

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05019

研究課題名(和文) 口腔がん克服に向けた代謝ストレスシグナル制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of the mechanisms of metabolic stress signal for the treatment of oral cancer

研究代表者

西頭 英起 (Nishitoh, Hideki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：00332627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔領域で頻発する固形がんは、十分な血管新生がともなわないため低酸素・低グルコースストレス状態にあり、がん細胞は代謝要求性がきわめて高い状態にある。このようなストレス下では、オートファジーが細胞増殖に貢献していると考えられる。さらに、低栄養は不良タンパク質蓄積をまねき、小胞体ストレス誘導性の生存・増殖シグナルが発信される。ストレス耐性状態にある口腔がんを克服する一つの方策として、オートファジーや小胞体から発信される生存シグナルを抑制し、強い小胞体ストレスによる細胞死シグナルを惹起することが有効であると考えられる。本研究では、がん細胞における代謝ストレスシグナルを解明した。

研究成果の概要(英文)：Cancers that occur frequently in the oral cavity are in a state of low oxygen / low glucose stress because there is not sufficient angiogenesis, and the cancer cells are in a very high metabolic requirement. Under such stress, autophagy is thought to contribute to cell proliferation. In addition, malnutrition leads to accumulation of bad proteins and ER stress-induced survival / proliferation signals are transmitted. One way to overcome oral cancers in a stress tolerant state is to suppress the survival signal transmitted from autophagy or the endoplasmic reticulum and to induce a cell death signal due to strong endoplasmic reticulum stress. In this study, the metabolic stress signal in cancer cells was elucidated.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス

1. 研究開始当初の背景

著しいスピードで増殖をくり返す頭頸部固形がん細胞は、十分な血管新生が追いつかないため、低酸素あるいは低グルコースといった代謝ストレスのもとでの生存を余儀なくされている。また、がん細胞はその増殖を維持するため、アミノ酸、糖質、脂肪酸などをより多く必要とする。すなわち、がん細胞は代謝要求性がきわめて高い状態にある。オートファジーは、いったん腫瘍化してしまった細胞においては栄養源を供給することで代謝要求性をみだしがん増殖に貢献している。口腔がんのみならず、他のがん（例えば膵がんなど）でも、オートファジーが恒常的に亢進したオートファジー依存状態になっていることが知られている。一方で、細胞の栄養飢餓状態には、タンパク質の構造異常を伴う小胞体ストレスが惹起され、小胞体ストレスセンサーの活性化を介して、細胞生存シグナルが発信される。従って、固形がんにおいてはオートファジーと小胞体から発信される生存シグナルが、がん増殖に不可欠なファクターとなっていると考えられる。しかし、その制御メカニズムに関する報告は皆無である。

2. 研究の目的

本研究では、口腔がんにおける代謝ストレスから発信される2つのオルガネラストレス（オートファジーと小胞体）を制御することで、全く新たな口腔がん治療戦略を探ることを目的とした。具体的には、がん細胞における代謝ストレスシグナルを解明し、その分子標的に基づき、増殖シグナルを細胞死シグナルへと変換させることで新規口腔がん治療法開発に繋げることを目指した。

3. 研究の方法

小胞体膜を起点とした、あるいは小胞体ストレス時に起こるオートファジー誘導については近年多くのことが示されている。一方

で、Atgファミリー分子による小胞体ストレスシグナルの制御については、我々が世界に先駆けて初めて提唱するものである。そこで本研究では、はじめにその詳細なメカニズムを明らかにすることとした。その分子基盤に基づき、「生存・増殖 細胞死」の細胞応答制御を可能にする方策を細胞レベルで見出し、最終的には扁平上皮がんマウス移植実験により、個体レベルで Atg12/Atg5 -IRE1 α 結合阻害の有効性を検証した。具体的には下記のとおりである。

Atg12/Atg5 -IRE1 結合に必要な不可欠な最短アミノ酸配列をマッピングし、この結合を *in vitro*・*in vivo* で特異的に阻害する技術を確認した。

Atg12/Atg5 のオートファジーでの役割を阻害せず、小胞体ストレス依存的生存シグナルを選択的阻害することで、扁平上皮がん細胞死を誘導することを低酸素・低栄養培養条件で検証した。

ヌードマウスを用いた扁平上皮がん移植モデル実験により、Atg12/Atg5-IRE1 結合阻害によるがん増殖病態への効果を検証した。

4. 研究成果

Atg12/Atg5-IRE1 結合に必要な不可欠な最短アミノ酸配列の同定

Atg12/Atg5 がおよそ 200 アミノ酸から成る IRE1 キナーゼ領域のどの領域に、また IRE1 に直接結合する Atg12 側の結合領域をマッピングし、結合に不可欠な最短アミノ酸配列を同定した。

Atg12/Atg5-IRE1 結合を阻害する分子基盤の開発

細胞膜透過性結合阻害ペプチドの開発：
Atg12 および IRE1 側のそれぞれの結合領域ペプチドを、膜透過性配列（TAT 配列やオリゴアルギニンなど）を付加することで、Atg12/Atg5-IRE1 結合を競合的に阻害する

結合阻害ペプチドを合成した。

IRE1 活性制御メカニズム

Atg12/Atg5-IRE1 結合阻害ツールを用いて、その活性制御機構を分子レベルで明らかにした。これにより、新たながん治療の分子基盤開発が可能となった。

Atg12/Atg5-IRE1 結合阻害ベクターの開発

in vitro, in cell, in vivo の実験系により、扁平上皮がん細胞へ発現させ細胞内在性 Atg12/Atg5-IRE1 結合レベルおよび XBP1、NF- κ B、JNK 経路の活性化を検証した結果、オートファジーと小胞体ストレスの細胞生存・増殖と細胞死誘導の細胞応答バランスにおける役割を明らかにした。

スクリーニング系の開発

上記の効果が発揮された結合阻害を抗がん剤開発の分子標的とすべく、化合物ライブラリースクリーニングと siRNA ライブラリースクリーニングのアクセシ系を確立し、探索を実施し、標的分子の獲得に至った。

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 8 件)

Murao N, Nishitoh H: Role of the unfolded protein response in the development of central nervous system. *J. Biochem.* 162:155-162 (review article) (2017) 査読あり

Imamura K, Izumi Y, Watanabe A, Tsukita K, Woltjen K, Yamamoto T, Hotta A, Kondo T, Kitaoka S, Ohta A, Tanaka A, Watanabe D, Morita M, Takuma H, Tamaoka A, Kunath T, Wray S, Furuya H, Era T, Makioka K, Okamoto K, Fujisawa T, Nishitoh H, Homma K, Ichijo H, Julien JP, Obata N, Hosokawa M, Akiyama H, Kaneko S, Ayaki T, Ito H, Kaji R, Takahashi

R, Yamanaka S, Inoue H: The Src/c-Abl pathway is a potential therapeutic target in amyotrophic lateral sclerosis. *Sci. Transl. Med.* 9:eaaf3962 (2017) 査読あり

Moritake H, Obara M, Saito Y, Kashimada A, Takagi M, Funakoshi-Tago M, Fukuyama T, Yoshioka M, Inoue A, Komatsu H, Nishitoh H, Kataoka H, Nuno H: A mouse model reveals that Mfsd2a is critical for unfolded protein response upon exposure to tunicamycin. *Hum. Cell* 30:88-97 (2017) 査読あり

Fujisawa T, Takahashi M, Tsukamoto Y, Yamaguchi N, Nakoji M, Endo M, Kodaira H, Hayashi Y, Nishitoh H, Naguro I, Homma K, Ichijo H: The ASK1-specific inhibitors K811 and K812 prolong survival in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 25:245-253 (2016) 査読あり

Satrimafitrah P, Barman HK, Ahmad A, Nishitoh H, Nakayama T, Fukagawa T, Takami Y: RbAp48 is essential for viability of vertebrate cells and plays a role in chromosome stability. *Chromosome Res.* 24:161-173 (2016) 査読あり

Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T: Paired box gene 5 isoforms A and B have different functions in transcriptional regulation of B cell development-related genes in immature B cells. *Microbiol. Immunol.* 59:426-431 (2015) 査読あり

り

Kikuchi H, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nakayama M, Takami Y, Nishitoh H, Nakayama T: Lack of GCN5 remarkably enhances the resistance against prolonged endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through up-regulation of Bcl-2 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463:870-875 (2015) 査読あり

Kikuchi H, Nakayama M, Kawai C, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T: The histone acetyltransferase p300/CBP-associated factor acts as an effective suppressor of secretory immunoglobulin synthesis in immature B cells. *Microbiol. Immunol.* 59:243-247 (2015) 査読あり

[学会発表](計 5件)

西頭英起:第90回日本薬理学会年会 "小胞体品質管理の破綻による神経変性疾患の分子メカニズムと創薬標的 Molecular mechanism and therapeutic target of neurodegenerative diseases triggered by the dysfunction of ER quality control" オーガナイザ 2017.3.15-17 長崎市(長崎)

Hisae Kadowaki, Hideki Nishitoh : EMBO Conference 学会 "Molecular mechanism of newly synthesized protein degradation in ER stress-induced preemptive quality control" ポスター発表 2016.10.23-27 ジローナ(スペイン)

西頭英起 : 第 89 回日本生化学会大会 Derloin ファミリーを介した新規小胞体品質管理機構 口頭発表 2016.9.25-27 仙台市(宮城)

Hideki Nishitoh : 新生鎖の生物学国際会議 Structural and mechanistic basis of the protein disulfide bond formation networks in mammalian cells 2016.9.1-3 河口湖(山梨)

西頭英起:第68回日本細胞生物学会大会 "小胞体の予防的品質管理における新生タンパク質の分解機構 Molecular mechanism of ER stress-induced preemptive quality control" シンポジウム 2016.6.15-17 京都市(京都)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

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

西頭 英起 (NISHITOH, Hideki)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号: 00332627

(2) 研究分担者

高雄 啓三 (TAKAO, Keizo)
富山大学・医学部・教授
研究者番号：80420397

(3) 連携研究者

加藤 裕紀 (KATO, Hironori)
宮崎大学・医学部・特任助教
研究者番号：40610283

(4) 研究協力者

()