

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830075

研究課題名(和文)ミトコンドリア局在型熱ショックタンパク質90の機能調節による癌治療戦略

研究課題名(英文)A treatment strategy to target mitochondria-specific Hsp90 chaperones

## 研究代表者

吉田 宗一郎(YOSHIDA, Soichiro)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80383280

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)：ミトコンドリアに局在する分子シャペロンであるTRAP1の発現の意義について検討した。尿路上皮癌細胞株において、TRAP1発現抑制による浸潤能増殖と、TRAP1強制発現系での浸潤能抑制を確認。さらに、免疫組織学的染色による腎盂尿管癌内のTRAP1発現評価により、TRAP1発現は表在部位と比較し浸潤部位で低下している傾向があり、TRAP1陰性癌では陽性癌と比較し、病理組織学的進達度が高い傾向があることを確認。また、TRAP1発現は腎盂尿管全摘除後の癌特定の生存率の独立した有意な予測因子であった。腎盂尿管においてTRAP1が細胞浸潤を抑制し、その発現が有用な予後予測因子となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：TRAP1, a homologue of HSP90, are abundantly expressed in mitochondria. We investigated the biological and prognostic role of TRAP1 expression in upper urinary tract urothelial carcinoma (UTUC). In 5637 cells, knockdown of endogenous TRAP1 potentiated cell invasiveness, which is attenuated by a ROS inhibitor. In addition, exogenous expression of TRAP1 hampered in vitro invasion of 5637 cells. We further evaluated TRAP1 expression in UTUC surgical specimens and its association with cancer-specific survival (CSS). Lower TRAP1 expression was an independent predictor of shorter CSS, along with histological grade and lymph node involvement. The 5-year CSS rates were 52% for patients with lower TRAP1 expression compared to 95% for those with higher TRAP1 expression. Taken together, impaired TRAP1 expression is associated with increased invasive potential via modulating ROS and unfavorable prognosis in UTUC.

研究分野：泌尿器科

キーワード：尿路上皮癌 分子シャペロン ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

(1) これまで、申請者は、ミトコンドリア内のみ局在する分子シャペロンである Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1)は、cSrc との結合により、呼吸鎖の Complex IV の活性を抑制的に制御しており、酸化リン酸化の抑制による、ATP 産生抑制および活性酸素産生制御を介して、細胞の移動能を制御していることを見出してきた(Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110: E1604-12.)。TRAP1 は細胞内での酸化リン酸化と解糖のバランスを司っているものと解釈される。

(2) TRAP1 と構造的相同性の高い Paralogue である、Heat shock protein 90 (Hsp90)は、ATP の結合と ATP 加水分解による立体構造の変化により制御されているが、リン酸化を含む翻訳後修飾が Hsp90 の分子シャペロン活性の制御に重要であることが解明されてきた。TRAP1 も Hsp90 同様に、チロシンリン酸化蛋白であるため、翻訳後修飾が機能調節に重要であることが推測され、翻訳後修飾を変化させることで、TRAP1 の活性化を誘導する癌治療戦略となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究は、ミトコンドリア内の分子シャペロンを標的とした新規癌治療戦略を構築するべく、TRAP1 の分子生物学的な機能および制御機構を明らかにすることを目標とした。

(1) 癌組織内での TRAP1 発現を、臨床経過および病理組織学的所見と比較することで、TRAP1 発現に基づく癌の特徴を評価する。

(2) TRAP1 のチロシンリン酸化による翻訳後修飾での TRAP1 の機能制御機構を明らかにし、翻訳後修飾制御により TRAP1 の機能活性化を誘導する癌治療戦略を目指すものである。

## 3. 研究の方法

(1) 腎盂尿管癌の診断のもと腎尿管全摘除が施行された 62 例の摘除標本を使用し、免疫組織学的染色により腎盂尿管癌内の TRAP1 発現を評価。腎盂尿管癌における TRAP1 発現と臨床経過および病理組織学的特徴との関連を評価する。

(2) TRAP1 の翻訳後修飾による機能調節機構の評価について TRAP1 のリン酸化部位候補の絞り込みを質量分析により行う。同定されたリン酸化候補部位の変異型 TRAP1 の機能的評価を行うとともに、その残基のリン酸化が細胞内で起きていることを確認する。

## 4. 研究成果

(1) TRAP1 の翻訳後修飾による機能調節機構の評価について

### リン酸化候補部位の絞り込み

過剰発現させた TRAP1 を免疫沈降させ、質量分析し、106 番目のチロシン残基をリン酸化部位候補として同定した。106 番目のチロシン残基は、Hsp90 と TRAP1 との間で、アミノ酸配列が保存されており、Hsp90 の 38 番目のチロシン残基に相当する。Hsp90 の 38 番目のチロシン残基のリン酸化は、Hsp90 の機能制御に重要であることが示されており(Mol Cell. 2012; 47: 434-43.)、TRAP1 においても、同様に 106 番目のチロシン残基のリン酸化が、機能制御に重要な寄与をしていると推測された。

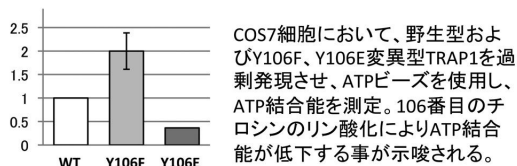


質量分析にて、TRAP1リン酸化部位の候補として 106番目のチロシンが同定された。

### 翻訳後修飾による機能変化の評価

106 番目のチロシンのリン酸化による TRAP1 の機能変化を調べるべく、非リン酸化型およびリン酸化型に模倣した変異である

TRAP1-Y106F と TRAP1-Y106E を作成し、ATP ビーズを使用し、ATP 結合能を評価。ATP 結合能は 106 番目のチロシンのリン酸化状態により変化することが判明した。



COS7細胞において、野生型およびY106F、Y106E変異型TRAP1を過剰発現させ、ATPビーズを使用し、ATP結合能を測定。106番目のチロシンのリン酸化によりATP結合能が低下する事が示唆される。

TRAP1 の 106 番目のチロシン残基の細胞内リン酸化の確認

過剰発現させた野生型 TRAP1 と TRAP1-Y106F のチロシンリン酸化の変化を、免疫沈降により評価したが、TRAP1 全体のチロシンリン酸化の程度に変化は認められなかった。そのため、TRAP1 には少なくとも 106 番目のチロシン残基以外にも、チロシンリン酸化残基があると考えられた。

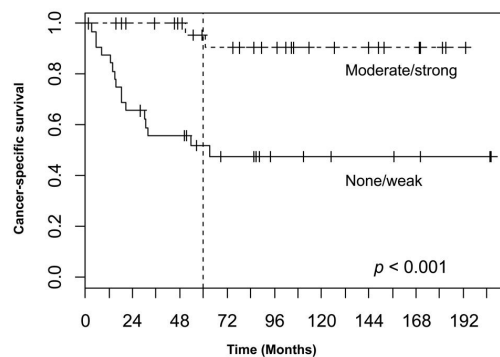
( 2 ) 尿路上皮癌細胞株における TRAP1 の機能評価

尿路上皮癌細胞株 5637 を使用し、TRAP1 発現の変化による浸潤能の変化を invasion assay により評価した。その結果、TRAP1 発現抑制による浸潤能増殖と、TRAP1 強制発現系での浸潤能抑制が確認された。

( 3 ) 腎盂尿管癌における TRAP1 発現と臨床経過および病理組織学的特徴との関連評価

腎盂尿管癌の診断のもと腎尿管全摘除が施行された 62 例の摘除標本を使用し、免疫組織学的染色により腎盂尿管癌内の TRAP1 発現を評価。TRAP1 発現は表在部位と比較し浸潤部位で低下している傾向があり、TRAP1 陰性癌では陽性癌と比較し、病理組織学的進達度が高い傾向があることを確認。また、TRAP1 発現は腎盂尿管全摘除後の癌特異的生存率の独立した有意な予測因子であった。腎盂尿管において TRAP1 が細胞浸潤を抑制

し、その発現が有用な予後予測因子となることを確認した。



TRAP1発現毎の腎盂尿管全摘除後の癌特異的生存率の解析

#### <参考文献>

Molecular chaperone TRAP1 regulates a metabolic switch between mitochondrial respiration and aerobic glycolysis. Yoshida S, Tsutsumi S, Muhlebach G, et al. Proc Natl Acad Sci U S A.110: E1604-12, 2013. doi: 10.1073/pnas.1220659110.

Dynamic tyrosine phosphorylation modulates cycling of the HSP90-P50(CDC37)-AHA1 chaperone machine. Xu W, Mollapour M, Prodromou C, et al. Mol Cell. 47: 434-43, 2012. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.015.

#### 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 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

Fukushima H, Yoshida S, Koga F, Nakanishi Y, Kijima T, Ishioka J, Matsuoka Y, Numao N, Saito K, Fujii Y, Kihara K Reduced TRAP1 expression is associated with poor

prognosis in upper urinary tract  
urothelial carcinoma patients: its  
implications for tumor invasion. The 108th  
annual meeting of the American Urological  
Association, Orlando, USA, 2014/5/18

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

吉田 宗一郎 (YOSHIDA, Soichiro)

東京医科歯科大学, 医学部附属病院, 助教

研究者番号 : 80383280