

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 28 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460711

研究課題名(和文) 白血病新規マーカーとしての血清ユビキチン測定の有用性の検討

研究課題名(英文) Evaluation of serum ubiquitin enzyme as a new biomarker for PML-RARA leukemia

研究代表者

炬口 真理子 (Takenokuchi, Mariko)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号：10379430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体内での蛋白質品質管理機構の1つにユビキチン-プロテアソーム系がある。プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)は、急性前骨髄性白血病細胞株に対して殺細胞効果を示すが、その機序として、BTZは異常蛋白PML/RARAを過剰に蓄積させ、その結果ERストレスが高まり、UPR(小胞体ストレス応答)を破綻させ、細胞死を誘導することを見いだした。更に、PML/RARAのユビキチン化酵素(E2)がUbcH8であることを同定し、血清中UbcH8の増加が、BTZによる細胞死と比例することを確認した。今回、血清中のE2濃度測定がプロテアソーム阻害剤の病勢を反映するバイオマーカーとして有用であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The ubiquitin-proteasome system (UPS) controls normal protein homeostasis in cells. Bortezomib, a proteasome inhibitor, time- and dose-dependently decreased cell viability and induced apoptosis in NB4, an acute promyelocytic leukemia (APL) cell line. We confirmed that UbcH8 is the E2-conjugating enzyme for a fusion protein PML-RARA. Moreover, UbcH8 abundance was dose-dependently increased in the culture supernatant of bortezomib-treated cells. Meanwhile, ER stress was increased by Bortezomib. We concluded that Bortezomib impairs the UPS that controls normal protein homeostasis by causing excessive accumulation of PML-RARA fusion protein, augmenting ER stress and leading to APL cell death. Furthermore, monitoring of UPS-related enzymes can be used to predict the treatment response to proteasome inhibitors and assess their therapeutic effects.

研究分野：検査血液学

キーワード：ユビキチン-プロテアソーム系 PML/RARA プロテアソーム阻害剤 ERストレス

1. 研究開始当初の背景

生体内での蛋白質品質管理機構の一つにユビキチン-プロテアソーム系(UPS)がある。ユビキチン化には、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)およびユビキチンリガーゼ(E3)の3つの酵素が必要であり、これらは蛋白質固有である。

多発性骨髄腫の治療にプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブ(BTZ)が汎用されているが、その作用機序は明らかではなく、疾患特異的バイオマーカーもない。そこで我々は、「BTZによりプロテアソームで処理されずに蓄積した異常蛋白がER(小胞体)ストレスを高め、Unfolded protein response (UPR)を破綻させ細胞死を誘導する」との仮説を立てた。更に、細胞死の結果として細胞外に逸脱した物質が、BTZ投与時のバイオマーカーとなり得るのではないかと考えた。

急性前骨髄性白血病(*acute promyelocytic leukemia*; APL)の病因遺伝子PML/RARA(*promyelocytic leukemia/retinoic acid receptor alpha*)の産物であるPML/RARAキメラ蛋白は、異常蛋白として一部がUPSで処理され、E3がSIAH-1(*E3 ligase seven in absentia homolog 1*)であることがわかっている¹⁾。我々はこれまで、SIAH-1と相互作用するE2を3種類報告しており^{2,3)}、PML/RARAのE2を同定することは可能である。そこでAPLにおいて、BTZによる細胞死誘導の結果として、PML/RARA特異的E2/E3またはPML/RARAが細胞外に逸脱するならば、BTZの効果を反映するバイオマーカーとして血清中での測定が可能であると考えた。

更に我々は、E3を人工的に作製し、E2の活性を微量サンプルから生理活性反応測定装置(AMIS-101: バイオエクス社)を用いて高感度に定量する方法(「ユビキチン化検出法」)を確立しており、PML/RARAのE3を人工的に作製することにより、血清中でのユビキチンの変化を定量的に測定することが可能である。従って、プロテアソーム阻害剤投与時のバイオマーカーとしてユビキチンが有用であると証明できれば、定量的測定法により臨床検査に応用できると考えた。

2. 研究の目的

LDHが多くの癌細胞において逸脱酵素として血清中に存在するのと同様に、APLではPML/RARA蛋白特異的ユビキチン化酵素E2またはE3がBTZの作用により、逸脱酵素として血清中に放出されることを検証し、血清中のユビキチン化酵素が、APLの病態を反映する疾患特異的バイオマーカーとして有用であるかどうかを検討する。併せて血清中のE2を「ユビキチン化検出法」を用いて定量することにより、E2測定の臨床検査への応用を目指す。

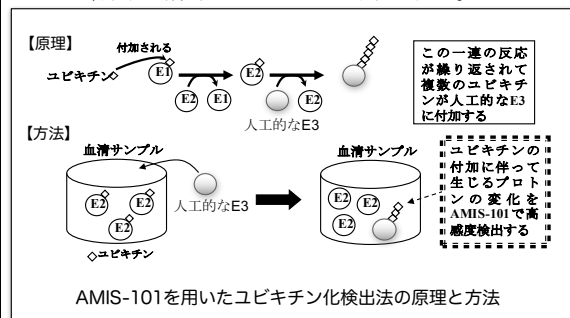
3. 研究の方法

(1) E2がバイオマーカーとして有用であるかどうかの実験
APL細胞株NB4にボルテゾミブ(Velcade™, PS-341, BTZ)を0,10,100nMの濃度で添加し、

- ① BTZがAPLに対して抗腫瘍効果を示すか検討
24,48,72時間後の細胞増殖をXTTテスト、アポトーシスをDNA ladder、Annexin Vで測定する。
- ② BTZによる細胞/培養上清中のPML/RARAの発現量の変化を検討
BTZ添加後48時間の細胞および培養上清中のPML/RARA、ユビキチン化PML/RARA(Ub-PML/RARA)を免疫沈降(IP)法、ウエスタンブロット(WB)法で検出する。
- ③ E3の同定
3種のE2候補UbcH5(*ubiquitin-conjugating human enzyme 5*), UbcH6, UbcH8からPML/RARAのE2をIP、WB法を用いて検索する。
- ④ BTZによる細胞/培養上清中のE2の発現量の変化を検討
②と同様の方法でE2を検出する。
- ⑤ ERストレスの変化を検討
ERストレスマーカーXBP-1、BiP/GRP78の抗体を用いて調べる。

(2) 「ユビキチン化検出法」を用いた実験

- ① PML/RARAのE3を人工的に合成して、AMIS-101装置の至適化を行なう(原理: 下図参照)。
- ② AMIS-101装置を用いてBTZ投与前後のNB4培養上清中のE2活性を測定する。



4. 研究成果

(1) NB4細胞にBTZを0,10,100nMの濃度で添加したところ、BTZの濃度・投与時間依存的に細胞増殖が抑制(図1-a,b)、アポトーシスが誘導(図1-c,d)された。NB4に対してBTZは、アポトーシスを通して抗腫瘍効果を示すことが確認できた。

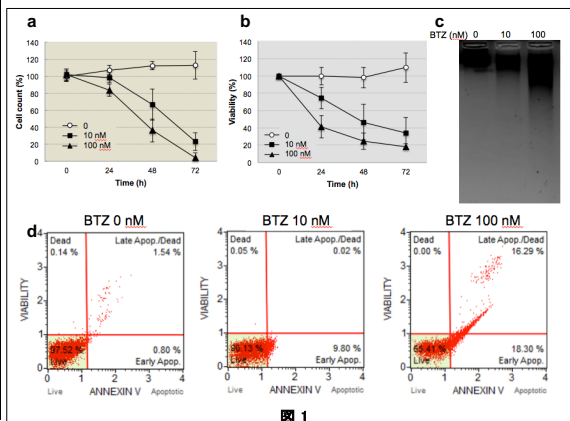
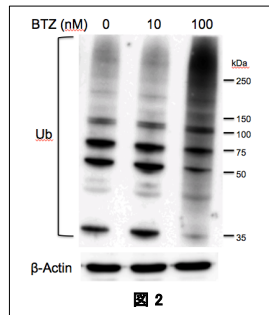
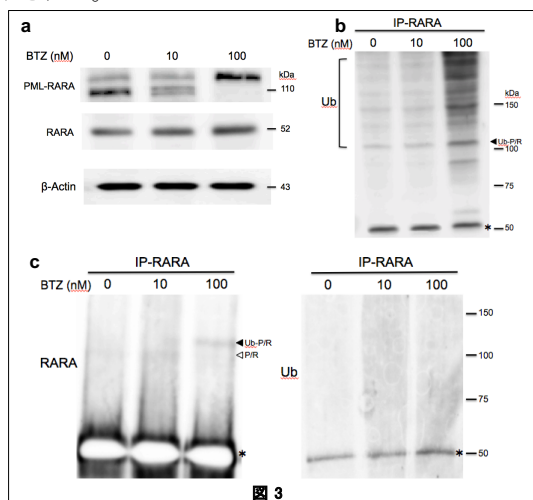


図1

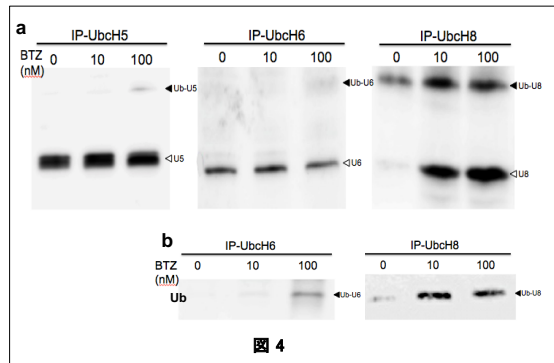
(2) (1)と同じ条件下、ユビキチン抗体を用いて WB 法を行ったところ、BTZ の濃度依存的に NB4 細胞中のユビキチン蛋白が増加した(図 2)。BTZ による抗腫瘍効果とユビキチンの蓄積との関連が示唆された。



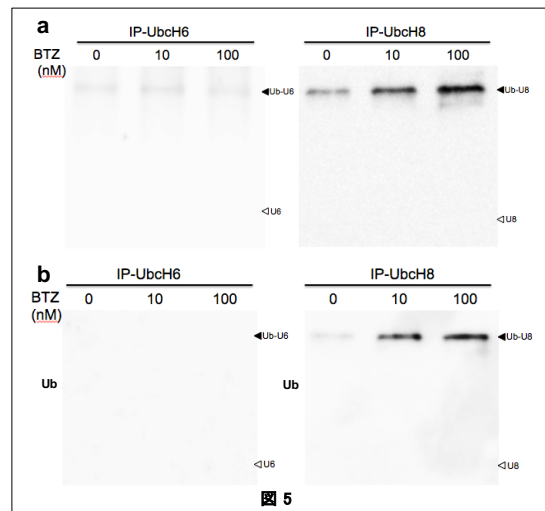
(3) NB4 細胞に BTZ を 0,10,100nM の濃度で添加し、48 時間後の細胞および培養上清中の PML/RARA および Ub-PML/RARA を RARA 抗体、Ub 抗体を用いて IP 法、WB 法で調べたところ、BTZ 濃度依存的に細胞中の Ub-PML/RARA が著しく増加した(図 3-a,b)。しかし、培養上清中ではほとんど検出されなかった(図 3-c)。BTZ によりユビキチン化された PML/RARA が細胞内に蓄積するが、細胞外には逸脱していないことが示された。



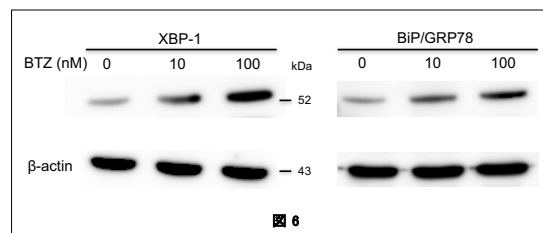
(4) PML/RARA の E3 が SIAH-1 であることが判明しており、かつ我々は SIAH-1 と相互作用する E2 を 3 種類報告している。そこで、3 種の E2 候補 UbcH5, UbcH6, UbcH8 から PML/RARA の E2 を同定するために、(3)の条件下で BTZ を投与し、UbcH5, UbcH6, UbcH8 の各抗体(図 4-a) およびユビキチン抗体(図 4-b)を用いて、IP、WB 法を行った。細胞中では、ユビキチン化された UbcH8 (Ub-UbcH8)が BTZ 濃度依存的に増加し、Ub-UbcH5 および Ub-UbcH6 はほとんど検出されなかった(図 4)。UbcH8 が PML/RARA の E2 であることを確認した。



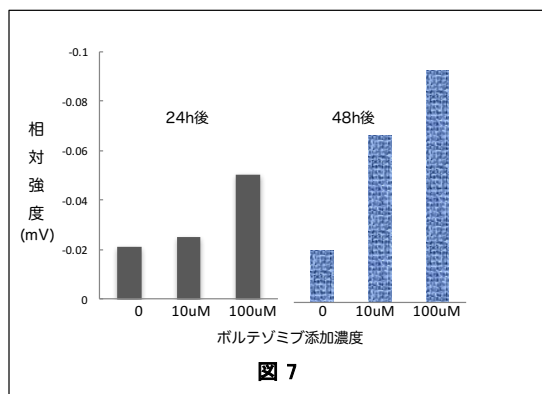
(5) (4)と同様の方法で、培養上清中に UbcH5, UbcH6, UbcH8 が検出されるかどうかを検討したところ、細胞中と同様に、培養上清中においても BTZ 濃度依存的に増加する Ub-UbcH8 が検出された(図 5)。Ub-UbcH8 が BTZ の作用により細胞外に逸脱することから、UbcH8 が BTZ 投与時のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。



(6) BTZ によりプロテアソームで処理されずに蓄積した異常蛋白 PML/RARA が細胞死を誘導する一因であることが示されたので、その経路に ER ストレスが関与しているかどうかを調べたところ、ER ストレスマーカーである XBP-1、BiP/GRP78 ともに BTZ 濃度依存的に増加した(図 6)。これらの結果は、我々が立てた仮説「BTZ によりプロテアソームで処理されずに蓄積した異常蛋白が ER ストレスを高め、Unfolded protein response (UPR) を破綻させ細胞死を誘導する」を証明する。



(7) 人工的に作製した E3 を用いて生理活性反応測定装置 (AMIS-101) の至適化を行った後、(3) の培養上清中の E2(UbcH8) を測定したところ、BTZ 濃度依存的に E2(UbcH8) が増加した(図7)。培養上清中の微量 E2 が定量的に測定できることは、患者血清中の E2 が測定可能であることを意味するものであり、プロテアソーム阻害剤を用いた治療におけるバイオマーカーとして、臨床検査に有用であると考えられる。



結論

BTZ により過剰に蓄積した異常蛋白 PML/RARA が ER ストレスを高めて UPR を破綻させた結果 APL 細胞を細胞死に導くと考えられた。またこのとき PML/RARA の E2(UbcH8) が、BTZ 濃度依存的に培養上清中に検出されたことから、血清中の E2 測定がプロテアソーム阻害剤投与時の病勢を反映するバイオマーカーとして有用であることが証明された。

<引用文献>

- 1) M. Fanelli, A. Fantozzi, P. De Luca, S. Caprodossi, S. Matsuzawa, M.A. Lazar, P.G. Pelicci and S. Minu. The coiled-coil domain is the structural determinant for mammalian homologues of Drosophila Sina-mediated degradation of promyelocytic leukemia protein and other tripartite motif proteins by the proteasome. *The Journal of biological chemistry*. Feb 13;279(7):5374-9 (2004) doi: 10.1074 /jbc. M306407200
- 2) K. Miyamoto. Ubiquitination of an artificial RING finger without a substrate and a tag. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*. Feb;18(2):135-9, (2012) doi: 10.1002/psc.1426
- 3) K. Miyamoto. Structural model of ubiquitin transfer onto an artificial RING finger as an E3 ligase. *Scientific reports*. Oct 10;4:6574 (2014) doi: 10.1038/srep06574

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Takenokuchi M, Miyamoto K, Saigo K, Taniguchi T. Bortezomib Causes ER Stress-related Death of Acute Promyelocytic Leukemia Cells Through Excessive Accumulation of PML-RARA. *Anticancer Res*. 2015 Jun;35(6):3307-3316. URL; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26026090>

[学会発表] (計 3 件)

- ① 炬口真理子、宮本和英、西郷勝康、谷口泰造. プロテアソーム阻害剤の治療効果を反映する疾患特異的ユビキチン化酵素測定の有効性. 第 63 回日本臨床検査医学会学術集会. 2016 年 9 月 1-4 日. 神戸国際会議場、神戸国際展示場、神戸ポートピアホテル. 神戸市
- ② Takenokuchi M, Miyamoto K, Saigo K, Taniguchi T. Bortezomib causes ER stress-related cell death in APL cells through excessive accumulation of PML-RARA. 4th Biotechnology World Congress. 16-18 Feb. 2016. University of Sharjah, UAE.
- ③ Takenokuchi M, Miyamoto K, Saigo K, Taniguchi T. Bortezomib causes ER stress-related cell death in APL through excessive accumulation of PML-RARA. The 77th Annual Meeting of the Japanese Society of Hematology. 16-18 Oct. 2015. Ishikawa Ongakudō, Kanazawa.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

炬口 真理子 (TAKENOKUCHI Mariko)
姫路獨協大学・薬学部・准教授
研究者番号: 10379430

(2) 研究分担者

宮本 和英 (MIYAMOTO Kazuhide)
姫路獨協大学・薬学部・准教授
研究者番号: 10415317

西郷 勝康 (SAIGO Katsuyasu)
姫路獨協大学・薬学部・教授
研究者番号: 20304107

谷口 泰造 (TANIGUCHI Taizo)
姫路獨協大学・薬学部・教授
研究者番号: 70346253