

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06888

研究課題名（和文）「がん遺伝子DUSP4」の新規基質同定と治療応用

研究課題名（英文）Identification and therapeutic application of novel substrates of "oncogene DUSP4"

研究代表者

守山 正胤 (Moriyama, Masatsugu)

大分大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90239707

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）：がん抑制遺伝子DUSP4はMAPキナーゼ脱リン酸化酵素である。種々の癌腫でDUSP4の発現低下とそれに伴うMAPキナーゼの恒常的活性化が認められる。一方、DUSP4が高発現する癌腫も存在する。本研究では、DUSP4のがん遺伝子としての機能的意義を解明するため、近位依存性ビオチン標識 (BioID)法を用いて新規基質の同定を試みた。まず、DUSP4高発現大腸癌細胞株HCT116を用いて、DUSP4-BirA融合タンパク安定発現細胞株を樹立した。この細胞株にビオチンを添加・抽出した細胞抽出液から複数のビオチン化タンパクが検出された。現在、アミノ酸分析にてビオチン化タンパクの同定を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来、がん抑制遺伝子と考えられてきたDUSP4が、特定の癌腫や症例においてはがん遺伝子として機能することが報告されている。本研究によって、DUSP4ががん遺伝子として機能する際に認識する新規基質候補が抽出されている。今後、DUSP4との相互作用により細胞が獲得する悪性形質およびその際に活性化されるシグナルパスウェイの解明を目指す。これによって、DUSP4や新規基質分子、あるいはシグナル関連分子を標的とした早期診断法や新規治療法の開発に役立つ。その結果として、DUSP4ががん遺伝子として機能している癌腫の治療成績の改善が期待される。

研究成果の概要（英文）：The tumor suppressor gene DUSP4 is a MAP kinase diphosphatase. Decreased expression of DUSP4 and constitutive activation of MAP kinase are observed in various cancers. On the other hand, certain cancers highly expressing DUSP4 have been reported. In this study, in order to elucidate the functional significance of DUSP4 as an oncogene, we attempted to identify a novel substrate using the BioID (proximity-dependent biotin identification) method. First, a cell line stably expressing the DUSP4-BirA fusion protein was established using the colorectal cancer cell line HCT116, which highly expresses DUSP4. Multiple biotinylated proteins were detected in the cell extract obtained by adding biotin to this cell line. Currently, we are trying to identify biotinylated proteins using amino acid analysis.

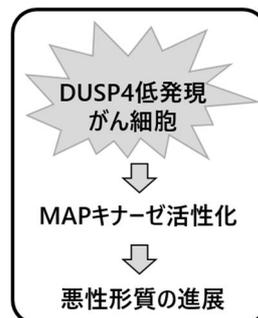
研究分野：人体病理学

キーワード：DUSP4 がん遺伝子 近位依存性ビオチン標識法 基質分子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DUSP4 は、がん遺伝子である MAP キナーゼを不活化する脱リン酸化酵素として機能する。さまざまな癌腫で DUSP4 の発現低下とそれに伴う MAP キナーゼの恒常的活性化が認められる。私たちは、膀胱前駆病変が浸潤性膀胱癌に進展する際に DUSP4 の欠失と発現低下が高頻度に認められることを報告した (*Cancer Res.* 2016)。さらに大腸癌が深部浸潤する過程で、DUSP4 が発現低下して MAP キナーゼが活性化することを報告した (*Cancer Sci.* 2018) (右上図)。



一方、癌腫によっては DUSP4 が高発現しているものもあり、癌細胞の増殖能亢進や抗がん剤抵抗性、上皮間葉転換などに関わることが報告されている。私たちも大腸癌の特定の亜型では、DUSP4 が高発現していること (*Cancer Sci.* 2018)、DUSP4 の発現抑制により増殖能が低下すること (*Biochem Biophys Res Commun.* 2020) を報告した (右下図)。



これらの知見は、従来、**がん抑制遺伝子と考えられてきた DUSP4 が、特定の癌腫や症例においてはがん遺伝子として機能すること**を示唆している。したがって、その分子メカニズムが詳細に解明されれば、DUSP4 あるいはその関連分子を標的とした早期診断法や新規治療法の開発に役立つ。その結果として、対象癌の治療成績の改善が期待される。

2. 研究の目的

「DUSP4 はどのようにしてがん遺伝子として機能するのか?」「その知見をどのように臨床応用できるか?」という問いの解明を目指す。私たちは、DUSP4 の基質として MAP キナーゼ以外のがん関連分子が存在すると考えている。そしてその分子が DUSP4 によって脱リン酸化されることで、悪性形質を促進するシグナルパスウェイが活性化すると推測する。この仮説を検証するために、DUSP4 の新規基質と活性化パスウェイの同定を試みた。

3. 研究の方法

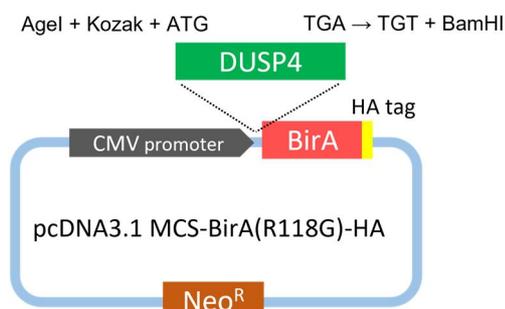
DUSP4 の新規基質の同定

- (1) DUSP4 の基質を同定するために近位依存性ピオチン標識 (BioID)法を採用する。その理由は、一時的かつ弱く結合する基質の網羅的検出に優れているためである。まず、DUSP4 とピオチンリガーゼ (BirA) の融合タンパクを発現するプラスミドを構築する。それを DUSP4 高発現大腸癌細胞株 HCT116 に導入して、DUSP4-BirA 融合タンパク安定発現細胞株を樹立する。すでに数クローンを得ている。
- (2) DUSP4-BirA 安定発現細胞株にピオチンを添加する。20 時間後の細胞抽出液を電気泳動して、HRP 標識ストレプトアビジンでピオチン化タンパクを確認する。
- (3) 細胞抽出液からピオチン化タンパクをストレプトアビジンビーズで抽出する。得られた抽出液を二次元電気泳動する。ゲルから単一スポットを回収してアミノ酸分析にてタンパクを同定する。これらの中から DUSP4 の新たな基質を検索する。

4. 研究成果

(1) DUSP4-BirA 融合タンパク発現プラスミドの構築

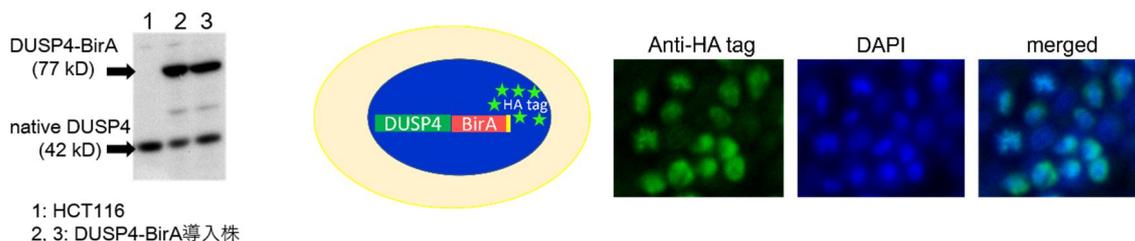
ヒト DUSP4 cDNA の開始コドンから終始コドンまでのコーディング領域を PCR で増幅して BirA 配列を搭載した発現ベクターに挿入した (右図)。このプラスミドから、CMV プロモーターの制御下



で、DUSP4 と BirA および HA タグを含む融合タンパクが発現される。このプラスミドを DUSP4 を高発現する大腸癌細胞株 HCT116 に NEPA21 (ネッパジーン) を用いて導入し、ネオマイシン (G418, 1 mg/mL) で 10 日間選択後、限界希釈法にて安定細胞株を得た。

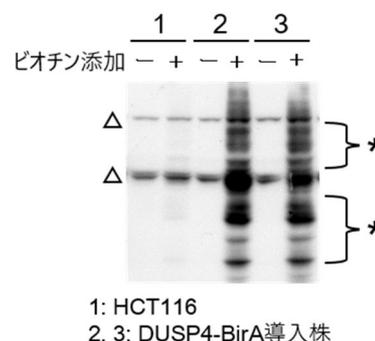
(2) DUSP4-BirA 融合タンパクの発現動態の確認

目的の DUSP4-BirA 融合タンパクが発現されているかを Western blot 法で確認した。親株である HCT116 (下左図#1) では 42 kD の内因性 DUSP4 タンパクの発現が観察された。一方、DUSP4-BirA 融合タンパク発現安定細胞株 (下左図#2,3) では、42 kD の内因性 DUSP4 タンパクに加えて、77 kD の融合タンパクの発現を認めた。さらに、細胞免疫組織化学にて、融合タンパクは、内因性 DUSP4 と同様に核内に局在していることが確認された。



(3) BirA によるビオチン付加機能の確認

融合タンパクの BirA がビオチン付加機能を有しているかを確認した。右下図のように黒く発色したバンドが複数検出される。このうち、HCT116 およびビオチン添加していない安定発現細胞株でも認められる上下 2 本のバンド () は、内因性のビオチンとビオチンリガーゼによってビオチン化されたタンパクである。それ以外のバンド (*印) が導入した DUSP4-BirA 融合タンパクによってビオチン化されたタンパクに相当し、これらの中に DUSP4 の新規基質が存在すると予想される。



現在、新規基質の同定を進めている。具体的には、細胞抽出液からビオチン化タンパクをストレプトアビジンビーズで抽出し、得られた抽出液を二次元電気泳動する。ゲルから単一スポットを回収してアミノ酸分析にてタンパクを同定する。これらの中から DUSP4 の新たな基質を検索する。

【今後の展開】

DUSP4 新規基質の機能解析と臨床応用

(1) DUSP4 新規基質の機能解析

HCT116 を含む DUSP4 高発現細胞株における新規基質の発現レベルを定量的 Real-time PCR 法および Western blot 法にて解析する。

siRNA を用いたノックダウン法あるいはレンチウイルスベクターを用いた強制発現法により、新規基質の発現レベルを変動させ、増殖能 (MTS 法) や浸潤能 (Boyden chamber 法)、生存能 (アポトーシス解析)、細胞周期 (FACS 解析) への影響を調べる。

(2) 新規基質が担うシグナルパスウェイの同定と治療応用

新規基質の発現変動に伴って発現レベルが変化する遺伝子群を抽出するために、網羅的発現解析 (Agilent) を行う。得られた発現プロファイルをパスウェイ解析データベース (Ingenuity Pathway Analysis, Ingenuity Systems) に連携して、シグナルパスウェイの概要を得る。さらに、細胞タンパク液を抽出し、リン酸化タンパクアレイを用いて活性化するパスウェイを確認する。

活性化シグナルパスウェイを構成する分子の中から、特異的阻害剤が存在し標的分子となりうる分子を抽出する。免疫不全マウス癌移植モデルを用いて、腫瘍形成後に阻害剤を投与 (経口、腹腔) して、腫瘍の縮小効果や遠隔臓器 (肝、肺、脳など) への転移抑制効果、生存期間の延長効果などを調べる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kinoshita K, Tsukamoto Y, Hirashita Y, Fuchino T, Kurogi S, Uchida T, Nakada C, Matsumoto T, Okamoto K, Motomura M, Fukuchi S, Sagami R, Nagai T, Gotoh Y, Fukuda K, Ogawa R, Mizukami K, Okimoto T, Kodama M, Murakami K, Moriyama M, Hijiya N.	4. 巻 103
2. 論文標題 Efficient Establishment of Bile-Derived Organoids From Patients With Biliary Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lab Invest	6. 最初と最後の頁 100105
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.labinv.2023.100105	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 Tsukamoto Y, Kurogi S, Shibata T, Suzuki K, Hirashita Y, Fumoto S, Yano S, Yanagihara K, Nakada C, Mieno F, Kinoshita K, Fuchino T, Mizukami K, Ueda Y, Etoh T, Uchida T, Hanada T, Takekawa M, Daa T, Shirao K, Hironaka S, Murakami K, Inomata M, Hijiya N, Moriyama M.	4. 巻 102
2. 論文標題 Enhanced phosphorylation of c-Jun by cisplatin treatment as a potential predictive biomarker for cisplatin response in combination with patient-derived tumor organoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lab Invest	6. 最初と最後の頁 1355-1366
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41374-022-00827-2	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 Amada K, Hijiya N, Ikarimoto S, Yanagihara K, Hanada T, Hidano S, Kurogi S, Tsukamoto Y, Nakada C, Kinoshita K, Hirashita Y, Uchida T, Shin T, Yada K, Hirashita T, Kobayashi T, Murakami K, Inomata M, Shirao K, Aoki M, Takekawa M, Moriyama M.	4. 巻 -
2. 論文標題 Involvement of clusterin expression in the refractory response of pancreatic cancer cells to a MEK inhibitor	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15735	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 Kurogi S, Hijiya N, Hidano S, Sato S, Uchida T, Tsukamoto Y, Nakada C, Yada K, Hirashita T, Inomata M, Murakami K, Takahashi N, Kobayashi T, Moriyama M.	4. 巻 88
2. 論文標題 Downregulation of ZNF395 Drives Progression of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma through Enhancement of Growth Potential.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathobiology	6. 最初と最後の頁 374-382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000514593	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 Hirashita Y, Tsukamoto Y, Kudo Y, Kakisako D, Kurogi S, Hijiya N, Nakada C, Uchida T, Hirashita T, Hiratsuka T, Akagi T, Ueda Y, Shiroshita H, Etoh T, Mizukami K, Honda K, Okimoto T, Kodama M, Inomata M, Moriyama M, Murakami K.	4. 巻 101
2. 論文標題 Early response in phosphorylation of ribosomal protein S6 is associated with sensitivity to trametinib in colorectal cancer cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lab Invest	6. 最初と最後の頁 1036-1047
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41374-021-00590-w	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3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 黒木 秀作, 泥谷 直樹, 塚本 善之, 中田 知里, 猪股 雅史, 小林 隆志, 守山 正胤
2. 発表標題 膀胱癌においてANXA8はMAPK阻害薬耐性に関与する
3. 学会等名 第82回日本癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 泥谷 直樹, 塚本 善之, 黒木 秀作, 中田 知里, 守山 正胤
2. 発表標題 Clusterinは膀胱癌細胞のMAPキナーゼ不応性に関与する
3. 学会等名 第82回日本癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒木 秀作, 泥谷 直樹, 塚本 善之, 中田 知里, 猪股 雅史, 小林 隆志, 守山 正胤
2. 発表標題 ZNF395の発現低下はJNKの不活性化を介して膀胱癌細胞の増殖を促進する
3. 学会等名 第80回日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

〔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	泥谷 直樹 (Hijiya Naoki) (80305036)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	

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