

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08317

研究課題名(和文) 新奇NOX4-ROS依存転写抑制複合体によるMMP-9発現とがん転移抑制の可能性

研究課題名(英文) A mitochondrial ROS pathway controls matrix metalloproteinase 9 levels and invasive properties in RAS-activated cancer cells

研究代表者

森 一憲 (Mori, Kazunori)

昭和大学・薬学部・講師

研究者番号：60349040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、がん転移に重要な役割を担うMMP9の発現制御に関して、細胞内レドックス状態の関与を調べ、ミトコンドリア由来活性酸素種(mtROS)によりMMP9のmRNAが安定化されること、そしてその制御として、細胞接着斑-核両局在性アダプター分子HIC-5によるNADPH oxidase 4 (NOX4)-mtROS制御を見出した。本制御機構は変異型Rasを有するがん細胞株で観察され、本機構を破壊させたがん細胞をマウスに接種すると転移は促進された。本機構は癌転移を抑制的に制御することから、悪性度の指標となる可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Here, we report a molecular axis, comprising the molecular adaptor hydrogen peroxide-inducible clone-5 (HIC-5), NADPH oxidase 4 (NOX4), and mitochondrial reactive oxygen species (mtROS), that regulates MMP9 expression and may be a target to suppress cancer metastasis. We found that that this axis primarily down-regulates mtROS levels which stabilize MMP9 mRNA. Specifically, HIC-5 suppressed the expression of NOX4, the source of the mtROS, thereby decreasing mtROS levels and, consequently, destabilizing MMP9 mRNA. Interestingly, screening cancer cell lines suggests that this mechanism operates in cancer cells by expressing oncogenic RAS, implying an important role of HIC-5 in suppressing metastasis of activated RAS-driven tumors. Notably, HIC-5 knockdown promoted lung metastasis of MDA-MB-231 cancer cells in mice without affecting primary tumor growth. We conclude that NOX4-mediated mtROS signaling increases MMP9 mRNA stability and affects cancer invasiveness.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：MMP9 ミトコンドリア 活性酸素種

## 1. 研究開始当初の背景

生体内に存在する 24 種類のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)の中で、MMP2、9 は、がんの浸潤/転移に重要な役割を果たす。従って、これら MMP の活性阻害は、がん転移抑制につながると期待され、阻害薬の開発が加速し、2000 年代初頭に臨床試験まで行われたが、いずれも開発が断念された。その主な原因は、それら阻害剤の MMP 分子種 (MMP2、9) への特異性が低かったことにあるとされ、正常組織への副作用も確認された。以上のような結果を踏まえると、がん転移抑制に有効な MMP 阻害剤開発のためには、先ず、がん細胞における MMP2、9 の発現や活性を特異的に制御するメカニズムを解明することが重要であり、そのうえで、それに基づいて、新たな視点から抑制手段を考案することが重要と考えられる。本課題では、申請者らが最近手掛かりを得た MMP9 の発現制御に特異的な新奇の転写抑制機構について解析し、がん転移抑制への応用を試みる。

申請者らは、これまで細胞接着斑-核両局在性のアダプター分子 HIC-5 について、がん形質への関わりを研究してきた。その過程で、HIC-5 ががん細胞の転移を抑制的に制御していること、そして機序が、MMP9 の発現の特異的な抑制によること、さらにその抑制が NADPH oxidase (NOX) 4 の発現抑制によることを見出した。NOX4 は、ミトコンドリアにも局在する NOX として知られ、新たなミトコンドリアの活性酸素種 (ROS) 産生源として注目されている。また、進行性乳がんの約 80% で高発現しているとされており、がんの進展に寄与していると考えられる。以上、HIC-5 の機能解析の過程で、がん細胞での MMP9 の発現誘導について、NOX4 の役割が示唆された。

一方、申請者らは TGF- $\beta$  シグナルについて、ミトコンドリア由来の ROS が寄与する経路について研究を進めており、この経路に依存する遺伝子の一つとして MMP9 を同定した。詳細を調べたところ、転写因子 CREB (cAMP 応答配列結合因子) が Tip60 及びその相互作用因子 Ecp1 (ポリコーム群蛋白質) と複合体を形成して MMP-9 の発現を抑制的に制御している可能性を見出した。

以上の二つの先行研究から、MMP9 の発現制御機構として、従来注目されてきた促進的なもの以外に、新奇の NOX4-ROS 依存性の転写抑制機構の存在が考えられるようになった。この抑制機構は平常時に MMP9 の発現を抑制するために機能していると考えられ、その解除と促進機構の活性化の二重制御により、MMP9 発現の時空間的に厳密な制御が保障されていると想定される。

本課題では抑制的制御機構に焦点を当て、がん細胞で CREB/Tip60/Ecp1 複合体機能が NOX4 由来 ROS により解除されて、MMP9 が誘導される実態を分子レベルで明らかにすることを旨とする。

## 2. 研究の目的

細胞外基質を分解する MMP 活性は、がん転移抑制の標的として有望だが、未だ非特異的な活性阻害剤しかなく、標的 MMP に特異的な阻害剤を新たな視点から開発する必要がある。申請者らは最近、ミトコンドリア由来 ROS が MMP9 誘導に寄与するという独自の知見を得た。本課題では、具体的な機序として NOX4 由来 ROS による MMP9 誘導に寄与する機構を解析し、その機序に基づいてがん転移抑制を試みる。その成果として、がんで過剰発現している MMP9 を特異的標的とした新奇創薬シーズを提案し、がん転移抑制への貢献を目指す。

## 3. 研究の方法

### 1) NOX4 産生活性酸素種 (ROS) による MMP9 発現制御機構

NOX4 を過剰発現/ロックダウン、或いは ROS 消去剤等により細胞内レドックス状態を変化させ、MMP-9 の発現が促進/抑制されることを示す。また、MMP9 発現制御における ROS の標的を明らかにするため、転写活性化、もしくは mRNA 安定性について調べる。MMP-9 誘導に至るシグナル伝達経路を明らかにすることを試みる。

### 2) MMP9 発現制御機構のがん転移能への影響

1)、2) の結果から明らかにされた本機構を阻止、または破綻させる手段を準備し、その手段により MMP-9 発現とともに最終的な転移を抑制できるか、個体レベルで検討する。

## 4. 研究成果

### 1) NOX4 産生活性酸素種 (ROS) による MMP9 発現制御機構

既に HIC-5 により NOX4 の発現が抑制されることを見出していることから、HIC-5 発現抑制細胞のミトコンドリア ROS レベルを調べたところ、ミトコンドリア ROS レベルは HIC-5 ロックダウン細胞で有意に上昇していた。一方、細胞質の ROS レベルは変化しなかった。ミトコンドリア ROS レベルの上昇は NOX4 のロックダウンにより消失したことから、ミトコンドリア ROS レベルの上昇は NOX4 に起因すると結論付けた。また、NOX4 の発現だけでミトコンドリア ROS レベルが上昇するか検証するため、ヒト NOX4 発現系を構築し、過剰発現させたところ、ミトコンドリア ROS レベルが上昇し、MMP9 発現も上昇した。また、別の NOX ファミリー分子である NOX2 の過剰発現ではミトコンドリア ROS レベルは変化しなかった。

MMP9 の発現誘導が ROS により媒介されることを明らかにするため、抗酸化物質を用いて検討した。ミトコンドリアに移行する化学的修飾した抗酸化物質により MMP9 mRNA 量はコントロールと同程度まで低下

した。一方、化学修飾しない抗酸化物質では効果がなかった。これらの結果から、MMP9 発現は ROS により媒介されることが明らかになった。

MMP9 誘導は、mRNA、蛋白質レベルで観察されることから、ROS の標的は MMP の転写活性化、もしくは mRNA の安定化であると考えられた。まず、転写活性に ROS が関与する可能性について、種々の MMP9 上流プロモーター領域を含むルシフェラーゼレポーターの応答を比較検討したが、応答はなかった。そのため、mRNA 安定性を調べるため、アクチノマイシン D を処理した細胞内の MMP9 mRNA 量について、経時の変化を追跡した。その結果、HIC-5 ノックダウン細胞では MMP9 mRNA は安定化されていた。さらに、ROS 産生源である NOX4 をノックダウンすると、mRNA の半減期は短縮され、コントロールと同じになった。この結果から、ROS による MMP9 の発現上昇は、mRNA 安定化によることが明らかになった。

MMP9 mRNA の安定化に働き、ROS の標的となる分子を探索し、ROS の標的を明らかにすることを試みた。しかしながら、このような働きをする新規関与因子を同定するに至らなかった。ここまでで、HIC-5 により発現が抑制的に制御される NOX4 が ROS 産生源であり、その ROS により MMP9 mRNA が安定化されることがわかった (HIC-5-NOX4-ミトコンドリア ROS 経路)。

この経路にかかわるシグナル伝達経路を探索することを試みた。様々ながん腫由来の細胞株で本機構の存在を調べたところ、RAS が活性化する細胞株で本機構が存在する傾向が得られた。この可能性を検証するために、がん化モデル細胞を樹立した。段階的遺伝子導入により、正常乳腺上皮細胞を不死化させ、活性化 RAS を導入してがん化させた細胞で、本機構が存在するか、HIC-5、NOX4 をノックダウンしたところ、MMP9 の発現を人為的に操作することができた。これらの結果から、HIC-5-NOX4-ミトコンドリア ROS 経路は、活性化 RAS シグナルと協調して機能する機構であることがわかった。

## 2) MMP9 発現制御機構のがん転移能への影響

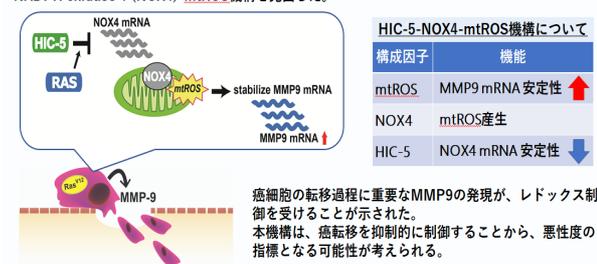
1) で明らかになった MMP9 発現機構である HIC-5-NOX4-ミトコンドリア ROS 経路を人為的に操作し、個体レベルでの転移能への影響を検討した。用いたがん細胞株は、RAS が活性化されている高転移性乳癌細胞株 MDA-MB-231 細胞を用いた。生体内での検出のため、EGFP を発現させた安定発現株を樹立し、さらにこの経路を破壊させた細胞を樹立した。この細胞を免疫不全マウスの乳腺、または尾静脈に接種し、肺への転移を調べたところ、肺への転移が顕著に抑制された。また、乳腺での腫瘍の増殖には影響しなかった。

以上の結果から、ミトコンドリア由来 ROS により MMP9 mRNA が安定化されること、そして、ROS を産生する NOX4 は HIC-5 により制御されることを明らかにした。本課題で見出した HIC-5-NOX4-ミトコンドリア由来 ROS 経路による MMP9 発現制御は、活性化 RAS シグナルと協調的に機能する機構であることがわかった。本課題で明らかにしたことを以下の図に示す。

### 新奇 NOX4-ROS 依存転写抑制複合体による MMP9 発現とがん転移抑制の可能性

癌細胞の転移は様々な過程を経て成立するが、初期の局所浸潤の開始に当たって癌細胞は、基底膜を分解して結合組織へ浸潤する必要がある。この基底膜の分解は、IV型コラーゲンを分解する matrix metalloproteinase (MMP) 2、9 が主に担う。

今回、MMP9 の発現制御に関して、細胞内レドックスの関与を調べ、ミトコンドリア由来活性酸素種 (mtROS) により MMP9 の mRNA が安定化されること、そしてその制御機構として、HIC-5-NADPH oxidase 4 (NOX4)-mtROS 機構を見出した。



本課題の成果から、がん転移過程に重要な酵素 (MMP9) 活性が、レドックス制御を受けることが示された。その詳細である mRNA の安定性のレドックスによる制御機構は今後の課題であるが、ミトコンドリア依存性のレドックス制御による癌細胞の悪性化形質制御の可能性が示唆された。本課題成果は、現在論文投稿中である。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

Kazunori Mori, Tetsu Uchida, Toshihiko Yoshie, Yuko Mizote, Fumihiko Ishikawa, Masato Katsuyama, and Motoko Shibanuma

The HIC-5-NOX4-mtROS axis regulates metastasis of RAS-activated cancer cells by affecting MMP9 mRNA stability

EMBO Conference on Redox Biology (国際学会), 2017 年 7 月

Kazunori Mori, Fumihiko Ishikawa, and Motoko Shibanuma

HIC-5 acts as a negative regulator for MMP-9 expression by inhibiting NOX4 expression in oncogenic RAS-driven cancers

第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月

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

昭和大学・薬学部・基礎薬学講座・腫瘍細胞  
生物学部門 ホームページ  
<http://www10.showa-u.ac.jp/~cancer/publication.htm>

昭和大学学術業績リポジトリ  
<https://meta.lititory.showa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 一憲 (MORI, Kazunori)  
昭和大学・薬学部・講師  
研究者番号：60349040

### (2) 研究分担者

柴沼 質子 (SHIBANUMA, Motoko)  
昭和大学・薬学部・教授  
研究者番号：60245876

石川 文博 (ISHIKAWA, Fumihiro)  
昭和大学・薬学部・助教  
研究者番号：60515667

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし