

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07309

研究課題名(和文) がん遺伝子活性化変異による小胞体ストレス抵抗性の分子機序解明と治療への応用

研究課題名(英文) Molecular basis of oncogenic mutation-associated resistance to endoplasmic reticulum stresses and their applications to cancer chemotherapy

研究代表者

國政 和宏 (KUNIMASA, Kazuhiro)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター ゲノム研究部・研究員

研究者番号：50534020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：がん微小環境は小胞体ストレスが蓄積しやすい環境であり、小胞体ストレス抵抗性の獲得は重要ながん進展機構の一つである。本研究では、小胞体ストレス下で、活性型X遺伝子がアポトーシス促進性のBim発現誘導を抑制することによって、小胞体ストレス抵抗性を賦与することを明らかにした。さらに、小胞体ストレス抵抗性を解除する化合物のスクリーニングから、核外輸送を担うexportin-1の阻害が小胞体ストレス抵抗性の解除に繋がることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小胞体ストレス抵抗性化機序の解明とそれに対する阻害剤の同定は、がん遺伝子Xの増殖シグナル阻害とは異なる作用機序に基づいたがん治療法の確立やX活性化変異がんの特徴的な病態の理解に繋がることが期待される。各種活性型がん遺伝子特有のストレス適応機構を明らかにできつつあり、今後の治療標的化研究への展開に重要な示唆を与えるデータが得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Tumor microenvironment is clinical circumstances where endoplasmic reticulum (ER) stresses tend to accumulate. Acquired resistance to ER stresses is one of key steps during cancer progression. In this study, we found that oncogenic mutations of gene "X" render resistance to ER stresses via suppression of ER stress-induced Bim, a proapoptotic Bcl-2 family protein. Furthermore, we carried out a phenotypic screening for compounds with the ability to cancel resistance to ER stresses and found that exportin-1 inhibitors can overcome the resistance.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：小胞体ストレス応答 がん遺伝子 活性化変異 がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織はエネルギー消費の増加や未成熟な血管網により、グルコース飢餓や低酸素等の微小環境ストレスに曝されている。こうしたストレスは、小胞体に異常タンパク質の蓄積を誘導することから、小胞体ストレスと呼ばれている。また近年、c-Myc 等のがん遺伝子による発がん過程においても、タンパク質の過剰な合成負荷により、小胞体ストレスが誘導されることが明らかにされている。こうした知見は、小胞体ストレスに対する抵抗性の獲得が、がんの進展に重要であることを示唆している。

申請者は siRNA ライブラリーを用いて、N 型糖鎖修飾阻害剤 tunicamycin 等に対する小胞体ストレス感受性を変化させる因子をスクリーニングし、がん遺伝子 X の活性化変異体 (X-mut) が小胞体ストレス抵抗性化因子である可能性を見出してきた。具体的な成果としては、X-mut のノックダウンによる小胞体ストレス選択的な細胞死の誘導、及び X-mut 細胞株や X-mut 過剰発現細胞での小胞体ストレス抵抗性化等の発見が挙げられる。X 活性化変異がんの主ながん進展機構としては、ERK 経路や Akt 経路等のがん増殖シグナルの亢進が報告されている。一方で、X 活性化変異がんの治療に関しては、薬剤との結合性が乏しい立体構造等から、X 遺伝子の標的化が困難であること、さらに MEK-ERK 経路等の増殖シグナルの阻害も奏効率が低いことが問題となっている。従って、増殖シグナル阻害とは異なるコンセプトに基づいた治療薬の開発が切望されており、その実現に向け、X 活性化変異がんにおける増殖シグナル以外のがん進展機構の解明とそれに関わるドラッグ可能な治療標的分子の同定が重要な研究課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、X-mut による小胞体ストレス抵抗性化機構を治療標的としており、従来の増殖シグナル制御機構を標的としたアプローチとは大きく異なる。X-mut の制御を受け、かつドラッグ可能な小胞体ストレス抵抗性化分子機序及び標的の同定は、小胞体ストレスを誘導するプロテアソーム阻害薬 bortezomib 等と相乗効果を示す薬剤の開発への展開が期待できる。そこで、本研究では、X 遺伝子活性化変異がんの新たながん進展機構として小胞体ストレス抵抗性化に着目し、その分子機序を明らかにすることを目的とした。さらに、同定した小胞体ストレス抵抗性化機構が X 活性化変異がんの治療標的になり得るかの検証を試みた。

3. 研究の方法

【X-mutによる小胞体ストレス抵抗性機構の解明】

がん遺伝子 X をノックダウンした X-mut がん細胞株において、小胞体ストレス下で細胞死が誘導されることから、小胞体ストレス応答に関わる細胞死シグナルに焦点を当て解析を進めた。具体的には、CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP)、Death receptor-5 (DR-5) や Bcl-2 ファミリータンパク質である Bim の量的変化を Western blotting で検出した。さらに各細胞死関連分子を siRNA でノックダウンし、小胞体ストレス下での細胞死誘導が抑制されるか否か等を細胞核染色や Caspase-3/7 活性測定等で検証した。

【小胞体ストレス抵抗性を解除する化合物の探索】

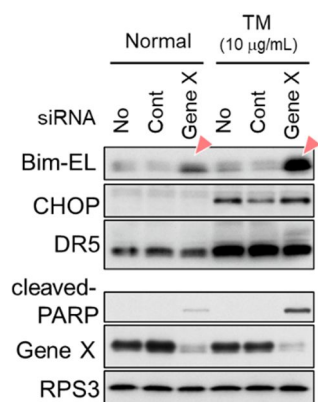
分子プロファイリング支援活動の標準阻害剤キット (368 化合物) を用いて、X-mut がん細胞株において、小胞体ストレス抵抗性を解除する化合物を小胞体ストレス選択的な細胞死誘導能を指標にスクリーニングした。さらに、ヒット化合物の標的分子を阻害する臨床試験薬等や siRNA 等で、小胞体ストレス抵抗性が解除されるか否かの検証を進めた。

4. 研究成果

【X-mutによる小胞体ストレス抵抗性機構の解明】

活性型の変異 X 遺伝子を発現するがん細胞株において X をノックダウンすると、小胞体ストレス選択的に高感受性化し細胞死が誘導されることを見出していた。そこで、活性化がん遺伝子 X による小胞体ストレス抵抗性の機序解明に焦点を当て、小胞体ストレスに関連する細胞死誘導分子に着目し解析を進めた。その結果、CHOP や DR-5 は tunicamycin 等の小胞体ストレス下で誘導されたが、X-mut のノックダウンによる量的な変化は認められなかった (図 1)。一方で、Bim は小胞体ストレス下で X-mut をノックダウンすることにより、顕著に発現誘導されることを見出した。さらに、活性型 X とともに Bim をノックダウンすると、小胞体ストレスによる細胞死誘導が抑制された。これらの結果などから、活性型 X は Bim 発現誘導を抑制することによって、小胞体ストレス抵抗性を賦与することが明らかになった。以上のように、活性化 X 遺伝子による細胞死抵抗性が小胞体ストレス選択的であることに着目し、小胞体ストレスに関連する細胞死誘導分子の解析を進めた結果、活性型 X による Bim の発現抑制という小胞体ストレス抵抗性機序を明らかにすることができた。本研究を通して、各種活性型がん遺伝子特有のストレス適応機構を明らかにできつつあり、今後の治療標的化研究への展開に重要な示唆を与えるデータが得られたと考えている。

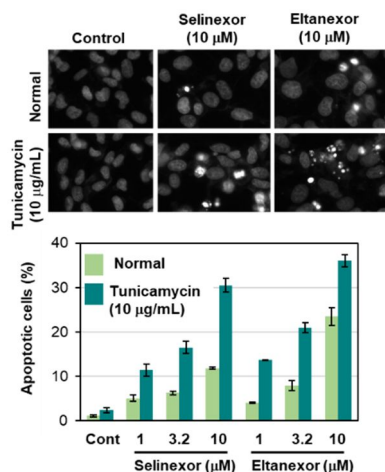
図1 X-mut 遺伝子のノックダウンによる
小胞体ストレス下での Bim 誘導



【小胞体ストレス抵抗性を解除する化合物の探索】

がん遺伝子 X は直接阻害することが困難な標的分子である。そのため、X 活性化変異細胞株において、tunicamycin 等の小胞体ストレスラーと合成致死効果を発揮する化合物を、細胞核の断片化を指標にフェノタイプスクリーニングで探索した。その結果、小胞体ストレス下で細胞死を誘導する 22 個のヒット化合物を同定した。さらに、複数の X 活性化変異細胞株等を用いて小胞体ストレス選択性等を検証した結果、小胞体ストレス抵抗性を解除する化合物として、leptomycin B を同定した。Leptomycin B はタンパク質等の核外輸送を担う exportin-1 (XP01, 別名 CRM1) に対する阻害剤であり、積み荷タンパク質等の輸送を阻害する濃度域で、ボルテゾミブやツニカマイシン等の小胞体ストレス選択的にアポトーシスを誘導した。さらに、小胞体ストレスのマスターレギュレーターである転写因子 ATF4 の発現誘導を抑制することを見出した。また、Exportin-1 を標的とする複数の臨床試験薬 (selinexor 及び eltanexor) も同様に、小胞体ストレス抵抗性を解除する効果を持つことを確認した (図 2)。以上の成果は、exportin-1 が小胞体ストレス抵抗性の賦与に関与していることを示唆している。小胞体ストレス抵抗性化機序の解明とそれに対する阻害剤の同定は、増殖シグナル阻害とは異なる作用機序に基づいたがん治療法の確立や X 活性化変異がんの特徴的な病態の理解に繋がることが期待される。

図2 Exportin-1 阻害剤による
小胞体ストレス下での細胞死誘導



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Kato Yu, Kunimasa Kazuhiro, Takahashi Mizuki, Harada Ayaka, Nagasawa Ikuko, Osawa Masanori, Sugimoto Yoshikazu, Tomida Akihiro	4. 巻 98
2. 論文標題 GZD824 Inhibits GCN2 and Sensitizes Cancer Cells to Amino Acid Starvation Stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Pharmacology	6. 最初と最後の頁 669 ~ 676
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1124/molpharm.120.000070	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nagasawa Ikuko, Koido Masaru, Tani Yuri, Tsukahara Satomi, Kunimasa Kazuhiro, Tomida Akihiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Disrupting ATF4 Expression Mechanisms Provides an Effective Strategy for BRAF-Targeted Melanoma Therapy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101028 ~ 101028
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101028	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 -

1. 著者名 Kato Yu, Kunimasa Kazuhiro, Sugimoto Yoshikazu, Tomida Akihiro	4. 巻 504
2. 論文標題 BCR-ABL tyrosine kinase inhibition induces metabolic vulnerability by preventing the integrated stress response in K562 cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 721 ~ 726
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.09.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<https://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/genome/index.html>

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
連携研究者	富田 章弘 (TOMIDA Akihiro) (40251483)	公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター ゲノム研究部・部長 (72602)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------