

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08310

研究課題名(和文) 新規PTENリン酸化酵素SCYL2の機能解析

研究課題名(英文) Molecular analysis of a novel PTEN binding protein SCYL2 function

研究代表者

市川 朝永 (ICHIKAWA, TOMONAGA)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80586230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：成人T細胞白血病(ATL)を含む多くの腫瘍では、PTENのリン酸化による不活性化がPI3K/AKT情報伝達系を異常亢進させ、がんの発症進展に関わっている。我々はPTEN結合タンパク質としてSCYL2(SCY1-like protein 2)を同定し、機能解析を行なった。ATL細胞ではSCYL2が高発現しPTENと細胞質で局在しており、SCYL2を発現低下させるとAKT/PTEN脱リン酸化により腫瘍形成能が低下していた。SCYL2が直接PTENをリン酸化する可能性を示唆した。SCYL2を標的としたキナーゼ阻害剤の開発が、多くの腫瘍に対する新規治療薬として使用できると考えている。

研究成果の概要(英文)：We reported that inactivation of PTEN by the phosphorylation plays an important role in the development of Adult T-cell leukemia (ATL) and cancers through the aberrant activation of PI3K/AKT signaling pathway. We identified SCYL2 (SCY1-like protein 2) as a novel PTEN binding protein. Although SCYL2 associated with Clathrin to regulate endocytosis and signaling pathways, it is still unclear how SCYL2 regulates phosphorylation status of PTEN. SCYL2 was highly expressed in ATL cells, and localized in cytoplasm with PTEN. Knockdown of SCYL2 expression suppressed cell proliferation and tumorigenesis through the dephosphorylation of AKT and PTEN. We suggested that PTEN at the Ser380, Thr382 and Thr383 cluster with the C-terminal tail was directly phosphorylated by SCYL2. Furthermore, the inhibition of Clathrin function decreased the phosphorylated PTEN and cell proliferation in ATL. SCYL2 inhibition may become promising novel targets for cancer diagnosis and therapy in many type of cancer.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん PTEN リン酸化

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病リンパ腫 ATL(Adult T-cell leukemia/lymphoma)はヒト T リンパ好性ウイルス 1 型 HTLV-1(Human T cell Leukemia Virus Type1)の感染によって引き起こされる白血病である。主に母子間で感染し、国内での HTLV-1 キャリア数は約 108 万人存在し、さらに約 5%の HTLV-1 キャリアが 50 年以上の潜伏期間後 ATL を発症する。ATL の中でも、急性型およびリンパ腫型は発症後の平均生存期間が約 1 年と非常に予後が悪く、根本的な治療法が確立されていない。また新規 HTLV-1 キャリアは減少しているものの、人口の高齢化に伴い逆に ATL およびその関連疾患の発症者数は増加しており、緊急的な ATL 診断、治療法の確立が期待されている。

ATL の発症因子を同定するために総合的ゲノム解析を行った結果、14q11 領域に染色体転座集中領域を同定し、NDRG2(N-myc down-regulated gene 2)をがん抑制遺伝子候補として単離した。NDRG2 を新規 PTEN 結合タンパク質として同定したが、ATL では PTEN のゲノム変異はなく発現が保たれ、かつ PTEN—C-tail 領域の Serine380、Threonine382、Threonine383(STT)のリン酸化が亢進していた。このリン酸化は PTEN 酵素活性を不活性化し、ATL における下流の AKT リン酸化および情報伝達系の恒常的活性化を明らかとした。NDRG2 の正常機能として、脱リン酸化酵素(フォスファターゼ)の PP2A と共に PTEN に結合し STT 脱リン酸化し、PTEN 活性化に戻し PI3K/AKT 情報伝達系を負に制御していることを示した。さらに Ndr2 欠損マウスでは各種臓器で Pten-STT および Akt リン酸化が増加し、悪性リンパ腫、肝臓、肺、消化器腫瘍を発生し、有意に生存期間が短縮した。従って NDRG2 は PTEN-STT を脱リン酸化し、PI3K/AKT 情報伝達系を抑制するがん抑制遺伝子(tumor suppressor gene)であることを明らかとした(*Nat Commun*

2014)。

そこで今回、我々は PTEN-STT のリン酸化酵素の同定を試みた。PTEN に結合し、キナーゼ領域を有しているタンパク質を同定するために ATL 細胞株 KK1 を PTEN 抗体で免疫沈降して PTEN 結合タンパク質を質量分析 LC/MS/MS 法(Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)で検索した。我々は新規 PTEN 結合タンパク質として Serine/Threonine キナーゼ領域を有した SCYL2 (SCY1-like protein 2)を同定した。

SCYL2 は細胞膜上の Clathrin と相互作用し、endocytosis に関与していることが示唆されている。Clathrin が PI3K/AKT 情報伝達系を活性化することが知られており、SCYL2-Clathrin が情報伝達系活性化に重要な役割を果たしている可能性がある。しかし、腫瘍や循環器疾患のような病的状態における発現量の変化および機能については詳しく解析されておらず、また、遺伝子改変動物も存在せず、生理的な機能についても不明な点が多い。

SCYL2 の機能解析を行うことによって、NDRG2 を含めた PTEN-STT リン酸化-PI3K/AKT 情報伝達系亢進-ATL 発症機構を明らかとし、新規診断治療法の開発につなげることを目的とする。

2. 研究の目的

がん抑制遺伝子 PTEN の不活性化は、多くの腫瘍で PI3K/AKT 情報伝達系の異常亢進を引き起こし、がんの発症・進展に関与している。その原因として、ゲノム(点突然変異、欠失)やエピゲノム(DNA メチル化、ヒストン修飾)異常による発現低下と共に、近年リン酸化修飾による不活性化機構が言われてきたがその分子機構は不明であった。これまでの研究で PTEN 脱リン酸化機構としてがん抑制遺伝子 NDRG2 の同定および機能解析を行ってきた。今回、我々は PTEN リン酸化酵素(キナ

ーゼ)の候補として SCYL2 を同定した。

PI3K/AKT の情報伝達において、各種 receptor から下流へは PI3K 活性化による情報伝達が主であるが、その receptor 群が clathrin を足場として凝集し、情報伝達が増強されると共に clathrin 依存性取り込み時に SCYL2 を通じて PTEN リン酸化が亢進する新しい情報伝達系が存在し、PI3K/AKT 情報伝達系の調節に関係している事が示唆される。このことは PI3K/AKT 情報伝達系の制御因子として PTEN リン酸化を制御するキナーゼ(SCYL2) とフォスファターゼ(NDRG2/PP2A)のアンバランスががんの発症に重要である事を示唆する。この機構が明らかになれば、新たな PI3K/AKT 情報伝達の制御機構がわかり、さらには PTEN 脱リン酸化によって PTEN 本来の機能を元に戻すことによる、新たながん治療法開発に繋がる可能性が高い。現在、キナーゼを分子標的とした新しいがん治療法開発が盛んに行われており、がん化に関わる新規キナーゼの同定および機能解析は新たながん治療法開発に非常に有用であると考えられる。従って、SCYL2 機能解析およびこれを標的としたキナーゼ阻害剤の開発が、ATL を含む多くのがん種に対する新規治療薬として使用できると考えている。

3 . 研究の方法

1)SCYL2 発現の解析

SCYL2 発現は IFN 誘導遺伝子群とされているが、その詳細は不明である。ATL 患者検体および固形腫瘍で発現量を確認し、がんにおける遺伝子発現解析を行う。

2)SCYL2 の PTEN-STT リン酸化調節機構の解析

SCYL2 は PTEN に結合しキナーゼ領域を有しているため、SCYL2 自身にキナーゼ活性があるか大腸菌および細胞から精製したタンパク質を使って *in vitro* キナーゼアッ

セイを行い確認する。さらに Clathrin および NDRG2 による PTEN-STT リン酸化への影響を検討する。

3)*in vivo* における SCYL2 機能解析

免疫不全マウスへの細胞移植モデルおよび Scyl2 欠損(KO)マウスを作製し、*in vivo* における SCYL2 の機能を検討する。

4 . 研究成果

1)SCYL2 発現の解析

SCYL2 は ATL 患者検体では正常 CD4T 細胞に比べて有意に発現が亢進していた。ATL 細胞株においても同様に他の T 細胞株に比べて顕著に増加していた。また、固形がんである口腔扁平上皮がん OSCC(oral squamous cell carcinoma)でも SCYL2 発現が亢進していた。ATL および固形がん細胞株で SCYL2 発現増加が AKT および PTEN-STT のリン酸化亢進と正に相関していた。

HTLV-1 の oncogene である Tax を T 細胞株 (Jurkat)に過剰発現させると、SCYL2 発現が上昇することから、HTLV-1 感染によって SCYL2 発現が増加し、PI3K/AKT 情報伝達系の異常亢進を惹起する可能性を示唆した。

2)SCYL2 の PTEN-STT リン酸化調節機構の解析

ATL 細胞株では SCYL2 と PTEN が細胞質で局在していた。SCYL2 発現を低下させると AKT および PTEN-STT リン酸化が減少し細胞増殖も低下した。SCYL2 低発現細胞株に SCYL2 を過剰発現させると、AKT および PTEN-STT リン酸化が増加し細胞増殖が上昇し、PTEN 欠損細胞株に SCYL2 を過剰発現させても AKT リン酸化が増加しなかったことから、SCYL2 は PTEN リン酸化を介して AKT リン酸化および細胞増殖亢進を制御していることを明らかにした。

SCYL2 自身にキナーゼ活性があるか大腸

菌および細胞から精製したタンパク質を使って *in vitro* キナーゼアッセイを行い確認した。精製 SCYL2 は大腸菌および細胞から精製した PTEN タンパク質の STT 領域をリン酸化したことから、直接リン酸化する可能性を示唆した。

ATL 細胞株で SCYL2 は Clathrin と細胞膜付近で局在していた。Clathrin を過剰発現させると SCYL2 によって誘導される AKT と PTEN-STT リン酸化をさらに亢進させ、Clathrin の発現低下および阻害剤投与により AKT と PTEN-STT リン酸化が減少した。

当研究室では ATL および多くの腫瘍で有意に発現が低下しているがん抑制遺伝子 NDRG2 がフォスファターゼである PP2A と複合体を形成し、PTEN を含む情報伝達系に重要な因子群を脱リン酸化することを明らかにしている。ATL および固形がん細胞株に NDRG2 を過剰発現させると AKT および PTEN-STT リン酸化が低下し細胞増殖も抑制される。SCYL2 発現による PTEN-STT リン酸化亢進も NDRG2 過剰発現によって抑制できたので、PTEN に対して SCYL2 はキナーゼ(リン酸化酵素)、NDRG2/PP2A はフォスファターゼ(脱リン酸化酵素)として働き、腫瘍形成に関与していることを明らかにした。

3) *in vivo* における SCYL2 機能解析

SCYL2 発現低下 ATL 細胞株を免疫不全マウスの皮下に移植すると、腫瘍形成が減少し、腫瘍における AKT と PTEN-STT リン酸化も低下していた。

Scyl2 欠損マウスを作製し、ヘテロ同士で掛け合わせを行っているがホモ欠失が生まれてきていない。ヘテロ妊娠マウスから E12.5 の胎児を取り出し、genotyping をしてみるとホモマウスは存在しており、MEF(mouse embryo fibroblast)を作製すると Scyl2 ホモ MEF では Akt と Pten-STT リン酸化が抑制され細胞増殖も減少していた。Scyl2 欠損マウ

スが胎生致死のためさらなる解析が必要になるが、SCYL2 が腫瘍形成に関与していることを示した。

ATL を含む多くの腫瘍で発現亢進している SCYL2 は、PTEN と結合して直接、STT 領域をリン酸化するキナーゼとして働く可能性を明らかにし、また、SCYL2/Clathrin 複合体が PTEN-STT リン酸化を促進し、恒常的な PI3K/AKT 情報伝達系の異常活性化とそれに伴う腫瘍発症・進展に繋がる事が示唆した。現在、SCYL2 を標的とした治療薬の開発を進めている。

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5件)

1. Permatasari HK, Nakahata S, Ichikawa T, Morishita K. BCL11B is frequently downregulated in HTLV-1-infected T-cells through Tax-mediated proteasomal degradation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017, 490:1086-1092. 査読有り
2. Tamura T, Ichikawa T (equal author), Nakahata S, Kondo Y, Tagawa Y, Yamamoto K, Nagai K, Baba T, Yamaguchi R, Futakuchi M, Yamashita Y, Morishita K. Loss of NDRG2 expression confers oral squamous cell carcinoma with enhanced metastatic potential. *Cancer Res.* 2017, 77:2363-74. 査読有り
3. Shimosaki S, Nakahata S, Ichikawa T, Kitanaka A, Kameda T, Hidaka T, Kubuki Y, Kurosawa G, Zhang L, Sudo Y, Shimoda K, Morishita K. Development of a complete human IgG monoclonal antibody to transferrin receptor 1 targeted for adult T-cell leukemia/lymphoma. *Biochem Biophys*

Res Commun. 2017, 485:144-151. 査読有り

4. **Ichikawa T**, Nakahata S, Fujii M, Iha H, Morishita K. Loss of NDRG2 enhanced activation of the NF- κ B pathway by PTEN and NIK phosphorylation for ATL and other cancer development. *Sci Rep.* 2015, 5:12841. 査読有り
5. **Ichikawa T**, Nakahata S, Tamura T, Manachai N, Morishita K. The loss of NDRG2 expression improves depressive behavior through increased phosphorylation of GSK3 β . *Cell Signal.* 2015, 27:2087-98. 査読有り

[学会発表](計 15 件)

1. **Tomonaga Ichikawa**, Obeid Shanab, Shingo Nakahata, Shunsuke Shimosaki, Nawin Manachai, Hidekatsu Iha, Kazuya Shimoda, Masaya Ono, Mohammed N. Ismail, Ahmed Y. Nassar and Kazuhiro Morishita. Targeting of PRMT5 inhibits HSP90A function and induces apoptosis in NDRG2-deficient adult T-cell leukemia. 第 79 回日本血液学会. 2017 年 10 月 20 日-22 日. 東京国際フォーラム (東京都)
2. **Tomonaga Ichikawa**, Obeid Shanab, Shingo Nakahata, Shunsuke Shimosaki, Nawin Manachai, Hidekatsu Iha, Kazuya Shimoda, Masaya Ono, Mohammed N. Ismail, Ahmed Y. Nassar and Kazuhiro Morishita. Synthetic lethality of PRMT5 inhibition in NDRG2-deficient adult T-cell leukemia through HSP90A dysfunction. 第 76 回日本癌学会. 2017 年 9 月 28 日-30 日. パシフィコ横浜 (神奈川県) International Sessions
3. **市川朝永**, 田村知丈、中畑新吾、二

口充、森下和広. 新規がん抑制遺伝子 NDRG2 によるがん進展および転移の分子機構の解明. 第 76 回日本癌学会. 2017 年 9 月 28 日-30 日. パシフィコ横浜 (神奈川県) 日本癌学会奨励賞受賞記念講演

4. **市川朝永**, Obeid Shanab, 中畑新吾、伊波英克、尾野雅哉、中武彩子、阪本訓代、森下和広. 成人 T 細胞白血病(ATL)に対するアルギニンメチル化転移酵素 PRMT5 阻害による抗腫瘍効果の検討. 第 4 回日本 HTLV-1 学会. 2017 年 8 月 19 日-20 日. 関西医科大学 (大阪府)
5. **市川朝永**, Obeid Shanab, 中畑新吾、伊波英克、尾野雅哉、中武彩子、阪本訓代、森下和広. アルギニンメチル化による HSP90A 活性調節機構の解析. 平成 29 年度日本生化学会九州支部例会. 2017 年 5 月 13-14 日. 宮日会館 (宮崎)
6. **Tomonaga Ichikawa**, Obeid Shanab, Shingo Nakahata, Hidekatsu Iha, Masaya Ono, Ayako Nakatake, Kuniyo Sakamoto, Kazuhiro Morishita. Targeting PRMT5 inhibits HSP90A function with induction of tumor-specific apoptosis in NDRG2^{low} ATL and other cancers. 18th International conference on Human Retrovirology HTLV and Related Viruses. March 7th-10th, 2017. Hotel Grand Arc Hanzomon (Tokyo)
7. **市川朝永**, Obeid Shanab, 中畑新吾、伊波英克、尾野雅哉、中武彩子、阪本訓代、森下和広. アルギニンメチル化転移酵素 PRMT5 による HSP90A 活性調節機構. 第 21 回造血器腫瘍研究会. 2017 年 2 月 17 日-18 日. 熊本大学医学部山崎記念館 (熊本県)

8. **Tomonaga Ichikawa**, Shingo Nakahata, Kazuhiro Morishita. Loss of NSRG2/PP2A complex induces global abnormalities in protein phosphorylation in cancer development and progression. 12th International Conference on Protein Phosphatase. October 27th-30th, 2016. NOVEMBER HALL, Kinki University (Osaka)
9. **市川朝永**、中畑新吾、森下和広. Molecular mechanism of a novel tumor suppressor gene NDRG2 expression regulation by HTLV1 infection. 第75回日本癌学会. 2016年10月6日-8日. パシフィコ横浜 (神奈川県)
10. **市川朝永**、田村知丈、田川友梨、中畑新吾、二口充、山下善弘、森下和広. The loss of NDRG2 promotes oral carcinogenesis and metastasis in chemically induced mouse model. 第89回日本生化学会. 2016年9月25日-27日. 仙台国際センター (宮城県)
11. **市川朝永**、中畑新吾、中武彩子、阪本訓代、森永樹、森下和広. PTEN リン酸化異常による ATL 発症機構の解析. 第3回日本 HTLV-1 学会. 2016年8月26日-28日. 鹿児島県市町村自治会館 (鹿児島県)
12. **Tomonaga Ichikawa**, Shingo Nakahata, Kazuhiro Morishita. A novel tumor suppressor, NDRG2 is down-regulated by EZH2 overexpression through HTLV-1 infection in ATL cells. 5th JCA-AACR Special Joint Conference. July 13th-15th, 2016. Tokyo Bay Maihama Hotel Club Resort (Chiba)
13. **市川朝永**、中畑新吾、田村知丈、Nawin Manachai、森下和広. The loss of NDRG2 expression improves depressive behavior through the activation of AKT signaling. 第88回日本生化学会. 2015年12月1日-4日. 神戸ポートアイランド (兵庫県)
14. **市川朝永**、中畑新吾、藤井 雅寛、伊波 英克、森下和広. Loss of NDRG2 enhanced activation of NF-κB pathway by PTEN and NIK phosphorylation for ATLL development. 第74回日本癌学会. 2015年10月8日-10日. 名古屋国際会議場 (愛知県)
15. **市川朝永**、中畑新吾、中武彩子、森永樹、森下和広. HTLV-1 感染によるがん抑制遺伝子 NDRG2 発現調節機構の解析. 第2回日本 HTLV-1 学会. 2015年8月22日-23日. 東京大学医科学研究所講堂 (東京都) Young Investigator Award (YIA)

○取得状況 (計1件)

名称: 成人 T 細胞白血病の診断方法および成人 T 細胞白血病のスクリーニング方法

発明者: 宮崎大学、森下和広、**市川朝永**、中畑新吾

権利者: 同上

種類: 特許

番号: PCT/JP2014/061548(WO2014175375A1)

取得年月日: 2014年4月24日

国内外の別: PCT(国外)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/home/atl/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

市川 朝永 (ICHIKAWA TOMONAGA)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 80586230