

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution

研究開発課題名： (日本語) FOXK1 による CCL2 発現調節機構を標的としたがん治療法の開発
(英語) Development of cancer therapeutics targeting FOXK1-mediated regulation of CCL2 expression

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人九州大学生体防御医学研究所・主幹教授・中山 敬一
所属 役職 氏名： (英語) Keiichi Nakayama, Distinguished professor, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University

実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

II. 成果の概要（総括研究報告）

FOXK1 依存的な CCL2 の発現上昇をモニター可能な系を、HeLa 細胞株を用いて構築した。まず FOXK1 の上流シグナル伝達系を常に活性化させるため、FOXK1 シグナルの上流に位置する阻害分子をコードする XXX 遺伝子を CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術によって破壊した。また、CCL2 発現は FOXK1 経路だけでなく、古典的な NF- κ B 経路の影響を受けるため、これを抑制するためにゲノム編集技術を用いて NF- κ B 経路の必須分子 RelA を欠損させた。これらのゲノム改変によって高感度かつ低ノイズのハイスループットスクリーニングが可能になることが期待される。次に CCL2 の発現上昇を蛍光強度によって検出可能となるように、CCL2 プロモーターに連結した NanoLuc Luciferase 遺伝子と、PGK プロモーターに連結した Firefly Luciferase を発現するプラスミドをトランスフェクションして一過性に発現させ、NanoLuc Luciferase と Firefly Luciferase の発光強度比 (Ratio) を測定することで偽陽性率の低下を狙う系を構築した。これらの実験系を用いて、最も高感度かつ再現性高く結果が得られる実験条件を求めた。

本研究においては臨床診断に耐えうる高感度抗活性化型 FOXK1 モノクローナル抗体を樹立することとした。われわれは FOXK1 の転写活性化能の制御機構を詳細に検討した結果、その転写活性化能はリン酸化による制御を受け、特定の部位の脱リン酸化によって活性が高まることを発見した。そのリン酸化制御を受けるアミノ酸残基を含むペプチド（非リン酸化型）を抗原としてラットを免疫し、定型通りの方法で多数のモノクローナル抗体を得た。それらをスクリーニングして高感度抗活性化型 FOXK1 モノクローナル抗体を樹立することに成功した。

We developed a screening system to monitor the expression of CCL2 gene that is dependent on FOXK1 with a use of HeLa cells. First, in order to activate the FOXK1-mediated signaling pathway in a constitutive manner, we disrupted XXX gene encoding an inhibitory regulator for FOXK1 by the CRISPR-Cas9-mediated genome editing technology. Second, RelA gene was also disrupted to inactivate the NF- κ B signaling pathway, given that CCL2 is regulated not only by the noncanonical FOXK1-mediated pathway but also by the classical NF- κ B-mediated pathway dependent on RelA. The genetic engineering in HeLa cells is expected to reduce the background noise for our high-throughput screening. We transfected the modified HeLa cells with plasmids containing CCL2 promoter-driven NanoLuc luciferase gene and PGK promoter-driven Firefly luciferase gene.

In this study, we attempted to generate monoclonal antibodies to an activated form of FOXK1. Given that our preliminary results showed that dephosphorylation of FOXK1 is essential for its transcriptional activation for CCL2 gene, we immunized rats with a synthetic peptide containing the dephosphorylation site, and finally obtained specific monoclonal antibodies to the active form of FOXK1.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）
（本年度は該当なし）

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. The Cell Cycle from Mechanism to Therapy, 口頭, Nakayama, K. I., Cell cycle regulation in cancer stem cell, Montreal, Canada, 2016/6/2, 国外.
2. 細胞周期から見たがん幹細胞の治療抵抗性のメカニズム, 口頭, 中山敬一, 第 26 回がん臨床研究フォーラム, 東京. 2016/6/17, 国内.
3. Cell cycle regulation in cancer stem cell, 口頭, Nakayama, K. I., The 47th International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund: Current status and perspective of cancer stem cell research, Tokyo, 2016/11/10, 国内.
4. がん幹細胞の撲滅による新しいがん治療法, 口頭, 中山敬一, 第 19 回癌と骨病変研究会, 東京, 2016/11/11, 国内.
5. 栄養シグナルは転写因子 FOXK1 を活性化して慢性炎症を惹起する, ポスター, 中津海洋一, 松本雅記, 中山敬一, 第 39 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2016/12/1, 国内.
6. がん幹細胞の撲滅による新しいがん治療法, 口頭, 中山敬一, 第 35 回口腔腫瘍学会総会・学術大会, 福岡, 2017/1/27, 国内.

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み
（本年度は該当なし）

(4) 特許出願
（本年度は該当なし）