる有望な標的分子に関する知見も乏しい悪性胸膜中皮腫を対象とした独自性の高い新規分子治療法開発の基盤となり、このような現状を打破するものと期待される。

研究成果の概要(英文)： Malignant pulmonary mesothelioma is a form of tumor that develops from the protective lining that covers the lung and usually caused by exposure to asbestos. We identified that CKAP4 is up-regulated in malignant pleural mesothelioma and further analyses revealed detailed molecular mechanism of CKAP4 which regulates phosphorylation of eIF2 . We also investigated molecular function of OSF2, of which we found high expression in malignant pleural mesothelioma, and identified cluster of phosphorylated proteins regulated by OSF2.

研究分野：腫瘍分子医学

キーワード：悪性胸膜中皮腫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アスベスト曝露に起因する難治性腫瘍である悪性胸膜中皮腫は、確立された有効な標準的治療法が存在しないのみならず、新たな分子診断・治療法の開発が立ち遅れている状況にある。研究代表者は、臨床試料を用いたクリニカルプロテオミクス解析とそれに引き続く分子生物学的解析の結果から、悪性胸膜中皮腫組織と細胞株の両者で高頻度に過剰発現する事が確認され、その増殖に深く関与する極めて有望な分子標的候補である CKAP4 と OSF2 の同定に成功している。CKAP4 は低栄養などが惹起するストレス応答シグナル系の制御に関与する事が明らかとなり(論文投稿中)さらには、中皮腫細胞から特異的に分泌される OSF2 は新たな分子診断法開発に繋がるものと期待される知見を得ている(論文投稿中)。本研究課題では、これらの分子が担うシグナル伝達経路の詳細解明を通じて、革新的分子治療法開発の基盤を確立することを目指す。

2. 研究の目的

本研究では、プロテオミクス研究分野における実績を有するとともに、がん臨床に応用が期待される新たな分子標的の同定・機能解析に関する報告を行なってきた研究代表者が、臨床検体を対象として展開したプロテオミクス解析の過程で見出した、悪性胸膜中皮腫細胞増殖に深く関与する2つの極めて有望な分子標的候補である Cytoskeleton Associated Protein 4 (以下 CKAP4)と Osteoblast Specific Factor 2 (以下 OSF2)の詳細な分子機能の解明を目指している。得られた知見を基盤として、特異的な分子標的治療法が全く存在しない悪性胸膜中皮腫に対する新たな分子標的治療法開発に繋げていくことを目的とする。本研究の基盤となる知見は、研究代表者らが有するプロテオミクス技術を駆使して、悪性胸膜中皮腫症例から供与された臨床試料を用いた解析から得たものであり、極めて独自性が高いものと期待される。

3. 研究の方法

➤ 中皮腫高発現分子 CKAP4 とストレス応答分子 eIF2 の機能解析

質量分析装置を駆使したプロテオミクス解析により、CKAP4 発現変動に伴うリン酸化タンパク質解析、並びに結合分子の網羅的な探索を進め、eIF2 リン酸化誘導に関して CKAP4 と共作用する候補キナーゼ同定を目指す。引き続いて、CKAP4、並びに候補キナーゼを発現する中皮腫細胞株を用いて、それぞれに対する siRNA を用いた発現抑制を組み合わせを行い、eIF2 リン酸化制御、細胞増殖能、ストレス対応能に対する効果、或いはそのレスキュー効果について検討する。また、CRISPR システムを用いた遺伝子改変、テトラサイクリンを用いた CKAP4-shRNA 誘導による遺伝子発現調節を組み合わせることにより、*in vivo*における eIF2 リン酸化制御・細胞増殖能・浸潤能などへの関与について解析を進め、悪性中皮腫細胞増殖に関連する CKAP4-eIF2 を含むリン酸化シグナル促進経路の解明を目指す。さらには、詳細なシグナル制御の分子機構を解明すべく、関与が明らかとなったシグナル伝達分子群について、結合などの相互作用の検討を並行して進める。

➤ OSF2 を標的とする分子治療法開発基盤構築研究

悪性胸膜中皮腫細胞株から分泌発現される OSF2 の発現を、siRNA を用いて阻害することにより、中皮腫細胞の増殖が抑制できることを *in vitro* 解析系を用いて確認している。本研究

では、OSF2 が制御するシグナル伝達経路の全貌を解明するため、我々が有するプロテオミクス技術を最大限に活用して、siRNA を用いた OSF2 発現抑制時の総タンパク質、或いはリン酸化タンパク質群の網羅的発現変化を検討する。具体的には、独自に開発したリン酸化タンパク質精製法と、多次元ナノ液体クロマトグラフィー / 質量分析装置を組み合わせた非標識定量的プロテオミクス解析技術 (SWATH 法) を組み合わせて進める。

このようなシグナル解析に加えて、プロテオミクス技術を用いたレセプターの同定を進める。これまでの予備的検討では、悪性胸膜中皮腫細胞において、OSF2 の発現抑制が、EGFR, Met など複数の増殖シグナル伝達受容体を不活化することが確認されている。このことは、OSF2 が未同定の受容体を介してシグナルの活性化を制御している可能性を示唆するものと考えられる。この責任受容体を同定するために、パキユロウィルスシステムを用いた GST タグ OSF2 タンパクの大量調整とグルタチオンビーズを用いた精製を行い、これを OSF2 高発現細胞の培養液中に添加、クロスリンク試薬によりレセプターとの架橋を行った後、グルタチオンビーズを用いて OSF2-レセプター複合体を精製、質量分析装置を用いたショットガンタンパクシーケンス解析を進める。先進的なプロテオミクス技術である SWATH 法を用いることにより、カラム作成時に混入する非特異的タンパク質や液体クロマトグラフィーによる分離不良などの影響を除いた、効率的な結合タンパク質探索の遂行に配慮する。

4. 研究成果

➤ 中皮腫高発現分子 CKAP4 とストレス応答分子 eIF2 の機能解析

小胞体膜上に存在しその形態維持の役割を担う CKAP4 が、ストレス応答分子 eIF2 のリン酸化を制御することを明らかとし、責任キナーゼとリン酸化抑制分子の同定を進めることにより、それぞれに候補分子を特定するに至っている。さらなる機能解析を進め、責任キナーゼ、あるいは責任リン酸化抑制分子を、CKAP4 と同時に発現抑制することにより、eIF2 のリン酸化が誘導されない、あるいは増強するという結果を得ており、この経路における CKAP4 の機能の優位性を確認している。以上の知見を悪性胸膜中皮腫の新規治療法開発へと昇華させることをめざして、CKAP4 の発現抑制による eIF2 のリン酸化誘導時に、同定したホスファターゼの阻害薬を作用させ、悪性胸膜中皮腫細胞の増殖能あるいは運動能などに対する影響を検討したところ、eIF2 のリン酸化の遷延と、それに伴う増殖能抑制効果の顕著な増強を確認している。この知見は、同定したホスファターゼ阻害効果を有する低分子化合物が悪性胸膜中皮腫の増殖抑制効果を示す新たな分子標的治療開発につながる可能性を有すること示唆していると考えられる。

➤ OSF2 を標的とする分子治療法の開発基盤構築研究

分泌因子である OSF2 が、悪性胸膜中皮腫細胞においてタンパクレベルにて高発現していることを見出すとともに、その発現抑制により悪性胸膜中皮腫細胞株の顕著な増殖抑制が認められることを確認し、培養細胞株を用いて、OSF2 発現抑制時のリン酸化タンパク群の変化を、質量分析技術を用いて検討した。30,000 種類を超えるリン酸化サイトを同定するに至り、対照試料と比較して数十種類のサイトで発現変動が認められることが確認された。

これらのリン酸化状態の変化が確認されたタンパク質を対象として、それぞれに対する特異的 siRNA を用いて発現を抑制し、悪性胸膜中皮腫細胞における増殖能や運動能に対する影響を検討したところ、3 種類のリン酸化タンパク質に関して悪性胸膜中皮腫細胞の増殖能の制御に関わる事を確認している。

本研究の成果は、今後 30 年以上持続的な増加が見込まれているにも関わらず、有効な標準的治

療法が確立されておらず、また新たな診断法・治療法の創出につながる有望な標的分子に関する知見も乏しい悪性胸膜中皮腫を対象とした独自性の高い新規分子治療法開発の基盤となり、この様な現状を打破するものと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kajino T, Shimamura T, Gong S, Yanagisawa K, Ida L, Nakatochi M, Griesing S, Shimada Y, Kano K, Suzuki M, Miyano S	4. 巻 38
2. 論文標題 Divergent lncRNA MYMLR regulates MYC by eliciting DNA looping and promoter-enhancer interaction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO J	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.201798441	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Sudo M, Hashimoto K, Yoshinaga M, Azimi MD, Fayaz SH, Hamajima N, Kondo-Ida L, Yanagisawa K, Kato M.	4. 巻 744
2. 論文標題 Lithium promotes malignant transformation of nontumorigenic cells in vitro	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Total Environ.	6. 最初と最後の頁 140830
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scitotenv.2020.140830.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 Suzuki M, Cao K, Kato S, Mizutani N, Tanaka K, Arima C, Tai MC, Nakatani N, Yanagisawa K, Takeuchi T, Shi H, Mizutani Y, Niimi A, Taniguchi T, Fukui T, Yokoi K, Wakahara K, Hasegawa Y, Mizutani Y, Iwaki S, Fujii S, Satou A, Tamiya-Koizumi K, Murate T, Kyogashima M, Tomida S	4. 巻 24
2. 論文標題 CERS6 required for cell migration and metastasis in lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Cell Mol Med.	6. 最初と最後の頁 11949-11959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.15817	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tetsunari Hase, Kiyoshi Yanagisawa, Asuki Fukatsu, Tomoki Kimura, Eiji Kojima, Takashi Abe, Kazuyoshi Imaizumi, Yoshitsugu Horio, Tetsuya Oguri, Masashi Yamamoto, Tomohiko Ogasawara, Yasuteru Sugino, Masahiro Morise, Masahiro Nakatochi, Masahiko Ando, Masashi Kondo, Hideo Saka, Hiroshi Saito, Yoshinori Hasegawa
2. 発表標題 PREDICT1: An observational study for identifying blood biomarkers associated with clinical benefit from carboplatin and pemetrexed (CbP) treatment in patients with non-squamous (NS) Non-small cell lung cancer (NSCLC) (CJLSG1201).
3. 学会等名 2020 ASCO Annual Meeting (Chicago, USA) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------