

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640109

研究課題名(和文)ポリ(ADP-リボシル)化による細胞運動の制御とがんの浸潤・転移克服への応用

研究課題名(英文)Regulation of cell motility by poly(ADP-ribosylation) and its application to overcoming cancer invasion and metastasis

研究代表者

清宮 啓之(Seimiya, Hiroyuki)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・部長

研究者番号：50280623

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ポリ(ADP-リボシル)化酵素タンキラーゼの結合タンパク質TAB182の細胞運動・浸潤への寄与とその仕組みを解明することを目的とする。我々は、TAB182ががん細胞の運動・浸潤を負に制御することを見出し、同結合タンパク質としてアクチン動態制御因子Xを同定した。TAB182およびXの枯渇は、アクチン脱重合因子コフィリンのリン酸化を導き、細胞運動・浸潤を亢進させた。これらの現象はタンキラーゼの過剰発現によっても誘導され、同阻害剤によって抑制された。臨床レベルでは、膵がん浸潤部でTAB182の発現が低下していた。以上より、TAB182の発現異常はがんの浸潤を促進させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the functional involvement of TAB182, a binding partner of tankyrase poly(ADP-ribose) polymerase, in cell motility and invasion and its molecular mechanism. We found that TAB182 negatively regulates cancer cell motility and invasion. We identified X, a regulator of actin dynamics, as a novel TAB182-binding protein. Depletion of either TAB182 or X induced phosphorylation of cofilin, a destabilizer of the actin filaments, and enhanced cell motility and invasion. These phenomena were also induced by tankyrase overexpression and inhibited by a tankyrase inhibitor. In clinical settings, TAB182 expression was reduced in the invasive areas of pancreatic cancer. These observations suggest that aberrant expression of TAB182 may facilitate cancer cell invasion.

研究分野：腫瘍治療学

キーワード：ポリ(ADP-リボシル)化 細胞運動 アクチン がん 浸潤

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ポリ(ADP-リボシル)化研究の背景：ポリ(ADP-リボース)鎖 (PAR 鎖) は、肝核抽出液から合成される構造不明のポリアデニル酸として、研究開始当初の 50 年前に初めて報告された。この修飾鎖は負の電荷を持ち、電子顕微鏡で目視できるほど伸長するため、タンパク質に劇的な物性変化を与える。その結果として、PAR 鎖は細胞内のさまざまなイベントの制御に関与することが知られている。PAR 化を司る酵素 [poly(ADP-ribose) polymerase: PARP] の代表格である PARP1 は、DNA の修復や複製、転写などを制御する。PARP1 とがん抑制遺伝子 BRCA1 もしくは BRCA2 の働きを同時に抑制すると、「合成致死 (synthetic lethality)」と呼ばれる選択的な細胞毒性が生じるため、BRCA1 もしくは BRCA2 を欠損したがんに対する PARP 阻害剤の治験が国内外で実施されている (注：本研究課題着手後の 2014 年の年末、PARP 阻害剤オラパリブが、欧州および米国で卵巣がんに対する治療薬として承認された)。このことは、PAR 化の制御が疾患の治療につながることを示しており、同翻訳後修飾の生物学的意義をさらに詳細に理解し、これを新たな治療薬の開発に活かすことが期待されている。一方、本研究領域の課題として、PARP1 によって生成される PAR 鎖は不均一に岐分し、アミノ酸の厳密な修飾コンセンサス配列も不明であることから、PAR 化タンパク質の同定やその制御機構の解明には技術的困難が伴ってきた。

(2) タンキラーゼ結合タンパク質 TAB182：我々は、がん治療の分子標的として染色体末端のテロメアに着目してきた (Seimiya et al. EMBO J, 2000; Hirashima et al. MCB, 2013 他)。テロメアの短縮は細胞老化を導くが、がん細胞はテロメラーゼによりテロメアを再生するため、無限分裂が可能である。テロメラーゼ阻害剤はテロメア短縮を介して制がん効果を発揮するが (Seimiya et al. Mol Cancer Ther, 2002)、そこでさらに注目したのがタンキラーゼである。タンキラーゼはテロメア蛋白質 TRF1 を PAR 化してテロメアから遊離させ、テロメラーゼによるテロメア伸長を促す。タンキラーゼの阻害はテロメラーゼ阻害剤の制がん効果を増強させることから、新たな制がん戦略として有望である (Seimiya et al. Cancer Cell, 2005)。タンキラーゼは PARP1 と異なり、核のみならず細胞質にも豊富に存在するため、複数の機能を持つと予想される (Seimiya, Br J Cancer, 2006)。事実、我々は最近、タンキラーゼ結合タンパク質 TAB182/TNKS1BP1 (Seimiya et al. JBC, 2002) が細胞の運動能を制御することを見出し (未発表)、これらのタンパク質相互作用ががんの浸潤・転移能に影響を与えている可能性が見えてきた。

### 2. 研究の目的

本研究では、予備検討により細胞運動の制御に関わると想定された、タンキラーゼ結合タンパク質 TAB182/TNKS1BP1 (以下、TAB182 と表記する) に焦点を絞り、その機能制御の分子機構とがん形質への関与、タンキラーゼによる PAR 化の影響を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) アクチン再構成経路の変化：ヒト線維肉腫 HT1080 細胞および子宮頸がん HeLa 細胞から樹立した、タンキラーゼもしくは TAB182 の枯渇細胞および過剰発現細胞について、アクチン骨格形成を制御する Rho-ROCK-LIMK-コフィリン経路の挙動変化をウェスタンブロット法や免疫蛍光染色法などで調べた。

(2) タンキラーゼおよび TAB182 とアクチン骨格系をつなぐ因子：TAB182 の免疫沈降複合体の質量分析を行った。これにより同定された TAB182 結合タンパク質群が、TAB182 とアクチン骨格系のリンカー分子として働き、細胞運動の調節に寄与しているかどうかを調べた。さらに、タンキラーゼ PARP 活性が同リンカー分子のアクチンフィラメントからの解離などにどのような影響を与えるか、種々のタンキラーゼ過剰発現細胞株を用いて検証した。

(3) タンキラーゼの PAR 化による影響：PARP 不活性型のタンキラーゼ変異体などを用い、上述と同様の実験を行った。また、上述の細胞運動の亢進がタンキラーゼ阻害剤によって抑制されないか調べた。

(4) 培養細胞レベルの浸潤能の変化：タンキラーゼもしくは TAB182 の枯渇細胞および過剰発現細胞について、マトリゲル浸潤能を比較解析した。

(5) ヒト臨床がんの病理学的特性とタンキラーゼおよび TAB182 の発現様態の相関：がん研究会倫理審査委員会の承認のもと、書面で同意を得た臨床がん患者由来の組織切片を用い、腫瘍部位におけるタンキラーゼおよび TAB182 の発現を調べた (その準備検討として、市販のがん組織マイクロアレイを用い、高次解析の対象となるがん種の絞り込みを行った)。

### 4. 研究成果

(1) TAB182 による細胞の運動および浸潤の制御：HT1080 細胞および HeLa 細胞において、複数の異なる siRNA により TAB182 を枯渇させると、いずれも細胞運動が亢進すること、逆に TAB182 を過剰発現すると細胞運動が鈍化することを見出した。これと一致して、TAB182 を枯渇させ

た細胞ではマトリゲル浸潤能が向上し、TAB182を過剰発現させた細胞では同浸潤能が低下していることが確認された(図1)。これらの現象を説明する分子機構として、TAB182の発現の増減が、アクチン骨格形成を制御するRho-ROCK-LIMK-コフィリン経路の活性に影響を与えていることを突きとめた。

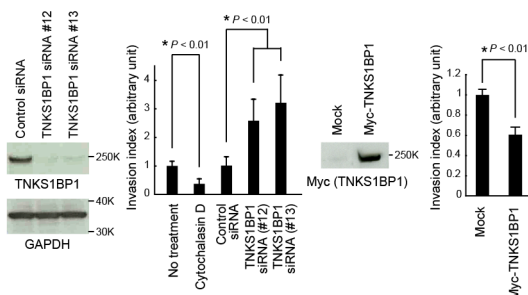


図1. TAB182/TNKS1BP1による細胞浸潤能の制御

すなわち、TAB182を枯渇させた細胞では、Rho-ROCK-LIMK経路依存的なコフィリン(=アクチンの脱重合促進因子)の不活性化リン酸化に伴うかたちで、アクチンフィラメントの形成が強化され、細胞運動能が亢進することが見出された。これと一致して、TAB182を枯渇させた細胞では、細胞運動に関与するフォーカル接着(focal adhesion)が亢進していることが確認された(図2)。

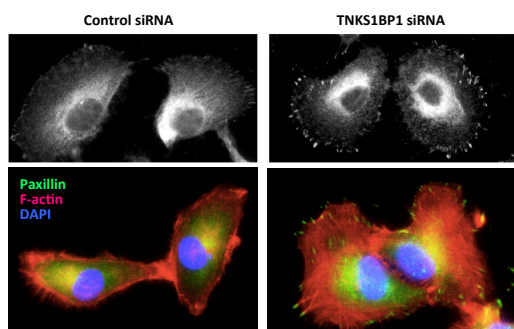


図2. TAB182/TNKS1BP1の枯渇によるフォーカル接着の増加

(2)TAB182とアクチンフィラメントの相互作用：TAB182の免疫沈降複合体について質量分析を行ったところ、アクチンフィラメントの動態制御因子Xが同定された。個別の免疫沈降実験を実施し、Xが細胞内でTAB182と複合体を形成していることを確認した。この結果と一致し、TAB182は細胞内でアクチンフィラメントと高い共局在性を示すことが免疫蛍光染色により確認された。siRNAによりXを枯渇させたところ、TAB182を枯渇させたときと同様に、コフィリンのリン酸化が観察された。さらに、この細胞の浸潤能が亢進していることも見出された。これらの結果から、TAB182はアクチン骨格分子に直接相互作用することにより、細胞運動・浸潤を制御することが強く示唆された。

(3)タンキラーゼPARP活性の関与：重要なことに、上述のコフィリンのリン酸化は、タンキラーゼの過剰発現によっても顕著に誘導された。このリン酸化はPARP不活性化型のタンキラーゼ変異体では誘導されず、タンキラーゼ特異的小分子阻害剤XAV939(Huang et al. Nature, 2009)によって抑制された。タンキラーゼは細胞質内と核内に分布することが知られているが、コフィリンのリン酸化はタンキラーゼを細胞質内で過剰発現させた場合にのみ認められ、核内に過剰発現させた場合は認められなかった。これらの結果と一致し、野生型のタンキラーゼを細胞質内に過剰発現させたときのみ、細胞浸潤の亢進が認められた。タンキラーゼは細胞内でTAB182と複合体を形成すること、試験管内でTAB182のPAR化修飾を行うことと合わせ、これらの結果はタンキラーゼによるTAB182のPAR化が細胞の運動能および浸潤能を制御する可能性を示唆している。

(4)がん病変におけるタンキラーゼおよびTAB182の発現：市販のさまざまな臨床臓器由来のがん組織マイクロアレイを用いてタンキラーゼおよびTAB182の発現を免疫組織染色で調べたところ、タンキラーゼの発現には有意な変化は認められなかったが、TAB182は膵がんで発現が低下している傾向が認められた。そこでさらに、がん研究会倫理審査委員会の承認のもと、書面で同意を得た膵がん患者由来の組織切片を精査した。その結果、膵がんの浸潤部においてTAB182の発現が有意に低下していることが明らかとなった。これらの結果より、TAB182の発現異常(低下)は細胞運動を亢進させ、がんの浸潤を促進させる可能性が示唆された。臨床がんにおけるTAB182の発現変化は転写レベルの制御によるものか、翻訳レベルもしくは翻訳後の安定性制御によるものかは今後の検討課題である。

以上の結果より、TAB182の発現異常(低下)が細胞運動を亢進させ、がんの浸潤については転移を促進する可能性が示唆された。がん転移に対する影響については、がん細胞のマウス尾静脈投与による肺転移モデルでの評価を実施したが、マウス体内投与後の細胞生着性に影響が生じている可能性が見出され、今回の成果からは除外した。今後は、本研究課題の成果を踏まえ、TAB182とタンキラーゼとの相互作用およびPAR化の直接的影響、がんの病態との関連についてさらに検討を進めたい。現在、タンキラーゼ阻害剤が主にWnt/ $\beta$ -カテニンシグナル経路の阻害剤として、非臨床レベルで開発されている。本研究成果は、タンキラーゼ阻害剤の新たな臨床応用の可能性を示唆するものである。

## 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 12 件)

- ① Seimiya H. Predicting risk at the end of the end: Telomere G-tail as a biomarker. *EBioMedicine* 2: 804-805 (2015), 査読有, DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.07.006
- ② 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: 909-920 (2015), 査読有, DOI: 10.1111/cas.12682
- ③ Mashima T, Soma-Nagae T, Migita T, Kinoshita R, Iwamoto A, Yuasa T, Yonese J, Ishikawa Y, Seimiya H. TRIB1 supports prostate tumorigenesis and tumor-propagating cell survival by regulation of endoplasmic reticulum chaperone expression. *Cancer Res.* 74: 4888-4897 (2014), 査読有, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3718
- ④ Ohishi T, Muramatsu Y, Yoshida H, Seimiya H. TRF1 ensures the centromeric function of Aurora-B and proper chromosome segregation. *Mol Cell Biol.* 34: 2464-2478 (2014), 査読有, DOI: 10.1128/MCB.00161-14
- ⑤ Migita T, Okabe S, Ikeda K, Igarashi S, Sugawara S, Tomida A, Soga T, Taguchi R, Seimiya H. Inhibition of ATP citrate lyase induces triglyceride accumulation with altered fatty acid composition in cancer cells. *Int J Cancer* 135: 37-47 (2014), 査読有, DOI: 10.1002/ijc.28652

[学会発表] (計 8 件)

- ① 清宮啓之、PARP ファミリー酵素を標的とする抗がん剤の開発、理研創薬・医療技術基盤プログラム第3回ワークショップ、2016年3月3日～4日、理化学研究所横浜キャンパス交流棟ホール(神奈川県横浜市)
- ② Yoshida H, Ohishi T, Muramatsu Y, Seimiya H. TNKS1BP1 regulates the actin filament dynamics and cancer cell invasion. 10th AACR-JCA Joint Conference on Breakthrough in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, 2016年2月16日～20日、Hawaii (USA)

- ③ 清宮啓之、ポリ ADP-リボシル化酵素タンキラーゼの多面的機能と創薬応用、BMB2015、2015年12月1日～4日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)
- ④ 大石智一、吉田喜香、村松由起子、清宮啓之、タンキラーゼ結合タンパク質 TAB182 はアクチン細胞骨格の再構成を介してがん細胞の浸潤を調節する、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日～10日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
- ⑤ 田中伯享、吉田喜香、村松由起子、杉本芳一、清宮啓之、大腸癌細胞株でのタンキラーゼ阻害剤に対する感受性規定因子、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日～10日、名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)
- ⑥ 大石智一、村松由起子、清宮啓之、タンキラーゼ結合タンパク質 TAB182 による細胞浸潤能の制御、第19回日本がん分子標的治療学会学術集会、2015年6月10日～12日、松山全日空ホテル(愛媛県松山市)
- ⑦ 清宮啓之、PARP 阻害剤をめぐる最近の話題、第18回日本がん分子標的治療学会学術集会、2014年6月25日～27日、仙台市情報・産業プラザ(宮城県仙台市)
- ⑧ 清宮啓之、大石智一、テロメアタンパク質 TRF1 による染色体分配制御、第73回日本癌学会学術総会シンポジウム、2014年9月26日～26日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

[図書] (計 1 件)

- ① 清宮啓之、PARP 阻害剤によるがん治療、日本臨牀社、日本臨牀 73: 1330-1335 (2015)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular\\_biotherapy/index.html](http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular_biotherapy/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清宮 啓之 (SEIMIYA, Hiroyuki)  
公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター分子生物治療研究部・部長  
研究者番号：50280623