成蹊大学理工学研究報告
J. Fac. Sci.Tech., Seikei Univ.
Vol.53 No.1 (2016)pp.39-40
（研究速報）

抗がん剤候補化合物 MF4426 結合タンパク質の同定

矢島 知佳*[1]，横山 智哉子*[2]，久富 寿*[3]

Identification of the anticancer agent candidate compound MF4426 binding protein

Chika YAJIMA*[1], Chikako YOKOYAMA*[2], Hisashi HISATOMI*[3]

(Received May 31 2016)

1．背景

がん治療法には，手術療法・化学療法・放射線療法がある。化学療法である抗がん剤治療は，頻繁な細胞増殖を伴うがん細胞においてDNA合成阻害による細胞増殖抑制を主要目的とする。しかし，既存の抗がん剤はがん細胞特異的に作用しないため，同時に正常細胞へも細胞毒性を誘発する[1,2]。当研究室では，培養細胞において正常細胞に影響が少なく，がん細胞に細胞増殖抑制能を示す抗がん剤候補化合物MF4426 を開発した。既存の抗がん剤と比べ，MF4426 はがん細胞特異的に作用するため，がん細胞に対する高い抗腫瘍効果が示唆されている。本研究では，MF4426 結合タンパク質の同定により，細胞増殖抑制能の機序解明を目的とした。核酸医薬や抗体医薬によるターゲット因子の活性阻害に起因した細胞増殖抑制が可能となり，さらなる新規抗がん剤候補化合物の創造も期待できる。ヒト大腸がん細胞株DLD-1 タンパク質抽出液において，MF4426 結合タンパク質調査の結果から，約 200 kDa付近と約 90 kDa付近にMF4426 と特異的な結合タンパク質を確認した。MS解析の結果をもとに，信憑性の高いタンパク質を選別し，強制発現とノックダウンによりMF4426 結合タンパク質の同定を試みた。

2．材料と方法

MF4426 とタンパク質を結合させるため，Gelatinコート処理後の 100 mm dishにMF4426 溶液を添加した。16 時間後，MF4426 溶液を洗浄し，DLD-1 タンパク抽出溶液を 3 mL添加した。16 時間後，沈殿物と上清をそれぞれ回収した。沈殿物および上清をポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) し，結合タンパク質を可視化した。電気泳動後のゲルをCoomassie Brilliant Blue (CBB) で染色し，40% メタノール/ 10% 酢酸で 3 時間以上洗浄した。MF4426 が標的とするバンドのゲル断片をメスで切り取り，タンパク質を抽出した。抽出した溶液をEASY-nLC 1000 Liquid Chromatograph (Thermo Scientific™) によりLC/MS/MS解析した。解析結果より，スペクトル数を表すSpc値が高いMYH9 とMYH14 を約 200 kDaの結合タンパク質候補とした。結合タンパク質候補のplasmidをScreenFect™ A (Wako) を用いて，ヒト胎児腎細胞株HEK293Tに強制発現した[3,4]。24 時間培養後，MF4426 およびCamptothecinを 20 μM投与した。投与後 48 時間後でのMF4426 投与による細胞増殖の有無を観察した。また，Accumax (funakoshi) を用いて剥離した細胞数をトーマ血球計算盤により測定した。次に，結合タンパク質候補のsiRNAをHEK293T細胞に導入し，ノックダウンした[5)]。48 時間培養後，既存の抗がん剤およびMF4426 10 μM投与し，強制発現と同様に 48 時間後のMF4426 投与による細胞増殖の有無をおよび細胞数を測定した。

3．結果

MYH9 およびMYH14 強制発現細胞にMF4426 を投与し，48 時間後の細胞状態の変化を観察した。その結果から，MYH9 強制発現細胞において，顕著な細胞増殖抑制能の緩和が確認された。また，MYH14 強制発現細胞において，MF4426 の細胞増殖抑制能による細胞死が確認された (Fig 1. A)。MYH9 ノックダウン細胞にMF4426 を投与し，48 時間後の細胞状態の変化を観察した。その結果から，MYH9 ノックダウン細胞において，細胞増殖抑制能による細胞死の誘発が確認された (Fig 1. B)。

---

*[1]：理工学研究科理工学専攻博士前期課程
*[2]：物質生命理工学科　助教
*[3]：物質生命理工学科　教授(hisatomi@st.seikei.ac.jp)

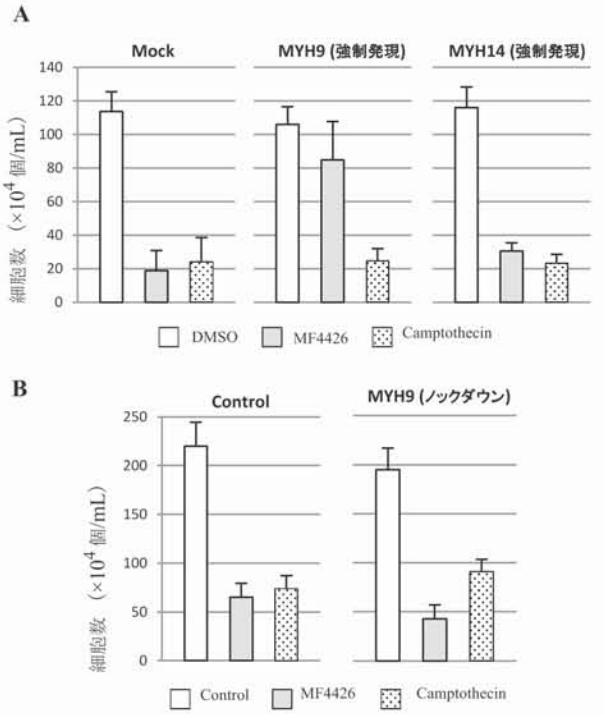

Fig 1. 抗がん剤およびMF4426 投与後 48 時間の細胞数
A; MYH9およびMYH14強制発現細胞にMF4426を20 μM投与
B; MYH9 ノックダウン細胞にMF4426 を 10 μM投与

4. 考察

MF4426 投与後 48 時間の細胞状態の観察により，MYH9強制発現細胞において顕著な細胞増殖抑制能の緩和が確認された。一方，MYH14強制発現細胞においては，MF4426 の細胞増殖抑制能による細胞死が確認された。これらの結果から，MYH9 強制発現細胞において，MF4426 とMYH9 の結合によるMF4426 の核移行の阻害により，MF4426 投与による細胞増殖抑制能の緩和が推測された。また，MYH14 強制発現細胞においては，MF4426 とMYH14 の未結合により，MF4426 の核移行が阻害されず，MF4426 の細胞増殖抑制能による細胞死が推測された。MYH9 ノックダウン細胞において，MF4426 投与後 48 時間の細胞状態の観察により，細胞増殖抑制能による細胞死の誘発が確認された。この結果から，MYH9 と未結合のMF4426 増加によるMF4426 の核移行により，細胞増殖抑制能による細胞死の誘発が推測された。本研究では，MYH9 を約 200 kDaのMF4426 結合タンパク質と決定した。しかし，MYH9 はMF4426 の核移行を阻害しているが，直接的にMF4426 の細胞増殖抑制能に関与しているとは考えにくい。今後は，細胞の核内においてMF4426 の細胞増殖抑制能と関与する約 90 kDaのタンパク質の同定が必要である。

参考文献

1) Press MF, Sauter G, Buyse M, *et al.* : Alteration of topoisomerase II-alpha gene in human breast cancer: association with responsiveness to anthracycline-based chemotherapy. *J Clin Oncol*, 49: 859-867, 2011
2) Sinha BK, Kumar A, Bhattacharjee S, *et al.* : Effect of nitric oxide on the anticancer activity of the topoisomerase-active drugs etoposide and adriamycin in human melanoma cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 14: 607-14, 2013
3) Katono K, Sato Y, Jiang SX, *et al.* : Prognostic significance of MYH9 expression in resected non-small cell lung cancer. *Plos One*, 3: e0121460, 2015
4) De Rocco D, Zieger B, Platokouki H, *et al.* : MYH9-related disease: five novel mutations expanding the spectrum of causative mutations and confirming genotype/phenotype correlations. *Eur J Med Genet*, 56: 7-12, 2013
5) Liang S, He L, Zhao X, *et al.* : MicroRNA let-7f inhibits tumor invasion and metastasis by targeting MYH9 in human gastric cancer. *Plos One*, 4: e18409, 2011