

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14614

研究課題名(和文)「がんの顔つき」の分子機構の解明と展開

研究課題名(英文)Analyses and application of molecular mechanisms of "countenances of cancer"

研究代表者

谷 時雄 (Tani, Tokio)

熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・教授

研究者番号：80197516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：「がんの顔つき」は、乳がんなどの病理検査による悪性度評価を表す言葉である。「がんの顔つき」による悪性度評価は、核異型化の度合いを基に評価されるが、その核異型化の分子機構については未だに未解明な部分が多い。本研究では、「がんの顔つき」の指標となる核異型化の分子機構を解明するため、2057核分葉化誘導化合物の作用機構を解析した。その結果、化合物2057による核分葉化誘導においてプロテインキナーゼC、RNA結合タンパク質YB-1とチューブリンが必須な役割を担うことを明らかにした。また、新規抗がん薬のシーズ開発に向けて、核の分葉化を阻害し通常の核形態に戻す抑制化合物を新たに分離することに成功した。

研究成果の概要(英文)：“Countenances of cancer” is a word that describes degrees of cancer malignancy, especially in breast cancers. Although grades of malignancy in “countenances of cancer” are generally rated based on, partly, the percentage of nuclei with aberrant morphology, little is known about the mechanisms involved in exhibiting aberrant nuclear morphology in cancer cells. In this study, we analyzed the action mechanisms of the natural compound 2057 that induced aberrant nuclear morphology, such as nuclear lobulation. As a result, we revealed that protein kinase C, RNA binding protein YB-1 and tubulin play essential roles in nuclear lobulation induced by 2057. In addition, as a first step toward developing novel anti-cancer drugs, we isolated compounds that inhibit 2057-induced nuclear lobulation, restoring the nuclear morphology to the normal oval-like form.

研究分野：分子生物学

キーワード：がんの顔つき 分葉核 核異型 がん YB-1 プロテインキナーゼ ケミカルバイオロジー 成人T細胞白血病

1. 研究開始当初の背景

「がんの顔つき」は、乳癌細胞の病理学的悪性度(グレード分類)を表す言葉として臨床でよく使用される。乳癌手術後、病理医が癌原発巣の組織切片を顕微鏡で観察する際、「がんの顔つき」は浸潤性乳癌の悪性度や予後指標として大変重要となる。「がんの顔つき」を表すグレード分類(3段階)は、核異型度と核分裂像数の2因子で判断される。核異型度は、正常細胞と癌細胞の核形態の相違、即ち核の形や大きさが均一であれば正常な細胞に近く、核が分葉化したり大きさが不揃いであれば、悪性度が高いと判断される(図1)。グレードが高いほど、乳癌の転移や再発率が高くなる。臨床診断では、「がんの顔つき」は乳癌転移・再発の重要な判断基準として使用されている。グレード分類指標のうち、核分裂像指標については癌細胞増殖との関連が良く研究されている。しかし、もう一つの指標である核異型化/分葉化が、癌化に伴いどのような仕組みで引き起こされるか、がん細胞の浸潤/転移とどう関連するか、また、核形態の変化が遺伝子発現へ及ぼす影響などについては、多くが未知のままである。

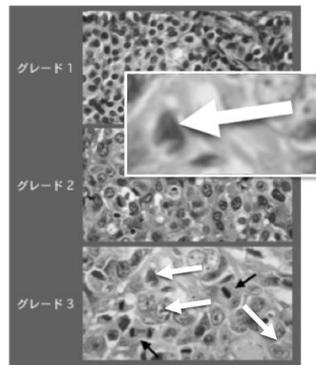


図1 「がんの顔つき」: 乳がん組織の核グレード分類。グレードが高いほど悪性度が高くなる。白矢印は異型核(特に分葉核)、黒矢印は分裂像を示す。乳がん診療HP([http://nyugan.info/q2\\_06.html](http://nyugan.info/q2_06.html))より引用改変。

細胞周期の間期において、一般的な動物細胞の核は円形もしくは楕円形の袋状を呈している。細胞内で核が球形や楕円袋状の形態を保つしくみはほとんど明らかになっていない。我々は、核内構造体の形成阻害化合物を、約 5,000 種類の放線菌培養上清サンプルからスクリーニングする過程で、一種類の天然化合物 2057 (環状ジペプチド構造化合物と判明)が、HeLa 細胞の楕円形の核を 1 時間という短時間の処理で、細胞の生存に影響なく、分葉状に大きく形態変化させることを見いだした(図2)。分葉状の核は、悪性度の高い癌細胞や急性型成人 T 細胞白血病(ATL)細胞

胞、遊走活性の高い好中球細胞に特徴的に見られる核形態である(図2)。2057 によって惹起される核分葉化と、乳がん細胞や ATL 細胞、好中球細胞の核分葉化は、現在までの様々な傍証から、共通の機構によって行われている可能性が極めて高い。本研究では、「がんの顔つき」の指標となる核分葉化の分子機

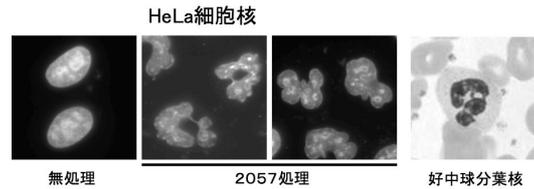


図2 化合物2057は、HeLa細胞核を異型化(分葉核化)する。1時間処理後のDAPIによる染色像を示す。分葉核は、細胞遊走活性の高い分化成熟した好中球細胞で観察される核形態である。

構を、新規に放線菌培養上清から同定した核分葉化誘導化合物 2057 の作用機構解析を介して解明する。本研究を展開することにより、核の形態と癌悪性度、遺伝子発現制御との関連、核の形が持つ生物学的意義について明らかにできると考えた。さらに、本研究で得られた知見を活用すれば、新たな抗癌剤スクリーニングや診断法開発への展開、がん治療で大きな問題となっている転移や浸潤のしくみの解明にも、大きく貢献できる。

また、ヒト成人 T 細胞白血病(ATL)は HTLV-1 ウィルスの感染によって引き起こされ、日本国内に 100 万人以上の HTLV-1 ウィルス保持者がいる疾患であるが、興味深いこ

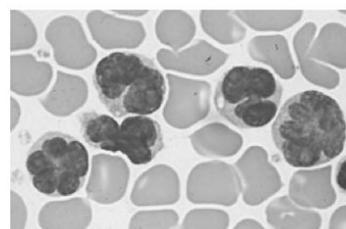


図3 成人T細胞白血病において観察される分葉化核(フラワー細胞)。図は<http://www.htlv1joho.org/>より引用。

とに、ATL 細胞では、急性型の悪性度の高い細胞ほど、2057 によって誘導される分葉核に類似した、核の分葉化が惹起され、それらは「フラワー(花)細胞」と呼ばれている(図3)。ATL 細胞において核が分葉化する機構については未知のままである。また、核の分葉化に伴い、ATL が悪性化するしくみも全く不明であり、本研究によって核分葉化の分子機構が解明されれば、ATL 発症機構の面からも意義は大きい。

## 2. 研究の目的

本研究は、「がんの顔つき」の指標となる核の異型化、特に分葉化の分子機構を、新規に同定した核分葉化誘導化合物 2057 の作用機構解析を介して解明することを目的として、「がんの顔つき」の分子機構解明から、好中球や成人 T 細胞白血病細胞における分葉核形成機構、核分葉化と乳がん細胞の浸潤/転移やエピゲノム制御との関連性の解明、更には抗分葉化活性を指標とした化合物スクリーニングなど創薬に繋がる基盤研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞の培養

HeLa Kyoto 細胞及び HeLa (SUN1-KO) 細胞 (愛媛県立医療技術大学檜枝美紀先生より分与)は、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター (37℃) で、10% Fetal Bovine Serum、ペニシリン、ストレプトマイシンを含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地を用いて培養した。

### (2) 化合物処理とノックダウン実験

35 mm カルチャーディッシュで培養した HeLa 細胞を、1 μM の化合物 2057 で 1~12 時間処理して解析に用いた。siRNA 導入による YB-1 のノックダウンは、リポフェクタミン 2000 を用いた。

## 4. 研究成果

### (1)PYT 核分葉化モデルの検証

我々は、現在までの解析により、核分葉化誘導化合物 2057 は、その構造上の特徴から Protein Kinase C (PKC)を活性化することが示唆され、実際に PKC 阻害剤処理で核分葉化が誘導できなくなったことから、2057 は PKC の活性化を介して核の分葉化を引き起こしている可能性が高いこと、乳がん細胞で高発現している多機能 RNA 結合タンパク質 YB-1 が、2057 処理により PKC を介して特異的にリン酸化されること、2057 で HeLa 細胞を処理すると、核分葉化後、浸潤突起様構造を形成し、細胞遊走性 (浸潤) が著しく活性化されること、微小管 (チューブリン)

の重合が核分葉化と遊走活性に必須であること、核膜裏打ちタンパク質 Lamin A/C が、2057 処理によって陥入する領域特異的に脱局在化することなどを明らかにした。これらの結果から、2057 によって活性化された PKC が反応のハブとなる YB-1 をリン酸化し、リン酸化された YB-1 がチューブリンや核膜タンパク質 Lamin A/C に作用して核の形態変化、即ち分葉化を引き起こす PYT 核分葉化モデルを提唱した(図4)。次に、PYT 核分葉化モデルを検証するため、野生型及びリン酸化型 YB-1 タンパク質を過剰発現したところ、核の分葉化が誘導された。更に、siRNA を用いて YB-1 をノックダウンすると、化合物 2057 で処理しても核の分葉化が誘導されなくなった。これらの実験結果、及び PKC 阻害化合物で処理すると核の分葉化が阻害されることから、PYT 核分葉化モデルの正当性が強く支持された。

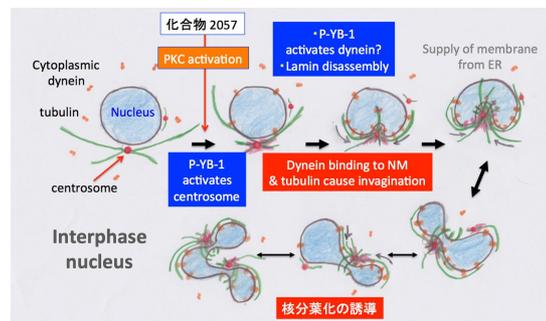


図4 2057による PYT 核分葉化モデル。2057によってPKCが活性化され YB-1がリン酸化されることが微小管による核分葉化を誘導する。

### (2)核分葉化阻害化合物のスクリーニングと解析

化合物 2057 による HeLa 細胞核の分葉化を阻害する化合物を、約 1,000 種類の化合物ライブラリーからスクリーニングした。その結果、2057 による核分葉化誘導を抑制もしくは促進する化合物計 26 種類を同定することに成功した。更に、PYT モデルの主要因子である YB-1 のリン酸化状態やチューブリンの分布変化への影響を詳細に調べ、得られた化合物の作用点について解析した。その結果、核分葉化抑制化合物の多くは YB-1 のリン酸化を阻害するキナーゼ阻害化合物であったが、化合物 #85 は YB-1 のリン酸化以降の過程を阻害して分葉化を止めていることが判明した。一方、核分葉化を促進する化合物は、YB-1

のリン酸化を強く促進し、細胞質に YB-1 を含む顆粒状構造体を形成させることが示された。

### (3) ヒト成人 T 細胞白血病(ATL)細胞に対する核分葉化阻害化合物の効果

典型的な分葉核を持つヒト成人 T 細胞白血病(ATL)細胞株(熊本大学エイズ研佐藤賢文先生との共同研究)を、同定した核分葉化抑制化合物で処理し、ATL 細胞において核の分葉化が抑制されるか検証した。その結果、解析した9種類のうち2種類の化合物#217及び#258は、ヒト ATL 細胞の分葉核を正常細胞の核に近い楕円状の細胞核に戻す活性があることが示された(図5)。今後、これら2種類の化合物が成人 T 細胞白血病に対する新規治療薬のシーズになり得るか検証していく予定である。

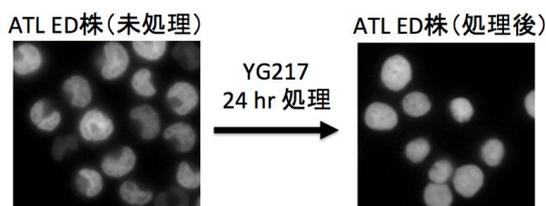


図5 成人T細胞白血病(ATL)培養細胞株を核分葉化抑制化合物 YG217 で24時間処理し、DAPIで核染色を行った。ATL 培養細胞株で観察される異型核が通常細胞様の核形態に戻る様子が観察された。

### (4)化合物 2057 処理による遺伝子発現変動の解析

核分葉化誘導化合物 2057 処理後の核の分葉化及び細胞遊走性促進に関わる遺伝子群を同定するため、処理開始後経時的に、RNA-Seq 解析を行った。その結果、2057 処理によって発現が上昇する遺伝子群、発現が抑制される遺伝子群をそれぞれ同定することに成功した。興味深いことに、化合物処理後の初期に発現が抑制される遺伝子の多くがタンパク質をコードしないノンコーディング RNA 遺伝子であった。これらノンコーディング RNA 遺伝子の機能解析も興味深い。

## 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4件)

BMX is a component of the centromere noncoding RNP complex involved in cohesion regulation. Yukiko Cho, Takashi Ideue, Megumi Nagayama, Norie Araki, Tokio Tani, *Genes Cells.*, 23(3), 172-184 (2018) 査読有  
DOI: 10.1111/gtc12562

*Saccharomyces cerevisiae* MSA1 mRNA has a sequence for the localization at the bud tip, Tomoko Andoh-Takeuchi, Yukiko Hayano-Ohsiro, Emi Nishiyoshi, Masatoshi Mutazono, Sachiko Hayashi and Tokio Tani *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 81, 1778-1785 (2017) 査読有  
DOI: 10.1080/09168451.2017.1347488

The intron in centromeric noncoding RNA facilitates RNAi-mediated formation of heterochromatin, Masatoshi Mutazono, Misato Morita, Chihiro Tsukahara, Madoka Chinen, Shiori Nishioka, Tatsuhiro Yumikake, Kohei Dohke, Misuzu Sakamoto, Takashi Ideue, Jun-ichi Nakayama, Kojiro Ishii, and Tokio Tani. *PLOS Genetics*, 13(2), e1006606 (2017) 査読有  
DOI: 10.1371/journal.pgen.1006606

Spatial regulation of the KH domain RNA-binding protein Rnc1 mediated by a Crm1-independent nuclear export system in *Schizosaccharomyces pombe*, Ryosuke Satoh, Yasuhiro Matsumura, Akitomo Tanaka, Makoto Takada, Yuna Ito, Kanako Hagihara, Masahiro Inari, Ayako Kita, Akira Fukao, Toshinobu Fujiwara, Shinya Hirai, Tokio Tani, and Reiko Sugiura. *Molecular Microbiol.*, 104, 428-448 (2017) 査読有  
DOI: 10.1111/mmi.13636

[学会発表](計10件)

池田智哉、野口貴史、平田久峰、高森規維、小宮依琳、五十嵐雅之、檜枝美紀、谷時雄、HeLa 細胞核の分葉化を誘導する化合物の作用機構解析、第40回日本分子生物学会年会、2017年12月6日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

中島啓太、糀本大和、前田沙希、五十嵐雅之、谷時雄、mRNA 核外輸送を阻害する天然

化合物の同定と解析、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年 12 月 6 日、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

河野貴亮、井手上賢、荒木令江、谷時雄、細胞分裂の制御に関わる Satellite I ncRNP 複合体構成因子候補 YB-1 の機能解析、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年 12 月 7 日、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

小井手俊輝、佐堂晃太、平田久峰、田中千晶、山口拓也、福長亜紀、石川勇人、五十嵐雅之、谷時雄、Polycomb group body の分散化を誘導する化合物の解析、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年 12 月 7 日、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

Yukiko Cho, Takashi Ideue, Norie Araki and Tokio Tani、Centromeric non-coding RNP complexes regulate cohesin and chromosome segregation、EMBL Symposia the Non-coding genome、2017 年 9 月 13 日、Heidelberg（Germany）

野口貴史、平田久峰、池田智哉、小宮依琳、五十嵐雅之、佐藤賢文、谷時雄、細胞核の形を決めるしくみ：核分葉化のケミカルバイオロジー、第 34 回染色体ワークショップ、2017 年 1 月 11 日、かずさアカデミアホール（千葉県・木更津市）

池田智哉、野口貴史、平田久峰、小宮依琳、五十嵐雅之、谷時雄、HeLa 細胞核の分葉化を誘導する Teleocidin A1 の作用機構解析、第 39 回日本分子生物学会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

石川聡美、北折康訓、竹下友佳子、Ramesh Pillai、五十嵐雅之、吉村華夏、石川勇人、谷時雄、Nuage 形成に影響を与える天然化合物のスクリーニングと解析、第 39 回日本分子生物学会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

野口貴史、平田久峰、池田智哉、小宮依琳、五十嵐雅之、谷時雄、RNA 結合タンパク質 YB-1 の異所的リン酸化は HeLa 細胞核の分葉

化を引き起こす、RNA フロンティアミーティング 2016、2016 年 9 月 2 日、ニセコいろは(北海道)

Keita Nakashima, Yamato Kojimoto, Saki Maeda, Masayuki Igarashi, Tokio Tani、Identification and characterization of natural compounds that inhibit nuclear mRNA export、RNA 2016、2016 年 7 月 1 日、京都国際会議場（京都府）

〔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

<http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/bio/staff/tani/index.htm>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

谷時雄 (TANI, Tokio)

熊本大学・大学院先端科学研究部・教授

研究者番号：80197516