

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05510

研究課題名（和文）核小体タンパク質NPM1によるがん抑制因子p27の新規機能制御機構の解析

研究課題名（英文）A novel regulatory mechanism of the function of tumor suppressor p27 by a nucleolar protein NPM1.

研究代表者

千葉櫻 拓（CHIBAZAKURA, TAKU）

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：30227334

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：サイクリン依存性キナーゼ阻害因子・がん抑制因子であるp27の機能制御の破綻はがん化の要因の一つである。本研究では、がんを高発現しているp27相互作用因子NPM1がp27を核小体にトラップすることでその機能を抑圧し、また別のがん抑制因子ARFがNPM1を抑制することでp27機能を回復させることを明らかにした。また、主要ながん抑制因子p53の欠損下でp27の分解が亢進することを新規に見出し、p53が2つのp27分解経路を負に制御することを示唆した。さらに、がん細胞におけるp27の誘導発現が、細胞増殖以外に細胞の遊走能・浸潤能・転移能といったがんの悪性化に寄与する要因を抑制することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で示されたNPM1によるp27機能制御機構は、p27を十分量発現していながら増殖が正常に制御されないがん細胞におけるp27の機能抑圧機構とともに、その抑圧を打ち消すがん抑制因子ARFの重要性を示唆するものとして新規性・学術的意義ともに高い。また、がん細胞でNPM1-p27相互作用を阻害することでp27機能を回復させるような新規抗がん戦略への応用も期待され、社会的意義も高い。さらに、最も主要ながん抑制因子p53によるp27安定化機構、およびp27が転移に関わるがん悪性化要因を抑制する機能を新規に見出したことは、p27を軸とするがん抑制ネットワークの理解に大きく貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：The dysfunction of the cyclin-dependent kinase inhibitor/tumor suppressor p27 is one of the contributing factors to carcinogenesis. In this study, we elucidated that NPM1, a p27-interacting factor highly expressed in cancers, suppresses p27 function by trapping it in the nucleolus. Additionally, we revealed that another tumor suppressor, ARF, restores p27 function by inhibiting NPM1. We also discovered that p27 protein degradation is accelerated in the absence of the major tumor suppressor p53 and suggest that p53 negatively regulates two pathways of p27 degradation. Furthermore, we demonstrated that induction of p27 expression in cancer cells not only inhibits cell proliferation but also suppresses factors contributing to cancer malignancy, such as cell migration, invasion, and metastatic potential.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞増殖制御 p27 NPM1 ARF p53 タンパク質分解 細胞遊走・浸潤能 がん転移

1. 研究開始当初の背景

動物細胞周期の中心制御因子サイクリン (Cyc) -サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体に結合してキナーゼ活性を抑制する CDK 阻害因子の 1 つ p27^{Kip1} は、細胞外シグナルによる細胞増殖制御等において重要な役割を果たしている。また、p27 欠損マウスが腫瘍形成・がん誘発率上昇等の表現型を示し¹⁾、多くのがんにおいて p27 発現量低下と予後不良に強い相関が見られる²⁾ことから、p27 はがん抑制因子として知られており、その機能制御の破綻はがん化を促進する要因の一つと考えられている。p27 の量的制御、特に p27 タンパク質分解系については、ユビキチンリガーゼ SCF/Skp2³⁾と KPC1、²⁴⁾による分解経路が示されており、がん細胞ではこれらの亢進と p27 発現量低下との相関が多く見出されている。一方、p27 を十分量発現しているがん細胞もあること⁵⁾から p27 の質的制御機構も示唆されるが、殆ど解明されていない。

申請者は、がんに関連する p27 機能の質的制御機構を解析する端緒として、p27 誘導発現下で細胞増殖を検定したところ、正常細胞では増殖が停止するが、がん細胞株では増殖が停止しないことを見出した。また、p27-CycA 相互作用を生細胞内で検出する評価系により種々のヒトがん細胞株で検証した結果、相互作用の弱い細胞株が多く示され、p27-CycA 相互作用を阻害する因子の存在が示唆された⁶⁾。そこで p27 特異的相互作用因子を網羅的に探索し、がんで高発現する新規 p27 相互作用因子として nucleophosmin 1 (NPM1) を分離した。正常細胞での NPM1 過剰発現・がん細胞での NPM1 発現抑制は、p27 誘導発現下での増殖停止をそれぞれ抑圧・回復し、さらに担がんマウスにおいて、NPM1 を発現抑制した腫瘍の増殖が p27 誘導発現によって顕著に抑制される (図 1) ことから、NPM1 は新規 p27 機能抑圧因子であると示された⁷⁾。

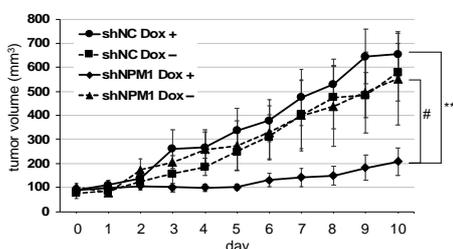


図1 マウス移植腫瘍における NPM1 ノックダウンによる p27 の増殖抑制機能の回復 (文献7)
ドキシサイクリン (Dox) 誘導性 p27 発現系を保持する HT-1080 細胞株に NPM1 標的 shRNA (shNPM1) またはコントロール shRNA (shNC) を導入し、マウスに移植後、Dox 投与 (+) 非投与 (-) 下での腫瘍増殖を計測した。 ** $p < 0.01$, # $0.05 < p < 0.1$

NPM1 は核小体タンパク質であり、p27 を核小体に隔離して機能を抑圧することが示唆されている⁷⁾が、NPM1-p27 相互作用の分子機構は全く未知である。また、NPM1 の発現は別のがん抑制因子 ARF によって抑制される⁸⁾ことから、ARF-NPM1-p27 制御経路の存在が示唆される。

以上より、NPM1 による p27 機能制御機構、および ARF-NPM1-p27 制御経路の解明は、がんにおける新規な増殖制御機構の理解と、それに基づく新規抗がん戦略への応用に重要であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、当初 NPM1 による新規 p27 機能制御機構の解明およびその応用を目的として開始したが、その過程で新規に見出した p53 による p27 タンパク質分解抑制機構、さらにはがん細胞の遊走・浸潤・転移に対する p27 の抑制機能について解析することを目的として追加した。

(A) 細胞レベルでの NPM1 による p27 機能抑圧の分子機構: NPM1-p27 間の相互作用部位を同定し、それらの部位の変異体を用いて、NPM1-p27 相互作用と p27 機能抑圧との相関を明らかにする。一方、多種のがん細胞における p27 機能抑圧の有無、NPM1 発現量と p27 機能抑圧との相関性等を検証し、NPM1 による p27 機能抑圧の普遍性を明らかにする。さらに、ARF による NPM1 の発現変動を介した p27 機能の制御経路について検証する。

(B) p53 による p27 タンパク質分解抑制機構: p53 欠損下で p27 タンパク質分解が亢進することを新規に見出したため、p27 分解制御を担う既知のユビキチン-プロテアソーム系の関与について明らかにするとともに、p27 分解経路において p53 が負に制御する段階の特定を目指す。

(C) p27 によるがん悪性化表現型の抑制機構: がんは原発巣での増殖能獲得以外に、組織内での遊走能・組織外への浸潤能を獲得することで悪性化し、他の組織部位に転移ようになる。その第一段階として重要ながん細胞の足場非依存的増殖を p27 が抑制することが示唆されたため、増殖能に依存しない上記の悪性化表現型に対する p27 の機能を細胞レベル・個体レベルで評価し、がん抑制因子としての新規機能の検証を行う。

3. 研究の方法

(A) 細胞レベルでの NPM1 による p27 機能抑圧の分子機構

(1) NPM1-p27 相互作用の分子解析: 相互作用に関わる両タンパク質の部位について、各種欠損遺伝子断片を用いて酵母 2 ハイブリッド法により、また組換えタンパク質断片を用いて in vitro 分子間相互作用装置により解析する。NPM1 の p27 結合部位が同定されたら、その部位に変異導入した NPM1 と p27 を動物細胞に導入して p27 機能抑圧について検証し、NPM1-p27 相互作用と p27 機能抑圧との構造相関を明らかにする。

(2) 各種がん細胞間での p27 機能抑圧の比較解析: 現時点では 2 種のヒトがん細胞株で NPM1

による p27 機能の抑圧が示されているが、より広範多種のがん細胞株において p27 機能抑圧の有無、NPM1 発現量との相関性、NPM1 の発現抑制による p27 機能の回復等について検証し、がんにおいて NPM1 による p27 機能抑圧機構が普遍的であるかを明らかにする。

(3) ARF-NPM1-p27 制御経路の検証: ARF を正常細胞において発現抑制、がん細胞において過剰発現させ、NPM1 の発現量および p27 誘導発現下での増殖に及ぼす影響を解析し、ARF-NPM1-p27 制御経路の実態を明らかにする。

(B) p53 による p27 タンパク質分解抑制機構

p27 タンパク質の分解は主に 2 種のユビキチン-プロテアソーム系によって制御されており、それぞれ p27 アミノ酸配列 10 番目のセリン (S10) と 187 番目のスレオニン (T187) のリン酸化を分解シグナルとして認識することが既知である。そこで、S10, T187 の非リン酸化型 (S10A, T187A) p27 変異体を p53 欠損細胞で発現させ、p53 欠損下での p27 タンパク質分解亢進が既知の分解経路を介しているのか、そのどの段階が p53 によって抑制されるのかを検証する。

(C) p27 によるがん悪性化表現型の抑制機構

(1) p27 のがん細胞遊走能・浸潤能に対する抑制機能の解析: 増殖阻害条件下のがん細胞で p27 を誘導発現し、細胞遊走能・浸潤能に対する抑制効果を検証する。また、p27 誘導発現が浸潤・転移関連遺伝子群の発現に及ぼす影響を解析する。

(2) 個体レベルでの p27 のがん転移能に対する抑制効果の検証: 国内外でがんの転移アッセイに適用されている発育鶏卵胚へのがん細胞異種移植系を用いて、がん細胞株を発育鶏卵に移植し、p27 を誘導発現させた場合の腫瘍成長および各臓器への転移率を検証する。

4. 研究成果

(A) 細胞レベルでの NPM1 による p27 機能抑圧の分子機構

(1) NPM1-p27 相互作用の分子解析

酵母 2 ハイブリッド系を用いた相互作用解析の結果、NPM1 は主に C 末端領域において p27 のサイクリン結合部位と相互作用することが示唆された。また、サイクリン A の p27 相互作用部位と構造的に類似した位置にある、NPM1 の C 末端領域の 3 箇所の疎水性アミノ酸が p27 相互作用に関与することが示唆された (図 2)。一方、組換えタンパク質を用いた in vitro 分子間相互作用解析については、非特異的相互作用が高く、評価が不可能であった。

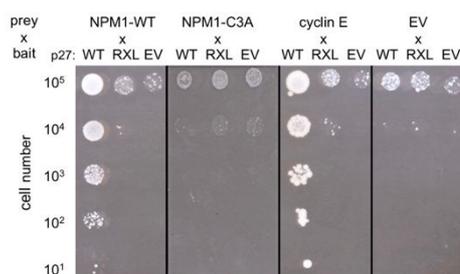


図 2 酵母 2 ハイブリッド系による p27 と NPM1 の相互作用解析 (文献 7 および未発表データ) NPM1 の C 末側における 3 アミノ酸 (Q281, Q285, W288) をアラニンに置換した NPM1-C3A 変異体を用いた Y2H アッセイを行った。RXL: p27 サイクリン結合部位変異体、EV: コントロールベクター。Cyclin E は p27 相互作用のポジティブコントロール。

NPM1 の p27 相互作用部位として 3 箇所のアミノ酸残基が示唆されたため、それらの置換変異体と p27 との細胞内相互作用を免疫沈降法により解析した結果、内在性 NPM1 発現下では外来性 NPM1-p27 相互作用が検出されず、内在性 NPM1 発現抑制下でのみ変異体の相互作用低下傾向が示された。NPM1 は細胞内の液-液相分離に関与することから、p27 との相互作用も液-液相分離を介しており、細胞破碎液中では検出されにくいと考えられた。一方で、p27 誘導発現系を導入した正常細胞株 NIH/3T3 で NPM1 の野生型または C3A 変異型を恒常的に過剰発現した結果、前者は p27 の増殖抑制機能を抑圧したが、後者は抑圧しなかった (図 3)。このことより、NPM1 による p27 機能抑圧は NPM1-p27 相互作用に依存していることが示唆された。

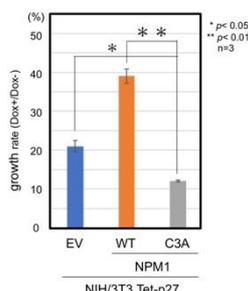


図 3 外来性 NPM1 による p27 機能抑圧の検証 (未発表データ)

Dox 誘導性 p27 発現系を保持する正常細胞株 NIH/3T3 に、野生型または C3A 変異型 NPM1 の恒常発現系を導入し、Dox 添加時の細胞数 (Dox+) の非添加時の細胞数 (Dox-) に対する比を増殖率 (%) として表した。EV: コントロールベクター導入細胞。

(2) 各種がん細胞間での p27 機能抑圧の比較解析

既に検証済みの 2 種 (U-2 OS, HT1080) に加えて 4 種の細胞株で検証した結果、3 種 (DAOY, A431, Saos-2) で同様の p27 機能抑圧が示されたが、1 種 (MDAH041) では部分的な抑圧であった⁸⁾。その要因として、この細胞株では他の 5 種と異なり NPM1 の抑制因子 ARF が発現しているためと考えられた。そこで ARF-NPM1-p27 制御経路を検証すべく、NPM1 による p27 機能抑圧を示す細胞株で ARF を過剰発現させた結果、NPM1 と p27 の核小体への共局在が消失し、p27 の正常な核質局在が回復した⁸⁾ (図 4)。ARF は多くのがん種で欠

損しており、それが NPM 1 による p27 機能抑圧の要因として重要であることが示唆された。

U-2 OS Tet-on p27

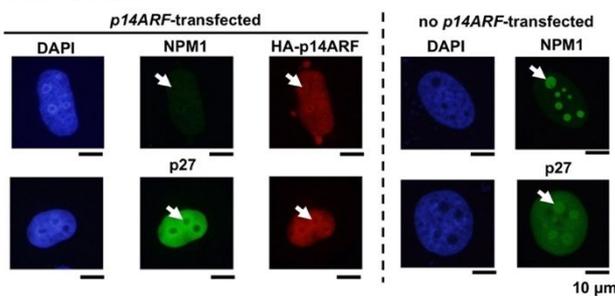


図4 ARF 過剰発現のNPM1, p27 核内局在に対する影響(文献 8)
Dox 誘導性 p27 発現系を保持する U-2 OS 細胞株に HA タグ付き ARF (HA-p14ARF) 発現ベクターをトランスフェクションし(左パネル) Dox 存在下で HA-p14ARF, NPM1, p27 の局在をそれぞれの抗体を用いて免疫染色により解析した。白矢印は核小体を示す。右パネルは HA-p14ARF 非導入細胞。

次に、通常の足場依存的(2-D)培養に加えて、足場非依存的(3-D)条件である軟寒天培地中で培養した場合の p27 機能抑圧を評価した結果、2-D と 3-D 条件で p27 機能抑圧の有無が異なる細胞株が多く見られた。特に 3-D 条件で p27 機能が正常な細胞株(図5, A)では主要がん抑制因子 p53 が野生型であるのに対し、p27 機能が抑圧される細胞株(図5, B)では p53 が変異型または欠損していること、またそれらの細胞株では外来性 p27(EGFP 融合)の発現量が顕著に低く、さらにプロテアソーム阻害剤によってその発現量が回復することが示された⁸⁾(図5, C)。

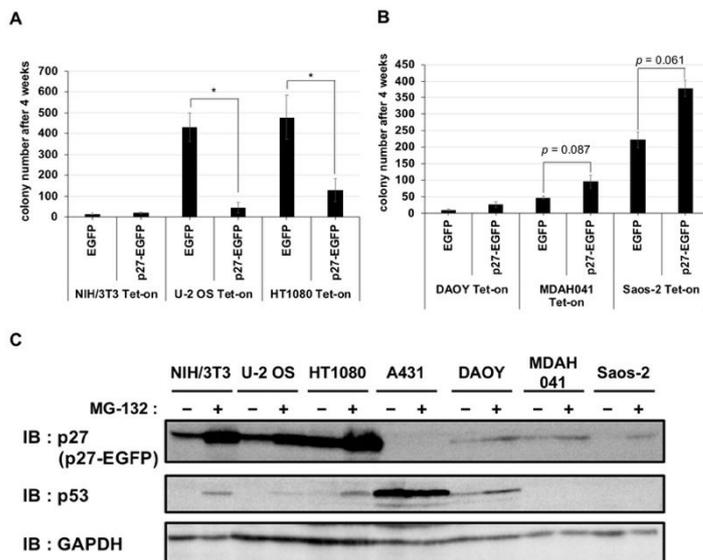


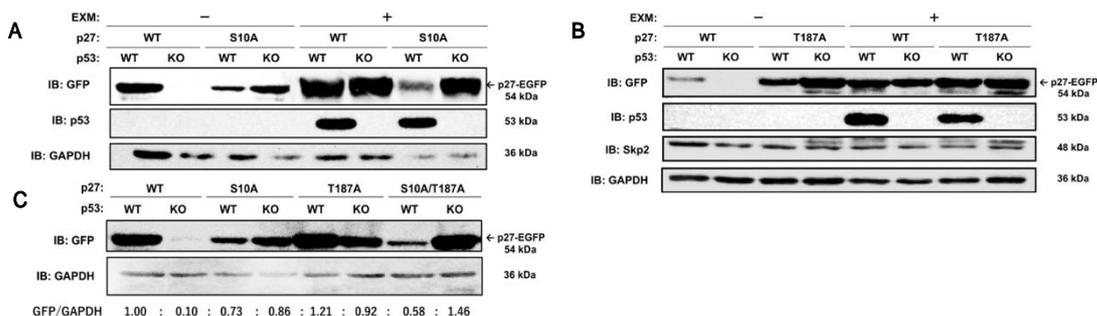
図5 足場非依存的増殖条件ががん細胞株の p27 機能抑圧に及ぼす影響(文献 8)
(A, B) 正常細胞株(NIH/3T3)および種々のがん細胞株に p27-EGFP または EGFP の Dox 誘導性発現系を導入し、軟寒天培地中で Dox 存在下で培養し、コロニー形成数を測定した。A: p53 野生型発現細胞、B: 機能欠損変異型 p53 発現または p53 遺伝子欠損細胞。(C) 各細胞株における p27-EGFP および p53 タンパク質発現量を、プロテアソーム阻害剤 MG132 非添加・添加条件でウエスタン解析した。

(3) ARF-NPM1-p27 制御経路の検証

NPM1 抑制因子 ARF と p27 機能との相関性を検証するため、ARF 遺伝子の破壊および外来性導入を試みたが、前者は ARF 遺伝子領域の別遺伝子との重複、後者は ARF の増殖抑制機能のため実現困難であった。

(B) p53 による p27 タンパク質分解抑制機構

p53 欠損下での p27 タンパク質分解の亢進が示唆され、全く新規な p27 の制御機構として重要と考えられたため、追加テーマとして研究を推進した。まず、プロテアソーム阻害剤 Epoxomicin (EXM)の添加により、p53 欠損下での p27 発現量が回復したことより、p53 は p27 のプロテアソーム依存的分解を抑制することが示された(図6, A, B)。次に、p27 分解を担う2つのユビキチン-プロテアソーム経路が認識するリン酸化部位 S10 または T187 の非リン酸化型変異により、p53 欠損下での p27 分解が抑圧された(図6, A, B)。さらに両変異を二重導入した結果、各単一変異と比べて p53 欠損下での p27 安定性がさらに向上したことから、2つの p27 分解経路がともに p53 によって抑制されていることが示唆された(図6, C)。リン酸化 T187 はユビキチンリガーゼ SCF^{Skp2} の Skp2 サブユニットが認識することが既知であるため、p53 欠損下での発現量を調べたが、野生型 p53 存在下と変わらなかった(図6, B)。



GFP/GAPDH 1.00 : 0.10 : 0.73 : 0.86 : 1.21 : 0.92 : 0.58 : 1.46

図6 p53欠損細胞における野生型および非リン酸化変異型 p27 の発現量解析 (未発表データ) 野生型 (WT) と S10A 変異型 (A) または T187A 変異型 (B) p27-EGFP 誘導発現系を野生型 (p53 WT) および p53 欠損型 (p53 KO) NIH/3T3 細胞に導入し、Epoximicin (EXM) 非添加・添加条件下での各タンパク質の発現量をウエスタン解析した。p53 タンパク質は EXM 添加時のみ検出される。(C) 野生型、S10A、T187、または S10A/T187A 二重変異型 p27-EGFP を導入した NIH/3T3 細胞 (p53 WT または K.O.) を EXM 非添加条件下でウエスタン解析した。内在性 GAPDH 発現量に対する p27-EGFP 発現量の相対比を示す。

(C) p27 によるがん悪性化表現型の抑制機構

(1) p27 のがん細胞遊走能・浸潤能に対する抑制機能の解析

p27 を誘導発現させたがん細胞株 HT1080 において、p27 誘導発現下での細胞遊走・浸潤・転移能について解析した。薬剤または培地条件により細胞増殖を抑制した条件下で、創傷治癒アッセイにより遊走能を、トランスウェルアッセイにより浸潤能を検証した結果、両表現型とも p27 の誘導発現により抑制された (図7)。

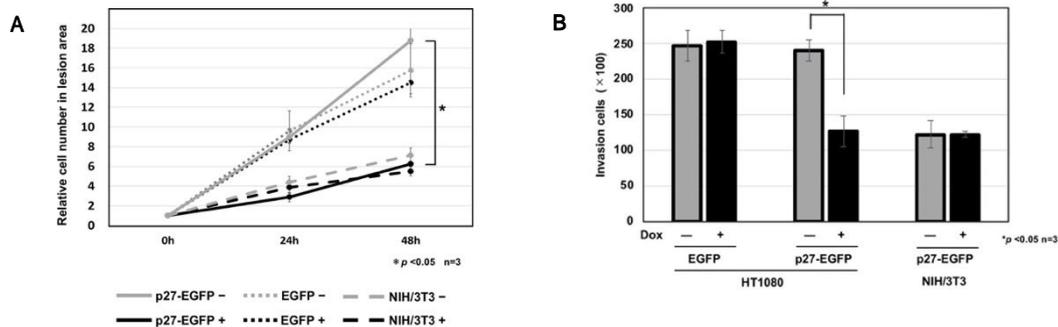


図7 p27-EGFP 誘導発現がん細胞における遊走能と浸潤能の解析 (未発表データ) HT1080 細胞および NIH/3T3 細胞に Dox 誘導性 p27-EGFP 発現系を導入し、Dox 非添加 (-)・添加 (+) 下で創傷治癒アッセイ (A) およびトランスウェルアッセイ (B) を行った。A: mitomycin C により増殖を阻害した高密度細胞層に一定幅の傷をつけ、創傷部位へ遊走した細胞数を経時的に計測した。B: 血清飢餓により増殖を停止した細胞をトランスウェル上部のコラーゲン層上に播種し、24 時間後に下部のウェルに移動した細胞数を計測した。

そこで、既知の主要な浸潤・転移関連遺伝子群 5 種 (細胞接着因子 VCAM, ITGaV, ITGβ5; 基底膜分解因子 MMP9; 浸潤促進因子 GLUT1) および血管新生因子 (VEGF) の発現を解析したところ、足場依存的条件下において、主要転移関連因子のうち ITGaV、GLUT1 の発現が p27 誘導発現により著しく低下することが示され、細胞接着・浸潤能が p27 発現により抑制されることが示唆された (図8)。

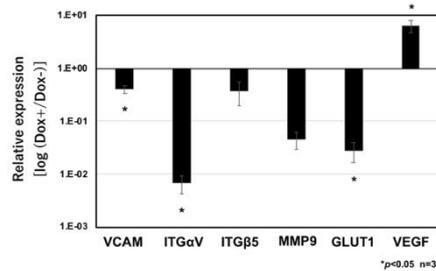


図8 外来性 p27 の誘導発現が転移関連遺伝子の発現に及ぼす影響 (未発表データ) Dox 誘導性 p27-EGFP 発現系を導入した HT1080 細胞を Dox 非添加 (Dox-)・添加 (Dox+) 下で培養し、細胞より RNA 抽出後 cDNA 化し、各遺伝子特異的プライマーを用いた RT-qPCR により転写量を定量し、Dox- サンプルに対する Dox+ サンプルの相対値で表した。

(2) 個体レベルでの p27 のがん転移能に対する抑制効果の検証

発育鶏卵の漿膜上に外来性 p27 誘導発現系を導入した HT1080 細胞を移植し、2 日おきに Dox を移植部位に滴下することで外来性 p27 の発現を誘導した。その結果、移植後 9 日 (孵化直前) で顕著な腫瘍の形成およびそのサイズが p27 の誘導発現により抑制されることが確認された (データ示さず)。転移能への p27 誘導発現の効果については、移植部位の腫瘍成長が抑制されることによって転移するがん細胞数が減少する可能性もあるため、がん細胞の静脈注射によって腫瘍増殖に依存しない直接的な転移アッセイ系を現在検証中である。

文献: (1) Nakayama, K., et al., Kiyokawa, H., et al., Fero, M. L., et al. (1996) Cell 85: 707-720, 721-732, 733-744. (2) Blain, S. W., et al. (2003) Cancer Cell 3: 111-115. (3) Pagano, M. (1997) FASEB J. 11:1067-1075. (4) Kamura, T., et al. (2004) Nat. Cell Biol. 6: 1229-1235. (5) Masciullo, V., et al. (1999) Cancer Res. 59: 3790-3794. (6) Chibazakura, T. & Asano, Y. (2017) Biosci. Biotechnol. Biochem. 81: 2360-2366. (7) Kometani, T., Arai, T., Chibazakura, T. (2020) Cancers 12: 2886. (8) Kometani, T., Kawasaki, Y., Chibazakura, T. Genes Cells, 27: 229-237 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kometani T, Kamo K, Kido T, Hiraoka N, Chibazakura T, Unno K, Sekine K.	4. 巻 658
2. 論文標題 Development of a novel co-culture system using human pancreatic cancer cells and human iPSC-derived stellate cells to mimic the characteristics of pancreatic ductal adenocarcinoma in vitro.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.03.061	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kometani Tatsuya, Kawasaki Yutaro, Chibazakura Taku	4. 巻 27
2. 論文標題 Differential regulation of p27Kip1 depending on culture conditions and its correlation with status of p14ARF and p53	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 229 ~ 237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12919	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------