

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：72602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23927

研究課題名（和文）核小体機能を標的とした新たな細胞増殖抑制機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of antiproliferative action in cancer cells targeting nucleolar function

研究代表者

渡邊 健司（WATANABE, Kenji）

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がん生物部・研究員

研究者番号：80404333

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究により発芽大豆由来の2次代謝物を分画することによって核小体ストレスを惹起し、がん細胞の増殖を抑制可能な小化合物が含まれる粗分画を同定することができた。この大豆由来の分画は骨肉腫由来の細胞株であるU2OS細胞のみならず、乳がん細胞やユーイング肉腫といった細胞株に対しても核小体ストレスを惹起し細胞死を誘導することが分かった。またこの分画に含まれる小化合物はp53の欠失に関わらず細胞死を誘導した。このことは粗分画中の小化合物が核小体ストレスを惹起しその結果p53の蓄積が生じるため細胞死を引き起こすのではなく、p53非依存的に核小体ストレスによる細胞死を誘導する経路の存在を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的には、今回の実験結果から核小体ストレスが関与するp53非依存的な新たな細胞死誘導のメカニズムを解明するきっかけとなることが期待される。また今回核小体ストレスを誘導しがん細胞の増殖抑制に効果のある小化合物が発芽大豆由来の抽出物より見いだされた。このことは将来的に核小体を標的とした新たな抗がん剤の開発につながる可能性があり、社会的意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we were able to obtain a crude fraction containing secondary metabolites derived from germinated soybeans, which induce nucleolar stress and suppress the growth of cancer cells. We found that this soybean-derived fraction induces nuclear body stress and induces cell death not only in osteosarcoma cell lines U2OS cells, but also in cell lines such as breast cancer cells and Ewing's sarcoma. In addition, the small compounds contained in this fraction induced cell death regardless of the p53 mutation, suggesting that this is a pathway that induces cell death due to nucleolar stress in a p53-independent manner.

研究分野：分子生物学

キーワード：核小体ストレス ファイトアレキシン がん

## 1. 研究開始当初の背景

日本人の死亡原因の1位は男女とも悪性新生物であり、その克服は社会的にも望まれているものである。細胞内で核小体機能はリボソーム RNA (rRNA) の転写やプロセッシングなどタンパク合成、いわゆる ribosomal biogenesis と呼ばれる細胞機能維持のための重要なプロセスを制御している。このことは細胞内の総 RNA 量のおおよそ 70% が rRNA であることから窺われる。そのため核小体機能を抑制する化合物を見出すことが出来れば、その化合物は細胞における ribosomal biogenesis の破綻をきたし、核小体ストレスを惹起させるため細胞増殖を抑制しうると考えられる。核小体機能はがん細胞では正常細胞と比較して亢進しており、がん細胞は核小体機能に、より依存して増殖していることが知られている。そのため核小体ストレスを惹起する化合物は、正常細胞よりがん細胞においてより効果的に ribosomal biogenesis の破綻をもたらすと考えられる。この際、細胞内では核小体ストレスが発端となって、RPL11、RPL5 などの核小体タンパクが核小体内から逸脱し核質に拡散する。更にこれらのタンパクが MDM2 と競合的に結合することにより MDM2 依存的な p53 の分解が阻害され、細胞内で p53 が安定化することが知られている。この一連の反応により p53 依存的に p21 が誘導され、核小体ストレスを起因とする細胞老化または細胞死が促進される。このように核小体ストレスを細胞に惹起させることによってがん抑制遺伝子 p53 の転写産物である p53 タンパク質の細胞内蓄積を誘導し、がん細胞の無限のない増殖を抑制することが可能であると考えられている。このような観点から、核小体ストレスを惹起する様々な小化合物をスクリーニングすることによって見つけ出す試みが行われ、がん細胞の増殖を抑制する有望な小化合物が見いだされてきた。核小体ストレスを惹起する小化合物として、核小体で rRNA を転写する RNA ポリメラーゼ I の阻害剤が数種類見いだされている。現在それらの抗がん剤としての有効性および安全性確認のための臨床試験が海外で行われており、核小体ストレスをターゲットとした抗がん剤に期待が持たれている。

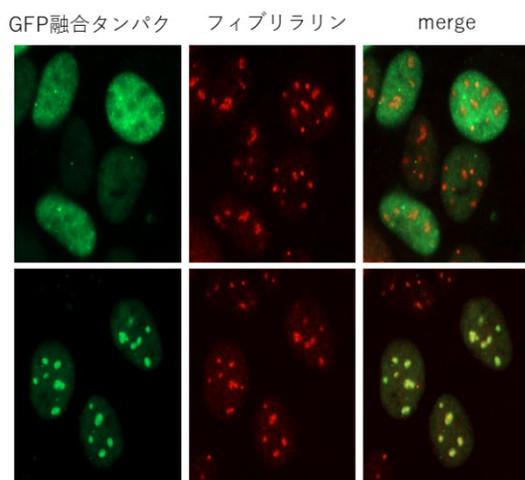
## 2. 研究の目的

悪性新生物に対する根本的な治療法は外科的な切除及び術後化学療法であるが、手術時に既に進行がんであった場合、外科的に切除可能で術後化学療法が施行された場合でも再発率が高い。術後化学療法における抗がん剤は現在、がん細胞の DNA に対して損傷を与える DNA 傷害性薬剤が主流である。これら DNA に損傷を生じさせる薬剤は正常細胞の DNA にも損傷を惹起させる。そのためがん細胞と同様に増殖が速い、血球系の正常細胞や腸管の上皮細胞にも傷害が生じ、その結果抗がん剤投与時に急性期の副作用として現れる。また急性期の副作用以外に正常細胞において DNA 傷害性薬剤により生じた DNA 損傷は、抗がん剤投与後の晩発性の二次発がんにつながると考えられている。とくにユーイング肉腫やリンパ腫など小児期に好発する悪性腫瘍に対しては DNA 傷害性薬剤による多剤併用療法が標準療法となっており、たとえ小児期のがんを克服できたとしても、その後の二次発がんの発生頻度が高くなることが知られている。また近年、がん幹細胞の存在ががんの薬剤抵抗性獲得と再発の機序として説明されている。これらがん幹細胞は通常幹細胞と同様に DNA 修復機構が亢進していることが知られており DNA 傷害性薬剤存在下でも長期間増殖を停止した状態で生存可能なことが脳腫瘍や乳がんのがん幹細胞において実験的に報告されている。このように DNA 傷害性薬剤は現在広くがんの標準療法としてももちいられているが、一方で再発や二次発がんをもたらす可能性を否定できない。そこで DNA 傷害性薬剤によらないがん治療薬の開発が急務であると考え、がん細胞で亢進している核小体機能を治療の標的とすることに着目した。本課題では、がん細胞における核小体機能を抑制することに

よって二次発がんやがん幹細胞への遺伝子の発現のリプログラミングを誘発する可能性のある DNA 損傷によらないがん治療薬の開発及びその核小体ストレスの誘導メカニズムを解明することを目的としている。

### 3. 研究の方法

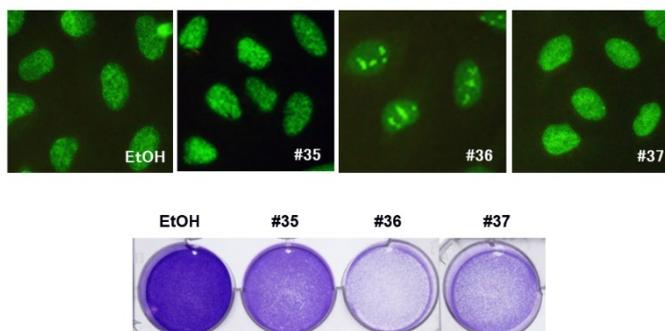
本課題で発芽大豆種子より抽出された二次代謝物をスクリーニングすることによってがん細胞において核小体機能を抑制する化合物を探索し、がん細胞の増殖を抑制する小化合物を見出す試みである。植物由来の化合物、例えばイリノテカン、ビンブラスチンやパクリタキセルなどに代表されるように一般的に合成化合物と比較して最終的に抗がん剤として製品化されやすいことを根拠とし発芽大豆種子より抽出された二次代謝物を今回のスクリーニング化合物としてもちいた。核小体ストレスを細胞内で検出するために、核小体ストレスに応じて核質から核小体へその局在を変化させる mRNA のスプライシングに関与するタンパク質に着目した。このスプライシングタンパク質を GFP 融合タンパク質として U2OS 細胞内で安定的に発現する安定発現株を樹立した (図 1)。この細胞株を用いて、融合タンパク質の核小体移行を指標として発芽大豆由来の抽出物の分画より核小体ストレスを誘導する小化合物をスクリーニングによって見出す。



**図 1) GFP 融合タンパクの核小体ストレスに応じた核質から核小体への移行。** GFP 融合タンパクを安定的に発現する U2OS 細胞株に核小体ストレスを惹起させる抗がん剤であるカンプトテシンで処理を行った。細胞を固定後、核小体のマーカーであるフィブリラリンに対する特異抗体を用いて同時に免疫染色を行った。

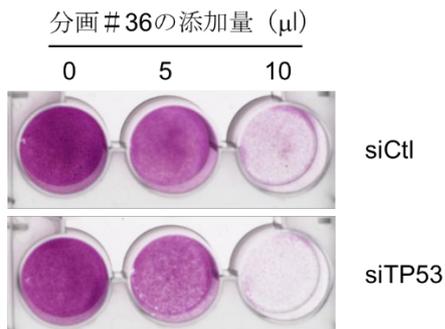
### 4. 研究成果

発芽大豆抽出物から液体クロマトグラフィーにより 29 の粗分画が分取されたが、そのうちの 1 つの分画が U2OS 細胞に核小体ストレスを惹起することを見出した。この GFP 融合タンパクの核小体移行を指標としたライブイメージングによる粗分画のスクリーニングを更に連続して 2 度行い、最終的に目的的分画 1 つを得た。この大豆由来の分画は予想通り U2OS 細胞の増殖を抑制することが分かった (図 2)。



**図 2) 分画#36 による核小体ストレスの惹起と細胞増殖抑制効果。** GFP 融合タンパク質を発現する安定株に連続して分取した分画を培地中に添加し 1 時間後に蛍光顕微鏡にて観察した (上段)。分画#35, 36 及び 37 を U2OS 細胞に添加し 4 日後の生存細胞をクリスタルバイオレット染色にて観察した (下段)。EtOH; 溶媒であるエタノールを添加した際のコントロールを示した。

またこの分画#36はU2OS細胞だけではなく、乳がん細胞やユーイング肉腫といった細胞株に対しても核小体ストレスを惹起し細胞死を誘導することが分かった。現在この分画に含まれる小化合物の詳細について質量分析装置を用いて解析中である。今回の研究期間内には、目的の発芽大豆由来の小化合物を同定することはできなかった。しかしながら今回の実験で用いた GFP 融合タンパクを用いたライブイメージによる核小体ストレスを誘導する化合物スクリーニングの有効性が確認できたこと、及びこの発芽大豆由来の抽出物にはがん細胞の細胞死を誘導する化合物が含まれていることが分かり、将来的にこの研究課題を進展させることが可能であることが分かった。またこの最終分画に含まれる小化合物は p53 野生型のがん細胞において p53 をノックダウンした細胞株においても、コントロール細胞と同程度に細胞死を誘導した(図3)。



**図3) 分画#36によるp53非依存的な細胞死の誘導。**野生型p53を発現するU2OS細胞にp53特異的およびコントロールsiRNAをそれぞれトランスフェクションした。分画#36をこれらの細胞に添加し4日後の生存細胞をクリスタルバイオレット染色にて観察した。

このことは先行研究の結果から予想していたように、目的の小化合物が核小体ストレスを惹起しその結果p53の蓄積が生じるため細胞死を引き起こすのではなく、p53非依存的に核小体ストレスによる細胞死を誘導する経路の存在を示唆している。これらの実験結果から今後核小体ストレスが関与する新たな細胞死誘導のメカニズムを解明するきっかけとなることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------