

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：82736

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10261

研究課題名（和文）悪性黒色腫病態進展における IER5-HSF1 経路の機能解明

研究課題名（英文）Role of IER5-HSF1 axis in malignant melanoma carcinogenesis

研究代表者

山野 荘太郎（Yamano, Shotaro）

独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター（試験管理部、病理検査部）・その他部局等・主任研究員

研究者番号：80614528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、予後不良な皮膚癌の一種である悪性黒色腫における IER5-HSF1 経路の役割、及び IER5 の機能について明らかにすることである。TCGA データベースにより、特に BRAF 遺伝子変異を有する患者群において、IER5 高発現群で予後が悪い事が明らかとなった。また B16F10 株で IER5KO 株の肺転移を評価した結果、IER5 は癌転移に重要な役割を有する可能性が示唆された。加えて、IER5 蛋白質は、one-bipartile 型の NLS を有する事を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は悪性黒色腫の治療及び予防を最終目標とした基礎研究であり、本研究成果は将来的に悪性黒色腫患者における治療薬の開発、予後予測、予防等の観点から有益な情報になることを期待する。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify the function of IER5 and the role of the IER5-HSF1 pathway in melanoma, a type of skin cancer with a poor prognosis. Re-analysis of the TCGA database revealed a poor prognosis in the IER5 high expression group, especially in the group of malignant melanoma patients with BRAF mutations. The evaluation of lung metastasis of IER5KO strain using mouse melanoma cell line B16F10 suggested that IER5 may have an important role in cancer metastasis. In addition, it was revealed that the IER5 protein has one-bipartile type Nuclear localization signal.

研究分野：癌研究

キーワード：IER5 HSF1 melanoma NLS

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

癌の発症及び悪性を強力に促進する分子 Heat-shock factor 1 (以下 HSF1) の活性化を制御する機構に注目が集まっている。HSF1 は蛋白質のホメオスタシスに必須であるヒートショックプロテイン群 (HSPs) のマスターレギュレーターとして知られていたが、近年米国 MIT ホワイトヘッド研究所の Lindquist ラボを中心に、種々の癌種における癌発症及び悪性の促進機構への HSF1 の関与が報告されている (Cell 2007, Cell 2012, Science 2013, Cell 2014 等)。内容を要約すると、癌組織内の HSF1 により転写される下流遺伝子群は、HSPs に限定されず、細胞増殖や代謝の亢進に寄与し悪性を加速させる分子群を包括的に含んでいることが示された。また、近年、HSF1 の活性化が悪性を促進する癌種として悪性黒色腫が注目を集めている。現在、悪性黒色腫における HSF1 に関する知見が急速に蓄積されており、悪性黒色腫細胞株で HSF1 を過剰発現させることにより薬剤耐性が亢進すること、ヒト悪性黒色腫の臨床材料で HSF1 の高発現症例は予後が悪いこと等が明らかにされている。以上のように癌研究領域における HSF1 研究は世界的にますます加速している。

一方で、このように HSF1 が注目されているが、HSF1 活性化を引き起こす上流の分子機構は、ほとんど明らかにされていなかった。先行研究より、HSF1 の機能は自身の転写量 (RNA 及び蛋白質量) の増減では調節されておらず、HSF1 蛋白質の翻訳後修飾及び、他の蛋白質との相互作用を介した活性化でのみ調節される事が知られているため、HSF1 を活性化させる上流因子の探索は極めて重要であると考えられていた。我々の研究チームは、これまでに世界に先駆けて種々の癌種において HSF1 を活性化させる上流分子 Immediate early response 5 (以下 IER5) の同定及び機能解析に成功している。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、予後不良な皮膚癌の一種である悪性黒色腫における IER5-HSF1 経路の役割、及び IER5 の更なる機能について明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### IER5KO B16F10 株の樹立

B16F10 株における IER5 遺伝子の KO については、pX335 Cas9 D10A nickase vector を用いた。Crispr grna design tool を用いて NGG に対して合計 3 セットの gRNA を設計し、B16F10 株に Lipofectamine 2000 を用いて定法に従いトランスフェクションした。その後 Bulk 細胞を 96well プレートを用いて single cell cloning し、gRNA1 セットから 10 クローン程度を選定した。各種 gRNA セット由来の 10 クローン亜株を用いて WB にて IER5 プロテイン発現量を検討し、IER5 発現が認められない IER5 KO 亜株 3 種類を樹立した。

#### 肺転移実験

8 週齢の雄の野生型 C57BL/6J マウスに対して B16F10 の IER5KO 亜株または、同時に樹立した negative control 株を  $5 \times 10^5$  cells/mouse で尾静脈より移植した。移植 18 日後に動物を解剖し、肺を摘出後、転移を評価した。

#### IER5 各種ベクター作成

pcDNA3.1 vector を用いて、IER5 full length 及び NLS のアラニン置換体を PCR にて作成した (wt: 217-RKR-CAAGVGGGPAGCPAPGSTPL-KKPRR-244、NLS1-3A: 217-AAA-CAAGVGGGPAGCPAPGSTPL-KKPRR-244、NLS2-4A: 217-RKR-CAAGVGGGPAGCPAPGSTPL-AAPAA-244、NLS-7A: 217-AAA-CAAGVGGGPAGCPAPGSTPL-AAPAA-244)。

加えて、pcDNA3.1-C-eGFP vector を用いて HA-各種 NLS-EGFP vector を PCR にて作成した (IER5-NLSwt: HA-RKRCAAGVGGGPAGCPAPGSTPLKKPRR-EGFP、IER5-(A)20-NLS: HA-RKRAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAKKPRR-EGFP、SV40NLS: HA-PKKKRKV-EGFP)。

### 4. 研究成果

cBioportal 経由で TCGA データベースのローデータをダウンロードして用い、悪性黒色腫患者の腫瘍組織内 IER5 mRNA 発現量と、臨床学的パラメータとの相関関係について R を用いて解析を行った。その結果、BRAF 遺伝子に変異を有する患者群において、IER5 mRNA 発現量が高い群で、低い群と比較し、有意な生存曲線の低下が認められたが、NRAS 遺伝子に変異を有する患者群、及び BRAF-NRAS 両遺伝子に変異を認めない Double Wt 患者群においては、IER5 mRNA 発現量の差によって生存曲線に有意な差は認められなかった。そのため、特に BRAF 変異を有する患者において、IER5 高発現と悪性の関連を示唆する初見である可能性が考えられた。

同種移植可能なマウス由来悪性黒色腫細胞株 B16F10 株を用いて、CRISPR/Cas9 法により内在性 IER5KO 亜株を樹立した。マウスへの移植により肺転移を評価した結果、negative control 株と比較して、IER5 KO 株では、肺転移能が有意に減少した。以上の結果より、IER5 は癌転移（悪性化）に重要な役割を有する可能性が示唆された。

加えて、IER5 アミノ酸配列内における新規核内以降シグナル（NLS）（RKR-CACGVGGGPAGCPAPGSTPL-KKPRR）を明らかにする事ができた。IER5 の RKR または KKPRR 配列をアラニンに置換すると、核への移行が抑制された。加えて、RKR-CACGVGGGPAGCPAPGSTPL-KKPRR 配列を EGFP に結合させると、EGFP が核及び核小体に効率に局在し、その核内移行能は SV40-NLS よりも高い結果を得た。加えて、核内以降を示さない IER5 は HSF1 活性化能が減弱し、HSP mRNA の転写量が、野生型 IER5 と比較し、有意に低値を示した。以上の結果より、IER5 蛋白質は、2 箇所にも NLS を持つのではなく、one-bipartite 型の NLS を有する事が明らかとなった。加えて、核内以降する事で HSF1 を活性化させ、機能する事が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shotaro Yamano , Makoto Kimura , Yu Chen , Naoko Imamoto , Rieko Ohki	4. 巻 386
2. 論文標題 Nuclear Import of IER5 Is Mediated by a Classical Bipartite Nuclear Localization Signal and Is Required for HSF1 Full Activation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 111686
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1016/j.yexcr.2019.111686.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分 担 者	大木 理恵子  (Ohki Rieko)  (70356252)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・独立ユ ニット長    (82606)	