

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：16401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893181

研究課題名(和文) 新たなp53の機能であるタンパク質合成の制御機構の解明と新規抗癌ターゲットの発見

研究課題名(英文) Analysis of p53 new function for protein synthesis and identification of new anti-cancer target

研究代表者

難波 卓司 (Takushi, Namba)

高知大学・教育研究部総合科学系複合領域科学部門・特任助教

研究者番号：10729859

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では癌抑制遺伝子p53が癌細胞における小胞体の機能制御に重要な役割を果たしていることを世界で初めて見出した。その制御機構としてp53の機能喪失によりIRE1の分解が抑制されることでその発現が増加し、IRE1/XBP1経路が活性化することで小胞体の機能が亢進していることが示唆された。また、マウス癌移植モデルにおいてIRE1阻害剤の投与により変異型p53移植癌の大きさは顕著に減少したがp53野生型移植癌の大きさはあまり抑制されなかった。以上、p53の機能喪失により活性化するIRE1/XBP1経路の阻害は、p53変異癌に対する選択的な抗癌剤のターゲットとして有望であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Altered regulation of ER stress response has been implicated in a variety of human diseases. Excessive ER function contributes to malignant phenotypes, such as chemoresistance and metastasis. Here we identified that the tumor suppressor p53 regulates ER function in response to stresses. We found that loss of p53 function activates the IRE1 /XBP1 pathway to enhance protein folding and secretion through upregulation of IRE1 and subsequent activation of its target XBP1. Moreover, IRE1 inhibitor suppressed protein secretion, induced cell death in p53-deficient cells, and strongly suppressed the formation of tumors by p53-deficient human tumor cells in vivo compared with those that expressed wild-type p53. Therefore, our data imply that the IRE1 /XBP1 pathway serves as a target for therapy of chemoresistant tumors that express mutant p53.

研究分野：分子生物学

キーワード：小胞体 p53 癌

1. 研究開始当初の背景

癌細胞はその増殖の早さから大量のエネルギーを必要としているため、エネルギー代謝経路は正常細胞と異なり、活性酸素等の細胞傷害物質が発生しにくい嫌氣的な解糖系が中心となっている。このエネルギー代謝経路の変化は、特に固形癌が低酸素、低栄養環境へ適応することを可能にしている。この癌細胞の生命維持に関わるエネルギー代謝機構を解明することは癌特異的に作用する抗癌剤開発につながると予想され、多くの研究が行われている (Willem *et al.*, *Nature Review Cancer*, 2011)。一方、癌細胞が増殖するためには産生したエネルギーを使用し、大量のタンパク質を合成する必要がある。タンパク質の合成は mRNA からの翻訳、新生タンパク質の折りたたみによる立体構造の形成、糖鎖などの修飾、そして適切な場所への輸送が主要な経路である。そしてこのステップのほとんどが小胞体で行われることから、癌細胞特異的に小胞体の機能を促進させる機構が存在し、小胞体の機能亢進が癌細胞の生育に重要であることが予想される (Ma *et al.*, *Nature Review Cancer*, 2008)。これまでにタンパク質の翻訳を行うリボソームの合成が癌細胞特異的な機構で亢進していることが報告されているが、小胞体におけるタンパク質合成の制御機構については癌細胞特異的なターゲットが発見されていないため、その研究は進んでいない (Murayama *et al.*, *Cell*, 2008)。

小胞体におけるタンパク質の合成はその質、量共に高度に管理されている。しかし、タンパク質の過剰な翻訳や固形癌が生育するような低栄養や低酸素のストレスによりタンパク質の折りたたみ、及び糖鎖修飾が阻害され、異常な構造を持つタンパク質が蓄積されてしまう。異常タンパク質は思いもよらない活性を持つことがあり細胞の癌

化や炎症の誘導に関与すると考えられている。そこで小胞体の機能を調節し、この異常タンパク質を取り除くために誘導されるのが小胞体ストレス応答である。小胞体ストレスセンサー(小胞体膜タンパク質)である IRE1、ATF6、及び PERK が活性化することでタンパク質の翻訳抑制、異常なタンパク質の分解、小胞体シャペロンの誘導によるタンパク質の折りたたみの促進を行うことで恒常性を維持しようとする。それでも恒常性が維持できない場合にアポトーシスが誘導される (Walter *et al.*, *Science*, 2011)。これまでに IRE1 経路の活性化、特に IRE1 が活性化する XBP1 により小胞体の容量を拡大し、機能を充実させることでより多くのタンパク質を合成できるように小胞体の機能を改善することが知られている (Sriburi *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 2004)。

一方、癌細胞における *ras* や *myc* などの癌遺伝子や *p53* や *Rb* などの癌抑制遺伝子の変異により誘導されるシグナル伝達因子、及び変異した遺伝子自身は癌特異的な創薬ターゲットとして有望である。この中でも特に *p53* は代表的な癌抑制遺伝子で DNA 損傷などのストレスを細胞が受けたとき転写因子として働き、細胞周期の停止と損傷の修復、及び遺伝子の変異を防ぐための細胞死を誘導することでゲノムの恒常性の維持に重要な役割を果たしている。

また *p53* は老化、エネルギー代謝やオートファジー制御などの様々な機能を有していることが報告されている (Levine *et al.*, *Nature Review Cancer*, 2009)。しかし、*p53* がどのような機構で小胞体におけるタンパク質の合成経路に影響を与えているかは全く分かっていない。

2. 研究の目的

癌細胞は活発に増殖するためエネルギー

を大量に産生し、必要なタンパク質を大量に合成している。このため癌細胞特異的なこの適応化のメカニズムの解明は、タンパク質合成阻害をターゲットにした新規抗癌剤の開発に重要であると考えられている。独自の予備実験の結果から、癌細胞で最も高頻度で変異がみられる癌抑制遺伝子 p53 がタンパク質の合成を制御しているという全く新しい可能性を見いだしている。そこで本研究では、p53 の新たな機能であるタンパク質合成の制御機構を小胞体の機能を調節する小胞体ストレス応答に注目して明らかにすることを目的にする。また p53 は癌細胞特異的に変異が見られるため本研究の結果から、癌細胞特異的なタンパク質合成阻害のターゲットの発見が期待できる。

3 . 研究の方法

本研究において p53 の新たな機能であるタンパク質合成の制御機構を小胞体の機能を調節する小胞体ストレス応答に注目して明らかにする。癌細胞は飢餓、低酸素といった小胞体ストレスに常にさらされ、小胞体ストレス応答により小胞体の機能が調節されていることが考えられる。そこでまず予備実験の結果をもとに、p53 が小胞体の大きさやタンパク質の折りたたみに重要な小胞体シャペロンの発現を変化させていることを確認する。そして、p53 による小胞体の制御機構を小胞体ストレス応答に関与するタンパク質に注目して解析を行う。具体的には小胞体の機能を亢進させることが示唆されている IRE1 経路に焦点を当て、p53 が IRE1 経路の活性化に与える影響、及び p53 による IRE1 の発現制御機構を解明する。

4 . 研究成果

まず癌特異的な癌抑制遺伝子の機能喪失に注目して小胞体の機能を調べたところ、p53 が癌細胞における小胞体の機能制御に重要な役割を果たしていることを見出した。野生型 p53 癌細胞と変異型 p53 癌細胞において小胞体ストレス応答に関与している種々の蛋白質の発現を比較したところ、IRE1 と活性型 XBP1 の発現が変異型 p53 癌細胞で顕著に増加していた。また、変異型 p53 癌細胞では蛋白質の分泌が促進され、小胞体ストレスによる細胞死も抑制されていることを発見した。次に p53 の機能喪失による小胞体機能の変化が IRE1 の発現増加に依存しているかを IRE1 阻害剤により IRE1 からのシグナル伝達を抑制することで調べた。IRE1 阻害剤の処理により、変異型 p53 細胞で増加していた活性型 XBP1 の発現、蛋白質の分泌、及び小胞体ストレスによる細胞死への耐性化のすべてが抑制された。一方で変異型 p53 細胞では IRE1 のプロテアソームによる分解が抑制され IRE1 蛋白質の安定性が増加することも見出した。さらにこれは、E3 ユビキチンリガーゼである synoviolin1 による IRE1 のユビキチン化が阻害された結果であることも示唆した。以上の結果から p53 機能喪失により IRE1 の分解が抑制されることでその発現が増加し、IRE1/XBP1 経路が活性化すること、及びこの経路の活性化が p53 機能喪失による小胞体の機能亢進を誘導していることが示唆された。変異型 p53 癌細胞は悪性度の高い表現型を示し、特に核酸合成を阻害するような抗癌剤に対して耐性を示すことが知られている。そこで IRE1 阻害剤は p53 変異癌に選択的に高い毒性を示す新たな抗癌剤として有望ではないかと考え、マウス癌移植モデルを用いて検討を行った。変異型 p53 移植癌は野生型 p53 のものと比較して増殖が

速く、endpoint における大きさも増大していた。IRE1 阻害剤の投与により変異型 p53 移植癌の大きさは顕著に減少したが p53 野生型移植癌の大きさはあまり抑制されなかった。この結果から、変異型 p53 癌細胞の悪性化の一部は IRE1/XBP1 経路の活性化によること、及び IRE1 阻害剤は変異型 p53 癌細胞に選択的な強い抗癌作用を示すことが示唆された。以上本研究により、p53 は IRE1 の発現調節を行うことで小胞体の機能を制御しているという新たな機能を発見した。また、p53 の機能喪失により活性化する IRE1/XBP1 経路の阻害は、特に悪性度の高い p53 変異癌に対する選択的な抗癌剤のターゲットとして有望であることが示唆された。

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 7 件)

- (1) Namba T. Regulation of endoplasmic reticulum functions. *Aging* (Albany NY). 2015; 7, 901-902. (査読無し)
- (2) Byun S, Namba T and Lee SW. Losing p53 loosens up ER-stress. *Aging* (Albany NY). 2015; 7, 895-896. (査読無し)
- (3) Kakigano, A., Tomimatsu, T., Mimura, K., Kanayama, T., Fujita, S., Minato, K., Kumasawa, K., Taniguchi, Y., Kanagawa, T., Endo, M., Ishihara, T., Namba, T., Mizushima, T., and Kimura, T. Drug Repositioning for Preeclampsia Therapeutics by In Vitro Screening: Phosphodiesterase-5 Inhibitor Vardenafil Restores Endothelial Dysfunction via Induction of Placental Growth Factor. *Reproductive sciences*. 2015; 22, 1272-1280. (査読有り)
- (4) Hiraki, M., Hwang SY., Cao S., Ramadhar TR., Byun, S., Yoon, KW., Lee, KH., Chu, K., Gurkar, AU., Kolev, V., Zhang, J., Namba, T., Murphy, ME., Newman, DJ., Mandinova, A., Clardy, J., and Sam W. Lee. Small-Molecule Reactivation of Mutant p53 to Wild-Type-like p53 through the p53-Hsp40 Regulatory Axis. *Chemistry & Biology*. 2015; 22, 1206-1216. (査読有り)
- (5) Namba, T *, Chu, K., Kodama, K., Byun, S., Yoon, KW., Hiraki, M., Mandinova, A., and Sam W. Lee*. Loss of p53 enhances the function of the endoplasmic reticulum through activation of the IRE1 α /XBP1 pathway. *Oncotarget* 2015; 24, 19990-20001 (* **Corresponding author**) (priority research paper に選出) (カナダの医学・生物学系情報 サイト Global Medical Discovery(<http://globalmedicaldiscovery.com>) [ISSN 1929-8536] の重要科学論文 (Key Scientific Articles) の1つに選ばれた。) (査読有り)
- (6) Namba, T *, Kodama, R., Moritomo, S., Hoshino, T., and Mizushima, T. Zidovudine, an anti-viral drug, resensitizes gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells to gemcitabine by inhibition of the Akt-GSK3 β -Snail pathway. *Cell death & disease* 2015; 6, e1795 (* **Corresponding author**) (査読有り)
- (7) Namba, T *, and Kodama, R. Avarol induces apoptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma cells by activating PERK-eIF2 α -CHOP signaling. *Marine*

drugs 2015; 13, 2376-2389 (*
Corresponding author) (査読有り)

〔学会発表〕(計 3件)

(1) 難波卓司

「p53 の機能喪失は IRE1/XBP1 経路の活性化を誘導し、癌細胞における小胞体の機能を亢進させる」第9回 臨床ストレス応答学会 鶴殿平一郎 岡山大学医学部 2014/11/1-2 (口頭発表)

(2) 難波卓司

「p53 の機能喪失は IRE1/XBP1 経路の活性化を誘導し、癌細胞における小胞体の機能を亢進させる」日本薬学会第135年会 小林資正 神戸 2015/3/25-28 (口頭発表)

(3) 難波卓司

「癌抑制遺伝子 p53 による小胞体の機能制御機構の解明」第87回日本生化学会大会 米田悦啓 京都 2014/10/15-18 (ポスター発表)

〔図書〕(計 0件)

〔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

研究室のホームページ

<http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~t-namba/>

新聞報道

2016年1月15日 高知新聞

高知大学プレスリリース

<http://www.kochi-u.ac.jp/information/2016010600039/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

難波 卓司 (NAMBA Takushi)

高知大学・教育研究部総合科学系・
特任助教

研究者番号：10729859

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し