

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870562

研究課題名(和文) 口腔領域がん克服のための小胞体ストレス応答の役割の解明

研究課題名(英文) The role of ER stress response for overcoming oral cancer

研究代表者

門脇 寿枝 (Hisae, Kadowaki)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40568200

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体はタンパク質が機能的な立体構造をとるための場であり、その機能破綻は異常なタンパク質の小胞体内での蓄積につながる。このような小胞体ストレスに対し、細胞は異常なタンパク質を処理することで生存できる。一方で、がん細胞では小胞体ストレスに対する生存シグナルを悪用することで細胞増殖を促進することが分かってきたが、詳細な分子機構は不明である。そこで、本研究では小胞体ストレスの重要性がわかっていない口腔がんの克服を目標とした。小胞体の機能に関わる因子について、小胞体ストレス誘導性細胞死を引き起こす抗がん剤の使用により、がん病態における小胞体ストレスの関与を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The ER is the organelle in which proteins form their functional tertiary structure. Dysfunction of the ER leads to the accumulation of misfolded proteins in the ER. Cells possess ER quality control systems to remove these proteins and thereby survive. On the other hand, tumor cells are challenged by microenvironments such as hypoxia and hypoglycemia, which lead to the induction of ER stress. It is well known that ER stress-induced survival signaling is activated during tumor cell growth. However, the molecular mechanism underlying this process remains unclear. In this project, we focused on oral cancer in which significance of ER stress signaling has never been evaluated and aimed at therapeutic approaches. Our results from the experiments using anticancer agent which induces ER stress-mediated cell death revealed that ER stress is involved in cancer.

研究分野：細胞生物

キーワード：小胞体ストレス シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

小胞体ストレスは、小胞体内腔に構造異常不良タンパク質を蓄積させるストレスで、UPRを誘導する。近年、申請者らの研究を中心として(Nishitoh, Kadowaki, et al. Genes Dev. 2008; 2006; Kadowaki, et al. Cell Death Differ. 2005)、小胞体ストレスが糖尿病、虚血性疾患、神経変性疾患などのコンフォメーション病の分子メカニズムに関与することが報告され、創薬標的として特に注目され、UPR制御メカニズムや小胞体ストレス誘導性アポトーシス制御メカニズムに関する研究が広がっている。がん治療に関しては、多発性骨髄腫治療薬として認可されているプロテアソーム阻害剤の一種ボルテゾミブ(商品名 VELCADE: 詳細な作用機序は不明)が、*in vitro* 実験から小胞体ストレスを介したアポトーシスを誘導することが示されている。従って、小胞体ストレスを標的としたがん治療の可能性は極めて高いといえる。小胞体ストレスと口腔がんについては、口腔領域で特徴的な固形がんで見られるグルコース飢餓や低酸素状態は小胞体ストレス誘導につながり、臨床的にもがん組織における小胞体ストレスマーカーの誘導が観察されている。さらに、顎口腔がんの特徴である顎骨浸潤の際にみられる局所の現象として、TNF・MMPなどの様々な炎症性サイトカインや分泌タンパク質の産生亢進が見られ、これらの産生に際して、細胞は小胞体のタンパク質産生能力を高めるために、積極的にUPR経路を活性化する必要がある。このように、がん細胞は自ら生存・増殖するため、また周辺組織へと侵襲していくために、積極的に小胞体ストレス応答を活用していることが予想される。しかし、これまで口腔がん研究において、小胞体ストレスの観点からのアプローチはほとんどなされておらず、今後、口腔がん克服に向けた新たな創薬標的を見いだすために、当該領域は極めて重要な研究対象である。

蓄積した小胞体不良タンパク質は、小胞体膜受容体を介してUPRを活性化し、小胞体シャペロンの発現誘導によりリフォールディングされるか、小胞体関連分解(ERAD)により小胞体内腔から除去される(図1左側)。しかし、細胞にある種のストレスがかかるとこれらの小胞体品質管理機構が破綻し、不良タンパク質が蓄積し過度な小胞体ストレスとなる。この強い小胞体ストレスに対抗できなくなった細胞は自らを排除するため、小胞体ストレス誘導性アポトーシスシグナルが活性化される。

本研究が対象とするがん細胞においては、小胞体ストレス誘導性アポトーシスが抑制され、逆にUPRを介した生存・増殖シグナルが増強されていることが予想される。申請者が所属する研究グループは、これまでこの小胞体ストレス誘導性アポトーシスシグナ

ルの実行因子としてASK1を同定し(Nishitoh Genes Dev. 2002)詳細な機能解析を行ってきた。

すなわち、ASK1はJNK/p38経路を特異的に活性化するストレス応答性MAPキナーゼの一つであり、その抑制因子としてTrx、PP5、活性化因子としてDaxx、TRAF2などを同定してきた。さらに、ASK1ノックアウト(KO)マウスを作製し、小胞体ストレス誘導性アポトーシスにASK1が必要であることを明らかにした(Fujisawa, et al. Ann. Neurol. in press, Nishitoh, Kadowaki, et al. Genes Dev. 2008)。一方、UPRの一つERADのメカニズムとその破綻による細胞死分子機構についても明らかにしてきた。このような小胞体ストレスによる細胞の生と死に関する研究成果を踏まえ、本研究では口腔がんにおける小胞体ストレスシグナルの関与を明らかにし、これまでにない新規創薬標的を探索する。

2. 研究の目的

口腔がんを含むがん研究領域において、小胞体ストレスシグナルの重要性については未だ詳細な研究がなされていない。そこでまず、本研究前期において、申請者らが確立している小胞体ストレスマーカー(小胞体受容体IRE1や小胞体シャペロンBiP)に対する特異的抗体を用いて、培養細胞におけるUPRの関与、転移能・悪性度と小胞体ストレスシグナルの関係を検討した。また、小胞体品質管理機構や小胞体ストレス誘導性アポトーシスにおけるがん細胞と正常細胞の差異を明らかにすることにより、小胞体ストレスの観点から見たがん細胞の特徴を見いだす。さらに、小胞体受容体IRE1、小胞体品質管理に関わる分子Derlin-1およびアポトーシス実行因子ASK1のがん病態進行・転移における関与を、KOマウス・阻害剤を用いて検討する。これらの*in vitro*・*in vivo*解析により、小胞体ストレスを介した細胞の生と死のシグナルにおける口腔がん治療の標的を明らかにし、がん疾患克服のための応用研究に向けた研究基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

近年、小胞体ストレスは様々なコンフォメーション病との関与が明らかになっている。一方、がん疾患との関係については、がん特異的な小胞体ストレスシグナルは存在するのか?、存在するとすれば何故正常細胞ががん化によりそのような特性を獲得したのか?、果たして小胞体ストレスシグナルを標的としたがん治療は可能なのか?など、まだまだ解明すべき点は多く残されている。特に口腔がん領域において、小胞体ストレスとの関係を示す報告はほとんど無い。そこで、「口腔がんと小胞体ストレスは関係があるのか?」という点に絞って、小胞体ストレス応答(UPR)依存的な増殖シ

グナルと小胞体ストレス誘導性アポトーシスの両極面からのアプローチを行うため、モデル実験による検証を実施した。

4. 研究成果

(1)がん化培養細胞における小胞体ストレスに関する検討

小胞体ストレスマーカーの検討：これまでの研究により、小胞体ストレスシグナルをモニターする手段として、小胞体受容体 IRE1・PERK の活性化抗体、その下流で発現誘導される小胞体シャペロン BiP や転写因子 CHOP の抗体、小胞体ストレス特異的に起こる mRNA スプライシングを検出するプローブ、ERAD の機能低下による小胞体不良タンパク質の蓄積を検出する蛍光プローブ、アポトーシス実行因子 ASK1 経路の活性化抗体の開発に成功している。これらの抗体・検出プローブを用いて、がん化細胞が、低酸素・低栄養状態を模倣したストレスに対して、どのようなストレス応答をするか詳細に検討した。がん組織は低酸素状態にあるため、ミトコンドリアの酸化リン酸化が阻害されやすい状態にあり、そのためミトコンドリアストレスにさらされやすい。そこで、薬剤によりミトコンドリアストレスを与えたところ、意外なことに小胞体ストレス受容体 PERK の高度リン酸化が観察された。このことは、がん細胞および組織では、ミトコンドリアストレスを小胞体ストレスとして関知するシステムが備わっていることを示唆しており、全く新しい知見である。

(2)がん細胞における小胞体ストレス特異的増殖シグナルの同定

腫瘍細胞や抗原産生細胞と同様、がん細胞は多くの分泌タンパク質を産生するため、独自の小胞体品質管理機構によって小胞体機能を高く維持するとともに、低酸素・低栄養状態での増殖を可能にするため UPR を介した増殖シグナルが発信されていると考えられる。従って、このようながん細胞を排除するためには小胞体品質管理機構を破綻させ増殖シグナルを抑制することが一つの治療戦略となる。そこで、がん細胞特異的な UPR を検証した。その結果、上記細胞培養条件において、PERK 活性化の他に、IRE1 が活性化されることを見出した。IRE1 は、そのキナーゼ領域のリン酸化依存的に NF- κ B 経路を活性化し、サイトカインを産生することならびに増殖シグナルを発信することに関与することが知られている。一方、PERK 経路の下流で発現誘導されるアポトーシス関連因子 CHOP については、強い発現誘導を認めなかった。従って、がん組織においては、PERK および IRE1 経路の下流で、細胞死シグナルは抑制され、生存シグナルが増強されている可能性が示唆された。

(3)がん細胞における小胞体ストレス特異的アポトーシスシグナルの同定

神経細胞や心筋細胞など多くの細胞では、虚血・低栄養刺激によって速やかに小胞体ストレス誘導性細胞死が誘導される。一方で、一部の細胞は何らかのメカニズムによって小胞体ストレス依存的細胞死のシグナルから回避し生存し続けることが可能である。近年、がん細胞の分子メカニズムとして、アポトーシスの抑制機構が報告されていることから、がん細胞特異的な小胞体ストレス誘導性アポトーシス回避機構が存在すると予想される。一方これまでの研究により、小胞体ストレス誘導性アポトーシスに、受容体 IRE1 の活性化とその下流での ASK1 活性化が必要であることを、KO マウスを用いて示してきた。そこで、がん細胞における小胞体ストレスによる IRE1-ASK1 経路の関与を検討したところ、ミトコンドリアストレス誘導剤 CCCP によっては、ASK1 は強く活性化されないことを確認した。

(4)小胞体ストレスシグナルに関する解析

抗がん剤ボルテゾミブ作用機序に関する検討：幾つかの抗がん剤が小胞体ストレスを誘導することが報告されている。しかし、このような作用が抗がん剤としての本来の作用機序なのか、サイドエフェクトなのかは不明である。多発性骨髄腫の治療薬ボルテゾミブが小胞体ストレス誘導性アポトーシスを誘導することが明らかになり、抗がん剤標的としての小胞体ストレスシグナルが注目されているものの、この薬剤の作用機序、分子標的は不明である。そこで、小胞体ストレスシグナルをがん治療標的として確立するためのプロトタイプとしてボルテゾミブ作用機序を生化学的に解明することを試みた。

一方、これまでの研究により、細胞ストレスが小胞体ストレスを惹起するメカニズムとして、SOD1 がその構造変化によって小胞体品質関連分子 Derlin-1 と結合することで、小胞体ストレスが誘導されることを明らかにしている (Homma et al, Mol. Cell 2013)。そこで、SOD1 の構造変化誘導剤のスクリーニングを行ったところ、抗がん剤ボルテゾミブが SOD1 と Derlin-1 の結合を強く促進することを見出した。このことは、ボルテゾミブが SOD1 を介して小胞体ストレス誘導性アポトーシスを誘導しうることを示す全く新たな知見である。

以上のように、がん細胞はその生育環境、すなわちミトコンドリアストレス状態を小胞体ストレスに変換することで、UPR を介した生存シグナルを発する可能性があること、また反対に、ボルテゾミブのような薬剤による SOD1 の強固な構造変化が、強い持続的な小胞体ストレスさらにはアポトーシスに繋がることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Tristan C.A., Ramos A., Shahani N., Emiliani F.E., Nakajima H., Noeh C.C., Kato Y., Takeuchi T., Noguchi T., Kadowaki H., Sedlak T.W., Ishizuka K., Ichijo H., Sawa, A.

Role of Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 (ASK1) as an activator of the GAPDH-Siah1 Stress-Signaling Cascade.

J. Biol. Chem. 290:56-64(2015)

DOI:10.1074/jbc.M114.596205 査読有

Homma K., Fujisawa T., Tsuburaya N., Yamaguchi N., Kadowaki H., Takeda K., Nishitoh H., Matsuzawa A., Naguro I., Ichijo, H.

SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency.

Mol. Cell 52:75-86(2013)

DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.038

査読有

Kadowaki H., Nishitoh H.

Signaling Pathways from the Endoplasmic Reticulum and their Role in Diseases.

Genes 4:306-333 (2013)

DOI:10.3390/genes4030306 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

門脇寿枝 新規小胞体品質管理機構の分子メカニズム 日本薬学会第 135 年会 2015 年 3 月 25 日～28 日「神戸学院大学(神戸)」

門脇寿枝, 西頭英起 小胞体ストレス誘導性翻訳時分解の分子機構の解明 第 87 回日本生化学会 2014 年 10 月 15 日～18 日「国立京都国際会館(京都)」

門脇寿枝, 西頭英起 The molecular mechanism of novel ER quality control system 第 66 回日本細胞生物学会 2014 年 6 月 11 日～13 日「奈良県新公会堂(奈良)」

門脇寿枝, 西頭英起 Derlin ファミリーを介した小胞体品質管理システム 日本生化学会九州支部 2014 年 5 月 17 日～18 日「九州大学(福岡)」

門脇寿枝, 西頭英起 小胞体ストレス誘導性翻訳時分解の分子機構の解明 第 86 回日本生化学会 2013 年 9 月 11 日～13 日「パシフィコ横浜(横浜)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

門脇 寿枝 (KADOWAKI Hisae)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：40568200