

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19019

研究課題名(和文) MEK遺伝子変異がもたらすERK経路の異常活性化機構と疾患誘導プロセスの解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of carcinogenesis caused by mutation-dependent activation of the ERK pathway

研究代表者

久保田 裕二 (Kubota, Yuji)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70614973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ERK経路は細胞増殖、分化、発癌制御など各種細胞機能を担うシグナル伝達経路である。最近、孤発性癌および先天性Ras/MAPK症候群の遺伝学的解析から、ERK経路のMAPKKであるMEKの遺伝子変異が多数同定された。申請者は、これらMEK遺伝子変異により異常ERK活性が生じることで、機能未知の新規蛋白質(約10 kDa)およびlncRNA(lncRNA)が発現誘導されることを見出した。これらの分子は高ERK活性を示す様々な癌細胞で観察され、かつ実際の臨床検体サンプルを用いた解析においても強い発現が確認された。また、これらの遺伝子発現は細胞増殖や運動能など細胞機能制御に重要であることも示された。

研究成果の概要(英文)：The ERK pathway is a signaling pathway responsible for various cellular functions such as cell proliferation and differentiation. Recently, genetic mutations of MEK1 which is MAPKK of the ERK pathway were identified by genetic analysis of sporadic cancers and congenital Ras/MAPK syndromes. I found that the abnormal ERK activity caused by these MEK mutations leads to the expression of novel genes; a function-unknown protein (about 10 kDa) and long non-coding RNA (lncRNA). I confirmed that these molecules were expressed in various cancer cell lines with high ERK activity, and their strong expression was observed in several clinical cancer samples. In addition, cellular and molecular experiments showed that these gene expressions were important for cell functions such as cell proliferation and motility.

研究分野：分子生物学

キーワード：MAPK経路

1. 研究開始当初の背景

ERK-MAPK経路 (Raf-MEK-ERK) は、各キナーゼ分子がリン酸化により段階的に活性化されるシグナル伝達システムである。同経路は様々な増殖刺激により活性化され、細胞増殖や分化などを制御すると共に、その制御異常が癌を始めとする疾患に深く関与する。実際に、ERK経路の上流に位置するRasやRaf(B-Raf)の遺伝子変異や、増殖因子受容体 (EGFR) の遺伝子増幅が様々な癌で高率に報告されている。最近、癌の臨床検体の全ゲノム解析により、MEK遺伝子 (MEK1およびMEK2) の活性型変異が同定され、発癌の直接的要因となる事が判明した。これらの変異は大腸癌、肺癌、卵巣癌など多数の固形腫瘍で見出されており、中でも悪性黒色腫で高率 (8%) に観察される。また近年、MEK遺伝子のミスセンス変異が、常染色体優性遺伝性疾患「Ras/MAPK症候群」(Costello/Noonan/CFC症候群等の総称) の原因となる事が分かった。このように、ゲノムワイドな解析から、MEK遺伝子変異が癌と先天性疾患の両方の原因となる事が明らかとなったが、ERK活性化がこれら疾患を導く分子メカニズムは不明であった。

申請者らは、これらのMEK変異体(癌またはRas/MAPK症候群由来)を安定に発現する細胞株を樹立し、DNAマイクロアレイにより活性型MEK変異体の下流で特異的に発現変動する遺伝子を収集した。その結果、多数の遺伝子がERK活性化に依存して発現増進あるいは減少する事を見出した。興味深い事に、これら特異的な発現変動を示す遺伝子の中には、蛋白質のみならずLincRNA (Long intergenic non-coding RNA) をコードする機能未知の遺伝子が多数含まれている事も判明した。LincRNAは非翻訳RNAの一種であり、一部の分子は細胞分化や疾病に関与する事が報告されているものの、その全容は殆ど明らかにされておらず、これら新規遺伝子がどのように癌や先天性疾患の発症に寄与するか不明である。

2. 研究の目的

本研究では、MEK変異を持つ癌およびRas/MAPK症候群で特異的に発現増進/減少する新規遺伝子(蛋白質及び非コードRNA)につい

て、その発現制御機構・生理的機能を明らかにすると共に、各疾患の発症・進行機序への関与を分子・個体レベルで解明することを目標とした。具体的には、機能未知の新規遺伝子として同定したProtein-X およびLincRNA-Yの二分子に着目し、その癌細胞における発現パターン、発現様式、および分子機能の解明を試みた。

3. 研究の方法

まず、機能未知の蛋白質 (Protein-X) と非コードRNA (LincRNA-Y) がERK活性依存的に誘導されることを、ERK経路特異的阻害剤を用いて検証した。また、癌の悪性形質発現に寄与するか検証するために、各分子を安定発現するヒト培養細胞株を樹立して、細胞増殖能やアポトーシス、細胞運動能、浸潤能並びに悪性形質転換効率 (軟寒天培地でのコロニー形成能) を評価した。また、各分子を過剰発現またはノックダウンした癌細胞株も樹立し、同様のアッセイにて癌形質との関連を調査した。さらに、様々な癌臨床検体でこれらの遺伝子の発現を検証し、がんマーカーとしての可能性を模索した。

4. 研究成果

まず、ERK 高活性型の癌細胞株 (大腸がん、悪性黒色腫、肺癌など) における Protein-X およびLincRNA-Y 遺伝子の発現パターンを確認するために、Protein-X 特異的抗体によるウェスタンブロット、またはLincRNA-Y 特異的プライマーを用いた定量 PCR にて発現量を調査した。その結果、非癌細胞 (HEK293) と比較して、ERK 活性型変異を持つ癌細胞 (A375 (Braf^{V600E})、panc1 (Kras^{G12D})、H1299 (Kras^{Q61K})、A549 (Kras^{G12S}, EGFR 増幅)) では、これらの遺伝子産物が恒常的に発現していることを確認した。そこで次に、特異的 MEK 阻害剤である selmetinib や trametinib、または BRaf 阻害剤である vemurafenib を用いて ERK 経路を遮断したところ、これらの癌細胞における両分子の発現が著しく減弱することが分かった。また、HEK293 細胞に様々な癌遺伝子 (活性型 EGFR, Ras, Raf 変異体) を導入し、強力な

ERK 活性化を惹起したところ、これら新規遺伝子が強く発現誘導されることが分かった。これに加えて、任意のタイミングで目的遺伝子を細胞内に発現させる ProteoTuner shield システム (タカラバイオ) を利用し、低分子化合物である Shield-1 の添加依存的に HEK293 内に 活性型 MEK 1 (S218D/S222D) を発現させたところ、ERK 活性化の誘導に伴いこれら 2 遺伝子が発現亢進することを確認した。

さらに、これら新規遺伝子の発現制御機構を明らかにするために、プロモーター解析を行った。まず、各遺伝子上流 3000 bp をルシフェラーゼをコードするベクター上流にクローニングし、プロモーター活性を調査した。活性型 MEK や活性型 ERK の発現、あるいは ERK 経路の活性化刺激である TPA 刺激下で観察したところ、上記のいずれにおいても両遺伝子の発現が有意に亢進することを見出した。このことから、少なくともこれらの遺伝子上流 3000 bp に ERK 応答性のプロモーター領域が存在することが分かった。そこで次に、このプロモーター活性に必要な領域の絞り込みを行うために、上記領域の系統的な欠損変異体を作成し、ERK 活性化時のプロモーター活性を測定したところ、各遺伝子の発現が完全に消失する領域を同定することに成功した。また同領域には、Protein-X 遺伝子と lncRNA-Y 遺伝子とで異なる ERK 制御性の転写因子結合配列 (JASPAR を用いて検索) が存在することが分かった。実際に、得られた転写因子候補をそれぞれ過剰発現すると Protein-X または lncRNA-Y 遺伝子のプロモーター活性が亢進したことから、両遺伝子は強力な ERK 活性で発現誘導されるものの、異なる転写因子によって制御されていることが強く示唆された。

そこで次に、Protein-X の発現が癌組織で観察されるか検討した。ERK 活性化が高頻度で観察される膵臓がん、大腸がん、肺がん組織アレイを購入し (US biomax 社)、抗

Protein-X 抗体で染色したところ、解析した全ての癌組織において強い発現が観察された。一方で、正常組織においては低発現あるいは殆ど観察されなかった。また、lncRNA-Y に関しては公共データベースに登録されている癌臨床検体での発現量を利用して検証した。The Cancer Genome Atlas (TCGA) の公開データの中から、ERK 経路の構成因子 (EGFR、Ras、Raf など) の遺伝子変異が高頻度で認められ、かつ癌部/非癌部のデータを有する大腸癌と肺腺癌の read count データを The Genomic Data Commons (GDC) Data Portal より入手し、正規化した値について正常組織-癌組織および癌組織間で比較した。その結果、複数の癌で同遺伝子の発現が有意に亢進していることが明らかとなった。

次に、これらの遺伝子産物の細胞内局在を明らかにする為に、細胞分画を行った。MEK 活性型変異体を安定発現する HEK293 細胞株を回収し、核と細胞質に分画した。各画分における Protein-X および lncRNA-Y をウエスタンブロットまたは q-PCR により解析した結果、両遺伝子は核画分には殆ど検出されず、細胞質画分に強く検出された。

そこで次に、Protein-X に関して分子機能を解明するために、その結合タンパク質の同定を試みた。Protein-X を発現する細胞株のライセートから特異的抗体を用いて同分子を精製し、共沈したタンパク質を銀染色により検出した。ゲルからバンドを切り出して質量分析を行ったところ、アクチン骨格制御分子や、脱リン酸化酵素分子が同定された。また、酵母ツーハイブリッドによる結合タンパク質のスクリーニングも実施した結果、先の共沈実験によるスクリーニングと同じ分子を含む、様々な相互作用蛋白質が同定された。現在、これらの結合分子が有する細胞内機能を手がかりに、Protein-X が細胞の増殖能や運動能に関与するか検討しており、

lncRNA-Y の相互作用分子の検討も合わせて、
今後はこれらの新規遺伝子の生理的あるいは
病理学的意義を更に詳しく探索する予定
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2件)

1. Yuji Kubota and Mutsuhiro
Takekawa “Detection and Functional
Analysis of SUMO-modified MEK”
Methods in Mol. Biol.
1487,99-111(2016)
DOI:10.1004/978-1-4939-6424-6_7
2. Eiji Kinoshita, Emiko
Kinoshita-Kikuta, Yuji Kubota,
Mutsuhiro Takekawa and Tohru
Koike “A Phos-tag SDS-PAGE method
that effectively uses
phosphoproteomic data for profiling
the phosphorylation dynamics of
MEK1.” ***Proteomics***, 16(13),
1825-1836 (2016). DOI:
10.1002/pmic.201500494

[学会発表](計9件)

1. 久保田裕二、武川睦寛「癌および先天性
Ras/MAPK 症候群で認められる MEK
ミスセンス変異体の異常活性化機構と
疾患発症メカニズムの解明」,42015 年
4月10日-11日、第52回日本臨床分子
医学会学術集会(京都市勤業館)
2. Yuji Kubota and Mutsuhiro
Takekawa “MEK mutants derived
from sporadic cancers and congenital
Ras/MAPK syndromes induce
differential gene-expression profiles

by modulating spatio-temporal
properties of ERK signaling” 第10回
研究者ネットワーク国際シンポジウム、
2015年7月23日、北海道大学医学部
学友会館

3. Ryosuke Naka, Yuji Kubota and
Mutsuhiro Takekawa “Identification
of a novel JNK substrate using yeast
three-hybrid system” 第42回医科学
研究所創立記念シンポジウム、2015年
6月1日-2日、東京大学医科学研究所
4. Yusuke Takagi, Yuji Kubota, Yosuke
Kawabe and Mutsuhiro Takekawa
“EIG-1, a novel ERK-inducible gene,
promotes cell motility” 第15回東京大
学生命科学シンポジウム、2015年6月
27日、東京大学武田先端知ビル
5. Yusuke Takagi, Yuji Kubota, Yosuke
Kawabe and Mutsuhiro Takekawa
“Identification of a novel gene induced
by ERK activation” 第74回日本癌学
会学術集会、2015年10月8日-10日、
名古屋国際会議場
6. 大江星菜、久保田裕二、武川睦寛
“Identification of novel ERK
substrates by yeast three-hybrid
screening” 第39回日本分子生物学会
年会、2016年11月30日-12月2日、
パシフィコ横浜
7. 高木祐輔、久保田裕二、川邊庸介、武川
睦寛「ERK経路の異常活性化により発
現変化する新規遺伝子の機能解析」
第53回日本臨床分子医学会学術集会、
2016年4月16日、東京国際フォーラ
ム
8. 川邊庸介、久保田裕二、高木祐輔、武川
睦寛「新規 ERK 応答性 long
non-coding RNA の同定およびその機
能解析」 第53回日本臨床分子医学会
学術集会、2016年4月16日、東京国
際フォーラム
9. Yusuke Takagi, Yuji Kubota, Masaaki
Oyama, Hiroko Kozuka-Hata and
Mutsuhiro Takekawa “Identification

of a novel gene that is induced by hyperactivation of the ERK pathway”
平成 28 年度 東京大学医科学研究所 研究成果発表会、2016 年 6 月 4 日、東京大学医科学研究所

〔図書〕(計 2 件)

1. 久保田裕二、有本京子、武川睦寛 「ストレス顆粒の生理機能と疾患」, 409-415, 254(2015), 医学のあゆみ
2. Mutsuhiro Takekawa and Yuji Kubota ”Protein Modification in Pathogenic Dysregulation of Signaling” 211-231(2015), Springer Press

〔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

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/dcsmm/DCSMM/Top.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

久保田 裕二 (Kubota, Yuji)
東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70614973

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

東京大学・医科学研究所・大学院生
高木 祐輔 (Takagi, Yusuke)
川邊 庸介 (Kawabe, Yosuke)