

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04305

研究課題名(和文) p53不活化腫瘍細胞の選択的排除を可能とする革新的がん医療構築のための基盤研究

研究課題名(英文) Development of a novel strategy for the elimination of cancer cell inactivated p53

研究代表者

土屋 直人 (Tsuchiya, Naoto)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：30322712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん抑制因子p53が制御する細胞内ネットワークは、様々な発がんストレスから細胞の形質転換を防ぐために最も重要である。ヒト悪性腫瘍の半数以上でp53遺伝子の失活変異が認められることから、p53が不活化したがん細胞の選択的排除は、理想的ながん治療戦略の一つである。本研究では、p53変異細胞の細胞周期制御に必須なNEK9の機能の詳細解明と、p53の変異の有無で細胞に誘導する表現型が異なるmiR-101の機能の詳細を解析した。その結果、p53変異状態ではストレスに対する応答が極めて重要な働きをしている可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The p53 tumor-suppressor networks are crucial cellular components to prevent transformation of normal cells under exposure to various oncogenic insults. We previously identified NEK9 as an important cellular molecule that is required for the progression of cell cycle at G1 to S phase. NEK9 knockdown induced the inhibition of cell proliferation exclusively in p53 mutant and deficient cancer cell lines with cell cycle arrest at G1 phase. We tried to identify NEK9 interacting proteins in p53 mutant cancer cells and identified several translation initiation factors. Among them, knockdown of molecule X induced strong inhibition of cell proliferation dominantly in p53 mutant cancer cells. Our detailed study demonstrated that NEK9 and X complex regulates translation of a certain subset of mRNA, which are needed for the proliferation of p53 mutant cancer cell. We are now conducting further analyses to clarify the mechanism for the control of cell cycle specifically in p53 mutant cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：p53 microRNA NEK9

1. 研究開始当初の背景

マイクロRNA (miRNA) は、内在性のタンパク質非コード RNA (small non-coding RNAs) の一つであり、遺伝子発現制御因子である。その機能異常は、ヒト疾患、特に、がんの病態誘発とは極めて深く連携している。特に、がん細胞で発現低下を示す miRNA の中には、がん抑制因子として機能するものが少なくない。がん抑制因子 p53 が形成する細胞内がん抑制ネットワークの制御には、多くの miRNAs が関連していることもわかってきている。当研究室では、がん抑制的 miRNAs、特に p53 経路の制御に関連する miRNAs を複数同定し、それらの機能を明らかにしてきた。興味深いことに、それら miRNAs の活性化・機能は、細胞が暴露されるストレスの種類に依存していた。例えば、miR-34a、miR-22、miR-101 は、p53 ネットワークで機能するがん抑制的 miRNAs であるが、その活性化を誘導するストレスは異なっている。また、これらが誘導する表現型は、p53 の変異の有無で大きく異なることがわかって来た。miR-22 は、強いストレスに細胞が暴露された時に、p53 によって転写活性化され、アポトーシスを誘導する。しかしながら、p53 が変異型もしくは欠損細胞では、細胞死を誘導せず、細胞周期の停止を誘導する。miR-22 の p53 変異細胞の細胞周期停止の際には、キーとなる細胞周期制御因子の発現に変動は見られず、p53 変異の遺伝的背景に特徴的な分子が存在することが示唆された。その制御因子を探索し、NEK9 を同定した。NEK9 の発現抑制により p53 変異・欠損細胞の増殖が *in vitro* および *in vivo* で抑制されるものの野生型のがん細胞に影響はなかった。NEK9 は M 期を制御する因子として報告されているが、p53 変異細胞では G1-S の移行に深く関連していた。一方、miR-101 も p53 の変異状態で誘導する表現型が異なる。そのメカニズムの詳細を知るために、p53 野生型の背景での分子ネットワークを同定する必要がある。これらの解析を通じて、p53 不活化細胞に特徴的な細胞内ネットワークを明らかにすることで、新たな作用機序に基づく治療法の確立に貢献できると考える。

2. 研究の目的

本研究では、miR-101 の p53 野生型細胞におけるネットワーク制御の詳細を明らかにし、それを p53 変異細胞へと外挿する。さらに、NEK9 と相互作用する分子を同定し、その機能解析を通じて、p53 不活化がん細胞における特徴的な細胞内ネットワークを抽出することを目的とする。

3. 研究の方法

NEK9 相互作用分子の同定と機能解析

1) 質量分析

内在性の NEK9 を免疫沈降により回収し、共沈殿するタンパク質分子を質量分析により網羅的に解析する。

各々について、免疫沈降後にイムノプロッ

ト法により相互作用を確認する。

2) NEK9 複合体の機能解析

NEK9 複合体の機能は、siRNA による相互作用子のノックダウンや、過剰発現により p53 変異細胞に及ぼす影響を検討した。

3) 肺腺がん症例における NEK9 相互作用因子の発現解析

当研究室では、肺腺がん症例のオミックスデータを利用することが可能であり、それらを利用して臨床検体における当該因子の発現と p53 変異との関連を解析した。

4) Microarray 解析

マイクロアレイ解析から、NEK9 のノックダウンによって発現変動する遺伝子発現プロファイルを作成した。ネットワークの解析は IPA によって行った。

p53-miR-101 ネットワークの解明

1) miR-101 による p53 野生型がん細胞に及ぼす影響の解析

miRNAs はリポフェクション法により、がん細胞へと導入し、細胞増殖および細胞周期の解析は、比色定量法、Flow Cytometry によって行った。細胞死の検出も同様に実施した。miRNA の標的分子の発現解析は定量的 RT-PCR 法、ならびにイムノプロット法で行った。マウス移植がんへの miR-101 の投与実験のために、Dox 誘導型 miR-101 発現レンチウイルスベクターを作成し、それを発現するがん細胞を樹立した。その細胞をマウスへと移植し、Dox を含む餌の摂食によって、miR-101 の発現を誘導した。

2) miR-101 の発現と標的遺伝子の発現解析

上記、肺腺がん症例における miR-101 とその標的遺伝子の発現を解析し、病態との関連を解析した。

4. 研究成果

NEK9 と相互作用する細胞内因子の同定とその機能解析

当研究室では、p53 不活化がん細胞の増殖に必須な因子を探索し、NEK9 を同定した (Kurioka et al. Sci. Rep. 2014)。NEK9 をノックダウンすると、p53 野生型の細胞増殖には影響を与えないが、p53 変異・欠損細胞の増殖を有意に抑制することがわかった。詳細な結果、NEK9 の発現抑制により、細胞周期の G1-S の移行が阻害、もしくは極めて遅くなっていると考えられた。実際、p53 変異細胞においても、NEK9 の発現抑制で p21 の発現が上昇することがわかった。この機能は、NEK9 のキナーゼドメインに変異を導入した Kinase dead (KD) によって影響は受けないことから、NEK9 のキナーゼ活性は必要ない、即ち、キナーゼとしての機能ではなく、他の細胞内分子と複合体を形成し、特徴的な機能を持つことが示唆された。

NEK9 複合体を同定するため、抗 NEK9 抗体による免疫沈降 (Immunoprecipitation, IP) を行い、p53 野生型および変異型細胞の比較を行った。IP 後の電気泳動では、両者で大きく違うバンドは認められないことから、NEK9

と相互作用する細胞内因子は、p53 変異状態に寄らず、共通している可能性が高いことがわかった。IP 産物を質量分析により網羅的に解析した。図 1 に示すように、p53 野生型および変異がん細胞からは、多くの共通した因子が同定された。p53 変異細胞である SW480 から同定された NEK9 相互作用因子の候補と細胞

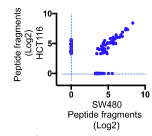


図 1) NEK9-IP産物の比較

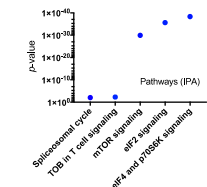


図 2) NEK9相互作用因子が関連する細胞内ネットワーク

内ネットワークの関連を解析した。多くの因子は、mRNA の翻訳と深く関連する因子であることがわかった (図 2)。p53 の変異細胞では、特徴的な遺伝子群の翻訳制御に関連していると考えられた。そのうちの一つ X は、翻訳制御因子として知られているが、グローバルな翻訳制御というよりはむしろ特定の mRNA の翻訳を制御していると報告されている。NEK9 と X の相互作用を IP により確認すると、p53 野生型と変異型細胞の両方で相互作用が確認されたが、IP されてくる量が両者で大きく異なることがわかった。特に、変異型 p53 を有する細胞では、NEK9 と X が同一複合体に属している可能性が高いことがわかった。興味深いことに、NEK9 と同様に X の発現を抑制すると、p53 野生型の増殖はあまり抑制しないが、変異型を有するがん細胞の増殖を強く抑制した。これらの結果から、X も NEK9 と同様に p53 変異細胞の増殖に必須な因子の翻訳制御に関連していると考えられる。リボソームアッセイから、NEK9 の局在は、p53 変異の有無で違いがない一方、X の局在は、変異の有無で大きく異なることがわかった。これらの結果から、p53 の変異は、特定 mRNA の翻訳状態を大きく変化させることが強く示唆された。NEK9 の発現抑制により、変動する遺伝子を探索し、その上流の制御因子の探索から、上記の特定 mRNA の推定をおこなった。その結果、ストレス反応に深く関連する転写因子 Y を候補として同定した。すなわち、がん細胞は多くのストレスに適応して、自身の増殖を促すが、p53 が不活性化したがん細胞で、その適応システムがさらに強く働いていると考えられる。現在、メカニズムの詳細について検討を加えている。

p53-miR-101 ネットワークの解明

miR-101 は、当研究室で開発した機能スクリーニング法 (Izumiya et al. Carcinogenesis, 2010) によって同定されたがん抑制的 miRNA の一つである。miR-101 の導入により、p53 野生型のがん細胞は強い細胞死が誘導されるが、変異型では細胞周期の停止が誘導される。そのメカニズムの詳細を解析するため、miR-101 と p53 ネットワークの関連を解析した。miR-101 の導入により、p53 が活性化されること、それは上流の ATM のリン酸化が必須であることを見出した。し

かしながら、miR-101 によって DNA ダメージ依存的な核内 γ -H2AX の蓄積は認められず、miR-101 による ATM-p53 経路の活性化は DNA 損傷応答とは異なることがわかった。その標的遺伝子の探索をマイクロアレイで実施し、M 期制御因子を複数同定した。中でも、中心体制御を司る EG5 の発現を抑制すると、ATM の活性化に伴う p53 のリン酸化の亢進が認められた。これらの結果から、miR-101 の発現上昇は、EG5 の抑制に起因する ATM-p53 経路の活性化を誘導し、細胞周期の G2 期停止からアポトーシスによりがん細胞の排除を行うことを見出した。miR-101 が細胞内で上昇する条件を検討するため、p53 野生型細胞株に様々なストレスを与え、miR-101 の発現を解析した。その結果、miR-101 は核小体ストレスに特化して、p53 依存的に発現が上昇することを明らかにした。興味深いことに、p53 依存的な miR-101 の活性化は、転写レベルでの制御ではなく、post-transcriptional に制御されていることも明らかにした。p53 野生型がん細胞が核小体を受けると、30 時間後に miR-101 の上昇と EG5 のレベルの低下が誘導される。このとき、細胞内に anti-miR-101 を導入しておく、細胞死が有意に抑制されることがわかった。miR-101 は、がん細胞の核小体ストレス誘導薬剤に対する感受性を亢進させるものの、それ以外の薬剤の感受性には影響を与えないことから、p53-miR-101 経路が核小体ストレス応答に関連していることがわかる。肺腺がん症例における miR-101 の発現は、正常肺に比べて有意に低下していた。一方、標的遺伝子である EG5 の発現は、miR-101 の発現と負の相関を示した。miR-101 の発現低下を示す p53 野生型の

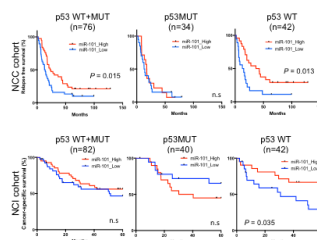


図 3) miR-101 の発現低下を阻す p53 野口型肺腺がんの予後は不良である

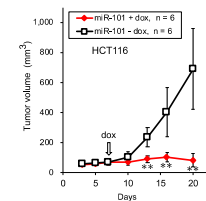


図 4) miR-101 による Xenograft の増殖抑制

症例は、有意に予後が悪く、この経路の失活もしくは機能の低下が、p53 野生型の肺腺がんの悪性化に関与していることも示唆された (図 3)。miR-101 の発現誘導は、マウス Xenograft の増殖を強く抑制することから、この経路の活性化は、p53 野生型がん細胞の排除に有用であると考えられる (図 4)。p53-miR-101 経路の活性化を模倣が既存薬剤により可能であるかの検討を行うため、p53-miR-101 の最下流に位置し、細胞死の誘導に重要な因子の探索を行い、Cellular Inhibitor of apoptosis protein (cIAP) ファミリーを同定した。特に、miR-101 導入後の細胞死は、cIAP1 と cIAP2 の発現低下と相

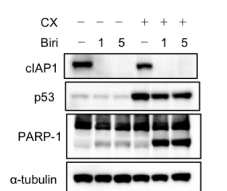


図5) CX-5461とピリナパントによるアポトーシスの誘導

討した。その結果、両者の併用により、p53 変異型細胞のアポトーシス経路は活性化されないが、p53 野生型のがん細胞ではその強い活性化が認められた(図5)。これらの結果から、miR-101 は、p53 依存的核小体ストレス応答を適切に制御する因子であり(図6) その機能異常は、内在性がん抑制ネットワークの機能低下のみならず、薬剤に対する感受性にも関連することがわかった。さらに、そのネットワークを模倣は、p53 野生型がん細胞の効率よい排除へと応用が可能であると考えられた。

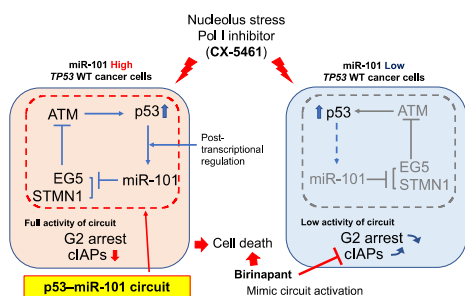


図6) p53-miR-101ネットワーク

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Fujiwara Y, Nishida M, Saito M., Robles Al., Takeshita F., Watanabe M., Ochiya T., Yokota J., Kohno T., Harris CC., Tsuchiya N. A nucleolar stress-specific miR-101 - p53 molecular circuit functions as an intrinsic tumor-suppressor network. (2018) EBiomedicine in press. 査読あり
2. Asano N., Matsuzaki J., Ichikawa M., Kawauchi J., Takizawa S., Aoki Y., Sakamoto H., Yoshida A., Kobayashi E., Tanzawa Y., Nakayama R., Morioka H., Matsumoto M., Nakamura M., Kondo T., Kato K., Tsuchiya N., Kawai A., Ochiya T. A serum microRNA classifier for the diagnosis of bone and soft tissue sarcomas of various histological subtypes. (2018) Nat. Commun. in press. 査読あり

[学会発表](計 11 件)

Tsuchiya N. Regulation of intrinsic p53-dependent tumor-suppressor networks by microRNAs. 第76回日本癌学会総会 2017年9月 横浜

Nishiyama Y., Asano N., Kondo T., Tsuchiya N. Regulation of CMTM6, a gene encoding a chemokine-like membrane protein, by miR-451a is involved in the metastasis of Ewing sarcoma. 第76回日本癌学会総会 2017年9月 横浜

Fujiwara Y., Kohno T., Tsuchiya N. A novel nucleolar stress-specific p53-miR-101 circuit as a potential target for cancer therapy. 第40回日本分子生物学会年会 2017年11月 神戸

Tsuchiya N. Nucleolar stress-specified molecular connection of miR-101 and p53 as a novel circuitry in an intrinsic tumor-suppressor network. (2016) 第76回日本癌学会総会 横浜市

Fujiwara Y, Kohno T, Tsuchiya N. Fine-tuning of p53-dependent nucleolar stress response by miR-101 (2016) 第39回日本分子生物学会年会 横浜市

土屋 直人 エクソソームマイクロRNAのがん診断マーカーとしての重要性 第54回日本癌治療学会学術集会 2016年10月20日~22日 横浜

田辺 芽衣, Weis, Melody, 村上 康文, 河野 隆志, 土屋 直人 がん細胞生存関連因子 SND1 複合体の機能解析 (2015) 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 兵庫県神戸市

藤原優子, 河野隆志, 土屋直人 miR-101によるp53依存性核小体ストレス応答反応の制御機構 (2015) 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会 兵庫県神戸市

Tsuchiya N. MicroRNA target screen identifies NEK9 pathway as a crucial component regulating proliferation of cancer cells lacking functional p53. AACR Annual Meeting 2015 Philadelphia PA USA 2015. 4.17-4.22

Tsuchiya N. Extra-cellular microRNAs - Basic research to clinical application - Seminar in Laboratory of Human Carcinogenesis, NCI. NIH Bethesda, MD, USA 24 April, 2015

Tsuchiya N. MicroRNAs in colon carcinogenesis ~ basic research to clinical applications ~ 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月8日~10日 名古屋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 直人 (TSUCHIYA, Naoto)
国立研究開発法人国立がん研究センター・
研究所・分子発がん研究ユニット
ユニット長
研究者番号：30322712

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

藤原 優子 (FUJIWARA, Yuko)
国立研究開発法人国立がん研究センター・
研究所・分子発がん研究ユニット
非常勤研究員