

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06565

研究課題名(和文) 悪性胸膜中皮腫を対象とする新たな分子標的治療法開発

研究課題名(英文) Exploration of molecular target therapy for malignant pleural mesothelioma

研究代表者

柳澤 聖 (Yanagsawa, 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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アスベスト曝露に起因する悪性胸膜中皮腫は特異的な分子標的治療の開発が立ち遅れている典型的な難治性腫瘍の一つである。我々は、疾患特異的分子の一つである小胞体膜上に存在するCKAP4を同定し、その細胞増殖制御機構を明らかとするとともに、当該経路の阻害活性を有する化合物を同定した。さらには、悪性胸膜中皮腫細胞の増殖に深く関与し、リン酸化を介したシグナル伝達経路の構成分子であることが明らかとなったOSF2タンパク質について、分子標的治療開発へつながることが期待されるOSF2の新たな受容体候補を同定した。これらの成果に基づいて、細胞増殖・ストレス制御機構を標的とする治療法開発を目指していく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が悪性胸膜中皮腫特異的タンパク質として同定したCKAP4とOSF2は、分子標的治療開発が立ち遅れている当該腫瘍の増殖能の維持に深く関与しており、その下流のシグナル伝達経路には、様々なリン酸化タンパク質の存在が明らかとなってきた。これらのシグナル伝達経路の構成タンパク質は、分子標的治療開発へと発展する可能性を有する重要な候補分子群であり、これまでに得た知見により、悪性胸膜中皮腫細胞の特性維持に重要な機能を有する治療標的候補が明確なものとなり、化合物のスクリーニング系構築など将来的な治療法開発の基盤が確立されたものと考えられる。

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 various signaling molecules. 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：分子腫瘍学

キーワード：悪性胸膜中皮腫 プロテオミクス 分子標的治療

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典型的な難治性腫瘍の一つである。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、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。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 응용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いる研究代表者が、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の実現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採得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

(1) 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。引き続き、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。さらには、細胞遊走能や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詳細解明を目指す。また、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。

(2) OSF2 を標的とする分子治療法の実現基盤構築研究

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。

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により、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

本研究では、悪性胸膜中皮腫の増殖促進因子として重要な機能を担う 2 分子を対象として詳細な機能解析を進めることにより、新たな治療標的候補としての有用性の検証を目的としている。

(1) 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。さらなる機能解析として、CKAP4 タンパク質が制御するシグナル伝達経路とは異なる経路を標的とした阻害剤と、RNA 干渉法による CKAP4 経路の阻害との相乗効果に関する検討を行い、悪性胸膜中皮腫細胞において、顕著な増殖抑制効果やアポトーシス誘導効果が得られることを確認した。以上に引き続いて、CKAP4 が制御する新たなシグナル伝達経路の同定に取り組み、その候補の絞り込みを進めた。さらには、当該経路の阻害効果を有する低分子化合物のスクリーニングを、CKAP4 発現上昇が認められる悪性胸膜中皮腫細胞株に対する抗腫瘍効果を指標に実施した結果、特異的にアポトーシスを誘導するリード化合物の同定に至った。

(2) 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。

これらの成果に基づいて、当該分子を対象とする多面的な解析を進めてきた。OSF2 が伝達するシグナル経路の詳細を検討した結果、悪性胸膜中皮腫の特性制御に関わる中心的なシグナル伝達分子群を同定し、その知見を応用して、OSF2 と共作用する候補受容体群の同定を完了していた。さらには、OSF2 のシグナル伝達経路における、同定された受容体群の役割を詳細に検討する目的で、各阻害剤を用いた増殖・抗アポトーシス活性の変化を解析し、悪性胸膜中皮腫細胞の腫瘍活性を促進的に維持している受容体を同定するに至った。以上の成果に基づいて、当該 OSF2 と受容体の結合を指標とするスクリーニング系の構築を進

め、蛍光シグナルにより判定可能な新システムの確立に成功した。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takahiro Hatta, Tetsunari Hase, Toru Hara, Tomoki Kimura, Eiji Kojima, Takashi Abe, Yoshitsugu Horio, Yasuhiro Goto, Naoya Ozawa, Naoyuki Yogo, Hirofumi Shibata, Tomoya Shimokata, Tetsuya Oguri, Masashi Yamamoto, Kiyoshi Yanagisawa, Masahiko Ando, Masashi Kondo, Makoto Ishii, Yoshinori Hasegawa	4. 巻 12
2. 論文標題 Adjustment of creatinine clearance for carboplatin dosing in Calver's formula and clinical efficacy for lung cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 15955-15969
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cam4.6235.	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大野乃愛、柳澤聖
2. 発表標題 Functional analyses of immune checkpoint molecule, VISTA, in malignant chest tumors
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 青木奏里、柳澤聖
2. 発表標題 Molecular functional analyses of immune checkpoint molecule, VISTA, in breast cancer
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 早川政、柳澤聖
2. 発表標題 膵臓がんにおける免疫チェックポイント分子の機能解析
3. 学会等名 第69回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 荻本祐也、柳澤聖
2. 発表標題 急性リンパ球性白血病におけるIKAROS分子の機能解析
3. 学会等名 第69回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuya Ogimoto, Lisa Kondo-Ida, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Functional analyses of IK6 generating knockout cells of B-cell acute lymphoblastic leukemia
3. 学会等名 第68回 日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuya Ogimoto, Lisa Kondo-Ida, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Exploration of novel molecular function of SMAD4 in colorectal cancer
3. 学会等名 第68回 日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳澤 聖
2. 発表標題 がん診療の最適化を目指した新たな分子標的の探索
3. 学会等名 第87回医療薬学（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柳澤 聖
2. 発表標題 プロテオミクス解析による悪性胸膜中皮腫 バイオマーカー群の同定
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荻本祐也、近藤梨沙、柳澤 聖
2. 発表標題 ヒトB細胞急性リンパ芽球性白血病細胞株におけるIkarosアイソフォーム6 (IK6) のノックアウトモデルによるIK6の役割の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuya Ogimoto, Lisa Kondo-Ida, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Functional analyses of IK6 generating knockout cells of B-cell acute lymphoblastic leukemia
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mari Inuma, Lisa Kondo-Ida, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Exploration of novel molecular function of SMAD4 in colorectal cancer
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuya Ogimoto, Lisa I. Kondo, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Functional analyses of IKAROS isoform 6 (IK6) generating knockout cells of B-cell acute lymphoblastic leukemia
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihide Nishimae, Lisa I. Kondo, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Exploration of functional significance of TTF-1 in drug resistance in lung adenocarcinoma
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mari Inuma, Lisa I. Kondo, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Exploration of novel molecular function of SMAD4 in colorectal cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lisa I. Kondo, Kiyoshi Yanagisawa
2. 発表標題 Proteomic identification of potential biomarkers of malignant pleural mesothelioma
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021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
---------	---------