

課題番号 42

新規 E3 複合体による静止期癌幹細胞の細胞周期制御

[1] 組織

代表者：玉井 恵一
(宮城県立がんセンター研究所)
対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物品費 15 万円

[2] 研究経過

現在広く使用されている抗癌剤は、一定の効果は得られるものの、ほとんどの場合はがんの根治にはつながらない。それは、抗癌剤は主に増殖の盛んながん細胞をターゲットととしているため、残存する「がん幹細胞」から再発を引き起こすからだと考えられる。

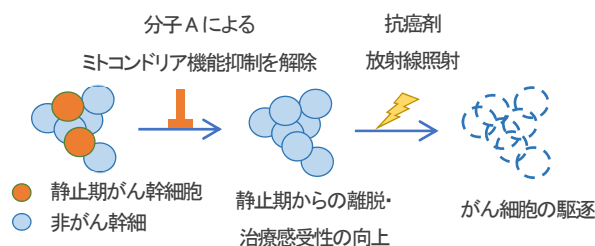
私たちは、特に治療抵抗性であると考えられる静止期癌幹細胞の形質を維持するために必要な分子 A を同定した (図)。分子 A が発現すると癌細胞は静止期に移行し、またノックダウンするとその逆になることが確認された。また、分子 A はユビキチン化を受け比較的短い半減期 (約 3 時間) であることがわかった。分子 A を制御する因子を探るために、加齢研研究所安井明博士・菅野新一郎博士と共同で会合分子を同定したところ、2 種類の E3 コンプレックス (XX および YY) が同定された。これまでの報告では、XX 複合体はユビキチン化タンパクの分解に関わり、逆に YY は基質の安定化に関わることが報告されている。このような結果から、私たちはこの 2 種の複合体によって分子 A の発現が制御を受け、それによって静止期維持の制御がなされているとの仮説を立てた。

これらのことから、私たちは分子 A を制御することが直接癌幹細胞形質を制御することにつながると考えた。そこで、私たちは分子 A 分解を引き起こす化合物を同定することを試みた。

対応者とは直接の打ち合わせを催した。また、メールを用いて頻繁に実験系に関するやりとりをした。

[3] 成果

(3-1) 研究成果



私たちは東京大学創薬機構から化合物ライブラリの提供を受け、スクリーニングを開始した。対応者らの助言にしたがい、分子 A にリンカーを含む Nluc タンパクを融合させた発現ベクターを構築し、強制発現細胞を作成した。予備検討によって、この細胞株はノックダウン・あるいはプロテアソーム阻害剤 MG132 によって Nluc の発光が増減することを確認した。

この細胞を用いて、9600 化合物のスクリーニングをはじめた。その結果、126 化合物によってルシフェラーゼ活性が低下した。さらに検討を進め、21 化合物がウェスタンブロットで分子 A の発現が低下することを確認した。最終的に、1 化合物 (Z 化合物) によって細胞周期に変化が生じることを見いだした。

この Z 化合物を胆管癌細胞株に添加すると、細胞の生存率はかわらないものの、G₀期の細胞が減少し、ミトコンドリア酸素呼吸能が増加することが判明した。これは、分子 A を siRNA を用いてノックダウンしたときと同じ形質であり、true hit であると考えられた。さらに、Z 化合物とゲムシタビンを併用すると、細胞生存率が有意に減少することを *in vitro* で確認した。

(3-2) 波及効果と発展性など

本課題では、加齢医学研究所との共同研究により、融合タンパクの構築・発現等、タンパク実験に関して多くの学ぶ点があった。また、同定した化合物 Z は、今後類似化合物を再スクリーニングする予定であり、最終的には担癌マウスをもちいた *in vivo* での効果を検討する予定である。同化合物は、いまだ上市されていない癌幹細胞を標的とする化合物になる可能性を秘めており、今後も検討・開発を続ける予定である。

[4] 成果資料

- 1 Okada, K. et al. Prediction of ALK mutations mediating ALK-TKIs resistance and drug re-purposing to overcome the resistance. *EBioMedicine*, doi:10.1016/j.ebiom.2019.01.019 (2019).
- 2 Yokoyama, M. et al. Pyruvate kinase type M2 contributes to the development of pancreatic ductal adenocarcinoma by regulating the production of metabolites and reactive oxygen species. *International journal of oncology* 52, 881-891, doi:10.3892/ijo.2018.4258 (2018).
- 3 Shimoyama, Y. et al. Periostin attenuates tumor growth by inducing apoptosis in colitis-related colorectal cancer. *Oncotarget* 9, 20008-20017, doi:10.18632/oncotarget.25026 (2018).
- 4 Okazaki, T. et al. Periostin is a negative prognostic factor and promotes cancer cell proliferation in non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 9, 31187-31199, doi:10.18632/oncotarget.25435 (2018).
- 5 Fujisaka, Y. et al. Long non-coding RNA HOTAIR up-regulates chemokine (C-C motif) ligand 2 and promotes proliferation of macrophages and myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma cell lines. *Oncol Lett* 15, 509-514, doi:10.3892/ol.2017.7322 (2018).