

日本医療研究開発機構 創薬基盤推進研究事業 事後報告書

I 基本情報

研究開発課題名： 分子腫瘍学・構造生物学・理論化学・臨床医学の融合による「がんの悪性進展促進因子 HPF4 に対するドラッグデザイン研究」

Drug design research against a malignancy-promoting factor, HPF4, based on the integrated study of molecular oncology, structural biology, theoretical chemistry, and clinical medicine

研究開発実施期間：2017年5月1日～2020年3月31日

研究開発代表者 氏名：原田 浩

Hiroshi HARADA

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

国立大学法人京都大学 大学院生命科学研究科 教授

Professor, Graduate School of Biostudies, Kyoto University

II 研究開発の概要

背景と目的：

がん患者の死因の実に90%以上はがんの転移・浸潤によるものであることから、その機序を解明し、適切に制御する治療法を確立することは、国民の健康福祉の向上にとって極めて重要である。本プロジェクトに先だって実施した予備的検討を通して研究代表者の原田らは、「低酸素誘導性転写因子 HIF-1 を活性化してがんの転移・浸潤を亢進する新規遺伝子」を同定、HPF4 (HIF-1-promoting factor 4) と命名していた。そして HPF4 の腫瘍内発現量ががん患者の予後不良と相関することや、HPF4-HIF-1 経路と UCHL1-HIF-1 経路を治療標的とする有用性を確認しつつあった。このような背景の下、構造生物学研究、および理論化学的分子シミュレーション研究の手法を取り入れることにより、同経路を標的とするドラッグデザイン研究を展開でき、かつ新たな創薬プラットフォームを構築でき、実際に治療候補物質を創出できると考えた。

そこで本プロジェクトでは先ず wet-lab の分子腫瘍学的研究を展開し、HPF4 が HIF-1 を活性化してがんの転移・浸潤能を亢進する機序を解明することとした。そして得られた知見を結晶構造解析や理論化学的分子シミュレーション研究と有機的に組み合わせ、HPF4 分子内に存在する治療標的とすべき活性中心を同定することを目標に定めた。また、計算化学を駆使して当該ドメインの機能を合理的に阻害する化合物をデザインすることとした。さらに、臨床検体を対象にした研究を通じて、HPF4 の治療標的としての有用性を確認する計画を立てた。

研究開発の成果：

1) 新規がん悪性進展促進因子の作用機序と機能の解析

(1) HPF4 の作用機序解明：

HPF4 が p53 変異型がん細胞において HIF-1 を活性化する機序を明らかにした。具体的には、まず HPF4 の機能ドメインを系統的に欠失させた変異体の解析で、N 末端の α ヘリックスが HIF-1 の活性化に必須のドメインであることを見出した。次に分子腫瘍学研究に構造生物学研究と理論化学研究を組み合わせた解析を通じ、HPF4 が、当該 α ヘリックスを介してホモ二量体を形成していること、また当該二量体形成が、HIF-1 α タンパク質の transactivation 活性の亢進に必須であることを明らかにした。以上の結果をもって、「p53 変異型がんにおいて HPF4 のホモ二量体形成を阻害する」という新たな治療コンセプトを提唱することができた。

(2) HPF4 の機能解明：

トランスウェル浸潤アッセイによって、HPF4 が p53 変異型がん細胞の転移・浸潤能を HIF-1 依存的に高めることを見出した。また、内在性の HPF4 発現レベルが高い p53 変異型細胞で、HPF4 の発現をノックダウンした場合に、浸潤能が低下することが確認できた。さらに、細胞増殖アッセイによって、HPF4 ががん細胞の増殖を亢進する作用も確認された。HPF4-HIF-1 経路を遺伝子工学的に活性化した腫瘍モデルマウスにより、HPF4-HIF-1 経路の活性化によって、p53 変異型腫瘍の増殖が亢進することを明らかにした。N 末端の α ヘリックス内に点変異を導入することでホモ二量体形成能を失った HPF4 は、腫瘍増殖亢進能を持たなかった。以上の結果から、当該領域を標的とする妥当性が確認された。

(3) 低分子化合物の評価：

分子腫瘍学研究、構造生物学研究、理論化学研究を組み合わせて、HPF4 N 末端の α ヘリックスによるホモ二量体形成を阻害する人工ペプチドをデザインし、当該ポリペプチドを発現するプラスミド DNA を構築した。また、当該ポリペプチドを化学合成した。HPF4 のホモ二量体形成をモニターできるルシフェラーゼアッセイと、HIF-1 transactivation 活性を定量するルシフェラーゼアッセイによって、当該ペプチドが、HPF4 ホモ二量体形成と HIF-1 活性化能を抑制できることを確認した。

2) 新規がん悪性進展促進因子 HPF4 の構造解析

(1) HPF4 の精製：

HIF-1 の活性化において重要な役割を果たす HPF4 N 末端 α ヘリックスの発現ベクターを構築し、大腸菌を宿主とした系で当該組換え蛋白質を大量発現、そして精製した。

(2) HPF4 の結晶化：

sitting drop 及び hanging drop 蒸気拡散法による結晶化条件の最適化を行い、回折斑点を与える HPF4 α ヘリックスの結晶を取得した。

(3) HPF4 の X 線結晶構造解析：

Spring-8 で X 線照射実験を実施し、X 線回折データセットを取得した。このデータを対象に構造計算ソフトを用いて、分子置換法を利用した回折データの位相決定、精密化を行った。

3) 新規がん悪性進展促進因子に対する理論化学的ドラッグデザイン研究

(1) ホモロジーモデリング：

HPF4 タンパク質分子構造を理論化学的に解析するにあたり、構造類似性が高い他のタンパク質立体構造を基にホモロジーモデリングを行い、構造緩和を行うことでひずみを取り除き、HPF4 野生型タンパク質の分子構造を得た。

(2) 結晶構造に基づいた理論化学計算、分子シミュレーション：

HPF4 タンパク質のホモ二量体構造を安定化・不安定化させる要因を同定するため、野生型タンパク質の分子シミュレーションを行った。その結果、二量体を構成する界面から離れているにもかかわらず、界面領域の α -ヘリックスの動きと連動する局所構造部位が 2 カ所あることを見いだした。また、理論化学的手法によって得られた HPF4 蛋白質結晶構造モデルを基に、HIF-1 の活性化を担う重要な HPF4 機能ドメインとして N 末端領域の α -ヘリックスを同定、特に 4 つのアミノ酸が極めて重要な役割を果たしている可能性を見出した。その解析結果を研究代表者の原田研究室にフィードバックした結果、分子腫瘍学的実験によって当該 N 末端領域が HPF4

のホモ二量体形成と HIF-1 の活性化の双方に必須であることが実証された。この N 末端領域によるホモ二量体形成を阻害するポリペプチドを計算科学的に予測し、原田研に情報提供した。そして上述の通り、分子腫瘍学的研究で、当該ポリペプチドが実際に期待した活性を発揮することが確認された。

4) 新規がん悪性進展促進因子の腫瘍内発現量に着目したがん患者の予後研究

(1) TMA 免疫染色実験最適化：

移植腫瘍を対象にした予備的実験で、新規 HIF-1 活性化因子 HPF4 と UCHL1 の免疫組織化学染色実験の系を最適化した。

(2) Tissue Micro Array 作成：

京大病院呼吸器外科が、根治的手術によって収集し、既に予後情報がとられているヒト肺がんの臨床検体を対象に、Tissue Micro Array を作成した。

(3) TMA 免疫染色と予後との相関解析：

当該ヒト肺がんの TMA を対象に HIF-1 α 、HPF4 に対する免疫組織化学染色を実施し、各染色強度をダブルブラインド法で定量した。その結果、HPF4 の腫瘍内発現量がん患者の生命予後と相関することを確認することができた。

成果のまとめ：

本研究を通じ、HPF4-HIF-1 経路を遮断することによって p53 変異型腫瘍の増殖を抑制できることが確認され、新たな治療法の確立に向けた道筋が示された。また HPF4 のホモ二量体形成を阻害することによって、HPF4-HIF-1 経路を遮断できることが実証された。さらに、分子腫瘍学・構造生物学・理論化学を融合した研究を通じて、HPF4 ホモ二量体形成の阻害を具現化するポリペプチド性阻害物質が得られた。今後、当該ポリペプチドやその構造類似化合物を開発することにより、p53 変異型腫瘍に対する治療薬の創出に繋がることが期待される。本プロジェクトを通じ、wet-lab 生物学と理論化学研究の双方に精通した人材を育成するプラットフォームが形成された点も意義深い。

Both aberrant activation of a hypoxia-inducible transcription factor, HIF-1, and dysfunction of a tumor suppressor, p53, are known to induce malignant phenotypes and therapy resistance of cancer cells. However, functional and mechanistic relationships between them remain elusive, which makes it difficult to develop therapeutic strategies for p53-deficient cancers. We recently conducted a genome-wide expression screening and successfully identified a novel gene potentially linking the two. We designated it as HIF-1-promoting factor 4 (HPF4) and hypothesized that we could open the new avenue to the development of anticancer drug against p53-deficient tumors by elucidating molecular mechanism underlying the activation of HIF-1 by HPF4.

We found that HPF4 increased the transactivation activity of HIF-1 α in functional p53-deficient cancer cells. HPF4 overexpression facilitated growth and invasion of cancer cells *in vitro* and promoted the growth of subcutaneous tumor *in vivo* when functional p53 was deficient. Immunohistochemical analysis of clinical lung cancer samples found HPF4 expression levels associated with poor overall survival of patients. Deletion and point mutation analyses revealed HPF4 N-terminus, whose importance in HPF4 homodimerization was predicted by *in silico* homology modeling, critical for the HPF4 activity. Polypeptides consisting of HPF4 N-terminus competitively inhibited the HPF4 homodimer formation and exhibited therapeutic effect against p53-deficient xenografted tumors. Our data indicates that HPF4 promotes growth and malignancy of p53-deficient tumors by activating HIF-1, thus provides a rational basis to target the HPF4-HIF-1 axis in p53-deficient cancers. We expect that the polypeptide itself or its conformation mimetics can be developed as an anticancer drug against p53-deficient cancers.