

様式3

令和2年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

令和3年2月15日

国立大学法人愛媛大学
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関： 広島国際大学

部局・職名： 保健医療学部 講師

氏名： 中山 寛尚

1. 研究課題

ヒト大腸がんにおける軸索誘導因子 Netrin の発現解析とリガンド・レセプター相互作用検出系の確立

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 中山 寛尚	広島国際大学 保健医療学部	講師	研究計画の立案 大腸癌細胞を使った実験
研究分担者 東山 繁樹	プロテオサイエ ンスセンター・ 細胞増殖・腫瘍制 御部門	教授	リガンド蛋白質の作成 リガンド・レセプター結合実験

3. 研究成果

別紙のとおり

研究成果報告書

研究代表者

所属機関：広島国際大学

部局・職名：保健医療学部 講師

氏名：中山 寛尚

研究目的

我々は腫瘍増殖・血管新生の分子メカニズム解析を行っており、近年、軸索誘導因子 netrin-1 とそのレセプターによるシグナルが脳腫瘍および小児髄芽腫の増殖、転移、血管新生、免疫応答を惹起するため、netrin-1 が『癌微小環境制御因子』であること示し、新たな治療標的としての可能性を提唱している (Front Physiol., 2018)。

大腸癌細胞は非常に細胞遊走・浸潤能が高く、血管新生を強力に誘導するため、肺、肝臓、リンパ節などに転移する。そこで我々は、大腸癌の進展に netrin-1 シグナルが影響していると考えている。大腸癌細胞株 6 種および大腸癌患者組織片における netrin-1 リガンドおよびそのレセプター (7 種類) の遺伝子発現解析を行ったところ、細胞株、組織片ともに netrin-1 とレセプターの遺伝子発現が強く“抑制”されていることが明らかとなり、脳腫瘍や髄芽腫のように発現が上昇する結果とは全く異なっていた (中山ら 未発表データ)。

本研究では、1) 大腸癌細胞における netrin-1 関連遺伝子 (リガンド・レセプター) のエピジェネティック制御解析 2) netrin-1 阻害化合物スクリーニング系の確立を目指し、netrin-1 を標的とする新規大腸癌治療法確立を目指すための基礎的検討を行う。

研究内容

(1) 大腸癌細胞、組織における netrin-1 遺伝子発現解析

大腸癌の分子発生機序として、DNA のメチル化による癌抑制遺伝子の不活化が明らかとなっている。基礎検討から、大腸癌細胞においては netrin-1 とそのレセプター遺伝子発現が抑制されていたため、netrin-1 プロモーター領域におけるメチル化の関与を検討した。

(2) 小麦無細胞発現系とアルファスクリーンを用いたリガンド・レセプターの相互作用検出系の確立

Netrin-1 シグナルを制御するために、netrin-1 とそのレセプターの相互作用を阻害する低分子化合物を探索したい。そのために、netrin-1 リガンドとそのレセプター7種をそれぞれコムギ無細胞タンパク質合成技術によって作成し、その結合評価として、2つのタンパク質が物理的に会合（結合）し、近距離となった時に出す発光シグナルを検出する「AlphaScreen システム」評価系の構築を行う。その後、この系を用いて東大創薬機構から分与される化合物ライブラリーから阻害化合物を探索し、細胞実験で netrin-1 による細胞遊走、増殖阻害効果、または細胞内シグナルを阻害するか確認したい。

研究成果

(1) 大腸癌細胞、組織における netrin-1 遺伝子発現解析

解析には大腸癌細胞株 3 種および正常ヒト腸管上皮細胞を用いた。RNA を抽出した後、netrin-1 遺伝子に対する定量 PCR を行った。図 1 に示すように、大腸癌細胞においては netrin-1 遺伝子発現が抑制されていた。さらに大腸癌臨床検体を使った検討においても同様に、正常部位に比して癌部で netrin-1 遺伝子発現が抑制されていることが明らかとなった。次に大腸癌細胞株 HT29 にメチル化阻害剤 5AzaD を処理したところ netrin-1 遺伝子発現が大きく上昇したことから、netrin-1 プロモーター領域のメチル化が示唆された（図 1）。

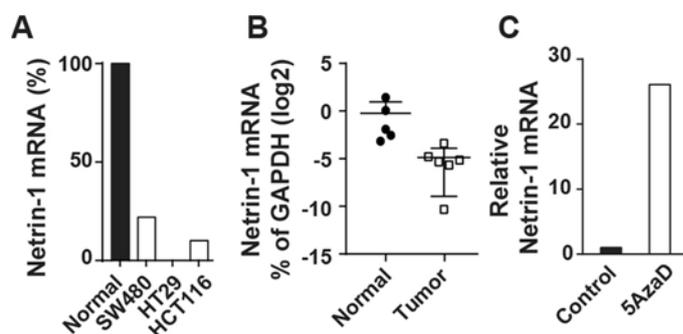


図 1：大腸癌細胞における netrin-1 遺伝子発現解析

A：正常腸管上皮細胞と大腸癌細胞株 3 種における遺伝子発現を比較検討した。B：大腸癌患者癌部(n=6)、非癌部(n=5)における遺伝子発現を比較検討した。C：HT29細胞にメチル化阻害剤(5AzaD, 10 mM)を3日間処理した後、遺伝子解析を行った。

(2) 小麦無細胞発現系とアルファスクリーンを用いたリガンド・レセプターの相互作用検出系の確立

本研究ではnetrin-1とレセプターのひとつUNC5Cについて基礎検討を行った。Netrin-1リガンド（全長）にflag タグを N-または C-末端に付加して、小麦無細胞発現系を用いて合成を行った。同時にnetrinレセプターのひとつUNC5Cにbiotin タグを付加して合成を行った。合成結果はウエスタンブロッティングによって合成の成否と分子量を確認した（図2）。

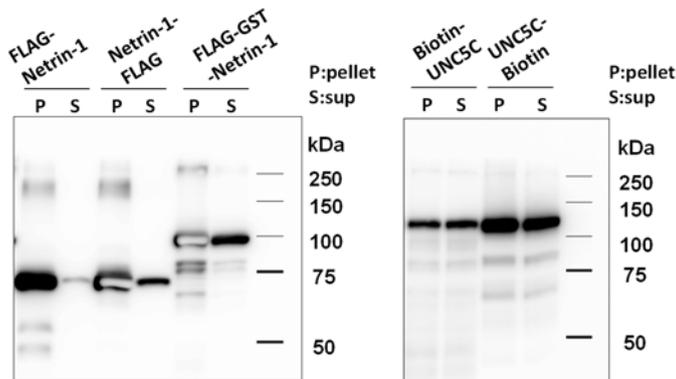


図2：コムギ無細胞タンパク質合成技術によるnetrin-1リガンド・レセプター合成
Netrin-1リガンド（左）とレセプターUNC5C（右）のタンパク合成結果をウエスタンブロットにて確認した。

合成タンパク質を用いて、リガンドとレセプターの結合を評価するAlphaScreenを行った。しかし、netrin-1とUNC5Cによる結合は非常に弱い結果であった。一方で陽性コントロールであるKCTD10-CUL3結合では高い値が出たためAlphaScreen自体は問題ないと考えられる（図3）。

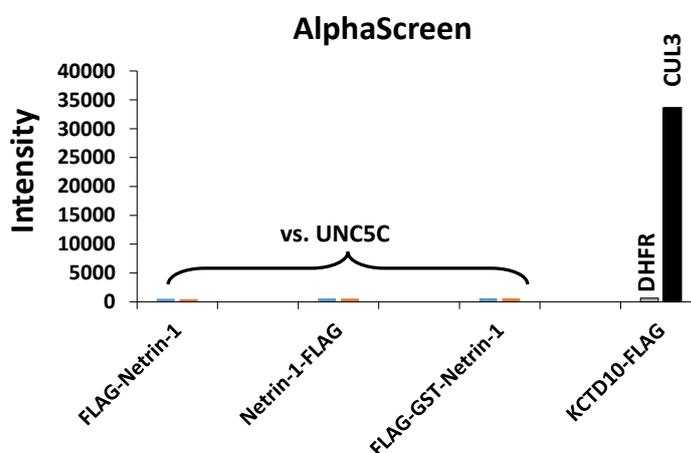


図3：AlphaScreen結果
各種netrin-1リガンドとUNC5Cレセプターの組合せによる結果と実験のコントロールとしてKCTD10とDHFR (negative)またはCUL3 (positive control)を用いた。

次に netrin-1 を結合に必要な最小部分に変えて検討を行った（図 4）。変異体として C-末端からドメインごとに削ったものを 4 種類作成した（m1-m4）。各種プラスミドを用いて、コムギ無細胞タンパク合成を行った。その結果、各種 netrin-1 変異体のタンパク合成をウエスタンブロットにて確認した（図 5）。

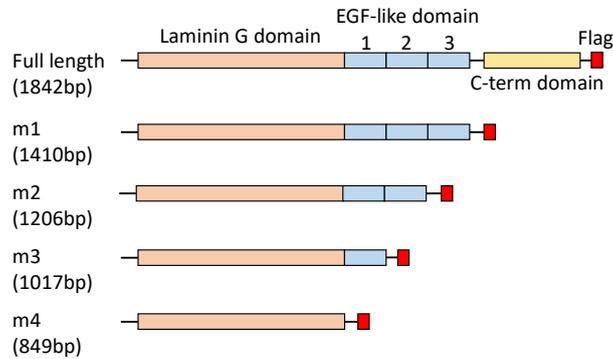


図 4：Netrin-1 変異体の作成
Netrin-1 全長に加えて、m1-m4 の変異体を作成した。

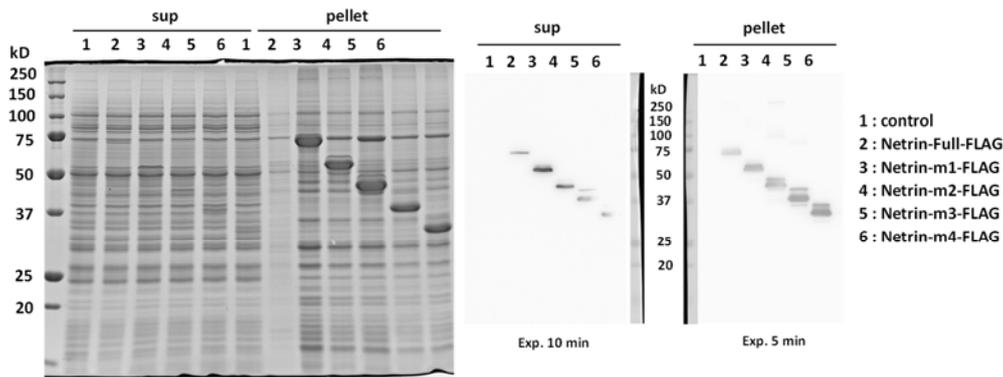


図 5：コムギ無細胞タンパク質合成技術による netrin-1 変異体合成
Netrin-1 変異体のタンパク合成とウエスタンブロットによる発現確認を行った。

成果発表

2021 年度の国内学会にて発表を予定している。

今後の課題

Netrin シグナル阻害剤のスクリーニング系の作成は本研究において重要であるため、今後も引き続き行う予定である。今後は、作成した netrin-1 断片と UNC5C レセプタータンパク質を用いて AlphaScreen を行う予定である。

また、大腸癌細胞を用いた netrin-1 遺伝子発現解析では、正常細胞との比較を行い、大腸癌細胞にてメチル化が促進されているかどうかを判定する予定である。