

# 細胞運動を司る分子クリップを標的にした制がん戦略

岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科 生化学分野

山田 浩司

## 1. はじめに

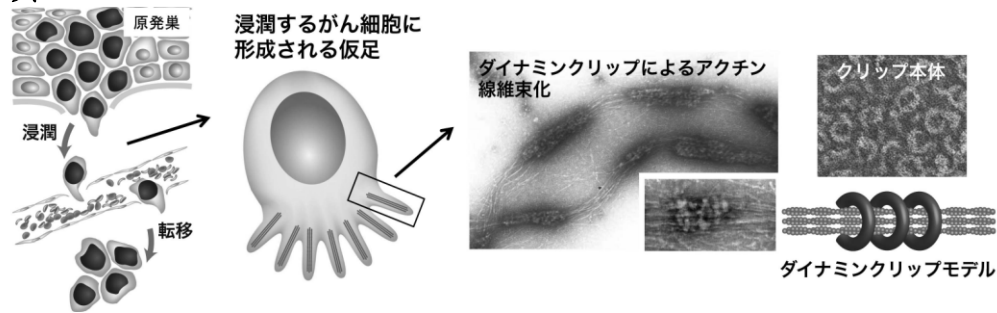


図1：ダイナミンクリップとがん細胞の仮足形成

ダイナミンは、神経細胞のエンドサイトーシスの際のシナプス小胞再生に働く分子として知られている。これまで我々は、ダイナミン関連タンパクがアクチン制御に働くことを発見してきた (Yamada et al., MBC, 2007; JBC, 2009)。また、ダイナミン阻害剤 Dynasore (Macia et al., Dev. Cell, 2006) が、がん細胞の走化浸潤に必要な糸状仮足、葉状仮足の形成を阻害することも見いだしてきた (Yamada et al., BBRC, 2009)。

ダイナミンは、アクチン再構成に必須の分子であることが示唆されていたが、長らくその実体は不明であった。ごく最近、我々はダイナミンがリング状複合体を形成しアクチン線維を束化するアクチン再構成に必須の分子であることを発見した (図1右: Yamada et al., J. Neurosci., 2013)。ダイナミンは、アクチン線維結合タンパクであるコルタクチンとリング状複合体を形成しアクチン線維を束化する。リング状ダイナミン複合体は、ダイナミンのGTP加水分解と共役して開閉しアクチン線維をクリップすることから、この複合体をダイナミンナノクリップと名付けた。しかしながら、これら複合体形成、そのリング開閉の制御機構については、現在のところ不明である。

がん細胞は、原発巣から浸潤転移する際に突起(仮足)を形成する (図1左)。我々は、ダイナミンナノクリップが、がん細胞の突起形成に関与することを見いだした(未発表)。これら知見から、ダイナミンを分子標的とした制がん剤の可能性を世界に先駆けて発表し(特許第 5283962; 特願 2012-137489; Yamada et al., BBRC, 2009)、その機構解明とダイナミンを標的とした抗浸潤剤の開発に着手した。

本研究はダイナミンナノクリップによる新規アクチン制御機構の詳細を解明し、上記発見に基づいた強力な制がん作用を持つダイナミン阻害剤を *in vitro* 及び *in vivo* で同定することを目的とした。

## 2. 方法

2006年にMaciaらによって報告されたダイナミン阻害剤 Dynasore に比べ、より強力に制がん作用のある分子を探索した。Dynasoreをリーディング化合物とし、その構造類縁化合物を既に構築した *in vitro* アクチン線維形成評価系を用いてスクリーニングした。構造類縁化合物は静岡県立大創薬探索センターの浅井博士より提供を受けた。スクリーニングされた分子につき、GTPase 活性阻害、仮足形成阻害、創傷治癒アッセイを用いた遊走阻害、浸潤阻害、マウスを用いた抗腫瘍効果を調べた。

### 3. 結果

Dynasoreをリーディング化合物として、*in vitro*アクチン線維形成阻害を示す分子、 $N'$ -[4-(di

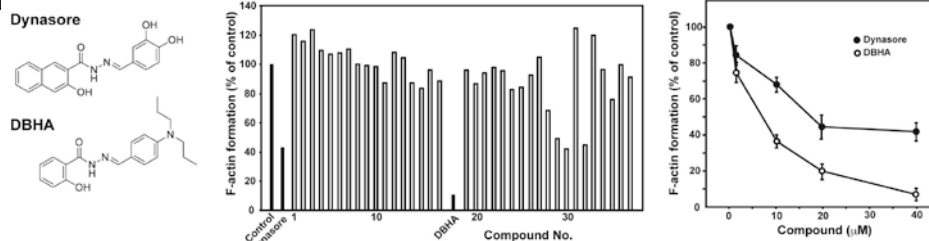


図2：DBHAによるアクチン線維形成阻害

アクチン線維形成阻害効果は、DBHAで $IC_{50}=7 \mu$ M、ダイナソアで $IC_{50}=18 \mu$ M (図2右)であった。DBHAは、ホスファチジルセリン (PS) で刺激されるダイナミンGTPase活性を強く阻害した ( $IC_{50}=26 \mu$ M)。従って、DBHAはダイナミンがPSを含む細胞膜への結合を阻害する可能性が示唆された。そこで、ヒト骨肉腫細胞株 (U2OS) を用いて、ダイナミンの細胞膜への局在を免疫染色法にて調べたところ、DBHAにて処理した細胞ではダイナミンの細胞膜への局在がおおよそ60%減少することが判明した。

さらに、ヒト肺がん細胞株 (H1299) を用いて、仮足形成、遊走、浸潤に対するDBHAの効果調べたところ、いずれの場合においても、強い阻害が観察され、その阻害程度はDynasoreと同等であった。また、H1299とヒト前立腺がん細胞株 (PC3) を用いて72時間における細胞生存率を調べたところ、仮足形成、遊走、浸潤を強く阻害した濃度 (50  $\mu$ M) において、DBHAは、細胞生存率にほとんど影響がなかった。一方、Dynasoreでは、30-50%生存率が低下した。最後に、抗腫瘍効果を調べた。マウスにPC3細胞を播種して腫瘍を形成し、その後、皮下に形成された腫瘍にDBHAもしくはDynasoreを局所注射した。DBHAを局所注射した群では、注射後4日目に抗腫瘍効果が発現し、8日目においても腫瘍の増大は、ごくわずかにとどまった。しかしながら、Dynasoreを局所注射した群では、8日目には、阻害剤を注射しなかった群と変わりなく腫瘍は増大した。これらの結果から、今回有効なアクチン線維形成を抑制するダイナミンGTPase阻害剤が同定できたと考えられる。

### 4. 考察

既知のダイナミン阻害剤 Dynasore よりも、細胞毒性が低くアクチン線維形成を強力に抑制する DBHA を同定した。DBHA は、ヒト肺がん細胞株 (H1299) の遊走、浸潤を強く抑制すると共に、抗腫瘍効果を示した。同定された DBHA とアクチン線維形成を指標にしたスクリーニング方法をあわせて特許出願した。DBHA は、細胞毒性が低く、抗がん剤候補として有用であると考えられる。今後、DBHA の基本構造をもとにさらに構造最適化を進める予定である。我々の研究は、抗がん作用を持つダイナミンに対する分子標的薬を目指しており、国内外を問わず、独創性の高い研究である。同時にダイナミンによるアクチン制御機構を世界に先駆けて明らかにした。得られた知見は、ダイナミンに関する細胞生物学のみならず創薬研究に多大に波及効果をもたらすと期待される。

### 5. 発表論文、参考文献

発表論文

- (1) **Yamada, H.**, Abe, T., Satoh, A., Okazaki, N., Tago, S., Kobayashi, K., Yoshida, Y., Oda, Y., Watanabe, M., Tomizawa, K., Matsui, H., Takei, K.: Stabilization of actin bundles by a Dynamin 1 / Cortactin ring complex is necessary for growth cone filopodia. *J. Neurosci.* **33**: 4514-4526, 2013
- (2) **Yamada, H.**, Abe, T., Li, SA., Tago, S., Huang, P., Watanabe, M., Ikeda, S., Ogo, N., Asai, A., Takei, K.:  $N'$ -[4-(dipropylamino)benzylidene]-2-hydroxybenzohydrazide is a dynamin GTPase inhibitor that suppresses cancer cell migration and invasion by inhibiting actin polymerization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press, 2013

#### 参考文献

- (1) **Yamada, H.**, Ohashi, E., Kusumi, N., Li, S. A., Abe, T., Yoshida, Y., Watanabe, M., Tomizawa, K., Kumon, H., Matsui, H., and Takei, K.: Amphiphysin 1 is important for actin polymerization during phagocytosis. *Mol. Biol. Cell* **18**: 4669-4680, 2007
- (2) **Yamada, H.**, Padilla-Parra, S., Park, S. J., Itoh, T., Chaineau, M., Monaldi, I., Cremona, O., Benfenati, F., De Camilli, P., Coppey-Moisan, M., Tramier, M., Galli, T., and Takei, K.: Dynamic interaction of amphiphysin with N-wasp regulates actin assembly. *J. Biol. Chem.* **284**: 34244-34256, 2009
- (3) **Yamada, H.**, Abe, T., Li, S. A., Masuoka, Y., Isoda, M., Watanabe, M., Nasu, Y., Kumon, H., Asai, A., and Takei, K.: Dynasore, a dynamin inhibitor, suppresses lamellipodia formation and cancer cell invasion by destabilizing actin filaments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **390**: 1142-1148, 2009

#### 特許

- (1) 特許第 5283962  
「ダイナミン機能阻害作用を有する化合物の仮足形成阻害剤（医薬組成物）」  
竹居孝二、李順愛、**山田浩司**、公文裕巳、那須保友、渡部昌実
- (2) 特願 2012-263317 平成 24 年 11 月 30 日出願  
「フルボキサミンを配合することを特徴とする分子標的型抗癌剤（特に抗脳腫瘍治療薬剤：第二医薬品用途）」道上宏之、林圭一郎、松井秀樹、**山田浩司**、竹居孝二、宮地弘幸、浅井章良
- (3) 特願 2012-137489 平成 24 年 6 月 19 日出願  
「抗浸潤薬の新規スクリーニング法および抗浸潤剤」  
**山田浩司**、竹居孝二、道上宏之、松井秀樹、浅井章良