

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07232

研究課題名(和文) がん特異的なROS除去機能の阻害による新規がん抵抗性の獲得

研究課題名(英文) Inhibition of novel cancer specific antioxidant regulation promotes anticancer function

研究代表者

横山 隆志 (YOKOYAMA, Takashi)

山梨大学・大学院総合研究部・特任助教

研究者番号：00535833

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：CSN複合体のサブユニットであるCSN5は、ユビキチン化の制御などを介して様々な細胞機能に関与している。近年ではCSN5が様々ながんにおいて発現上昇していることが報告されているが、私達はこれまでの研究から、CSN5が白血球やがんにおいて小複合体を形成し、がんの進展や悪性化に関与する可能性を明らかにしてきた。本研究結果から、CSN5が複数の代謝関連タンパク質と相互作用し、標的タンパク質の修飾や局在制御を介してがん細胞の生存に関与することを明らかにした。さらにCSN5はTGF- $\beta$ /SMAD2により発現誘導されることを明らかにし、TGF- $\beta$ によるがんの悪性化において重要な機能を持つことが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果からCSN5のがんにおける重要性が明らかになり、分子標的として治療や診断への応用が期待できる。また、本研究で作製した機能阻害ペプチドは直接取り込ませることにおいても増殖抑制が実証されたことから、このペプチドのノックインマウスを作製し解析することで、がん予防モデルとしての応用も可能であることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：CSN5 is a subunit of the CSN complex and it plays crucial roles in several cellular functions as a regulator of ubiquitination. According to recent studies, CSN5 expression is up-regulated in several cancer and leukemia patient cases, and we have previously reported that CSN5 promotes tumorigenesis. In this study, we have identified that CSN5 interacts with several metabolism-related proteins and it regulates their protein modification and localization. Our study also indicates that TGF- $\beta$  induces CSN5 mRNA via SMAD2, suggesting CSN5 is important for TGF- $\beta$ /SMAD-mediated tumor progression.

研究分野：腫瘍学

キーワード：がん がん代謝 ROS CSN5

## 1. 研究開始当初の背景

多くのがん細胞では増殖を維持するために代謝が亢進しており、それに伴って細胞内 ROS (Reactive oxygen species, 活性酸素種) 濃度が上昇している。ROS は DNA ダメージを引き金としたゲノム不安定性の誘導や、ROS に応答する下流シグナルの活性化により、がん細胞には有利に働くと考えられている。一方で過剰な ROS 濃度は細胞死を誘導するため、がん細胞は抗酸化に働くタンパク質の発現上昇などによる調節機能を獲得し、このチェックポイント機能を回避している。このため、がん特異的な ROS 調節機能を阻害することにより、がん細胞にのみ細胞死を誘導することが可能であると考えた。

私達はこれまでの研究において、CSN 複合体の第 5 サブユニットである CSN5 のがんにおける機能解析を行ってきた。私達が作製した CSN5 のトランスジェニックマウスは骨髄増殖性疾患を自然発症し、一方で CSN5 をコンディショナルノックアウトすると、活性型 Ras/p53-null によって誘導される腫瘍形成を著しく抑制した。私達はこの分子メカニズムとして、CSN5 が白血病細胞やがん細胞特異的に CSN 複合体とは別の複合体 (CSN5 小複合体) を形成することを明らかにした。さらに私達は CSN5 のタンパク質結合を阻害する CSN5 の阻害ペプチドを作製した、この阻害ペプチドを活性型 Ras でトランスフォームした細胞に発現させると、細胞増殖の停止や腫瘍形成の抑制が見られた。本研究ではがん細胞の生存における CSN5 の機能解析と、これを標的としたがんの予測・予防・治療への応用を目的とした。

## 2. 研究の目的

### (1) CSN5 小複合体の形成メカニズムと機能の解明

CSN5 の発現誘導機構や CSN5 と相互作用するタンパク質を探索し、CSN5 小複合体の形成メカニズムを調べる。さらに CSN5 による標的タンパク質の機能調節について調べることで、がんにおける CSN5 小複合体の機能を明らかにする。

### (2) CSN5 阻害ペプチドを用いたがんの治療・予防への応用

CSN5 のタンパク質相互作用を阻害するペプチドによる、がん細胞の増殖や生存への影響について検証する。将来的にはペプチド薬や、ペプチドのノックインによるがん予防マウスモデルへの応用を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) CSN5 と相互作用するタンパク質の探索

マイクロアレイ解析データを公的データベース GEO (Gene Expression Omnibus) から取得し (GSE26485)、ヒトがん細胞株において CSN5 をノックダウンすることにより発現量の変化する遺伝子群を GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) によって解析した。この結果を元に、すでに報告されている CSN5 の結合タンパク質候補から代謝制御に関与すると考えられるタンパク質を複数ピックアップした。これらの遺伝子をクローニングして発現ベクターに組み込み、GST pull-down assay と免疫共沈実験により CSN5 との相互作用を調べた。さらにこれらの標的タンパク質を CSN5 と共発現させて免疫蛍光染色を行い、共焦点顕微鏡でデータを取得して、標的タンパク質の局在変化を FIJI/ImageJ により解析した。

## (2) CSN5 の発現誘導機構の解明

RNA-Seq データを公的データベース GEO から取得し、TGF- $\beta$  刺激によって発現が変動する遺伝子群について用いたクラスタリング解析と GSEA による解析を行った。同様に SMAD2/3 の ChIP-Seq 解析データ (GSE51510) を取得し、IGB (Integrated Genome Browser) および R (ChIP Peak anno パッケージ) により SMAD2/3 が結合する近傍遺伝子の探索を行った。ヒト肺がん細胞株 A549 細胞において、CRISPR Double Nickase によって SMAD2 KO および SMAD3 KO 細胞を製作し、TGF- $\beta$  (1 ng/ml) 刺激後の CSN5 mRNA 発現量を Real-Time PCR によって解析した。

## (3) CSN5 阻害ペプチド

細胞膜透過ペプチドである Antennapedia を付加した GST-CSN5 阻害ペプチドを大腸菌に発現させ、Glutathione Sepharose ビーズを用いて CSN5 阻害ペプチドの組換えタンパク質を精製した。この CSN5 阻害ペプチドをヒト胎児腎細胞株 HEK293T 細胞に添加し、24~72 時間後にトリパンブルー染色により生細胞数と死細胞数のカウントを行った。

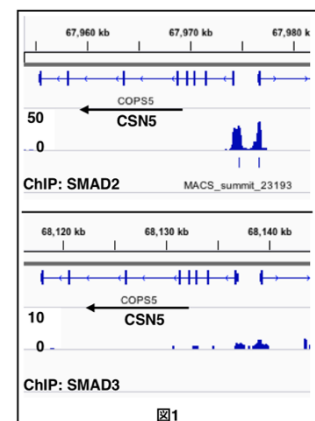
## 4. 研究成果

### (1) CSN5 によるがん特異的な ROS 調節機能の解析

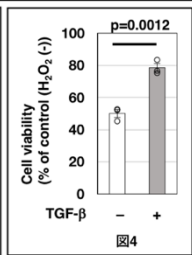
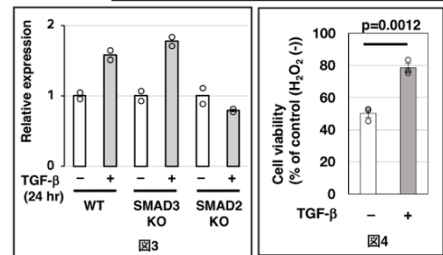
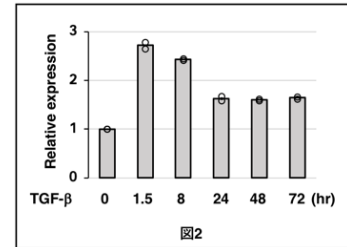
がんにおける CSN5 の機能予測を行うため、公的データベースからヒトがん細胞を用いたマイクロアレイ解析データを取得し、ヒト肝がん細胞株で CSN5 のノックダウンにより発現が変動する遺伝子群について GSEA による解析を行った。私達の先行研究でも明らかにされたように、この解析から CSN5 のノックダウンによって細胞周期関連の遺伝子群の発現が変動していた。さらに酸化リン酸化反応やペルオキシソーム関連遺伝子の発現変動が見られたことから、CSN5 が細胞内の酸化ストレス制御に関与する可能性が考えられた。そこですでに報告されている CSN5 結合タンパク質候補の中から代謝制御に関する 8 個の遺伝子をクローニングし、GST pull-down assay と免疫共沈実験によりいずれも CSN5 と相互作用することを明らかにした。さらにマウス線維芽細胞株 NIH3T3 細胞に CSN5 とこれらの標的遺伝子を共発現させて免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した結果、複数の標的タンパク質については CSN5 の導入により細胞質に共局在していた。また、標的タンパク質の 1 つは CSN5 存在下でタンパク質修飾を受けることが明らかになった。以上の結果から CSN5 は複数の代謝関連タンパク質と相互作用し、タンパク質修飾の足場としての機能や、局在制御を介して細胞内 ROS 濃度の調節に関与する可能性が示された。

### (2) CSN5 の発現誘導メカニズムの解析

CSN5 は多くのがんにおいて発現上昇していることが報告されているが、その発現誘導のメカニズムは明らかにされていなかった。私達は公的データベースから ChIP-Seq 解析データを取得し、CSN5 の発現誘導に関わる転写因子の探索を行った結果、SMAD2 が CSN5 の転写開始点上流に結合することを明らかにした (図 1)。一方で SMAD2 と同様に TGF- $\beta$  で活性化される SMAD3 は結合が見られなかった。そこで実際にヒト肺がん細胞株 A549 細胞に TGF- $\beta$  刺激を行ったところ、1.5 時間後から CSN5 の mRNA の発現量が 3 倍



程度上昇した (図 2). さらにゲノム編集により作製した SMAD2 ノックアウト細胞では TGF- $\beta$  刺激による発現上昇は見られなくなったが, SMAD3 をノックアウトした細胞では影響がなかった (図 3). TGF- $\beta$ /SMAD 経路は多くのがんにおいて悪性化に関与しており, EMT (上皮間葉転換) や細胞の運動性・浸潤能の亢進に加え, 近年の研究から酸化ストレスへの耐性にも関与することが報告されている. 私達の研究においても, A549 細胞に TGF- $\beta$  を前処理しておくことで過酸化水素の添加による増殖抑制に対して抵抗性を示したことから (図 4), CSN5 が TGF- $\beta$ /SMAD2/CSN5 を介した新たな酸化ストレス耐性機能に関与する可能性が考えられた.



### (3) CSN5 阻害ペプチドによる増殖停止の誘導

私達は先行研究において, 活性型 Ras 導入細胞に CSN5 阻害ペプチドを発現させることで細胞増殖を停止させることを明らかにしていた. この結果を踏まえ, 本研究では CSN5 阻害ペプチドに細胞膜透過配列を付加し, 細胞に直接取り込ませることを試みた. 大腸菌に発現させた組み換えタンパク質を精製し, HEK293T 細胞に添加して細胞内への取り込みを免疫ブロッティングで確認した. HEK293T 細胞に添加して 24~72 時間後の細胞数をカウントした結果, コントロールペプチドは細胞増殖に影響を与えなかったが, CSN5 阻害ペプチドを添加した細胞はコントロールと比較して細胞数が約 40%程度であった. 一方でトリパンブルー染色による死細胞の増加は見られず, CSN5 阻害ペプチドを発現させた場合と同様に細胞増殖の停止を誘導することが示された. この細胞膜を透過する CSN5 阻害ペプチドは, ヒト慢性骨髄性白血病細胞株 K562 細胞など遺伝子導入が困難な細胞にも有用であることが考えられた. さらに CSN5 阻害ペプチドのがん細胞に対する増殖抑制が改めて実証されたことから, このペプチドのノックインマウスを作製し解析することで, がん予防モデルとしての応用が可能であることが考えられた.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ikuko Nakamae, Tsumoru Morimoto, Hiroki Shima, Masafumi Shionyu, Hisayo Fujiki, Noriko Yoneda-Kato, Takashi Yokoyama, Shigehiko Kanaya, Kiyomi Kakiuchi, Tsuyoshi Shirai, Edy Meiyanto, Jun-ya Kato	4. 巻 24
2. 論文標題 Curcumin derivatives verify the essentiality of ROS upregulation in tumor suppression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 E4067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/molecules24224067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Beni Lestari, Ikuko Nakamae, Noriko Yoneda-Kato, Tsumoru Morimoto, Shigehiko Kanaya, Takashi Yokoyama, Masafumi Shionyu, Tsuyoshi Shirai, Edy Meiyant, Jun-ya Kato	4. 巻 9
2. 論文標題 Pentagamavunon-1 (PGV-1) inhibits ROS metabolic enzymes and suppresses tumor cell growth by including M phase (prometaphase) arrest and cell senescence.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 14867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-51244-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yonika Arum Larasati, Noriko Yoneda-Kato, Ikuko Nakamae, Takashi Yokoyama, Edy Meiyanto, and Jun-ya Kato	4. 巻 8
2. 論文標題 Curcumin targets multiple enzymes involved in the ROS metabolic pathway to suppress tumor cell growth	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci.Rep.	6. 最初と最後の頁 2039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-20179-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Beni Lestari, Ikuko Nakamae, Noriko Yoneda-Kato, Takashi Yokoyama, Jun-ya Kato
2. 発表標題 A Novel Curcumin Analog Inhibits Tumorigenesis through Prometaphase Arrest and Antioxidative Interference.
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ikuko Nakamae, Noriko Kato, Takashi Yokoyama, Edy Meiyanto, Jun-ya Kato.
2. 発表標題 Tumor suppression by controlling intercellular levels of ROS through ROS metabolic enzymes by curcumin derivatives.
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

奈良先端科学技術大学院大学 腫瘍細胞生物学研究室（加藤研究室）  
<https://bsw3.naist.jp/kato/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 順也  (KATO Jun-ya)  (00273839)	奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・教授    (14603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------