

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：72602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24650626

研究課題名(和文)がん微小環境におけるPERKシグナル伝達経路の役割解明と治療への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the role of PERK signaling pathway in tumor microenvironment and its application for drug discovery

研究代表者

富田 章弘(Tomida, Akihiro)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・ゲノム研究部 部長

研究者番号：40251483

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)：UPR(unfolded protein response)は、がん細胞が特殊な腫瘍内環境に適応し、生存増殖するのに重要な役割を果たす。本研究では、UPR制御において中心的役割を果たすPERK、ならびに、PERKと相互作用する新しい機能分子であるTBL2に着目し、PERKシグナル伝達経路の腫瘍内環境適応における役割について検討した。加えて、PERKシグナル伝達経路を標的とした治療戦略の考案を目指し、PERKシグナル伝達経路の機能阻害条件下で、合成致死作用を有する因子の検索を行った。

研究成果の概要(英文)：The UPR(unfolded protein response) is a cellular adaptive mechanism that plays an important role in cancer cell survival and proliferation within particular tumor microenvironment. In this study, we focused on two proteins: one is PERK, a central regulatory protein in the UPR, and the other is TBL2, a new function molecule which can interact with PERK during stress. Then, we examined roles of the PERK signaling pathway in cancer cell adaptation to tumor microenvironment by knocking down PERK or TBL2. In addition, aiming at the development of treatment strategy, we searched factors which had a synthetic lethal relationship under conditions inhibiting function of the PERK signaling pathway.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：がん微小環境 UPR 小胞体ストレス PERK グルコース飢餓 低酸素

1. 研究開始当初の背景

異常タンパク質が小胞体に蓄積すると、細胞はUPR (unfolded protein response) 経路を活性化する。UPRは、分子シャペロン GRP78 など、多くの遺伝子の協調的な発現誘導を特徴とし、結果として、小胞体の機能を強化することによって異常タンパク質の解消に導き、細胞防御機構として機能する。このUPRは、腫瘍内環境で認められる、低酸素やグルコース欠乏などの生理的ストレスでも誘導され、がん細胞が特殊な腫瘍内環境で生存増殖するのに重要な役割を果たす。実際UPRは、上記の細胞防御機構に加え、血管新生因子などの組織再構築因子の発現誘導にもかわり、腫瘍組織の維持という観点からも重要な役割を果たすものと考えられている。

UPRは、主として小胞体膜に存在するIRE1、ATF6、PERKといったセンサー分子によって複雑にかつ冗長性をもって制御されており、UPRを制御し治療に結びつけようとする試みが容易な状況までには、理解が進んでいない。申請者らは、UPR制御において中心的な役割を果たすPERKに着目し、ストレス応答タンパク質の選択的翻訳制御にかかわる因子として、TBL2の同定に成功するなど、PERKシグナル伝達経路の分子機構解明に取り組んできた。こうした独自の研究成果を踏まえ、本研究では、PERKシグナル伝達経路の腫瘍内環境適応における役割を明らかにし、治療標的化するための分子基盤を明らかにすることを目的に計画した。

2. 研究の目的

UPRは、がん細胞が特殊な腫瘍内環境に適応し、生存増殖するのに重要な役割を果たしている。しかしながら、UPRの活性化に導くシグナル伝達経路は、複雑で冗長性をもった形で制御されており、既知のシグナル伝達分子に対する阻害剤を探索開発するという単純なアプローチを取ることが必ずしも有効ではない。そこで本研究では、UPR制御において中心的役割を果たすPERKシグナル伝達経路に着目し、独自の研究で明らかにしてきたPERK経路の新しい機能分子であるTBL2を含めることで、従来とは異なるアプローチでPERKシグナル伝達経路の腫瘍内環境適応における役割を明らかにすることを第一の目的とする。そして、明らかにした分子基盤情報に基づいて、PERKシグナル伝達経路を標的とした治療戦略の考案を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、UPR制御において中心的役割を果たすPERKや、我々の見出してきたTBL2といったPERKシグナル伝達経路の制御分子

に焦点を当て、これらの機能阻害を通じ、PERKシグナル伝達経路の腫瘍内環境適応における役割を明らかにする。また、PERKやTBL2の機能阻害を誘導した際に、合成致死を引き起こす因子・阻害剤の探索を行う。以下の具体的方法により、研究を進めた。

(1) PERKならびにTBL2について、レンチウイルスベクター-shRNAを用い、ロックダウンヒトがん細胞株を樹立した。イムノプロットによるロックダウンの確認に加え、細胞増殖解析を行った。また、種々の抗がん剤やストレスに対する感受性について検討した。

(2) 親株ならびに樹立したロックダウン細胞株をヌードマウスに移植し、腫瘍増殖能について検討した。また、形成させたゼノグラフトよりRNAを抽出し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った。腫瘍内での遺伝子発現パターンについてバイオインフォマティクス的手法を活用し検討し、ロックダウンによるPERKシグナル伝達経路の機能阻害の、腫瘍組織の再構築への影響等について考察した。

(3) TBL2の機能解析の一環として、免疫沈降法を用いて、細胞内で相互作用する因子の探索を行った。同定された相互作用について、ストレス環境に依存するかどうか検討した。

(4) PERKやTBL2のロックダウン細胞株を用い、PERKシグナル伝達経路の機能阻害条件下で、合成致死作用を有する因子を探索した。具体的には、種々の抗がん剤や、TBL2と相互作用する因子とその阻害剤、また、miRNA阻害剤等について探索した。

4. 研究成果

PERKシグナル伝達経路の腫瘍内環境における役割解析を中心に、TBL2の機能解析を含めながら、以下の具体的研究を行った。

(1) PERKならびにTBL2について、レンチウイルスベクター-shRNAを、ヒト腎がん786-0細胞、ヒト乳がんMCF7、ヒト大腸がんHT-29細胞、ヒトすい臓がんPANC-1細胞、ヒト胎児腎293細胞へ感染することによって、ロックダウンがん細胞株を樹立した。イムノプロットによるロックダウンの確認後、単層培養での細胞増殖試験を行ったところ、今回樹立した細胞では、ロックダウンの影響がほとんどないことが明らかになった。また、シスプラチン、パクリタキセル、ドキシソルピシン、カンプトテシン、5-フルオロウラシルといった抗がん剤を用いて、樹立したロックダウンがん細胞株の薬剤感受性を検討したところ、ロックダウンによって薬剤感受性はほとんど変化しないことが明らかになった。

一方、興味深いことに、786-0 細胞を用いた解析では、ノックダウンにより、低グルコース・低酸素といった強いストレス条件下での細胞生存率が低下することが分かった。サブシガルジンなどのケミカルストレスを用いた検討では、高感受性を示す傾向は認められるものの、低グルコース・低酸素といった強いストレス条件下で見られるような有意な差は認められなかった。

(2) 786-0 細胞を用い、親株ならびに樹立した PERK ならびに TBL2 のノックダウン細胞株をヌードマウスに移植し、ゼノグラフト形成について検討したところ、造腫瘍性に有意な違いは認められなかった。しかしながら、形成させたゼノグラフトを採取し、採取したゼノグラフトより RNA を抽出し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行ったところ、対照細胞とは異なる発現パターンとなる遺伝子群が存在することが明らかになった。

この遺伝子発現の変化について、バイオインフォマティクス的手法を用いて詳細に解析した。その結果、劇的に発現変化している遺伝子群には細胞外マトリックスに関連するものや免疫応答に関連する因子が多く含まれていることなど、PERK ならびに TBL2 のノックダウンによって、がん細胞と腫瘍内環境との相互作用に一定の影響がもたらされることが示唆された。こうした PERK と TBL2 ノックダウンで共通にみられる遺伝子発現変化がある一方で、PERK あるいは TBL2 をノックダウンした細胞のゼノグラフトにおける発現パターンには、ジスルフィド結合に関連する因子など、異なるパターンを示すものがあることも明らかになった。こうしたデータから、PERK と TBL2 は、腫瘍増殖において一定の共通した役割を果たす一方で、異なる機能を有していることが強く示唆された。

(3) 本研究開始時点において、TBL2 は活性化 PERK とストレス環境下で特異的に結合することに加え、通常条件下において、翻訳開始因子 eIF2、
、
や 60S リボソームと結合することを見出していた。こうした知見に加えて、データベース検索や TBL2 の免疫沈降物複合体の MS 解析などの追加情報から、TBL2 はタンパク合成や RNA 代謝に参与する可能性が考えられた。そこで、TBL2 と相互作用する因子について、RNA 代謝に参与する因子を中心に、免疫沈降法を用いて探索を進めた。その結果、新たにスプライシングに参与する因子との相互作用を見出した。これらの TBL2 との相互作用は、翻訳開始因子 eIF2、
、
や 60S リボソームと同様に、通常条件下においても、また、ストレス環境下においても認められ、環境に依存しないことが明らかになった。こうした TBL2 とタンパク合成や RNA 代謝に参与する因子との相互作用が、PERK シグナル伝達経路において、どのような役割を果たすかについては、今後さらなる検討を必

要とするものと考えられた。

(4) PERK シグナル伝達経路を標的とした治療戦略の考案を目指し、樹立したノックダウン細胞株を用いるなどによって、PERK シグナル伝達経路の機能阻害条件下で、合成致死作用を有する因子の探索を実施した。(1)に記載したように、従来の抗がん剤等について検討したところでは、PERK や TBL2 のノックダウンで感受性の変化するものはなかった。

そこで、(3)で新たに見出した因子を含め、TBL2 と相互作用する因子の阻害剤や siRNA、ならびに、miRNA 阻害剤ライブラリーを用いて、TBL2 ノックダウンと合成致死作用を有する因子の探索を実施することにした。その結果、TBL2 と相互作用する因子の siRNA やその阻害剤を用いた場合には、TBL2 ノックダウン細胞の高感受性化を見出すことはできず、合成致死に至る因子を見つけることはできなかった。

次に、これまでに同定されているヒト miRNA を網羅した阻害剤ライブラリー (Exiqon 社)を用い検討した。その結果、982 種類の miRNA 阻害剤の中から、TBL2 ノックダウン細胞の増殖を選択的に抑制する 5 種類の miRNA 阻害剤を候補として選出することができた。miRNA は、タンパク合成の制御や RNA 代謝に参与することが知られていることから、TBL2 の機能の理解を深めるためにも、今後、さらなる検討を続けていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Tsukumo Y, Tsukahara S, Furuno A, Iemura S, Natsume T, Tomida A. The endoplasmic reticulum-localized protein TBL2 interacts with the 60S ribosomal subunit. *Biochem Biophys Res Commun*. 462(4):383-8, 2015.
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.04.144. 査読有

Tsukumo Y, Tsukahara S, Furuno A, Iemura S, Natsume T, Tomida A. TBL2 is a novel PERK-binding protein that modulates stress-signaling and cell survival during endoplasmic reticulum stress. *PLoS One*. 9(11):e112761, 2014.
doi: 10.1371/journal.pone.0112761. 査読有

Matsumura S, Yuge R, Sato S, Tomida A, Ichihashi T, Irie H, Iijima S, Shiba K, Yudasaka M. Ultrastructural localization of intravenously injected carbon nanohorns in tumor. *Int J Nanomedicine*. 9:3499-508, 2014.
doi: 10.2147/IJN.S62688. 査読有

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(1):37-47, 2014. doi: 10.1002/ijc.28652. 査読有

Migita T, Okabe S, Ikeda K, Igarashi S, Sugawara S, Tomida A, Taguchi R, Soga T, Seimiya H. Inhibition of ATP citrate lyase induces an anticancer effect via reactive oxygen species: AMPK as a predictive biomarker for therapeutic impact. *Am J Pathol*. 182(5):1800-10, 2013. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.01.048. 査読有

^{*}Ushijima M, ^{*}Mashima T, ^{*}Tomida A, Dan S, Saito S, Furuno A, Tsukahara S, Seimiya H, Yamori T, ^{*}Matsuura M. Development of a gene expression database and related analysis programs for evaluation of anticancer compounds. *Cancer Sci*. 104(3):360-8, 2013. ^{*}Equally contribution, ^{*}Corresponding. doi: 10.1111/cas.12071. 査読有

Saito S, Furuno A, Sakurai J, Park HR, Shin-ya K, Tomida A. Compound C prevents the unfolded protein response during glucose deprivation through a mechanism independent of AMPK and BMP signaling. *PLoS One*. 7(9):e45845, 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0045845. 査読有

Matsuo J, Tsukumo Y, Saito S, Tsukahara S, Sakurai J, Sato S, Kondo H, Ushijima M, Matsuura M, Watanabe T, Tomida A. Hyperactivation of 4E-binding protein 1 as a mediator of biguanide-induced cytotoxicity during glucose deprivation. *Mol Cancer Ther*. 11(5):1082-91, 2012. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-11-0871. 査読有

〔学会発表〕(計 14 件: 主要 3 件を記載)

岡本有加, 小井土大, 塚原里美, 国政和宏, 富田章弘. UPR 標的遺伝子の発現変化を伴って細胞毒性を示す miRNA 阻害剤の同定. 第 73 回日本癌学会学術総会, 2014 年 9 月 27 日. パシフィコ横浜 (横浜).

富田章弘, 築茂由則, 塚原里美. がん微小環境標的治療の分子標的としての新規ストレス応答 UPR 制御因子 TBL2. 第 72 回日本癌学会学術総会, 2013 年 10 月 5 日. パシフィコ横浜 (横浜).

富田章弘, 小井土大, 芳賀直実, 塚原里

美, 佐藤重男. がん微小環境標的治療法の開発を目指したがん細胞のグルコース飢餓への新たな適応機構の解析. 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 20 日. ロイトン札幌 (札幌).

〔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: 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 章弘 (TOMIDA, Akihiro)
公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・ゲノム研究部・部長
研究者番号: 4 0 2 5 1 4 8 3

(2) 研究分担者 該当なし

(3) 連携研究者 該当なし