

公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金研究報告書

平成 年 月 日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者 (職名)	氏名	所属施設					
	高野 直治 (印) (講師)	施設名	東京医科大学 生化学分野	所在地	東京都新宿区 新宿6-1-1	電話	03-3351-0564
研究課題	オートファジー制御による新規がん治療法開発						
研究目的	<p>申請者の所属する研究室では、がん細胞を用いて細胞内のタンパク質分解機構であるユビキチン・プロテアソーム系、オートファジー・リソソーム系、アグリソーム形成を同時に抑制し、細胞に過度のERストレスを引き起こし細胞死を誘導する、という全く新しい治療概念に基づく治療法の開発を目指し研究を行ってきた。また、マクロライド系抗生物質にオートファジー抑制効果があることを見出し、これを上記の方法に利用した殺がん細胞効果を示した。</p> <p>本研究では、マクロライド化合物の標的タンパク質を同定することでオートファジー抑制機構を明らかにし、新規治療概念に関する科学的根拠を明確化すること、そしてがん幹細胞への効果やマウス移植モデルを用いた抗腫瘍効果の検証を行い臨床応用への基盤づくりを目指す。</p>						
研究方法	<p>これまでの成果よりマクロライド化合物を用いた新規治療法は、<i>in vitro</i>の系で非常に良好な殺がん細胞効果を示している。そこで、マクロライド化合物の標的タンパク質を同定することでオートファジー抑制機構を明らかにし、新規治療概念に関する科学的根拠を明確化すること、そしてがん幹細胞への効果やマウス移植モデルを用いた抗腫瘍効果の検証を行い臨床応用への基盤づくりを目指し、以下の実施を計画している。</p> <ol style="list-style-type: none">① オートファジー制御に関する標的タンパク質の単離・同定② “細胞内タンパク質分解ネットワーク”における標的タンパク質の機能検証③ がん幹細胞への効果の検証④ 担癌マウスを用いた<i>in vivo</i>効果の検証						
研究成果	<p>始めにマクロライドによるオートファジー制御の分子メカニズムを明らかとするため、アジシロマイシン (AZM)をFGビーズに固定し、AZMに結合するタンパク質の単離を試みた。AZMのビーズへの固定化には光クロスリンカーを用い、ランダムなビーズへの架橋を行った。次に、AZMビーズへ結合したタンパク質をLC-MS/MSを用いて同定し、複数の候補タンパク質を見出した。しかしながら、これらの候補のリコンビナントタンパク質を作成し、AZMビーズへの結合を確認したが、いずれもビーズへ結合しなかった。これは、AZMのビーズへの固定効率の低さによる高いバックグラウンドによるものと考えられた。</p> <p>そこで、AZMのアミド化誘導体入手し、アミド化AZMをビーズへ架橋することで、AZMのビーズへの固定効率を改善した。次に、アミド化AZMビーズへ結合したタンパク質を単離し、LC-MS/MSを用いて同定を行い、複数のAZM結合タンパク質の候補を得た。</p>						

<p>研 究 成 果</p>	<p>そして、これら候補のリコンビナントタンパク質を作成し、アミド化AZMビーズを用いてAZMへの結合を<i>in vitro</i>の系で検討したところ、10種類の候補タンパク質がアミド化AZMビーズに結合することを確認した。</p> <p>次に、これらのタンパク質がAZM処理によるオートファジー抑制にどのように関わるのか検証することにした。細胞内局在とオートファジーの関わりについて過去に報告のある候補タンパク質は、AZMによる局在変化が起こるか検証するため、GFPとの融合タンパク質を作成し、AZMによる局在変化を観察中である。</p> <p>また、それぞれの候補タンパク質のどのドメインにAZMが結合するか検証するため、ドメインごとに発現するリコンビナントタンパク質を作成しAZMビーズを用いた結合実験を行っている。これにより、AZMが候補タンパク質とどのように結合しているか調べる。</p> <p>その他、それぞれの候補遺伝子をノックダウンした細胞を作成するため、ノックダウンベクターの作成中である。候補遺伝子をノックダウンすることでAZMの感受性が消えるか検証し、実際に細胞内でAZMと相互作用しているか明らかとする。</p> <p>以上のように、現在までに新規AZM結合タンパク質の単離・同定に成功し、現在それらの候補タンパク質が細胞内タンパク質分解系にどのように関わっているか、詳しく検証中である。</p> <p>また、本研究課題に付随するプロジェクトの研究成果を“Amino Acid-Starving Culture Condition Sensitizes Gefitinib-Induced Cytotoxicity via Atypical Necroptosis in EGFR-Expressing Cancer Cell Lines”として、現在投稿準備中である。</p>
<p>今 後 の 予 定</p>	<p>今後は、現在までに得られたAZM結合タンパク質がどのようにオートファジーに関与しているか検証し、AZM処理によってどのような機能変化がおこるのか調べ、どの候補タンパク質が最もAZMによるオートファジー抑制に寄与しているか検証を行う。</p> <p>そのため、①AZM処理による細胞内局在の変化を明らかとし、②AZMとの結合ドメインを明らかとし、③候補遺伝子のノックダウンによってAZM感受性が無くなるか、また、ノックダウンによるオートファジーへの影響を調べる。これらの実験から、AZMによるオートファジー抑制の細胞内分子メカニズムの解明を行う。</p> <p>また、がん細胞移植マウスモデルにマクロライドと抗がん剤の併用投与を行いマクロライドの抗腫瘍効果を検証する。<i>in vivo</i>の系でも実際にマクロライドを用いた新規治療法が抗腫瘍効果を発揮できるのか検証を行うことで、臨床応用への基盤作りを目指す。</p> <p>そして、マクロライドによるがん幹細胞の増殖抑制能をより詳しく検証していく。この実験により、マクロライドを用いた新規がん治療法の今までに無い優位な作用を調べる。</p>

様式第3号

公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金収支決算報告書

平成 年 月 日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者所属施設名

東京医科大学 生化学分野

氏 名

高野 直治 ㊞

収 支 決 算 書

(単位 円)

交付を受けた助成金額				
金				円
支 出 内 訳	費 目	明 細	別 添	計 額
	設備、備品費	別添収支簿の通り	別添収支簿の通り	65,080
	消耗品費	別添収支簿の通り	別添収支簿の通り	2,934,920
	計			3,000,000
過 △ 不足額				0
備 考	貴財団より交付を受けました助成金は全て本研究課題実施に必要な「生化学・分子生物学実験試薬」「実験器具」「細胞培養試薬」「細胞培養器具」など消耗品購入費、および設備・備品購入費として適正に使用致しました。 消耗品費には販売店への支払い時に発生しました銀行振込手数料(計3,672円)を計上しております。			

支 出 費 内 訳

区 分	金 額	根 拠
設備、備品費	21,600	㈱高長 請求書番号 465470 収支簿の通り合算して送金振込明細控え①に該当
	22,204	㈱宮川商店 請求書番号 100089445 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑤に該当
	21,276	㈱和科盛商会 請求書番号 02154-01084 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑩に該当
消耗品費	747,829	㈱高長 請求書番号 462082, 463118, 463184 他22点、収支簿の通り合算して送金 振込明細控え①に該当
	79,012	㈱ナカライテスク 請求書番号 760030076, 760030077 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え②に該当
	111,132	㈱ミヤギ 請求書番号 33416632 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え③に該当
	688,705	㈱高長 請求書番号 468141, 468323, 468508 他14点、収支簿の通り合算して送金 振込明細控え④に該当
	43,848	㈱ナカライテスク 請求書番号 760030078 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑥に該当
	898,611	㈱高長 請求書番号 472699, 472660, 472949 他24点、収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑦に該当
	16,783	㈱ナカライテスク 請求書番号 760030080, 760030083 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑧に該当
	108,000	㈱岩井化学 請求書番号 HM03403 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑨に該当
	11,664	㈱シマダ器械 請求書番号 S134576 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑪に該当
	71,928	㈱バイオテック・ラボ 請求書番号 6534000558 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑫に該当
	71,604	㈱バイオテック・ラボ 請求書番号 6534000587 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑬に該当
	60,456	㈱高長 請求書番号 480406, 480822, 481192 他6点、収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑭に該当
	21,676	㈱高長 請求書番号 487456 収支簿の通り合算して送金 振込明細控え⑮に該当
	3,672	振込手数料として振込明細控え①～⑮を合算