

インタビュー

京都府立医科大学

酒井敏行 教授、飯泉陽介 助教

がん予防法の確立とその応用に向けて
分子標的癌予防医学

FAQ

リガンド固定化とアフィニティ精製について



がん予防法の確立とその応用に向けて 分子標的癌予防医学

酒井 敏行 教授、飯泉 陽介 助教(京都府立医科大学)

がん予防研究に取り組み、「癌の分子標的予防法の確立とその応用に向けての研究」に関する業績について、平成26年度日本医師会医学賞を受賞された酒井先生に、がん分子標的薬やがん予防法の開発と、FG beads®の関わりについてお聞きしました。

がんの基礎研究から新薬開発に成功

本教室では、なぜがんになるのかという研究から、がん治療薬、予防法、診断システムの開発など応用を視野に研究を行っています。現在では多くのがんでRBやp53などのがん抑制遺伝子が失活しており、細胞増殖が止まらなくなることが分かっていますが、私のがん予防の研究を始めた1980年代前半の頃は発がんのメカニズムは分かっていませんでした。私は、1986年に初めてがん抑制遺伝子であるRB遺伝子をクローニングしたハーバード医科大学のDryja博士の研究室に留学して発がんのメカニズム研究を始めました。網膜芽細胞腫の家系にRB遺伝子のプロモーター領域に点突然変異があること¹⁾などを見つけ、その後帰国して、プロモーター領域のメチル化でRBタンパク質の発現量が低下して発がんに至ることを証明しました²⁾。「がん抑制遺伝子がメチル化で失活する」という初めての報告であり、この研究は、その後の「がんとエピジェネティクス」研究の端緒となりました。

その後、発がんメカニズムの研究だけでなく、治療薬や予防法の研究を行いました。多くのがんでがん抑制遺伝子の失活やがん遺伝子の活性化により、最終的にRBが失活していることに注目し、「RB再活性化スクリーニング」という独自のがん分子標的薬のスクリーニング系を考え、複数の製薬企業と共同研究を実施しました。その代表的な成功例が、RB活性化に関与するp15遺伝子の発現増強を指標としたスクリーニングによって見出された新規MEK阻害剤である「trametinib」³⁾

です。このtrametinibは、皮膚がんの一種である悪性黒色腫(メラノーマ)に著効を示し、2013年5月にMEK阻害剤として世界で初めて米国食品医薬品局(FDA)に認可されました。trametinibは従来の抗がん剤(バクリタキセル等)の奏効率が約5%であったのに対し、BRAF阻害剤dabrafenibとの併用で奏効率76%(完全奏効率9%)を示しました。欧米で多いメラノーマに対する画期的な治療薬であり、2013年のBritish Pharmacological SocietyのDrug Discovery of the Yearにも選ばれました。MEKというリン酸化酵素は発がんの共通経路の主要分子なので、trametinibはいろいろながんにも効くと考えられ、世界中で多くの臨床試験が行われています。他にも、RB再活性化スクリーニングで見出されたRAF/MEK阻害剤やHDAC阻害剤の臨床試験が行われています。

遺伝子調節化学療法、及び遺伝子調節化学予防

RBについて同定されたがん抑制遺伝子として、p53があります。p53は、ヒトのがんの約半数において異常が見出されている非常に重要な遺伝子です。そのため、p53が失活しているがん細胞に対し、外からp53遺伝子を遺伝子導入することによって治療する遺伝子療法が研究されてきました。しかし、一般的な治療法としては普及が困難なことから、予防法として用いることが出来ないため、私たちは、独自のがんの予防法、治療法を研究してきました。p53遺伝子の機能は、その産物が転写因子として細胞周期抑制、アポトーシス誘導、DNA修復に関与する遺伝子群の転写を活性化することなので、失活しているp53標的

遺伝子を標的として、薬物的にそれらを活性化することでがん治療、がん予防を目指しています。私たちは、p53標的遺伝子の中で、細胞周期抑制、DNA修復、アポトーシス誘導に関与する遺伝子として、p21/WAF1、Gadd45、DR5 (death receptor 5) があり、これらが、酪酸やトリコスタチンAといったHDAC阻害剤で活性化されることを見出しました⁴⁾⁻⁷⁾。さらに、DR5発現誘導剤として、野菜や果物に含まれるフラボノイド類のアピゲニン⁸⁾など複数の有用な化合物を見出しました。

アピゲニン標的タンパク質の精製と同定

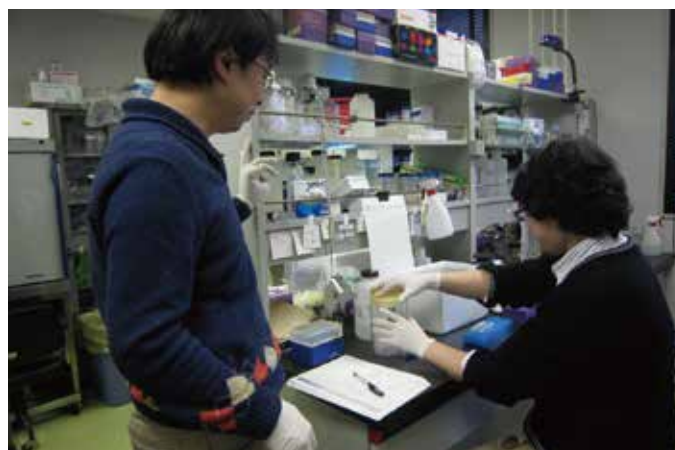
次に予防法の研究についてですが、食品成分の中には、動物実験などでがん予防に効果があると言われている様々な物質があります。それらに関してin vitroで調べたら実際にRBを再活性化する物質がいろいろあるということが分かりました。いくつかの物質については、p21などの発現量を増加させてRBを再活性化することなどが分かりましたが、理論的な予防法を確立するためには、もっと突き詰めてメカニズムをきちんと押さえる必要があると考えました。そこで、飯泉先生がFG beads[®]を使用して食品中のがん予防物質の標的タンパク質同定の研究を開始しました。

まず、本教室でその効果を見出したアピゲニンに注目しました。アピゲニンは、食品に含まれるフラボノイドで、がん予防効果が期待されています。私たちは、フラボノイドによるがんの増殖抑制を直接の標的タンパク質から解明するために、アピゲニンをFG beads[®]へ固定化、ヒト結腸腺がん細胞からアピゲニン結合タンパク質「RPS9 (リボソームタンパク質S9)」を精製、同定しました。アピゲニンの添加は、RPS9のノックダウンと同様に、プロモーターレベルにおいてcyclin-dependent kinase 1 (CDK1)の発現を低下、G2/M期の進行を阻害しました。これにより、アピゲニン結合タンパク質RPS9が、がん細胞の細胞周期をG2期で制御するタンパク質であること、アピゲニンがRPS9を阻害することでがん細胞の増殖を抑制していることが明らかとなりました。本研究成果は、フラボノイドによるがんの増殖抑制を直接の標的タンパク質から証明する初めての例でした⁹⁾。

また、アポトーシス関連因子TRAIL、DR5に注目し、研究を進めました。TRAILはDR5に結合し、caspaseを活性化、アポトーシスが誘導されます。本教室では、前述の様にアピゲニンがこのDR5の発現量を増強し、TRAILとの組み合わせでがん細胞特異的に非常に強くアポトーシスを誘導することを見出しています。しかし、アピゲニンと類似した構造を有するフラボノイドであり、TRAILによるアポトーシスを増強するゲニステインは、DR5の発現を誘導しませんでした。そこで、



●がん研究について語る酒井教授



●実験の指導を行う飯泉助教

アピゲニンとゲニステインの直接の標的タンパク質は異なると考え、標的タンパク質を解明することとしました。前述のアピゲニン標的タンパク質の精製同様、アピゲニンとゲニステインをそれぞれFG beads[®]へ固定化し、ヒト前立腺がん細胞から結合タンパク質をアフィニティ精製しました。すると、アピゲニンでは、RPS9、ANT2 (Adenine nucleotide translocase-2) が精製され、ゲニステインではRPS9のみが精製されました。ANT2をノックダウンしたところ、アピゲニンの添加同様、DR5の発現を増強し、アポトーシスを増強しました。このことは、アピゲニンがANT2に結合し、その機能を阻害することでDR5を増加させ、TRAILが誘導するアポトーシスを増強することを示唆しています¹⁰⁾。

おわりに

私は、発がんメカニズムの基礎研究からスタートして、独自のRB再活性化スクリーニングにより、いくつかの分子標的薬を開発してきました。予防法については、野菜や果物に含まれるフラボノイドなどの作用メカニズムを解明し、現在では、RBを活性化できるがん予防ジュースの開発を進めています。他に、RBの活性を制御するCDKの活性を調べるシステムを開発、乳がんの再発予測に使えることが分かりました。今後も、がん分子標的薬、予防法、診断法の開発を精力的に行っていきます。

References

- 1) T. Sakai et al., Nature, **353**, 83 (1991).
- 2) N. Ohtani-Fujita et al., Oncogene, **8**, 1063 (1993).
- 3) T. Yamaguchi et al., Int. J. Oncol., **39**, 23 (2011).
- 4) K. Nakano et al., J. Biol. Chem., **272**, 22199 (1997).
- 5) Y. Sowa et al., Cancer Res., **59**, 4266 (1999).
- 6) T. Hirose et al., Oncogene, **22**, 7762 (2003).
- 7) S. Nakata et al., Oncogene, **23**, 6261 (2004).
- 8) M. Horinaka et al., Mol. Cancer Ther., **5**, 945 (2006).
- 9) Y. Iizumi et al., PLOS ONE, **8**, e73219 (2013).
- 10) M. Oishi et al., PLOS ONE, **8**, e55922 (2013).

□経歴

酒井 敏行(さかい としゆき)

1980年 京都府立医科大学卒業

1986年 京都府立医科大学博士課程修了、助手

1988年 ハーバード医科大学留学、京都府立医科大学 講師を経て、

1996年より京都府立医科大学 教授、現在に至る

飯泉 陽介(いひずみ ようすけ)

2003年 東京工業大学卒業

2008年 東京工業大学博士課程修了、博士研究員

2009年 京都府立医科大学 助教、現在に至る

FAQ — リガンド固定化とアフィニティ精製について

Q1. リガンドをビーズに固定化するプロセスの概要は？

NHSビーズにリガンドとして化合物を固定化する場合、固定化反応は仕込濃度を4点(0.0, 0.1, 0.3, 1mM)振り、最適濃度を検討します。リガンドの固定化量はリガンドの性質によって異なります。固定化量はおよそ数 nmolから100 nmol程度です。良い精製結果を得るには数 nmolから数十 nmolがよく、固定化量は多すぎると立体障害や非特異的吸着の原因となってしまいます。その他のビーズを使用する方法に関しては、各プロトコルをご確認ください。

Q2. リガンドをデザインする際の注意点は？

結合タンパク質を探索したい原化合物に対して官能基を導入してリガンドをデザインする際、構造活性相関が分かっている場合には化合物の活性に重要で無い位置に官能基を導入し、固定化します。構造活性相関が分かっていない場合、化合物に官能基を導入する部位によって精製される結合タンパク質が異なるので、一つの原化合物に対してFG beads®への固定化部位の異なる複数のリガンドをデザイン、固定化してアフィニティ精製されることをお勧めします。

Q3. 結合タンパク質のバンドが数多く検出された場合は？

競合阻害実験、ドラッグエリキュションを行い、そのリガンドに対して特異的なバンドかどうかを確認する必要があります。リガンド固定化量を減らすまたはバッファーの組成を変えることにより親和性の高いタンパク質を絞り込むことも可能です。また、活性有無のリガンド固定化ビーズを使用することで、標的タンパク質を絞りやすくなります。

Q4. アフィニティ精製されるタンパク質の親和性はどれくらいですか？

通常、アフィニティ精製されるタンパク質のリガンドへの親和性は、解離定数(Kd)で 10^{-6} Mより強ければ結合タンパク質が精製できる可能性が高いです。親和性が弱い場合、結合タンパク質が回収できなかったり、バックグラウンドが高くなる場合があります。

Q5. 溶出の際に、塩溶出とボイル溶出を両方行っているのはなぜですか？

ある程度弱い結合(塩の力で外れる結合)と強い結合(サンプルバッファー+加熱で外れる結合)を分けているためです。ボイル溶出のみを行って頂いても問題ありません。

☆その他のFAQはこちらをご参照ください ▶ <http://www.magneticnanoparticle.jp>

表紙 作者紹介

～経歴～

創刊号表紙の版画に関して、「どなたの作品ですか？」と多くのお問合せを頂きましたので作者紹介をさせていただきます。作品を掲載頂いている小島氏は国内外の銅版画のコンクールで数多く受賞されており、当社がある長野県飯田市の出身です。今後も引き続き作品を掲載予定ですのでご期待下さい。

小島 敬介氏(こじま けいすけ)

1990年 信州大学教育学部卒(小学校教員養成課程美術科)
1994年 恩師、北野敏美氏(日本版画協会会員)の勧めで銅版画を始める
日本版画協会 準会員、2007、2011年 ソフィア国際小版画コンクール ファーストプライズ受賞、
2001年 国際アートシンポジウムに参加(ハンガリー)、1995、2003、2014年 信州版画展県知事賞、
協会賞受賞、2000、2004年 Oギャラリー個展(東京・銀座)



創刊号掲載の作品

編集 後記

日本で発明されたがんの分子標的薬として米国で初めて認可されたtrametinib。今号のインタビューではその成果により平成26年度日本医師会医学賞を受賞された京都府立医科大学の酒井教授、FG beads®をご使用いただいている飯泉助教にお話を伺いました。がん研究の進歩ですべてのがんが完治する病気になる日も近いかもしれませんね。当社ではより良い情報をお届けするため、皆様のご意見・ご感想をお待ちしています。ご意見・ご感想はこちらまで ▶ FGbeads@tamagawa-seiki.co.jp

多摩川精機株式会社

【技術的なお問い合わせ】

多摩川精機株式会社 バイオロニクス研究所

〒395-8515 長野県飯田市大休1879番地
FGbeads@tamagawa-seiki.co.jp
TEL (0265) 21-0501 (平日9:00~17:00)
FAX (0265) 21-1896

【ご注文・販売に関するお問い合わせ】

多摩川精機販売株式会社

バイオ営業部 TEL (0265) 56-5421 FAX (0265) 56-5426
北関東営業部 TEL (048) 833-0733 FAX (048) 833-0766
名古屋営業部 TEL (0568) 35-3533 FAX (0568) 35-3534
大阪営業部 TEL (06) 6307-5570 FAX (06) 6307-3670
福岡営業部 TEL (092) 437-5566 FAX (092) 437-5533

<http://www.tamagawa-seiki.co.jp>
<http://www.magneticnanoparticle.jp>

販売店