

令和元年6月6日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18874

研究課題名(和文)オートファジーとアポトーシスを制御する新たな癌抑制遺伝子の発見

研究課題名(英文) To identify new tumor suppressive factor, which regulates autophagy and apoptosis.

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複合領域科学部門・准教授

研究者番号：10729859

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)：本研究により、BAP31が小胞体ストレスによる細胞死と細胞の生存に寄与するオートファジーの両者を制御していることが示唆された。BAP31の発現が無い癌細胞は過酷な環境条件でも増殖することができ、また転移についても転移先での増殖に有利であることが示唆された。このように細胞の死と生存を決定する因子は癌抑制遺伝子があり、BAP31も新たな癌抑制遺伝子である可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先進諸国において癌による死亡者数は増加の一途をたどり、癌の治療は未だ大きな課題である。同じ組織由来の癌であっても各個人の間で有効な治療法が異なることが明らかにされ、新たなターゲットに対する抗癌剤の開発が待ち望まれている。これまでに癌細胞が低栄養等のストレスに耐性化する機構をターゲットにした抗癌剤は開発されていない。そこで本研究により明らかにされつつあるBAP31を中心とした小胞体膜上でのダイナミックなシグナル伝達機構を解析し、新たなオートファジーの制御機構を解明することで、癌細胞特異的に低栄養ストレスに感受性化させ、転移を防ぐような癌の治療ターゲットの発見が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study suggested that B-cell receptor associated protein 31 (BAP31) regulates both endoplasmic reticulum stress induced cell death and autophagy that contributes to cell survival. The suppression of BAP31 expression in cancer cells indicated that these cells are able to proliferate under severe environmental conditions, such as hypoxia and starvation, and have high ability of metastasis in vivo. Thus, there is a possibility of BAP31 as a novel tumor suppressive factors that determine cell death and survival.

研究分野：細胞生物学

キーワード：癌 小胞体 オートファジー アポトーシス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

先進諸国において癌による死亡者数は増加の一途をたどり、癌で苦しむ多くの人を救うために、抗癌剤の新たなターゲットの発見とそれに対する創薬は急務である。固形癌、特に有効な治療薬がほとんど無く、新たな治療薬が望まれている膵臓癌や転移した癌は低栄養環境に置かれ、増殖を行うにはその環境に適応する必要がある。そのため、癌細胞の低栄養環境への適応化の阻害は抗癌剤の新たなターゲットとして有望であると考えられている。

細胞では低栄養により小胞体における新生蛋白質の折りたたみ機構に破綻が生じ、異常な構造を持つ蛋白質が蓄積することで細胞の恒常性が乱される。異常蛋白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。そこで細胞は小胞体ストレス応答を誘導し、異常蛋白質を分解するなどして取り除こうとするが、それでも細胞の恒常性が取り戻せない場合にアポトーシスを誘導する。一方、細胞が生存するにはアミノ酸などの栄養素が必要である。オートファジーは低栄養により誘導され、ハウスキーピング蛋白質などを分解することで、細胞の生育により重要な蛋白質を合成するためのアミノ酸を産生、供給する。これまでに癌細胞は強い低栄養環境でも生育できるように小胞体ストレスによるアポトーシスに耐性化し、高いレベルでオートファジーが誘導されていることが知られている(Ma et al., Nature Review Cancer, 2008)。一方でこの二つの細胞応答は密接に関与していることも示唆されている。オートファジーの誘導により小胞体ストレスが軽減されること(Heath-Engel HM et al., Oncogene, 2008)、オートファゴソームの形成は小胞体とミトコンドリアの接触点から起こること (Hamasaki M et al., Nature, 2013)、及び小胞体やミトコンドリアの機能障害においてもオートファジーが誘導されること(Saita et al., Nature communication, 2013)が報告されている。しかし、詳細なオートファジーとアポトーシスのクロストーク機構については不明である。最近申請者は小胞体膜蛋白質である BAP31 がアポトーシス誘導因子 CDIP1 と結合し、ミトコンドリアを傷害することで小胞体ストレスによるアポトーシスを誘導することを発見した(Namba T et al, Cell Reports. 2013)。一方、前述の研究過程で BAP31 の発現を抑制し、小胞体ストレスによるアポトーシス誘導を調べたところ、アポトーシスが非常に強く抑制されることが明らかになった。この結果から BAP31 の発現抑制によりアポトーシスの経路が抑制されるのみでなく、細胞保護の経路も同時に活性化されているのではないかという新たな仮説の着想に至った。そこで、BAP31 の発現抑制により活性化される細胞保護経路を探索したところ、BAP31 の発現を抑制することでオートファジーが誘導されることを見いだしている(未発表データ)。さらに癌細胞における BAP31 の遺伝子変異についてデータベース(COSMIC(<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>))を検索した結果、BAP31 のコピー数の減少(発現抑制を示唆している)が高い頻度で確認されていた(Glioma (64.7 %)、Kidney carcinoma (67.7 %)、Lung carcinoma (62.2 %))。このような申請者の研究結果、及びデータベースの情報から、BAP31 は小胞体ストレスによるアポトーシスを実行し、それとは別の機構でオートファジーの誘導を抑制することでこれまで知られていない新たな癌抑制遺伝子として働いていることが考えられる。すなわち癌細胞において BAP31 の発現が減少し、小胞体ストレスによるアポトーシスに耐性化、及びオートファジーが誘導されることで低栄養環境においても生存、増殖できるようになり、BAP31 は癌細胞が低栄養ストレス(小胞体ストレス)による細胞の生存と死を決定する因子として機能していることが予想される。

2. 研究の目的

癌細胞は低栄養、低酸素といった強いストレス環境に適応し、生育している。このため、ストレスに耐性化する癌細胞特異的なメカニズムの解明は、新規抗癌剤の新たなターゲットの発見に重要である。独自の予備実験の結果から、小胞体膜蛋白質 BAP31 を中心にした蛋白質複合体が、ストレスによりオートファジーを誘導し、細胞を生存させるか、それともアポトーシスを誘導するかを決定しているという全く新しい機能を見いだしている。そこで本研究では、BAP31 による新たなオートファジーの制御機構を解明することで、オートファジーとアポトーシスのシグナルのクロストーク機構を明らかにすること、及び BAP31 の機能喪失がストレス環境における癌細胞の増殖や転移にあたる影響を明らかにすることを目標とする。

3. 研究の方法

オートファジーの制御機構、ミトコンドリアと小胞体の情報伝達を介した機能制御機構、及び癌の発癌や増殖・転移における BAP31 の役割を明らかにする。小胞体ストレスの誘導や細胞死についてはそれぞれのマーカータンパク質の発現をウエスタンブロット法で検討する。BAP31 によるオートファジーの制御機構解析には、BAP31 と結合する蛋白質に注目して、オートファゴソームの形成開始集合体に与える影響を生化学や細胞生物学的手法を用いて解析する。一方、BAP31 が癌の特性に与える影響については、癌の増殖をみることのできる癌細胞移植マウスモデルを用いて調べることで明らかにする。

4. 研究成果

これまでの報告から小胞体ストレスによりオートファジーが誘導され、このオートファジーの誘導が小胞体ストレスによる細胞死を抑制していることが報告されている。そこで、本研究で用いる実験系においてもその結果が再現されるか検討を行った。まず小胞体ストレスを誘導することが知られている Brefeldine A(BFA)と Tunicamycine(Tm)を U2OS 細胞に処理し、その後ウエスタンブロット法で各種タンパク質の発現を調べた。その結果、小胞体ストレス応答のマーカーである BiP の発現が誘導され、小胞体ストレス応答が誘導されていること、及び PARP が切断され(Cleaved PARP)細胞死も誘導されていることが確認された。オートファジーの誘導についてはオートファゴソーム形成に必要な LC3-II の発現を調べた。その結果、BFA、Tm とも処理後 12 時間から LC3-II の発現が増加し、オートファジーが誘導されていることが示唆された。

次に、小胞体ストレスによるオートファジーの誘導が細胞死に対して抑制的に働いているかをオートファジーの誘導阻害剤である 3-Methyladenine (3-MA)を用いて検討した。BFA 処理によりオートファジーが誘導されるが、その誘導は 3-MA 処理により抑制されることが、LC3II の発現増加と LC3-GFP の凝集(オートファゴソームの形成)により確認され、BFA による PARP の切断は 3-MA 処理により促進された。以上の結果から、小胞体ストレスによりオートファジーが誘導され小胞体ストレスによる細胞死を抑制していることが考えられる。

そこで BAP31 がオートファジーの誘導に関与しているかの検討を行った。これまでに我々は BAP31 の発現抑制により小胞体ストレスによる細胞死が顕著に抑制されることを報告しているが、BAP31 がオートファジーの誘導に関与しているかどうかは全く分かっていない。BAP31 の発現を shBAP31 で抑制したところ、LC3-II の発現が増加してオートフ

ファジーが誘導された。そこで、BAP31 の発現抑制による小胞体ストレスによる細胞死の抑制機構に、このオートファジーの誘導が関与しているかを検討した。shBAP31 処理により BFA による細胞死(PARP の切断)が抑制され、オートファジー(LC3-II)も強く誘導された。BFA、shBAP31、及び 3-MA を処理したところ、BAP31 の発現が抑制され、且つオートファジーの誘導も抑制された。その結果、BFA による細胞死の誘導が shBAP31 と BFA を処理したものより強く誘導されていた。以上の結果から BAP31 は小胞体ストレスによる細胞死に関与するだけではなく、オートファジーの誘導にも関与すること、及び BAP31 の発現抑制により小胞体ストレスによる細胞死に耐性化すると同時にオートファジーの誘導も促進されることが示唆された。

ここまでの結果により BAP31 が小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導とオートファジーの制御に関与していることが考えられる。我々はこれまでに BAP31 が小胞体ストレスによるアポトーシスの誘導に関する機構については既に報告しているため、BAP31 によるオートファジーの制御機構について検討を行った。BAP31 は小胞体膜タンパク質であることから、小胞体近傍で起こるオートファジーの誘導経路に関与している可能性を考えた。これまでにオートファゴソームの形成に重要な Atg14 複合体(Atg14、Beclin1 や Syntaxin17(Stx17)など)の形成と活性化が小胞体膜上で起こることが報告されているので、これらのタンパク質とオートファジーの誘導に関与している Atg7 及び Atg12 と BAP31 が相互作用しているかを免疫沈降法で検討した。細胞ライセートを BAP31 の抗体で免疫沈降したところ、BAP31 と Stx17 の結合が確認された。以上のことから BAP31 は Stx17 と結合することでオートファジーの誘導を制御している可能性が示唆された。

最後にBAP31が癌の特性に与える影響について、癌の増殖をみることのできる癌細胞移植マウスモデルを用いて検討した。BAP31発現抑制細胞とコントロール細胞をヌードマウスの皮下に移植し、その増殖を比較したところ、BAP31発現抑制細胞で癌の増殖が移植後から促進された。しかし最終的な癌細胞の大きさについては有意な差はなかった。また移植後1週間の移植癌においてはBAP31発現抑制細胞でオートファジー誘導が促進していた。肺組織への転移を検討したところ、BAP31発現抑制細胞において肺への転移が増加している傾向が確認された。動物実験の結果からBAP31は特に虚血等のストレスが強いときに細胞死を誘導していることが考えられ、BAP31の欠損は強いストレスに対して細胞を適応化させることが示唆された。以上の結果より、BAP31の欠損は癌細胞の生存に有利に働くことが示唆され、BAP31は細胞の癌化を抑制する因子であることが考えられる。

本研究により、BAP31 が小胞体ストレスによる細胞死と細胞の生存に寄与するオートファジーの両者を制御していることが示唆された。このように細胞の死と生存を決定する因子は癌抑制遺伝子が有名であり、BAP31 も新たな癌抑制遺伝子である可能性が考えられる。先進諸国において癌による死亡者数は増加の一途をたどり、癌の治療は未だ大きな課題である。プロテオミクス解析や次世代シーケンズを用いた癌細胞の遺伝子情報解析から、同じ組織由来の癌であっても各個人の間で癌の性質が大きく異なること、つまりそれぞれの癌に対して有効な治療法が異なることが明らかにされた。新たなターゲットに対する抗癌剤の開発が待ち望まれている。これまでに癌細胞が低栄養等のストレスに耐性化する機構をターゲットにした抗癌剤は開発されていない。そこで本研究により明らかにされつつある BAP31 を中心にした小胞体膜上でのダイナミックなシグナル伝達機構を解析し、新たなオートファジーの制御機構を解明することで、癌細胞特異的に低栄養ストレスに感受性化させ、転移を防ぐような癌の治療ターゲットの発見が期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. 難波卓司 小胞体 - ミトコンドリアの情報交換とアポトーシスとオートファジーの誘導
BIO Clinica 33 (7) , 2018 (649) 43-46. (査読なし)
2. Sato H, Hiraki M, Namba T, Egawa N, Baba K, Tanaka T, Noshiro H. Andrographolide induces degradation of mutant p53 via activation of Hsp70. Int J Oncol. 2018, 53, 761-770. (査読あり)
3. Machihara K, Tanaka H, Hayashi Y, Murakami I, Namba T. Quetiromycin A stimulates sorafenib-induced cell death via suppression of glucose-regulated protein 78. Biochem Biophys Res Commun. 2017, 492, 33-40. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

1. 難波卓司 小胞体-ミトコンドリアタンパク質複合体によるミトコンドリアの恒常性維持機構の解明小胞体ストレス研究会 2018年10月
2. 難波卓司 糖尿病の発症に關与する小胞体とミトコンドリアの新たな恒常性維持機構小胞体とミトコンドリアのクロストーク糖尿病学術講演会(招待講演)2018年6月
3. 難波卓司 小胞体膜タンパク質 B-cell receptor-associated protein 31 は autophagy と apoptosis の誘導を制御する. 2017年度生命科学系学会合同年次大会. 2017年12月
4. Takushi Namba. The suppression of endoplasmic reticulum function is a new anti-cancer target. The 11th International Kuroshio Science Symposium. 2017年7月

〔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

難波研究室

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

6 . 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名： 町原加代

ローマ字氏名： Kayo Machihara

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。