

## 腫瘍動態制御研究分野

### <研究スタッフ>

教授	松本 邦夫		
助教	中村 隆弘	助教	酒井 克也
研究員	足立 恵理		
大学院生	横山 茉梨	大学院生	平井 智子
技術補佐員	丹保 智佳子	技能補佐員	端谷 泉

### 【研究概要】

HGF (hepatocyte growth factor) は Met チロシンキナーゼを受容体とし、主として間葉由来の因子として、上皮組織の 3 次元 (3-D) 形態形成、肝臓や神経系をはじめとする組織の再生・保護を担う。一方、HGF はとりわけがん細胞の 3-D 浸潤や細胞の生存を促す生物活性が強く、がん転移に深く関与するとともに、分子標的抗がん剤に対する耐性獲得に関与する。HGF-Met 系を介した組織修復の仕組みは悪性腫瘍の生物学的特性に深く関与すると考えられる。私達はがん微小環境を介したがん悪性化ならびに組織再生制御における HGF-Met 系の意義とメカニズムの研究を中心に進めており、とりわけがん悪性進展 (浸潤・転移・薬剤耐性) における HGF-Met 系の機能、構造生物学を基盤とする低分子 HGF 阻害剤ならびに人工低分子 HGF の創薬研究、HGF-Met 系を介した再生制御の研究などを行っている。また、HGF による難治性疾患の治療法開発にも力を注いでいる。

良性腫瘍と悪性腫瘍の明確な違いが浸潤性である。悪性腫瘍は活発に組織内を浸潤し、活発な浸潤性はがん転移につながる。がんの 3-D 浸潤性制御の研究から、自律的浸潤性を示す細胞と、非浸潤性細胞に分けられることを観察し、数年前から両者の性質の違いを制御するメカニズムの研究をあらたにスタートした。その結果、ポリコーム抑制系複合体を介したエピゲノム制御異常が浸潤性やがんの悪性形質に関わる遺伝子群の発現に関与することを見出した。

### <2013 年の研究成果、進行状況>

#### 1. CBX/ポリコーム抑制系制御異常を介したがん悪性進展制御の研究

各種ヒトがん細胞は、浸潤性を示さないものとダイナミックな自立的 3-D 浸潤性を示すがん細胞に分けられる。非浸潤性/浸潤性ヒト悪性中皮腫細胞を用いて、非浸潤性と浸潤性を区別するメカニズムとして、1) 浸潤に必須の細胞外マトリックス分解酵素の遺伝子発現がヒストン/DNA のメチル化とポリコーム抑制系複合体 (polycomb Repressive Complex) によって制御されること、2) ポリコーム群タンパク質の翻訳後修飾異常が PRC を介した遺伝子セットの発現抑制の解除に関与すること、3) ポリコーム抑制系は浸潤性に加え、サイトカイン、血管新生、炎症性など、悪性進展に関与する遺伝子群の連動的な発現に関与することなどを明らかにした。悪性形質制御に遺伝子発現のリプログラミング機構が関与する可能性、翻訳後修飾が新しい治療標的となりうる可能性が考えられる。

## 2. 構造生物学を基盤とする低分子 HGF-Met 系阻害剤創製研究

結晶構造解析，化学合成などの研究者と協力し，HGF と Met 受容体相互作用を阻害する低分子創薬研究を進めている。前年までにタンパク質へのドッキング構造，活性-構造相関に基づいて，リード化合物の活性向上を進めたが，マイクロモルオーダー以下に活性が向上した化合物を得るに至っていない。本年度，活性向上に向けて，骨格の異なる複数のリード化合物が必要と判断し，high throughput screening (HTS) のためのアッセイ系を構築するとともに，約 180,000 の化合物ライブラリーの HTS を実施した。数百個の活性化合物を，2 次スクリーニング，濃度依存性，カウンターアッセイなどによって数十個に絞込んだ。標的タンパク質とヒット化合物の相互作用解析，ヒット化合物類縁体の化学合成とアッセイ，結晶化改善のための糖鎖欠損組換えタンパク質の発現・調製を進めている。

## 3. 人工低分子 HGF の創製

菅裕明教授（東京大学）と共同で，Met 受容体に高親和性に結合する環状ペプチドを基盤に，HGF と同様の生物活性を示し，HGF に置き換わる可能性のある，人工小分子 HGF の創製に成功した。この技術は人工小分子細胞増殖因子創製を実現するものである。HGF は組織再生や傷害に対する組織の保護作用をもつことから，創薬ベンチャーと大学の連携によって，ALS（筋萎縮性側索硬化症）や脊髄損傷を対象に組換え HGF タンパク質の臨床試験が進められている。HGF タンパク質に置き換わる人工細胞増殖因子の創製は，医薬候補としての可能性をもっている。

## 4. 悪性黒色腫における Met 発現の階層性と腫瘍形質制御の研究

近年，腫瘍形成能をもつがん幹細胞とそこから派生する腫瘍形成能をもたない腫瘍細胞からなる階層性を介した不均質性の制御がいくつかの固形腫瘍においても示されており，階層性と幹細胞性/不均一性の理解は重要な課題である。B16/B16-F10メラノーマ細胞を用いて，細胞表面 Met 発現を解析した結果，Met<sup>low</sup> と Met<sup>high</sup> の population に分けられ，Met<sup>low</sup> から Met<sup>high</sup> population が生じる階層性，両者での造腫瘍性，スフェア形成能などに違いがあることが明らかになった。

## <今後の計画>

1. CBX/ポリコーム抑制系制御異常を介したがん悪性進展制御: CBX/ポリコーム群タンパク質の翻訳後修飾異常の詳しいメカニズムと druggable target を明らかにすること，同様のメカニズムが悪性中皮腫以外の複数の腫瘍に関与すること，臨床材料での CBX/ポリコーム群タンパク質の異常制御を明らかにすることなどを進める。
2. 悪性黒色腫における Met 発現の階層性と腫瘍形質制御の研究: 腫瘍形成能制御や幹細胞性制御における Met 発現の意義，ヒト悪性黒色腫における Met 発現の階層性制御などについて解析を進め，階層性の有無/制御と腫瘍形質制御に HGF-Met が関与するかどうかを明らかにする。
3. 小分子人工 HGF の創製と構造解析: 人工小分子 HGF と Met 受容体複合体の構造解析を進め，HGF-Met 系制御の構造基盤を明らかにするとともに，HGF に置き換わる医薬候補分子としての研究を進める。
4. 低分子 HGF-Met 系阻害剤創製: 新規骨格リード化合物の絞込みと類縁体合成，化合物-HGF 複合体の結晶構造解析と化合物デザインなどにより，数十倍～100 倍の活性向上を目指す。

## 【 研 究 業 績 】

### <論文発表>

(研究室主体)

1. Nakayama M, Sakai K, Yamashita A, Nakamura T, Suzuki Y, Matsumoto K. Met/HGF receptor activation is regulated by juxtamembrane Ser985 phosphorylation in hepatocytes. *Cytokine*, 62: 446-452, 2013.
2. Michikoshi H, Nakamura T, Sakai K, Suzuki Y, Adachi E, Matsugo S, Matsumoto K.  $\alpha$ -Lipoic acid-induced inhibition of proliferation and Met phosphorylation in human non-small cell lung cancer cells. *Cancer Lett*, 335: 472-478, 2013.
3. Xu Q, Sakai K, Nakayama M, Suzuki Y, Tambo C, Sakai Y, Matsumoto K. Suppression of fibrogenic gene expression and liver fibrosis using a synthetic prostacyclin agonist. *Biomed Res*, 2013, in press.

(共同研究)

1. Sugiura T, Takahashi S, Sano K, Abe T, Fukuta K, Adachi K, Nakamura T, Matsumoto K, Nakamichi N, Kato Y. Pharmacokinetic modeling of hepatocyte growth factor in experimental animals and humans. *J Pharm Sci*, 102, 237-249, 2013.
2. Hirata Y, Kurobe H, Uematsu E, Yagi S, Soeki T, Yamada H, Fukuda D, Shimabukuro M, Nakayama M, Matsumoto K, Sakai Y, Kitagawa T, Sata M. Beneficial effect of a synthetic prostacyclin agonist, ONO-1301, in rat autoimmune myocarditis model. *Eur J Pharmacol*, 699: 81-87, 2013.
3. Sano T, Takeuchi S, Nakagawa T, Ishikawa D, Nanjo S, Yamada T, Nakamura T, Matsumoto K, Yano S. The novel PI3K-mTOR inhibitor, BEZ235, circumvents erlotinib-resistance of *EGFR* mutant lung cancer cells triggered by HGF. *Int J Cancer*, 133: 505-513, 2013.
4. Matsumura A, Kubota T, Taiyoh H, Fujiwara H, Okamoto K, Ichikawa D, Shiozaki A, Komatsu S, Nakanishi M, Kuriu Y, Murayama Y, Ikoma H, Ochiai T, Kokuba Y, Nakamura T, Matsumoto K, Otsuji E. HGF regulates VEGF expression via the c-Met receptor downstream pathways, PI3K/Akt, MAPK and STAT3, in CT26 murine cells. *Int J Oncol*, 42: 535-542, 2013.
5. Ishikawa D, Takeuchi S, Nakagawa T, Sano T, Nakade J, Nanjo S, Yamada T, Ebi H, Zhao L, Yasumoto K, Nakamura T, Matsumoto K, Kagamu H, Yoshizawa H, Yano S. mTOR inhibitors control the growth of EGFR mutant lung cancer even after acquiring resistance by HGF. *PLoS One*. 8: e62104, 2013.
6. Kubota T, Matsumura A, Taiyoh H, Izumiya Y, Fujiwara H, Okamoto K, Ichikawa D, Shiozaki A, Komatsu S, Nakanishi M, Kuriu Y, Murayama Y, Ikoma H, Ochiai T, Nakamura T, Matsumoto K, Nakamura T, Otsuji E. Interruption of the HGF paracrine loop by NK4, an HGF antagonist, reduces VEGF expression of CT26 cells. *Oncol Rep*. 30: 567-572, 2013.
7. Nakamura A, Nagaya N, Obata H, Sakai K, Sakai Y, Yoshikawa M, Hamada K, Matsumoto K, Kimura H. Oral administration of a novel long-acting prostacyclin agonist with thromboxane synthase inhibitory activity for pulmonary arterial hypertension. *Circulation J*, 77: 2127-2133, 2013.

8. Tsunemi S, Iwasaki T, Kitano S, Matsumoto K, Takagi-Kimura M, Kubo S, Tamaoki T, Sano H. Molecular targeting of hepatocyte growth factor by an antagonist, NK4, in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*, 15: R75, 2013.
9. Hayakawa H, Ichihara E, Ninomiya T, Takata S, Ohashi K, Masayuki Yasugi, Sakai K, Matsumoto K, Takigawa N, Tanimoto M, Kiura K. Lower gefitinib dose led to earlier resistance acquisition before emergence of T790M mutation in EGFR mutated lung cancer model. *Cancer Sci*, 104: 1440-1446, 2013.
10. Zhao L, Yasumoto K, Kawashima A, Nakagawa T, Takeuchi S, Yamada T, Matsumoto K, Yonekura K, Yoshie O, Yano S. Paracrine activation of MET promotes peritoneal carcinomatosis in scirrhous gastric cancer. *Cancer Sci*, 104: 1640-1646, 2013.
11. Nanjo S, Yamada T, Nishihara H, Takeuchi S, Sano T, Nakagawa T, Ishikawa D, Zhao L, Ebi H, Yasumoto K, Matsumoto K, Yano S. The efficacy and feasibility of Met kinase inhibitor crizotinib combined with new generation EGFR inhibitor on the resistance to EGFR inhibitor by multiple mechanisms. *PLOS ONE*, in press.
12. Uchida T, Hazekawa M, Yoshida M, Matsumoto K, Sakai Y. A novel long-acting prostacyclin agonist (ONO-1301) with an angiogenic effect: promoting synthesis of hepatocyte growth factor and increasing cyclic AMP concentration via IP receptor signaling. *J Pharmacol Sci*, 123: 392-401, 2013.

#### <学会発表>

1. 櫛川舞, 松本邦夫, 酒井芳紀, 原口珠実, 吉田都, 内田享弘: c-Met のダウンレギュレーションを伴わない新規 PGI<sub>2</sub> アゴニスト反復投与の血管新生作用. 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日(横浜)
2. 伊藤健一郎, 鈴木芳典, 松本邦夫, 菅裕明: 肝細胞増殖因子受容体 c-Met を活性化させるチオエーテル大環状ペプチドの開発. 日本ケミカルバイオロジー学会第 8 回年会. 2013 年 6 月 20 日(東京)
3. 中村隆弘, 酒井克也, 足立恵理, 松本邦夫: Kremen による肺がん細胞における Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルの調節. 第 72 回日本癌学会総会, 2013 年 10 月 3 日(横浜)
4. 酒井克也, 鈴木健之, 矢野聖二, 高橋智聡, 松本邦夫: がん悪性化におけるポリコーム群クロモボックスタンパク質の機能. 第 72 回日本癌学会総会, 2013 年 10 月 4 日(横浜)
5. 小柳潤, 東昌市, 菊地慶司, 酒井克也, 松本邦夫, 宮崎香: TGF- $\beta$  阻害剤は in vitro において線維芽細胞の HGF 産生の亢進を介してがん細胞の浸潤を促進する. 第 72 回日本癌学会総会, 2013 年 10 月 5 日(横浜)
6. 松郷誠一, 道越洸充, 中村隆弘, 酒井克也, 松本邦夫: リポ酸によるヒト肺がん細胞増殖抑制機構の解析. 第 8 回  $\alpha$ -リポ酸研究会, 2013 年 10 月 25 日(富山)
7. 酒井克也, 鈴木健之, 矢野聖二, 高橋智聡, 松本邦夫: 悪性腫瘍の浸潤に関わるポリコームタンパク質の翻訳後修飾. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 4 日(神戸)



### <外部資金>

1. 松本邦夫：科学研究費補助金 基盤研究（B）「3-D 浸潤性獲得と上皮形態形成制御を基盤とする腫瘍悪性化機構の研究」 6,500 千円
2. 松本邦夫：次世代がん研究推進プロジェクト「結晶構造を基盤とするリード化合物の最適化による低分子 HGF-Met 阻害剤の創製研究」 3,950 千円
3. 松本邦夫：金沢大学戦略的研究推進プログラム（拠点形成型）「アカデミアがん創薬拠点形成のための人材と知の集約・循環プログラム」 3,000 千円

### <共同研究>

1. 大阪府立大学大学院理学系研究科 構造生物学 木下誉富准教授：結晶構造に基づく HGF-Met 系阻害剤創成の研究
2. 大阪大学大学院工学研究科 井上豪教授（構造物理化学）、南方聖司教授（構造物質機能化学）：結晶構造に基づく HGF-Met 系阻害剤創成の研究
3. 東京大学大学院理学系研究科 菅裕明教授：HGF-Met 系を制御する特殊環状ペプチドの創製と作用機作の研究
4. 神戸大学大学院医学系研究科 西田満准教授・南康博教授：肺がん EGFR 阻害剤に対する耐性獲得における Ror-Met 系の意義とメカニズムの研究
5. 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 木浦勝行教授：HGF-Met 系活性化を介した肺がん分子標的薬耐性獲得の研究
6. 千葉県がんセンター細胞治療開発研究部 田川雅敏教授：NK4 遺伝子治療による悪性中皮腫治療の研究
7. 新潟大学大学院医歯薬総合研究科内部環境医学（呼吸器内科） 小屋俊之助教：プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した喘息治療の研究
8. 奈良県立医科大学内科学第二講座（呼吸器・血液内科） 木村弘教授：プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した肺線維症・肺高血圧症治療の研究
9. 京都大学大学院医学研究科糖尿病・栄養内科 稲垣暢也教授：プロスタグランジン類による HGF 発現誘導を介した脾臓移植・糖尿病治療の研究
10. 横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科 宮崎香教授：がん細胞浸潤における TGF- $\beta$  と HGF の相互作用
11. 金沢大学大学院医学系研究科（組織発達構築学） 井関尚一教授・若山友彦准教授：精巣機能における HGF-Met 系の役割についての研究
12. クリングルファーマ株式会社：HGF-Met 系制御による疾患治療の研究と臨床開発  
他