

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830071

研究課題名(和文) 癌遺伝子産物DJ-1のp53抑制による抗がん剤耐性機構の解明

研究課題名(英文) DJ-1 regulating anticancer resistance through suppressing p53

研究代表者

加藤 いづみ (KATO, Izumi)

北海道大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40634994

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の第一選択治療法である抗がん剤治療では癌細胞死効果は細胞内の活性酸素濃度上昇に伴い、増加する。癌原因因子DJ-1タンパク質は癌抑制因子p53に結合し、そのDNA結合を阻害して細胞死を抑制する。実際、DJ-1が高発現する膵癌患者では生存率が半減する。そのため、抗がん剤耐性を示す膵癌細胞では酸化ストレスにより起こる細胞死抑制機構が癌悪性化に働くことが予想された。申請者は膵癌の抗がん剤耐性とDJ-1発現量に相関があることを見出し、抗がん剤耐性の異なる膵癌細胞を用いることにより、抗がん剤耐性とDJ-1、p53の発現や修飾の関連を評価すると共に、酸化型DJ-1とp53の相互作用解析法を確立した。

研究成果の概要(英文)：The effect of cancer cell death increases depending on the ROS (Reactive Oxygen Species) in pancreatic cancer cells after anti-cancer therapy. DJ-1 binds to p53 and suppresses the transactivation activity of p53 depending on the p53-DNA binding affinity. The survival rate of pancreatic cancer patients who express high level of DJ-1 reduces by half. Therefore, cell death suppression by oxidative stress was predicted to work the malignant alteration of pancreatic cancer. We revealed the interaction between anticancer drug resistance and DJ-1. Furthermore, the relationship between anticancer drug resistance and DJ-1 or p53 was estimated by using the pancreatic cancer cells with different anticancer drug resistance.

研究分野：細胞生物学

キーワード：DJ-1 p53 がん

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌の5年生存率は5%と部位別の癌の中で断トツに低い。膵癌の第一選択治療である抗がん剤治療では癌細胞死効果は細胞内の活性酸素濃度上昇に伴い、増加する。そのため、抗がん剤耐性を示す膵癌細胞では酸化ストレスにより起こる細胞死抑制機構が癌悪性化に働くことが予想される。

癌原因因子 DJ-1 タンパク質が高発現する膵癌患者では生存率が半減する。申請者は酸化型 DJ-1 が癌抑制因子 p53 に結合することで、転写因子として重要な p53 の DNA 結合を阻害して、p53 による細胞死誘導を抑制することを報告している。また、p53 においては酸化ストレスにより、構造が不安定な状態へ変化することが明らかとなっており、構造が不安定化した p53 の発現が酸化ストレスと関連する疾患で報告されている。

神経疾患においては患者脳に過剰酸化型 DJ-1 が蓄積しているため、DJ-1 は細胞内の酸化度を感知するセンサーとして働き、その破綻が疾患に繋がるのではないかと考えられてきた。

しかしながら、膵癌細胞内での DJ-1 量や酸化状態がどのように制御されているのか、また、細胞内の酸化レベルに応じた DJ-1 の酸化状態の変化や DJ-1 がその酸化度に応じて p53 を制御する仕組みは不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では抗がん剤が酸化ストレスとして働き、DJ-1 が癌細胞悪性化を増強すると予測し、酸化型 DJ-1 に着目して、DJ-1 の癌細胞悪性化メカニズムを解明することを目的に、研究を進めることとした。

そのために、以下の3つの目的を設定した。まず、DJ-1 が抗がん剤投与後の膵癌細胞死を変化させるか明らかにすること、2つめは抗がん剤耐性膵癌細胞における DJ-1 発現量の制御機構を転写レベル、分解レベルの双方にて解析すること。3つめは、酸化型 DJ-1 による p53 の制御機構を分子レベルで明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1)膵癌細胞での DJ-1 と p53 の発現量と修飾状態

抗がん剤耐性強度の異なる膵癌細胞 4 種を用いて、抗がん剤投与後、ウェスタンブロッティングを行い、DJ-1 と p53 のタンパク質量変化、翻訳後修飾変化を上記の細胞間で比較した。

(2)膵癌細胞での DJ-1 発現調節機構の解明

抗がん剤処理後の DJ-1 の mRNA とタンパク質量変化を RT-PCR 法やプロテアソーム阻害剤処理後のウェスタンブロッティング法を用いて解析した。

(3)膵癌悪性化への DJ-1 発現量や酸化状態の寄与

抗がん剤耐性が低い膵癌細胞へ野生型 DJ-1 もしくは酸化型へ変化しない還元型 DJ-1 (DJ-1 C106S) 変異体を過剰発現させ、抗がん剤投与後の細胞生存変化を MTS assay にて解析した。

(4)大腸菌発現系を用いた還元型、酸化型 DJ-1 調整法の構築

野生型 DJ-1 を含む発現プラスミドを用い、大腸菌 Rosetta2 (DE3) を形質転換した。途中、還元剤メルカプトエタノールもしくは酸化剤過酸化水素を添加し、His Trap を用いたアフィニティークロマトグラフィーとゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行った。

(5)恒常的酸化型 DJ-1 モデルの作製

DJ-1 は溶液中でも容易に酸化されるため、殊に細胞内においてはその酸化修飾状態を制御することは困難であった。そこで、1アミノ酸変異 DJ-1 タンパク質を作製することにより、酸化処理を行うことなく、酸化型 DJ-1 の性質を示すことが出来る DJ-1 変異体をデザイン、作製した。

(6)Surface plasmon resonance (SPR) を用いた結合実験

anti-mouse IgG をセンサーチップ CM5 へアミンカップリング法にて固定化、さらに DJ-1 認識抗体もしくは酸化型 DJ-1 認識抗体を固定化したレーンへアナライトとして、酸化型 DJ-1 タンパク質または DJ-1 変異体を流し、抗体と DJ-1 の相互作用を測定した。

加えて、センサーチップ CM5 へ還元型 DJ-1 または、酸化型 DJ-1、DJ-1 変異体タンパク質を固定化し、p53 DNA 結合ドメイン (p53 DBD) をアナライトとして流し、DJ-1 と p53 DBD の結合強度を測定した。

(7)MAP キナーゼ経路における DJ-1 の相互作用

DJ-1 発見当初から関連が示唆されていた MAP キナーゼ経路での DJ-1 の機能を明らかにするため、MAP キナーゼ経路タンパク質との結合実験を行い、解析した。さらに、MAP キナーゼ経路タンパク質のリン酸化量へ DJ-1 が与える影響を、ウェスタンブロッティング法により解析した。

## 4. 研究成果

(1)膵癌第一選択薬ゲムシタビン処理後の生存細胞を測定し、4種の膵癌細胞がゲムシタビンに対する感受性が異なることを見出した。その感受性はゲムシタビン濃度 10-8M で細胞死を起こすものからゲムシタビン濃度 10-4M に対しても細胞死を起こさないものまでバリエーションがあり、まず本研究を進める上で必要な細胞条件を確立することが出来た。

DJ-1 タンパク質の発現量をゲムシタビン処理後の膵癌細胞間で比較すると、ゲムシタビン感受性が低い、すなわち、抗がん剤耐性が強い膵癌細胞ほど DJ-1 の発現量が増加していた。このことから、膵癌細胞における DJ-1 量と抗がん剤耐性には相関があることが明らかとなった。なお、ゲムシタビン添加後、p53 タンパク質量に変動は観察されなかった。

さらに、DJ-1 の酸化修飾量変化と p53 のアセチル化修飾量変化をウェスタンブロッティング法により調べた結果、抗がん剤耐性が強い細胞では抗がん剤耐性が弱い細胞に比べ、酸化型 DJ-1 の割合が低い傾向が見られた。また、p53 のアセチル化量はゲムシタビン処理により増加するものの、ゲムシタビン耐性とアセチル化量に相関は見られなかった。

(2) 膵癌細胞における DJ-1 の発現量調節機構を解明するため、抗がん剤処理前後の DJ-1 mRNA 量を定量したところ、DJ-1 タンパク質量の低下が見られた抗がん剤耐性の弱い細胞では DJ-1 mRNA 量に変化がない一方、抗がん剤耐性の強い細胞では、ゲムシタビン処理により DJ-1 mRNA 量が増加した。

さらに、プロテアソーム阻害剤処理後のウェスタンブロッティングの結果では、抗がん剤を添加しない場合、プロテアソーム阻害剤処理により DJ-1 量は増加した。一方、抗がん剤を添加した場合には、プロテアソーム阻害剤を添加しても DJ-1 量に大きな変化は見られなかった。

(3) 抗がん剤感受性の低い、すなわち抗がん剤耐性が低く、DJ-1 発現量が低い細胞へ野生型 DJ-1 もしくは還元型 DJ-1 変異体を過剰発現させ、抗がん剤添加後の細胞生存割合を観察した。その結果、野生型 DJ-1 の過剰発現により、抗がん剤添加後の細胞死が抑制され、還元型 DJ-1 変異体の過剰発現時では、野生型 DJ-1 に比べ、その抑制効果が弱いことが明らかとなった。このことは、DJ-1 発現量が膵癌の悪性度に相関することを示し、DJ-1 量の増加により膵癌細胞へ抗がん剤が効果を発揮しにくい状態になっていると考えられた。さらに、この効果を発揮するためには酸化型 DJ-1 が重要であることが、この結果から、示唆された。

(4) 還元型、酸化型 DJ-1 を大量調整することに成功した。酸化型 DJ-1 認識抗体を用いたウェスタンブロッティングの結果、調整した還元型 DJ-1 は酸化型 DJ-1 抗体で認識されず、酸化型 DJ-1 のみが酸化型 DJ-1 認識抗体で検出された。これら還元型、酸化型 DJ-1 を用いて、以後の SPR 法による相互作用実験を行うこととした。

(5) 酸化剤の未添加で酸化型 DJ-1 機能を示す DJ-1 変異体を作製し、その大量調整に成功した。作製した DJ-1 変異体タンパク質は酸化剤を加えて、大腸菌内で発現、精製した酸化型 DJ-1 タンパク質と同様に酸化型 DJ-1 認識抗体で検出された。このことは、新たにデザイン、作製した DJ-1 変異体が恒常的酸化型 DJ-1 モデルとして有用であることを示している。この恒常的酸化型 DJ-1 変異体を用いて、以後の SPR 実験を行うこととした。

(6) SPR 法を用いて、還元型 DJ-1、酸化型 DJ-1、恒常的酸化型 DJ-1 変異体と DJ-1 認識抗体もしくは酸化型 DJ-1 認識抗体の相互作用を解析した。その結果、ウェスタンブロッティングの結果同様、すべての DJ-1 が DJ-1 認識抗体で検出される一方、酸化型 DJ-1 認識抗体は還元型 DJ-1 を検出せず、酸化型 DJ-1 および恒常的酸化型 DJ-1 変異体とのみ相互作用を引き起こすことを明らかにした。このことは、酸化型 DJ-1 認識抗体が構造を保持した DJ-1 を認識可能であることも示している。

DJ-1 タンパク質と p53 DBD の結合を SPR 法により解析したところ、p53 DBD は酸化型 DJ-1 と相互作用するとともに、恒常的酸化型 DJ-1 変異体とも相互作用する様子が観察された。このことは、恒常的酸化型 DJ-1 変異体がタンパク質結合機能においても酸化型 DJ-1 のモデルとなり得ることを示す。

(7) 細胞死抑制経路に働く DJ-1-p53 相互作用に加え、細胞増殖経路への DJ-1 の関与を明らかとするため、DJ-1 が MAP キナーゼ経路のタンパク質 Ras と協調的に働くことに着目し、まず DJ-1 が直接結合するタンパク質を免疫沈降法により探索した。その結果、MAP キナーゼ経路のタンパク質の中で Ras により活性化される c-Raf タンパク質と DJ-1 が直接結合することを明らかとした。また、DJ-1 は c-Raf のキナーゼ部位である C 末領域と結合していた。

MAP キナーゼ経路の c-Raf, MEK, ERK のリン酸化量を DJ-1 ノックダウン条件もしくは DJ-1 ノックアウト細胞を用いて調べた結果、DJ-1 の減少やノックアウトにより、EGF 刺激後の c-Raf, MEK, ERK のリン酸化量が減少していた。このことから、DJ-1 が c-Raf と結合することにより、MAP キナーゼ経路の活性化を促進していることが明らかとなった。

以上の結果から、DJ-1 は癌細胞死抑制、癌細胞増殖の 2 つの経路から癌細胞に機能して、その悪性化に寄与していることが考えられた。今後は、恒常的酸化型 DJ-1 モデルを用いて、酸化型 DJ-1 の機能を解明することにより、DJ-1 が癌細胞死を抑制する機構や癌細胞増殖を促進する機構を分子的な観点からさらに明らかにしていきたいと考えている。

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 2 件)

① Takahashi-Niki K\*, Kato-Ose I\*

Murata H\*, Maita H, Iguchi-Ariga S M M  
and Ariga H (\*: **Equal contributor**)

Epidermal growth factor-dependent activation of  
the ERK pathway by DJ-1 through its direct  
binding to c-Raf.

*J. Biol. Chem.* **290**, 17838-17847 doi:

10.1074/jbc.M115.666271(2015) (査読有り)

② Ariga H, Takahashi-Niki K, Kato I,

Maita H, Niki T and Iguchi-Ariga S M M  
Neuroprotective function of DJ-1 in Parkinson's  
disease.

*Oxid. Med. Cell. Long.* 2013 : 683920. doi:

10.1155/2013/683920 (2013) (査読有り)

[学会発表] (計 3 件)

①堺谷政弘、加藤いづみ、小川雄大  
酸化ストレス誘導神経細胞死抑制薬の開発  
第 33 回 メディシナルケミストリーシンポ  
ジウム

2015 年 11 月 25 日-2015 年 11 月 27 日  
幕張国際研修センター (千葉県千葉市)

②Kato-Ose I

Cell protection after oxidative stress  
Tentative Agenda for the International  
Symposium

June 27, 2014,  
北海道大学 学術交流会館 (北海道札幌市)

③Kato I, Murata H, Maita H,  
Iguchi-Ariga S.M.M. and Ariga H

Oxidative DJ-1 affects cell protection  
under the oxidative stress condition  
through regulation of the MAP kinase  
signaling

November 9-13, 2013  
San Diego (United states of America)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 酸化ストレス誘導神経細胞死抑制化合物

発明者: 堺谷政弘、尾瀬いづみ

権利者: 北海道大学

種類: 特許

番号: PCT/JP2016/058048

出願年月日: 2016 年 3 月 13 日

国内外の別: 国外

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 いづみ (KATO, Izumi)

北海道大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号: 40634994

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし