

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430120

研究課題名(和文) 小胞体ストレス応答を制御するミトコンドリア機能調節分子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of mitochondrial regulators modulating the unfolded protein response

研究代表者

國政 和宏 (KUNIMASA, KAZUHIRO)

公益財団法人がん研究会・その他部局等・研究員

研究者番号：50534020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：がん微小環境選択的な治療法の開発を目指し、グルコース飢餓等のがん微小環境ストレスが誘導する小胞体ストレス応答に焦点を当て、新規小胞体ストレス応答制御因子の探索を進めた。siRNAスクリーニング及び機能評価研究を通じて、複数の小胞体ストレス応答制御分子候補の同定に成功した。さらに、新規UPR阻害化合物を見出し、遺伝子発現変動解析や薬剤感受性データ解析により、作用機序の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We focused on the unfolded protein response (UPR) that are induced by tumor microenvironmental stresses such as glucose starvation, and screened the novel UPR regulators to develop effective cancer chemotherapy under tumor microenvironment. Using a siRNA focused library and functional analyses, several candidates for the UPR modulator were identified. Furthermore, we found a novel UPR inhibitor and characterized its potential mode of action via gene expression signature- and chemosensitivity-based approaches.

研究分野：腫瘍生物学、腫瘍治療学

キーワード：がん微小環境 小胞体ストレス応答 グルコース飢餓 ミトコンドリア オートファジー

1. 研究開始当初の背景

腫瘍組織では、大量のグルコース消費や未成熟な血管網により、グルコース飢餓や低酸素等の特殊ながん微小環境が形成されている。こうした微小環境ストレスは、がん細胞の小胞体に正しく折りたたまれていない異常タンパク質 (unfolded proteins) の蓄積を引き起こし、がん細胞の生存や増殖の足枷となっている。そこで、がん細胞はこのような状況を打開するために、小胞体ストレス応答 (unfolded protein response; UPR) を誘導する。UPR では、3 系統の小胞体局在ストレスセンサー (PERK、ATF6、及び IRE1alpha) が、それぞれ異常たんぱく質の蓄積を感知・活性化し、タンパク質翻訳の抑制や小胞体のフォールディング機能の増強を介して、異常タンパク質を低減させている。

こうした知見から、UPR 阻害剤はがん微小環境ストレス下で、がん細胞を選択的に死滅させることができると期待されている。しかしながら、これまで同定された UPR 阻害剤の多くはミトコンドリアの呼吸鎖を標的にしており、その副作用である乳酸アシドーシスのため、臨床応用には至っていない。さらに、上述した 3 つの小胞体ストレスセンサーも、お互いの補完関係からがんの分子標的としては適していない。従って、UPR を標的としたがん微小環境選択的な治療法の確立には、ミトコンドリア呼吸鎖や小胞体ストレスセンサー以外で、UPR の“ハブ”となる制御因子の同定が必要であると考えられた。

最近、連携研究者の富田は、ミトコンドリア機能障害を持つ 0 がん細胞 (ミトコンドリア DNA 欠損) が、グルコース飢餓時に UPR を誘導できず、細胞死に至ることを見出している (Haga N et al, Cancer Sci, 2010)。こうした知見から、申請者は、「がん微小環境ストレスが誘導する UPR には、ミトコンドリアの機能やミトコンドリア-小胞体クロストークが重要であり、その制御因子は新たながん治療の分子標的になり得る」と考えた。

また近年、がん微小環境ストレス下での生存や細胞増殖に、オートファジーやがん代謝が関与することが報告されている。例えば、栄養飢餓環境下では、不良タンパク質やダメージを受けた細胞小器官がオートファジーと呼ばれる細胞内分解機構を介して、新たな栄養源として利用されている。また、がん細胞は周囲の利用可能な栄養源に応じて、代謝経路を変化させ、がん微小環境への適応を図っていることも明らかにされている。しかしながら、UPR 制御におけるオートファジーやがん代謝制御因子の役割は未だ不明な点が多いままであった。

2. 研究の目的

本研究では、siRNA フォーカスライブラリーを用いて、ミトコンドリア機能、オート

ファジー、及びがん代謝制御分子を中心に、新たな UPR 制御因子を探索・同定し、その UPR 制御機構を明らかにすることを目的の一つとした。さらに、同定した制御因子の機能を阻害または活性化する低分子化合物が入手可能な場合は、その活性評価を行うことで、がん微小環境選択的な治療薬開発に向けた基礎データの取得を進めた。

3. 研究の方法

本研究では、(1) siRNA のフォーカスライブラリーを用いた新規 UPR 制御因子の探索、(2) ヒット siRNA の標的分子を制御する低分子化合物の評価、(3) ヒット siRNA 及び化合物の作用機序解析、という一連の流れで、新規 UPR 制御因子及び化合物の同定を進めた。以下に、研究項目ごとに分け、研究の方法を簡潔に述べる。

(1) siRNA のフォーカスライブラリーを用いた新規 UPR 制御因子の探索

ミトコンドリア機能、オートファジー、及びがん代謝制御因子を中心に、約 100 種類の siRNA (ON-TARGETplus SMARTpool siRNA: Dharmacon) からなるフォーカスライブラリーを作製した。小胞体ストレスとしては、グルコース飢餓、2 デオキシグルコース (2-deoxy-D-glucose, グルコース飢餓ミミック)、ツニカマイシン (tunicamycin, 糖鎖修飾阻害剤)、タプシガルギン (thapsigargin, 小胞体カルシウムポンプ阻害剤) 及びボルテゾミブ (bortezomib, プロテアソーム阻害剤) 等を使用した。また、細胞増殖に対する各 siRNA 及び低分子化合物の効果は、ATP レベル (CellTiter-Glo luminescent cell viability assay) を指標に評価した。

新規 UPR 制御因子の 1 次スクリーニングでは、各 siRNA をトランスフェクションしたヒト線維肉腫細胞株 HT1080 を通常栄養条件またはグルコース飢餓条件下で培養し、グルコース飢餓選択的に細胞毒性を示した siRNA をヒット siRNA とした。次に、2 次スクリーニングとして、ヒット siRNA のグルコース飢餓以外の小胞体ストレスに対する影響 (小胞体ストレス選択性) や JFCR39 がん細胞パネルを中心に細胞選択性を評価した。なお、JFCR39 がん細胞パネルに関しては、がん研究会 がん化学療法センター 分子薬理部より提供を受けた。

(2) ヒット siRNA の標的分子を制御する低分子化合物の評価

ヒット siRNA の標的分子を阻害又は活性化する低分子化合物が入手可能な場合は、(1) の 1 次及び 2 次スクリーニングと同様に、小胞体ストレス及びがん細胞株選択性を検証した。その際、ヒット siRNA と作用スペクト

ルが一致するか否かを中心に解析を進めた。

(3) ヒット siRNA 及び化合物の作用機序解析

ヒット siRNA 及び低分子化合物の UPR 制御に対する効果を、タンパク質及び遺伝子発現変動解析を中心に検証した。具体的には、小胞体ストレス下で誘導される分子シャペロン [glucose-regulated protein 78 (GRP78)] や転写因子 [activating transcription factor-4 (ATF4)、X-box binding protein 1s (XBP-1s)] 等に対する効果を、ウェスタンブロット法等で解析した。また、グルコース飢餓に特徴的な遺伝子発現変動パターン (246 個のプロープセットからなるシグネチャー、Saito S et al, Cancer Res, 2009) に対する効果を、マイクロアレイ等を用いて解析した。さらに、ミトコンドリア機能に対する効果を、細胞外フラックスアナライザーや単離ミトコンドリア等を用いて検証した。

4. 研究成果

成果について、研究項目ごとに分け、以下に簡潔に述べる。

(1) siRNA のフォーカスライブラリーを用いた新規 UPR 制御因子の探索

siRNA スクリーニングにより、通常培養条件下と比較して、グルコース飢餓条件下で顕著な殺細胞効果を発揮する 3 つのヒット siRNA を得た。

1 つ目は、ミトコンドリアに局在する膜型ユビキチンリガーゼ MARCH5 に対する siRNA である。当研究部では、これまでに同定してきたミトコンドリア機能を標的とする UPR 阻害剤の多くは、グルコース飢餓や 2-デオキシグルコース条件下で顕著な細胞毒性を示す一方で、ツニカマイシン等の他の小胞体ストレス下では殆ど細胞毒性を示さないことを明らかにしていた。それに対して、MARCH5 siRNA は、HT1080 細胞においてグルコース飢餓や 2-デオキシグルコース飢餓条件下のみならず、ツニカマイシン等の他の小胞体ストレス条件下でも殺細胞効果を示し、特にツニカマイシン条件下で顕著な殺細胞効果が認められた。これらの知見は、この siRNA がこれまでのミトコンドリア機能阻害を介した UPR 阻害機構とは違う作用機序を有していることを示唆している。そこで、異なる標的配列を持つ複数の MARCH5 siRNA を用いて、小胞体ストレス下での殺細胞効果や詳細な遺伝子発現変動解析を行った結果、その効果を発揮する標的分子が MARCH5 ではなく、がん遺伝子 “X” であることを新たに見出した。現在、がん遺伝子 “X” による UPR 制御機構やがん化との関連性について詳細に解析中である。

2 つ目は、がん代謝関連酵素の一つであり、ペントースリン酸経路の律速酵素

glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) に対する siRNA である。G6PD siRNA は HT1080 に加え、LOX-1MV1、HBC-4 細胞等でグルコース飢餓選択的に殺細胞効果を発揮したが、一方でツニカマイシンやボルテゾミブ等の小胞体ストレスに対する感受性にはほとんど変化が認められなかった。

3 つ目は、オートファジー制御因子 beclin1 や Vps34 を脱ユビキチン化する酵素 USP10 に対する siRNA である。USP10 siRNA は HT1080 や HBC4 細胞において、グルコース飢餓選択的に殺細胞効果を発揮したが、ツニカマイシンやボルテゾミブに対しては、ほとんど影響を与えなかった。

(2) ヒット siRNA の標的分子を制御する低分子化合物の評価

上述の(1)で選出したヒット siRNA の標的分子のうち、G6PD と USP10 に対する阻害剤の小胞体ストレス下での殺細胞効果を検証した。

G6PD 阻害剤として報告されている CB70、CB72 及び CB83 (Preuss J et al, J Biomol Screen, 2013) を入手し、通常栄養またはグルコース飢餓条件下で HBC-4 と HT-29 細胞に対する効果を検証した。G6PD siRNA は HBC-4 細胞ではグルコース飢餓選択的な殺細胞効果を示す一方で、HT-29 細胞ではグルコース飢餓選択的な作用は認められなかった。それに対して、評価した全ての G6PD 阻害剤では、HBC-4 及び HT-29 細胞において、グルコース飢餓選択的な殺細胞効果は認められなかった。今後、より強力かつ選択性の高い G6PD 阻害剤で、UPR 制御機構に対する G6PD の役割等を検証する必要がある。

USP10 及び USP10 と同様にオートファジー制御因子を脱ユビキチン化する USP13 を阻害する spautin-1 (Liu et al, Cell, 2011) を入手し、通常栄養またはグルコース飢餓条件下で HT1080 に加え、JFCR39 の中で in vivo 造腫瘍性の高い U251、PC-3、HBC-4、HT-29 細胞等に対する効果を検証した。その結果、spautin-1 は評価に使用したほぼすべての細胞で、グルコース飢餓選択的な殺細胞効果を発揮することを見出した。一方で、USP10 siRNA は特定の細胞株でのみグルコース飢餓選択的な殺細胞効果を発揮し、USP13 siRNA はグルコース飢餓に対する感受性の変化は認められなかった。従って、spautin-1 と USP10 siRNA では、異なる細胞選択性を持つことが示唆された。

(3) ヒット siRNA 及び化合物の作用機序解析

USP10/USP13 阻害剤である spautin-1 の UPR に対する作用を検証するために、小胞体ストレス時に発現誘導される GRP94、GRP78

等をウェスタンブロット法で確認したところ、spautin-1はグルコース飢餓や2-デオキシグルコース誘導性のGRP94、GRP78等の発現誘導を抑制していた。さらに、小胞体ストレス時に特徴的に発現変動する246個のプロテオームセット(UP246シグネチャー)に対するspautin-1の影響をDNAマイクロアレイ解析で検証した結果、spautin-1は既知のUPR阻害剤であるブホルミン(buformin)やversipelostatinと同様に、タンパク質フォールディングやUPRに関係するタンパク質の発現をmRNAレベルで抑制することを確認した。以上の結果は、spautin-1がUPRを抑制していることを示している。

一方で、spautin-1とその標的分子USP10に対するsiRNAは、グルコース飢餓下での殺細胞効果に対して、異なる細胞選択性を示したことから、spautin-1はUSP10以外の標的を介して、UPR抑制効果を発揮している可能性も考えられた。これまで、がん研究会では、作用機序または作用標的が同じ場合は、類似した遺伝子発現変動パターン(Ushijima M et al, Cancer Sci, 2012, Mashima T et al, Cancer Sci, 2016)及びJFCR39がん細胞パネルに対する薬剤感受性データ(Yamori T, Cancer Chemother Pharmacol, 2003)を示すことを明らかにしてきた。そこで、本研究ではspautin-1が誘導する遺伝子発現変動パターンと薬剤感受性データを、それぞれレファレンス化合物と比較解析を行った結果、spautin-1はブホルミン等のピグアナイド系化合物の作用機序に類似していることが予想された。さらに、ピグアナイド系化合物の作用標的の一つがミトコンドリア呼吸鎖であること、及びミトコンドリア機能はUPR誘導に必須であることから、spautin-1はミトコンドリア呼吸鎖阻害を介して、UPR阻害活性を発揮している可能性が考えられた。そこで、ミトコンドリア呼吸に対するspautin-1の作用を細胞外フラックスアナライザー及び単離ミトコンドリアを用いて検証した結果、spautin-1がミトコンドリア電子伝達系酵素複合体Iを阻害することを見出した。一方で、USP10やUSP13ノックダウン細胞では、ミトコンドリア機能に顕著な変化が認められなかったことから、spautin-1のUPR阻害作用は、USP10の機能阻害に加えて、ミトコンドリア呼吸鎖阻害を介して発揮されていることが示唆された。

以上の成果をまとめると、本研究では新規UPR制御候補分子として、がん遺伝子“X”、グルコース-6-リン酸水素酵素G6PD、及び脱ユビキチン化酵素USP10を同定し、さらにUSP10/USP13阻害剤であるspautin-1がミトコンドリア機能阻害を介して、UPR阻害活性を発揮していることを見出した。今後、各標的のUPRにおける役割等を明らかにしていくことで、UPRを標的としたがん微小環境選択的な治療法の確立へと展開していきたい。

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3件)

Narayanan NK, Kunimasa K, Yamori Y, Mori M, Mori H, Nakamura K, Miller G, Manne U, Tiwari AK, Narayanan B. Antitumor activity of melinjo (Gnetum gnemon L.) seed extract in human and murine tumor models in vitro and in a colon-26 tumor-bearing mouse model in vivo. *Cancer Med.* 4(11): 1767-80, 2015. doi:10.1002/cam4.520. 査読有

Mashima T, Ushijima M, Matsuura M, Tsukahara S, Kunimasa K, Furuno A, Saito S, Kitamura M, Soma-Nagae T, Seimiya H, Dan S, Yamori T, Tomida A. Comprehensive transcriptomic analysis of molecularly targeted drugs in cancer for target pathway evaluation. *Cancer Sci.* 106(7): 909-20, 2015. doi: 10.1111/cas.12682. 査読有

Eguchi R, Kubo S, Ohta T, Kunimasa K, Okada M, Tamaki H, Kaji K, Wakabayashi I, Fujimori Y, Ogawa H. FK506 induces endothelial dysfunction through attenuation of Akt and ERK1/2 independently of calcineurin inhibition and the caspase pathway. *Cell Signal.* 25(9): 1731-8, 2013. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.05.008. 査読有

[学会発表](計13件)

Kunimasa K, Koido M, Ikeda C, Tsukahara S, Sakurai J, Dan S, Yamori T, Tomida A. Selective cancer cell killing by spautin-1, a USP10/USP13 inhibitor, under glucose starvation. Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer research, February 16-20, 2016 (Hawaii, USA)

国政和宏、旦慎吾、矢守隆夫、冨田章弘、USP10/13阻害剤spautin-1のグルコース飢餓選択的な殺細胞効果、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8-10日(名古屋)

国政和宏、冨田章弘、オートファジー阻害剤spautin-1のグルコース飢餓選択的な殺細胞効果、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25-27日(横浜)

国政和宏、冨田章弘、オートファジー阻害剤spautin-1はグルコース飢餓誘導性の小胞体ストレス応答を抑制する、第84回日本がん分子標的治療学会、2014年6月25-27日(仙台)

[その他]

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/departments/genome/index.html>

6. 研究組織

(1) 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・特任研究員
研究者番号：50534020

(2) 研究分担者：該当なし

(3) 連携研究者

富田 章弘 (TOMIDA AKIHIRO)
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
研究者番号：40251483