

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22790266

研究課題名（和文）

非環式レチノイドによる肝臓癌特異的細胞死の経路解析に基づく新規抗癌剤の開発

研究課題名（英文）

Development of novel cancer drug based on pathway analysis for specific cell death of hepatocellular carcinoma treated with acyclic retinoid

研究代表者

辰川 英樹 (TATSUKAWA HIDEKI)

名古屋大学・創薬科学研究科・助教

研究者番号：10565253

研究成果の概要（和文）：

肝臓癌再発予防候補薬である非環式レチノイドの作用機序を明らかにする目的で、抗癌作用に働く標的タンパク質の探索を行った。アフィニティービーズによる沈降実験ではグルタチオン代謝酵素 PRDX4 や翻訳開始因子 eIF5A を、次世代スクリーニングによる解析ではメチオニン代謝に関わる MAT2A や CTH を見出した。また、肝発癌に起因する既知受容体のリン酸化を捉える抗体を作製し、癌組織での検出に成功した。

研究成果の概要（英文）：

To clarify underlying molecular mechanism of acyclic retinoid's effect to prevent recurrence of hepatocellular carcinoma in patients after surgical removal of the primary tumors, we investigated target proteins of acyclic retinoid responsible for its selective prevention of the cancer. Using precipitation assay with acyclic retinoid-conjugated affinity beads and analyses by next-generation sequencing, we identified PRDX4 and eIF5A, and MAT2A and CTH as promising binding and target proteins, respectively. We made antibodies recognizing the phosphorylated nuclear receptor, RXR α , which was selectively detected in hepatocellular carcinoma. Using these antibodies, we succeeded to observe specific signals in liver cancer tissues.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

 キーワード：癌、レチノイド、抗癌剤、アポトーシス、核内受容体、
生理活性物質、ケミカルバイオロジー

1. 研究開始当初の背景

非環式レチノイド（興和創薬株式会社：治験薬記号 NIK-333）は現在国内開発段階 第

III相の臨床試験が行われており、副作用の低い肝臓癌再発予防薬として大きく期待されている。

非環式レチノイドの持つ低い副作用の理

由として、肝臓癌選択性があげられる。癌細胞は正常細胞と比較して、レチノイド受容体 **RXR** が過剰にリン酸化され、恒常的に不活性化している。非環式レチノイドは **RXR** のリン酸化を防ぐことにより、**RXR** の機能低下を回避し、癌細胞の増殖・細胞死を引き起こすことが示唆されているが、その作用機序は未だ明らかでない。

2. 研究の目的

本研究は、肝臓癌再発予防候補薬、非環式レチノイドの作用機序を明らかにし、その結果を基にしてより有効な新規抗癌剤の探索・開発を目的とする。

具体的には非環式レチノイドの標的タンパク質を同定し、**RXR** リン酸化阻害に基づくより効果的な肝臓癌治療薬の探索及び開発を行う。

3. 研究の方法

(1) 肝臓癌細胞において特異的に観察されるリン酸化 **RXR α** に焦点を当て、**RXR α** リン酸化阻害を引き起こす非環式レチノイドの標的タンパク質を解明し、その生物活性を評価した。

具体的には非環式レチノイドに対して構造活性相関を行い、活性部位を見極める。次に非活性部位にリンカー及びビオチンを標識した化合物を合成し、肝臓癌細胞に作用させた後に、アビジンで免疫沈降することにより、標的タンパクを同定した。標的タンパクが同定できれば、随時、その生物活性及び制御法について検討し、より有効な肝臓癌の新規制御物質の開発に繋げていく。

(2) 恒常的な **RXR** のリン酸化が肝臓癌に繋がることが予想されるため、リン酸化 **RXR** に対する特異的なポリクローナル抗体を作製・評価を行った。良い抗体が十分量得られたら、化合物ライブラリーを用いた **RXR** リン酸化の制御候補化合物をスクリーニングする。

(3) **RXR** 以外の非環式レチノイドの標的転写因子について検討するため、理化学研究所オミックス基盤研究領域の林崎・鈴木博士の協力を得て、非環式レチノイドを処理した肝臓癌細胞を用いた網羅的な遺伝子解析を行い、この結果を基に転写因子制御ネットワーク解析を行うことにより、同薬剤処理により活性が変化する転写因子を探索・評価した。

4. 研究成果

(1) 癌細胞選択的な細胞死誘導作用を示す非環式レチノイドの標的タンパク質を同定するため、非環式レチノイドのカルボキシル基側にリンカー及びビーズを結合させた化合物を合成した。得られた化合物を肝臓癌細胞及び正常肝臓細胞の抽出液とインキュベーションした後に遠心し、得られたタンパク質を電気泳動して **CBB** 染色することにより、質量分析を行うための候補タンパク質を調べた。

非環式レチノイドを結合していないビーズに結合したタンパク質と比較して、優位に増加するタンパク質について質量分析を行ったところ、グルタチオン代謝酵素の一つであるペルオキシレドキシシン 4 (**PRDX4**)、翻訳開始因子 **eIF5A** などが非環式レチノイド結合タンパク質の候補として同定された (図 1)。また、従来結果から、非環式レチノイドの標的タンパク質の候補として予想されていた **Ras** タンパク質も非環式レチノイド結合ビーズに結合することを、結合タンパク質のウェスタンブロットにより確認した (図 1)。**PRDX4** siRNA による発現阻害実験では **ACR** による肝臓癌細胞死の誘導作用への影響は認められなかったが、**PRDX4** 発現抑制により肝臓癌細胞の増殖能の亢進が見られた。

また、ビーズの結合部位が修飾された **ACR** が殺癌細胞作用を持つかどうか、**COOH** 基を修飾したメチルエステル体及びエチルエステル体を用いて癌選択的な作用を確認したところ、明瞭な細胞死誘導活性が認められなかったため、現在、**COOH** 基の反対側にビーズを修飾させて **COOH** 側への結合化合物の取得を試みている。

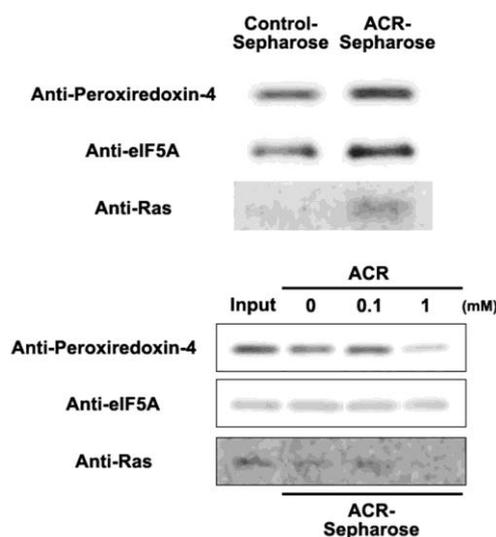


図 1 ACR 結合タンパク質の同定

上図：ACR 非結合及び結合セファロースを肝臓癌細胞株 (JHH-7) と 4°C で 24 時間反応させ、沈降後に抽出される画分について、上記のそれぞれの抗体でウェスタンブロットを行った。下図：ACR 存在下において、上記と同様の条件で反応を行った。

(2) 肝癌細胞では正常肝細胞と比較し、RXRの82番目のスレオニンと260番目のセリンが恒常的にリン酸化されているため、このリン酸化部位を認識するポリクローナル抗体を作製した。リン酸化させたそれぞれのサイト付近のペプチドを結合したカラムを用いて、リン酸化サイト特異的に認識する抗体を得た。ELISAを用いた評価により、非リン酸化ペプチドはほとんど認識しないが、リン酸化ペプチドには強く認識する抗体を得た。

同抗体を用いて肝癌細胞及び正常肝細胞の免疫染色及びこれらの細胞抽出液を用いたウェスタンブロット解析を行ったところ、肝癌細胞選択的にリン酸化RXR α の染色シグナルやバンドが確認され、肝癌細胞では非環式レチノイド処理により染色シグナルの低下が認められた。ジメチルニトロサミン投与ラット肝発癌モデルから得られた肝切片の染色実験では、非癌部に比べ、癌部選択的にリン酸化RXR抗体による染色像が確認されたのに対し、通常のRXR抗体では癌部領域を区別したような特徴的な染色は見られなかった(図2)。また、ACRとPI3K阻害剤の併用による肝癌細胞の相乗的増殖抑制効果の分子機構解明の一環として、RXRリン酸化の相乗的抑制の観察に本研究で開発したリン酸化RXR特異抗体を使用した。

当初の研究計画では、同抗体を用いてRXRのリン酸化を阻害する化合物をスクリーニングしていく予定であったが、得られた抗体量が十分でなかったため、同抗体を用いた様々な癌やRXRの機能障害が予想される病変についての解析実験に予定を変更した。

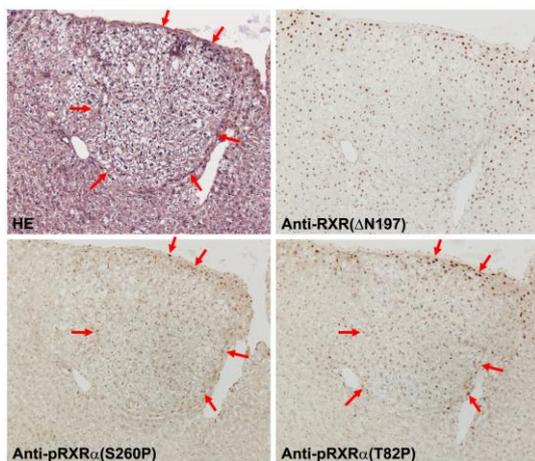


図2 ジメチルニトロサミン発癌モデルマウスにおけるリン酸化RXRの検出

ジメチルニトロサミン投与により誘導した肝発癌モデルマウス肝臓を採取し、凍結包埋後に組織切片を作製した。癌部の領域を含む組織を上記のRXR α 抗体(Δ N197)、2種のリン酸化RXR α 抗体(S260P, T82P)及びヘマトキシリン・エオシン(HE)により染色を行った。

(3) 標的タンパク質探索の別のアプローチとして、ACR処理した肝癌細胞と正常細胞を用いたマイクロアレイ、トランスクリプトーム、メタボローム解析による網羅的な比較検討を行った。その結果、RafやNF- κ Bの抑制に関与するGILZ/TSC22D3の発現亢進及びメチオニン代謝、特にS-アデノシルメチオニン(SAM)の合成に関わるメチオニンアデノシルトランスフェラーゼIIa(MAT2A)やCTHの発現抑制がACR処理した肝臓癌特異的に認められた(図3)。RafやNF- κ Bは癌細胞の増殖に関与、また、肝臓癌の前癌病変ではSAMの量の減少とMAT2Aの高発現が報告されているため、ACRによるGILZ/TSC22D3やMAT2A遺伝子発現の選択的な抑制作用が肝臓癌発症予防に関与している可能性が示唆された。

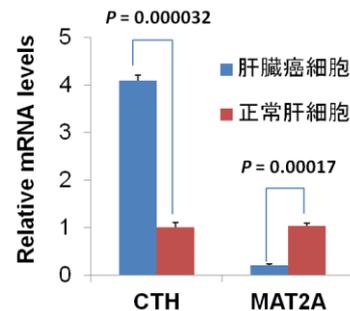


図3 ACRは肝臓癌細胞選択的にメチオニン代謝に関わる遺伝子CTH、MAT2Aを抑制する

正常肝細胞株及び肝臓癌細胞株にACRもしくは溶媒であるEtOHを処理し、マイクロアレイ・トランスクリプトーム・メタボローム解析により、ACR処理した癌細胞でのみ発現変化が大きい遺伝子について同定した。

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6件)

- ① Tatsukawa H, Sano T, Fukaya Y, Ishibashi N, Watanabe M, Okuno M, Moriwaki H and Kojima S: Dual induction of caspase 3 and transglutaminase dependent apoptosis by acyclic retinoid in hepatocellular carcinoma cells, *Mol Cancer*, 10:4 (2011) (11 pages) 査読有
- ② Itoh M, Kawamoto T, Tatsukawa H, Kojima S, Yamanishi K and Hitomi K: In situ detection of active transglutaminases for keratinocyte type (TGase 1) and tissue type (TGase 2) using fluorescence-labeled highly reactive substrate peptides, *J Histochem Cytochem*, 59: 180-187. (2011) 査読有

- ③ Saiki R, Park H, Ishii I, Yoshida M, Nishimura K, Toida T, Tatsukawa H, Kojima S, Ikeguchi Y, Pegg AE, Kashiwagi K and Igarashi K: Brain infarction correlates more closely with acrolein than with reactive oxygen species, *Biochem Biophys Res Commun*, 404: 1044-1049. (2011) 査読有
- ④ Kuo TF, Tatsukawa H and Kojima S: New insights into the functions and localization of nuclear transglutaminase 2, *FEBS J (Review)*, 278: 4756-4767. (2011) 査読有
- ⑤ Kuo TF, Tatsukawa H, Matsuura T, Nagatsuma K, Hirose S and Kojima S: Free fatty acids induce transglutaminase 2-dependent apoptosis in hepatocytes via ER stress-stimulated PERK pathways, *J Cell Physiol*, 227: 1130-1137. (2012) 査読有
- ⑥ Kojima S, Kuo TF and Tatsukawa H: Regulation of transglutaminase mediated hepatic cell death in alcoholic steatohepatitis and non-alcoholic steatohepatitis, *J Gastroenterol Hepatol* 27: 52-57. (2012) 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① 辰川 英樹, 石橋 直人, 森脇 久隆, 小嶋 聡一: “非環式レチノイドによる肝細胞癌治療におけるリン酸化阻害作用と標的分子同定の試み”, 第14回日本がん分子標的治療学会学術集会, 船堀, 7月 (2010)
- ② 辰川 英樹, 石橋 直人, 森脇 久隆, 小嶋 聡一: “非環式レチノイドによる肝癌細胞死誘導機構”, 第33回日本分子生物学会年会&第83回日本生化学会大会(BMB2010), 神戸, 12月 (2010)
- ③ 辰川 英樹, 清水 雅仁, 本田 香織, 近藤 恭光, 堂前 直, 石橋 直人, 長田 裕之, 森脇 久隆, 小嶋 聡一: “リン酸化 RXR・特異抗体の作製および非環式レチノイドの標的分子同定の試み”, 第22回日本レチノイド研究会学術集会, 日本大学, 11月 (2011)
- ④ 辰川 英樹, 本田 香織, 近藤 恭光, 堂前 直, 石橋 直人, 長田 裕之, 森脇 久隆, 小嶋 聡一: “肝細胞癌再発抑制剤「非環式

レチノイド」の作用標的分子同定の試み”, 第34回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜, 12月 (2011)

- ⑤ Tatsukawa H, Hitomi K and Kojima S “Further analyses of nuclear localization of transglutaminase and screening of inhibitors against nuclear localization of transglutaminase”, Gordon Research Conference on Transglutaminase in Human Disease Processes, Davidson College, Davidson, NC, July (2012)
- ⑥ Qin XY, Tatsukawa H, Suzuki H, Yoshinaga J, Kojima S “Studies on the molecular mechanism of a selective anti-cancer effect of ACR toward HCC”, The 7th International Symposium on Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases and Cirrhosis (ISALPD/C), Beijing, China, Sep (2012)
- ⑦ 秦 咸陽, 辰川 英樹, 鈴木 治和, 林崎 良英, 吉永 淳, 小嶋 聡一: “トランスクリプトーム解析による非環式レチノイドの肝細胞癌に対する選択的殺細胞作用の新規標的分子同定”, 第23回日本レチノイド研究会学術集会, 米子, 10月 (2012)
- ⑧ 秦 咸陽, 辰川 英樹, 鈴木 治和, 林崎 良英, 魏 菲菲, 田之 倉優, 石橋 直人, 森脇 久隆, 小嶋 聡一: “非環式レチノイドの肝細胞癌に対する選択的殺細胞作用のオミックス解析”, 第49回日本肝臓学会総会, 新宿, 6月 (2013)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ps.nagoya-u.ac.jp/research/organization05/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辰川 英樹 (TATSUKAWA HIDEKI)

名古屋大学大学院・創薬科学研究科・助教
研究者番号: 10565253

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし