

平 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) 革新的がん医療実用化研究事業  
(英語) Practical Research for Innovative Cancer Control

研究開発課題名： (日本語) 骨肉腫の増悪化に関与する Ror2 チロシンキナーゼの基質を標的とした  
新規分子標的薬の開発  
(英語) Development of a novel molecular target drug targeting the substrate  
for Ror2 tyrosine kinase involved to malignant progression of  
osteosarcoma

研究開発担当者 (日本語) 神戸大学 大学院医学研究科 助教 林 真琴  
所属 役職 氏名： (英語) **Kobe University Graduate School of Medicine,  
Assistant Professor, Makoto Hayashi**

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

研究開発分担者 (日本語) 神戸大学 大学院医学研究科 教授 南 康博  
所属 役職 氏名： (英語) **Kobe University Graduate School of Medicine,  
Professor, Yasuhiro Minami**

研究開発分担者 (日本語) 神戸大学 大学院医学研究科 准教授 西田 満  
所属 役職 氏名： (英語) **Kobe University Graduate School of Medicine,  
Associate Professor, Michiru Nishita**

研究開発分担者 (日本語) 神戸大学 大学院医学研究科 講師 遠藤 光晴  
所属 役職 氏名： (英語) **Kobe University Graduate School of Medicine,  
Associate Professor, Mitsuharu Endo**

研究開発分担者 (日本語) 東京慈恵会医科大学 医学部 前田 和洋  
所属 役職 氏名： (英語) **The Jikei University School of Medicine, Kazuhiro Maeda**

研究開発分担者 (日本語) 第一三共株式会社 研究開発本部 オンコロジーラボトリー 磯山 毅  
所属 役職 氏名: (英語) DAIICHI SANKYO COMPANY, Oncology Laboratory, Takeshi Isoyama

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

### (1) 骨肉腫細胞の浸潤における Ror2 の基質タンパク質の同定および機能解析

林真琴 助教 (神戸大学 大学院医学研究科) は、南康博 教授 (神戸大学 大学院医学研究科)、西田満 准教授 (神戸大学 大学院医学研究科)、遠藤光晴 講師 (神戸大学 大学院医学研究科) らとともに、Ror2 受容体型チロシンキナーゼの基質タンパク質を同定することを目的として、iDimerize Inducible Homodimer System を利用した二量体化を誘導可能な細胞膜局在型 Ror2 intracellular domain (Ror2 ICD) の融合タンパク質 (MiD-Ror2 ICD) の発現ベクターを構築した。MiD-Ror2 ICD を発現するヒト骨肉腫細胞株 (143B 細胞) を用いて、二量体化 MiD-Ror2 ICD タンパク質による基質タンパク質のリン酸化を誘導し、リン酸化基質タンパク質の検出を試みた。しかしながら、再現性の良い結果を得ることが出来なかった。このため、ヒト骨肉腫細胞株 (SaOS2 細胞) を Wnt5a で刺激することによって誘導されるリン酸化タンパク質の検出も行った。抗リン酸化チロシン抗体を使用した免疫沈降法および電気泳動法によって、Wnt5a 刺激により誘導されるチロシンリン酸化タンパク質を検出できた。しかし、十分な試料を得ることができなかつたため質量分析を行うことが出来なかった。そこで、Ror2-ビオチンリガーゼ融合タンパク質 (Ror2-BioL) を発現するヒト骨肉腫細胞株 (143B 細胞) を樹立した。この細胞株を用いて、Ror2 に結合するタンパク質 (基質タンパク質の候補) を Ror2-BioL タンパク質によってビオチン化し、ビオチン化 Ror2 結合タンパク質をストレプトアビジンビーズによって精製した。その結果、ビオチン化 Ror2 結合タンパク質を検出できた。しかし、平成 28 年度内で質量分析を行うに至らなかった。

### (2) 臨床検体における Ror2 による基質タンパク質の発現・リン酸化レベルの解析

林らが同定した Ror2 基質タンパク質について、前田和洋 (東京慈恵会医科大学) が骨肉腫の患者の臨床検体を用いてその発現レベルの解析を行う予定であったが、**基質タンパク質の同定に至っておらず解析を行っていない。**

### (3) Ror2 とその基質のチロシンリン酸化を阻害する低分子化合物のスクリーニング・システムの構築

林、磯山毅 (第一三共株式会社) らが Ror2 のチロシンキナーゼ活性、あるいは Ror2 とその基質の相互作用を阻害する低分子化合物 (リード化合物) を化合物ライブラリーから同定するハイスループット・スクリーニング (HTS) システムの構築を行う予定であったが、**基質タンパク質の同定に至らなかつたため行っていない。**

### (1) Identification of substrates for Ror2 in invasion of osteosarcoma cells and functional analysis

To identify substrates for Ror2 tyrosine kinase, an expression vector containing a fusion protein (Mid-Ror2 ICD) composed of a membrane anchor domain, inducible homo-dimerization domain based on iDimerize Inducible Homodimer System, and Ror2 intracellular domain (Ror2 ICD) was constructed, and human osteosarcoma cells (143B cells) transiently expressing Mid-Ror2 ICD protein were established. Identification of phospho-proteins as substrates for Ror2 induced by homo-dimerized Mid-Ror2 ICD proteins in 143B cells was failed. At the same time, immunoprecipitation analysis by an anti-phosphotyrosine antibody showed that some phospho-proteins in human osteosarcoma cells (SaOS2 cells) stimulated with Wnt5a were detected. However, the amount of the phospho-proteins extracted from the cells and the protein quality were not suitable for Mass-spectrometry analysis. Finally, An expression vector of a fusion protein (Ror2-BioL) composed of a full-length Ror2 protein and a biotin ligase was constructed, and 143B cells stably expressing Ror2-BioL protein were established. Pull down assay of Ror2-BioL 143B cells treated with Biotin using streptavidin beads showed that biotinylated proteins were detected. This result suggests that substrates for Ror2 are bound to and biotinylated by Ror2-BioL protein. Mass-spectrometry analysis is performing to identify the biotinylated proteins.

### (2) Analysis of expression and phosphorylation of substrates for Ror2 in clinical specimens from patients with osteosarcoma

The analysis using clinical specimens is not performed.

### (3) Establishment of high-throughput screening assay to identify small molecules which inhibit interaction between Ror2 and its substrates or activity of Ror2 tyrosine kinase

Establishment of the high-throughput screening assay is not preformed.

## 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）

ありません

#### (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

ありません

#### (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

ありません

#### (4) 特許出願

ありません