

中央実験施設

Central Research Resource Branch
中央実験施設

Professor	Kunio Matsumoto 松本 邦夫
Associate Professor	Yoshio Endo 遠藤 良夫, Kouji Kuno 久野 耕嗣
Assistant Professor	Shamma Awad シャムマ アワード

【 Abstract 】

Enhancing effect of novel Schiff base derivatives on 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy (Endo Y)

Photodynamic diagnosis and therapy using 5-aminolevulinic acid (ALA) is widely accepted as a non-invasive strategy against various cancers. Previously, we had shown that the Schiff base derivative TX-816 markedly increased the effect of ALA-based photodynamic therapy (ALA-PDT) by facilitating intracellular PpIX accumulation. However, TX-816 was unstable in aqueous solutions and quickly hydrolyzed into 3,5-dichlorosalicylaldehyde (DCSA) and 2-chloro-4-nitroaniline. Recently, we found that TX-816 derivatives in which 2-chloro-4-nitroaniline was substituted with 4-pentyl or 4-hexyl aniline were more stable than TX-816. Therefore, we examined the ALA-PDT enhancing effect of novel 4-alkyl aniline derivatives, which were synthesized from 4-methoxysalicylaldehyde (MeOSA) and 4-alkyl anilines with various alkyl chains from C = 1 to C = 6. Consequently, the MeOSA-based 4-pentyl or 4-hexyl aniline derivatives showed higher stability and stronger ALA-PDT-enhancing effect than the DCSA-based derivatives. These findings indicate that MeOSA derivatives are excellent lead compounds for the development of novel ALA-PDT sensitizers.

Analysis of the functional roles of ADAMTS-1 in female genital organs (Kuno K)

ADAMTS-1 is an extracellular matrix (ECM)-anchored metalloproteinase that degrades ECM molecules such as proteoglycans and regulates ECM remodeling. Recently, we found that ADAMTS-1 null mice on a BALB/c background exhibited impaired parturition. Uterine strips from these mice showed decreased contractile responses to uterotonins and decreased spontaneous contractile activity. ADAMTS-1 null mice also showed reduced uterine expression of genes encoding contraction-associated proteins (CAPs), suggesting that ADAMTS-1 is required for uterine activation prior to parturition. Decidual activation is an important process for labor progression, wherein the morphology of the decidual layer changes significantly from late pregnancy to active labor in mice, including the dilation of uterine glands. As the morphology of the decidual layer of ADAMTS-1 null mice on gestation day 19 sometimes differed from that of wild-type mice, we are investigating the role of ADAMTS-1 in decidual layer tissue organization during the prepartum period.

Mechanisms of tumor suppressor network in repression of pluripotency and self-renewal capacity (Shamma A)

The proteasome-mediated degradation of the core reprogramming proteins determines the stem cell fate decision. How the core reprogramming proteins are identified and recruited for proteasomal degradation is greatly unknown. We demonstrate that simultaneous inactivation of pRb and ATM reciprocally induces and stabilizes Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc (OSKM) proteins, and consequently enables self-renewal capacity and pluripotency. We further show that pRB recruits Kat3b and inhibits the transcription of HDAC5, whereas ATM binds and sequesters HDAC5, leading to acetylation labeling of the OSKM proteins that become

identified and assembled by ATM in a complex with the E3 ubiquitin ligase Uhrf1 or Fbxw7 for ubiquitination and subsequent proteasomal degradation. Furthermore, ATM-kinase inhibition in Rb-negative cells rescues the OSKM proteins and self-renewal capacity, suggesting that ATM kinase activation signaling antagonizes reprogramming of Rb-deficient cells.

<2019年の研究成果、進捗状況及び今後の計画>

アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法に対して感受性増強作用を有する新規シッフ塩基誘導体の開発 (遠藤)

我々は5-アミノレブリン酸 (ALA) を用いる光線力学的治療 (PDT) において、ALA との同時処理により細胞内PpIX量を増加させてPDT効果を増強する低分子化合物として、3,5-ジクロロサリチルアルデヒド (DCSA) と2-クロロ-4-ニトロアニリン (CNA) からなるシッフ塩基TX-816を見出した。本年度は、TX-816のCNAを4-アルキルアニリン (C=2からC=6) に置換した誘導体とTX-816の活性本体であるDCSAを4-メトキシサリチルアルデヒド (MeOSA) に置換した4-アルキルアニリン誘導体を合成し、ALA-PDT効果増強活性の比較検討を行った。DCSAおよびMeOSAの4-アルキルアニリン誘導体はいずれもTX-816やDCSAよりも強いALA-PDT効果増強作用を示し、溶液中での安定性も顕著に向上していた。中でもMeOSAの4-ペンチルおよび4-ヘキシルアニリン誘導体はDCSAの誘導体よりも増強作用が強く、安定性も高いことも示され、がん細胞内で活性化されるプロドラッグ型効果増強剤の有用なリード化合物となる可能性が示唆された。今後、さらに有用な効果増強剤の開発を目指して研究を展開する。

ADAMTS-1の雌生殖機能における役割の解析 (久野)

ADAMTS-1^{-/-}マウス (129/B6 遺伝子背景) は、排卵、卵胞生育過程に異常を示す。一方 BALB/c 遺伝子背景の ADAMTS-1^{-/-}マウスは分娩異常を示すが、同マウスの子宮平滑筋では uterotonin に対する収縮応答性が低下し、収縮調節関連遺伝子群の発現が低下していることを見出している。また ADAMTS-1^{-/-}マウスの分娩前の子宮脱落膜層では、野生型マウスとは異なる形態が認められることから、今回、分娩前の脱落膜組織の構築における ADAMTS-1 の役割について調べた。抗ラミニン抗体を用いて基底膜の染色を行ったところ、分娩直前の ADAMTS-1^{-/-}マウスの脱落膜組織では、脱落膜上皮細胞下の基底膜の一部で肥厚が観察された。この結果から、ADAMTS-1 が基底膜の形成制御を通して、分娩に向けての脱落膜組織の形態変化と維持に関わっている可能性が示唆された。今後、ADAMTS-1^{-/-}マウスの子宮組織のさらに詳しい組織学的解析を行って分娩時の子宮機能における ADAMTS-1 の役割を調べるとともに、子宮頸管熟化過程についても解析を行い、ADAMTS-1 の分娩過程全般における役割を明らかにする。また ADAMTS-1 によるがん微小環境の制御について解析を行う。

【 研究業績 】

< 発表論文 > (共同研究)

1. Yamahana H, Takino T, Endo Y, Yamada H, Suzuki T, Uto Y: A novel celecoxib analog UTX-121 inhibits HT1080 cell invasion by modulating membrane-type 1 matrix metalloproteinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 Oct 16. pii: S0006-291X(19)31988-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2019.10.092. [Epub ahead of print]
2. Murakami Y, Kimura Y, Kawahara A, Mitsuyasu S, Miyake H, Tohyama K, Endo Y, Yoshida N, Imamura Y, Watari K, Ono M, Okamura T, Kuwano M: The augmented expression of the cytidine deaminase gene by 5-azacytidine predicts therapeutic efficacy in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget.* 2019 Mar 19;10(23):2270-2281. doi: 10.18632/oncotarget.26784. eCollection 2019 Mar 19.
3. Sarker MAK, Aki S, Yoshioka K, Kuno K, Okamoto Y, Ishimaru K, Takuwa N, Takuwa Y. Class II PI3K α and β are required for Rho-dependent uterine smooth muscle contraction and parturition in mice. *Endocrinology.* 2019;160(1):235-248.

< 著書・総説 >

1. Yoshio Endo: The history of the development of chick embryo tumor xenograft models. In “Chick Chorioallantoic Membrane Model and Precision Cancer Therapy,” Fuyuhiko Tamanoi (ed). *The Enzymes: ENZ Volume 46*, pp11 – 22, Elsevier, 22nd November 2019.
2. Yoshihiro Uto, Chiaki Abe, Mana Futawaka, Hisatsugu Yamada, Masahide Tominaga and Yoshio Endo: *In vivo* drug screening method of radiosensitizers using tumor-bearing chick embryo. In “Chick Chorioallantoic Membrane Model and Precision Cancer Therapy,” Fuyuhiko Tamanoi (ed). *The Enzymes: ENZ Volume 46*, pp113 – 127, Elsevier, 22nd November 2019.
3. 玉野井冬彦, 遠藤良夫, 宇都義浩, 楠橋由貴, 二若真菜, 松本光太郎: がんの個別化医療を切り拓く鶏卵モデル (Next Tech Review). *実験医学* Jan; 37(1): 88-92, 2019.

< 学会発表 >

1. 遠藤良夫, 宇都 義浩, 篠原 侑成, 安部 千秋, 小幡 徹, 小倉 俊一郎, 米村 豊: 5-アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法に対する耐性化機構とその克服 日本薬学会第139年会 2019年3月20日(水) -23日 (土) (千葉、幕張メッセ)
2. Kitano Yuto, Miyashita omoharu, Makino Isamu, Kinoshita Jun, Nakamura

- Keishi, Tajima Hidehiro, Takamura Hiroyuki, Ninomiya Itasu, Fushida Sachio, Endo Yoshio, Yamamoto Yasuhiko, Ohta Tetsuo: PANCREATIC SENESCENT STROMA INFLUENCE ON PROGNOSIS IN PDAC. Digestive Disease Week (DDW2019) May 18-21, 2019 (San Diego Convention Center, San Diego, CA, USA) Gastroenterology Volume 156, Issue 6, Supplement 1, May 2019, Pages S-765. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(19\)38859-6](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(19)38859-6)
3. Yusei Shinohara, Yoshihiro Uto, Chiaki Abe, Tohru Obata, Shun-ichiro Ogura, Yutaka Yonemura, Yoshio Endo: Enhancing effect of novel Schiff base derivatives on photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid. 新規 Schiff 塩基による 5-アミノレブリン酸を用いるがん光線力学的療法の効果増強作 第 78 回日本癌学会学術総会 2019 年 9 月 26 日 (木) ~28 日 (土) (京都、国立京都国際会館)
 4. Bolidong Dilireba, Takahiro Domoto, Masahiro Uehara, Tomoyuki Okumura, Yoshio Endo, Pyko Iiya V, Tomoharu Miyashita, Mitsutoshi Nakada, Toshinari Minamoto: Effect of targeting GSK3b against esophageal squamous cell carcinoma (ESCC) inducing cell cycle arrest and apoptosis. 食道扁平上皮がんの GSK3b 阻害は細胞周期停止とアポトーシスを誘導する 第 78 回日本癌学会学術総会 2019 年 9 月 26 日 (木) ~28 日 (土) (京都、国立京都国際会館)
 5. 生水真紀夫, 多久和陽, 松島綱治, °久野耕嗣 (°発表者)「マウス分娩時の子宮組織構築における ADAMTS-1 の役割の解析」第 42 回日本分子生物学会年会 (2019 年 12 月, 福岡、福岡国際会議場)