

総括研究報告書

1. 研究開発課題名： 「がん幹細胞を標的とした根治療法の開発」（アミノ酸輸送複合体をシーズとしたがん幹細胞の探索法と分子標的治療の開発）
2. 研究開発代表者： 国立大学法人名古屋大学大学院医学系研究科総合医学専攻 榎本 篤
3. 研究開発の成果

本研究ではがん関連分子 Girdin が CD98hc を中心としたアミノ酸輸送複合体と複合体を形成することに基づき、本複合体形成を制御する Girdin のリン酸化状態を特異的に認識する抗体を作製し、本リン酸化が組織中におけるがん幹細胞を同定するための診断マーカーとなり得る可能性について検証した。また Girdin/CD98hc 間の結合を阻害することでがん幹細胞の増殖あるいは未分化性を抑制する新規リード化合物の探索を試みることを目標とした。その結果、下記の成果を得た。

①POC 取得に向けた機能検証実験とがん幹細胞の新規診断マーカーの開発

・細胞生物学的機能検証実験

がんの進展及びがん幹細胞の維持や増殖における Girdin/CD98 複合体の機能について、主に培養細胞を用いた検証を行った。CD98 複合体は CD98hc とアミノ酸トランスポーターより構成されるが、Girdin の N 末端ドメインは CD98hc の細胞内ドメインと結合することを生化学的に明らかにした。本複合体構成には MAP キナーゼによる Girdin のリン酸化が必須であり、また複合体形成に応じて細胞内代謝の mTORC1 の活性を負に制御することを明らかにした。

・Girdin リン酸化抗体の取得

次に Girdin のリン酸化状態を検出する特異的抗体の作出を開始し、同リン酸化ががん幹細胞の診断マーカーとなり得る可能性について検証した。Girdin の 233 番目および 237 番目のセリンがリン酸化されたペプチドを抗原としてウサギポリクローナル抗体の取得を試みた。2回にわたる抗体作成ではいずれもリン酸化ペプチド特異的血清の取得に失敗したが、3回目にデザインしたペプチドを用いて免疫したところ、237 番目のセリンのリン酸化を認識する抗体の取得に成功した。

②がん幹細胞を標的とした Girdin/CD98 分子間相互作用の阻害薬の開発

・相互作用アッセイ系の開発

リン酸化依存的な Girdin/CD98 複合体の形成を阻害するリード化合物の取得を目標とし、同複合体の形成を簡便に検出可能なアッセイ系の構築を試みた。具体的には Fluoppi システムをベースとした Girdin/CD98 間の相互作用を検出するアッセイ系の構築を目指して、複数の Girdin N 末端ドメインおよび CD98hc の細胞内ドメインをコードするプラスミドの構築を行ったが、いずれもリアルタイムにおける複合体の検出は困難であった。理由として CD98hc が II 型膜貫通分子であり、そのような分子を外因性に発現させると細胞内で凝集を起こすことが原因と考えられた。

・リード化合物の探索

上記アッセイ系の開発が成功した場合に Girdin/CD98 複合体を阻害するリード化合物のスクリーニングに移行する予定であったが、上述の通りアッセイ系の開発に難渋し、スクリーニングの実施が困難であった。