

令和元年6月12日現在

機関番号：34517

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18969

研究課題名(和文) Pdc4ノックダウン細胞の解析によるがん化を引き起こすメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of oncogenic transformation by Pdc4 knockdown

研究代表者

吉川 紀子 (YOSHIKAWA, Noriko)

武庫川女子大学・薬学部・准教授

研究者番号：40373120

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：Programmed cell death 4 (Pdc4) は新規がん抑制遺伝子であり、臨床研究において予後の悪い腫瘍でその発現量が減少していることが報告されている。しかし、Pdc4 が細胞のがん化・悪性を抑制している直接的な標的および詳細な作用機序は明らかになっていない。そこで本研究では、正常細胞および転移能力の低いがん細胞を用いて、その機序を明らかにすることを目的とした。その結果、Pdc4 が細胞の浸潤能を抑制すること、さらにその標的分子としてMMP-2 および Twist1 を見出した。また、Pdc4 が翻訳を直接阻害している標的分子として、Np73 遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Pdc4 が細胞の遊走能および浸潤能を抑制すること、その標的分子として、MMP-2 及び Twist1 を見出した。さらに、Pdc4 が直接翻訳を阻害している標的分子として、Np73 遺伝子を同定した。これまでの臨床研究により Pdc4 発現レベルは、多種類のがんの進行度・予後の診断に有用であることが報告されている。従って、Pdc4 の Np73 翻訳抑制を介した細胞のがん化・悪性化抑制機構を解明すれば、新たながん治療法の標的を提示することが出来ると期待される。

研究成果の概要(英文)：Programmed cell death 4 (Pdc4) is a novel tumor suppressor gene which acts as a negative regulator of protein translation and transformation. Pdc4 expression decreases during carcinogenesis in several human cancer sites. Moreover, the direct targets of Pdc4 have not been clarified. In order to elucidate whether Pdc4 inhibits the oncogenic transformation and tumor malignancy, we knocked down Pdc4 in cells. We demonstrated that Pdc4 suppresses the invasive ability of tumor cells through inhibiting MMP-2 secretion and expression of Twist1. Furthermore, we identified that the tumor suppressor Pdc4 attenuates the translation of delta Np73 mRNA. Delta Np73, an isoform of p73 lacking the NH2-terminal transactivation domain, plays an oncogenic role by interfering with the transcriptional activity of tumor suppressors p53 and TA (full-length transactivating isoform) p73.

研究分野：がん転移

キーワード：Pdc4 がん化・悪性化

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

1. 研究開始当初の背景

Programmed cell death 4 (Pdc4) は、発がんを抑制する新規がん抑制遺伝子である (Jansen et al., Cancer Res. 2005)。現在までに、結晶構造解析により Pdc4 の構造がタンパク質の翻訳開始因子である eIF4G と類似していること (LaRonde-LeBlanc et al., Mol. Cell Biol. 2007) 及び Pdc4 は翻訳の際に RNA のステムループ構造をほどく RNA ヘリカーゼである eIF4A と結合することにより、その活性を阻害していることが明らかにされている (Yang et al., Mol. Cell Biol. 2004)。さらに、eIF4A に依存しないキャップ非依存的翻訳開始機構において、Pdc4 が Poly(A)-binding protein に直接結合し、リボソーム上でのペプチド伸長反応を抑制していることも報告されている (Fehler et al., Nucleic Acids Res. 2014)。これらの報告により、Pdc4 の mRNA からタンパク質への翻訳阻害作用機序が明らかにされつつあるが、どのタンパク質の翻訳を阻害しているのか、その直接的な標的分子は未だ明らかにされておらず、Pdc4 の翻訳阻害作用と発がん抑制作用との関係も明らかにされていない。

一方、Pdc4 のいくつかの間接的な標的分子は報告されており、がん化及びがんの悪性化に関与している uPAR、MAP4K 及び AP-1 などの転写を抑制することが報告されている (Yang et al., Mol. Cell Biol. 2006, Leupold et al., Oncogene 2007)。さらに、臨床研究により Pdc4 陽性の肺がん患者の生存日数は、Pdc4 陰性の患者よりも有意に長いことが報告されており (Chen et al., J. Pathol. 2003)、その後、Pdc4 発現レベルは、膵、大腸及び卵巣など多種類のがんの進行度・予後の診断に有用であることも報告されている (Mudduluru et al., Cancer 2007)。このような基礎及び臨床研究の結果から、Pdc4 は p53 や BRCA1 などに匹敵する重要ながん抑制遺伝子であることは明らかである。

2. 研究の目的

本研究では、Pdc4 の生理的機能及び直接的な標的分子を解明することを目的とし、正常細胞及び転移能の低いがん細胞を用いて Pdc4 ノックダウン細胞を作製し、その生理機能を細胞のがん化及び悪性度を指標にして解明する。

申請者はこれまでに、RNA を想定したステムループ構造を持つプロモーターを作製し、そのステムループ構造がほどかれた際に蛍光を発するルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて実験を行い、Pdc4 のステムループルシフェラーゼ阻害作用を確認してきた。タンパク質の翻訳調節は、細胞増殖及びがん化において重要な役割を果たしていることが知られており、翻訳の活性化は乳がん細胞の悪性度の維持に重要であることが報告されている (De Benedetti et al., Int. J. Biochem. Cell Biol. 1999)。そこで申請者は、Pdc4 が細胞のがん化・悪性化に関与しているタンパク質の翻訳を阻害し、がん抑制遺伝子としての生理的機能を発揮していると仮説を立てた。さらに、申請者は C57BL/6NCr マウス由来の正常細胞である C57BL/6J-emb 細胞及び同マウス由来の肺への転移能力の異なる 2 種類のマウスメラノーマ細胞である B16-F0 細胞 (転移能が低い) 及び B16-BL6 細胞 (転移能が高い) を用いて、Pdc4 発現量及び転移能を検討し、Pdc4 発現量と転移能 (悪性度) が負に相関しているという結果も得た。また、正常細胞における Pdc4 の生理的機能を明らかにした報告がないことから、正常細胞を用いてその機能を追究することにより、がん細胞を用いた検討では解明できていない Pdc4 の直接的な標的及び詳細な作用機序解明に新たな突破口が見出せると考え、本研究を着想した。

3. 研究の方法

Pdc4 ノックダウン細胞及び過剰発現細胞の作製

C57BL/6NCr マウス由来の正常細胞である C57BL/6J-emb 細胞、同マウス由来の肺への転移能力の異なる 2 種類のマウスメラノーマ細胞である B16-F0 細胞及び B16-BL6 細胞、NIH Swiss マウス由来の正常細胞である NIH3T3 細胞、ヒト乳がん細胞である T47D 細胞を用いて、siRNA システムを用いてノックダウン細胞を作製した Pdc4 過剰発現細胞は、ヒト乳がん細胞である MDA-MB-231 細胞に T-REx システムを使用して作製した。

In vitro アッセイ系を用いたがん細胞遊走能および浸潤能の測定

小孔を有するフィルターを底面に持つチャンバーを装着した 2 層培養槽を使用し、下層に細胞走化性誘引物質としてフィブロネクチンを添加した。がん細胞の遊走能は、培養槽上層からフィルター小孔を通過して下層へ移動したがん細胞を計数することにより評価した。さらに、がん細胞の浸潤能は、フィルター上面に細胞外マトリックス構成成分であるラミニン、コラーゲンおよびエラスチンを含むマトリゲルをコーティングして、培養槽上層からマトリゲルを分解し、フィルター小孔を通過して下層へ移動したがん細胞を計数することにより評価した。

In vivo 血行性肺転移モデルマウスを用いた転移能の測定

B16-マウスメラノーマ細胞を C57BL/6NCr マウスの尾静脈内に接種した。2 週間後に肺に形成された転移結節を計数することにより、がん細胞の転移能を評価した。

シヨ糖密度勾配遠心法による mRNA の分画

遠心チューブの上部から底部に向けて次第に濃度が高くなるようにシヨ糖溶液の密度勾配を作り、最上部に細胞から抽出した mRNA を添加して遠心し、リボソームとの結合数により mRNA を分画し、単一のリボソームと結合した mRNA (非翻訳 mRNA) 画分及び複数のリボソームが結合した mRNA (活発に翻訳されている mRNA) 画分を分けた。

マイクロアレイを用いた標的遺伝子の解明

上記の実験で分画した mRNA 画分をマイクロアレイによって解析した。コントロール細胞と比較して Pdc4 ノックダウン細胞において、非翻訳 mRNA 画分では減少し、活発に翻訳されている mRNA 画分で増加している mRNA を探索した。

Pdc4 標的遺伝子の mRNA 量及びタンパク質発現量定量による同定

マイクロアレイによって得られた Pdc4 の標的遺伝子候補群を Quantitative RT-PCR 法及びウエスタンブロットング法を用いてさらに詳細に解析し、標的遺伝子を同定した。

4 . 研究成果

転移能の異なるマウスメラノーマ細胞を用いた検討

C57BL/6NCr マウス由来の肺への転移能力の異なる 2 種類のマウスメラノーマ細胞である B16-F0 細胞および B16-BL6 細胞を用いて検討した。転移能の高い B16-BL6 細胞の Pdc4 発現量は、転移能の低い B16-F0 細胞と比較して 70.8% 有意に低値を示した。従って、Pdc4 発現量とがん細胞の転移能は負に相関している可能性が示唆された。さらに、そのがん細胞の転移能をより詳細に追究し、がん細胞が組織を浸潤する際に細胞外マトリックスを分解するために分泌する MMP-2 分泌量が、B16-BL6 細胞では B16-F0 細胞と比較して 4.0 倍有意に高値を示すこと、および、がん細胞が高い浸潤能・運動能を獲得する際に必要な上皮間葉転換に關与する Twist1 タンパク質発現量が、B16-BL6 細胞では B16-F0 細胞と比較して 5.5 倍有意に高値を示すことを見出した。 Twist1 と同様に上皮間葉転換に關与する Vimentin タンパク質発現量は、両がん細胞で有意な差は認められなかった。

Pdc4 ノックダウンマウスメラノーマ細胞を用いた検討

上記の転移能の異なるマウスメラノーマ細胞を用いた検討により、Pdc4 はがん細胞の浸潤能、MMP-2 分泌量および Twist1 タンパク質発現量を制御している可能性が示唆された。そこで、これらの変化が実際に Pdc4 によるものかを調べるために Pdc4 ノックダウンマウスメラノーマ細胞を作製して検討した。実際には、Pdc4 発現量が高く、転移能が低い B16-F0 細胞に siPdc4 を導入し、Pdc4 ノックダウン細胞を作製した。siPdc4 導入 24 時間後の Pdc4 タンパク質発現量は、コントロールと比較して、96.6% 有意に減少した。従って、以下の実験では、同条件で作製した Pdc4 ノックダウン細胞を用いた。

In vitro にて、がん細胞の浸潤能を検討したところ、Pdc4 ノックダウン細胞のフィルター下面に浸潤した細胞数は、コントロール細胞と比較して 2.2 倍高値を示した。また、遊走能も浸潤能と同様に高値を示した。さらに、MMP-2 分泌および Twist1 タンパク質発現量も、Pdc4 ノックダウン細胞においてコントロール細胞と比較して有意に高値を示した。一方、Vimentin タンパク質発現量は、両がん細胞で有意な差は認められなかった。

また、*in vivo* 血行性肺転移モデルマウスを用いて Pdc4 ノックダウン細胞の転移能および悪性度をマウスの生存日数を指標として検討したところ、B16-F0 の Pdc4 ノックダウン細胞接種群では、コントロール群と比較して、生存日数の短縮傾向が認められた。

Pdc4 ノックダウンヒト正常細胞を用いた検討

上記の Pdc4 ノックダウンマウスメラノーマ細胞を用いた検討により、Pdc4 が細胞の遊走能及び浸潤能を抑制すること、その標的分子が、MMP-2 及び Twist1 であることが明らかとなった。そこで、C57BL/6NCr マウス由来の正常細胞である C57BL/6J-emb 細胞及び NIH

Swiss マウス由来の正常細胞である NIH3T3 細胞を用いて、Pdc4 ノックダウン細胞を作製し、正常細胞における Pdc4 の役割を検討した。細胞に siPdc4 を導入し、Pdc4 ノックダウン細胞を作製した。両正常細胞共に、siPdc4 導入 24 時間後の Pdc4 タンパク質発現量は、コントロールと比較して、80.0% 以上有意に減少した。従って、以下の実験では、同条件で作製した Pdc4 ノックダウン細胞を用いた。その結果、両正常細胞共に Pdc4 ノックダウン細胞の遊走能は、コントロール細胞と比較して有意に高値を示した。

さらに、C57BL/6J-emb 細胞及び上記の転移能の低いマウスメラノーマ細胞である B16-F0 細胞の Pdc4 ノックダウン細胞を用いてマイクロアレイ解析を行い、セントロメアに局在する CENP-A のシャペロンである Hjurp が Pdc4 の標的分子である可能性が示唆された。

Pdc4 ノックダウンヒト乳がん細胞を用いた検討

ヒト乳がん細胞である T47D 細胞に siPdc4 を導入し、30 時間後の Pdc4 mRNA 量及びタンパク質発現量は、コントロールと比較して、それぞれ 84.2% 及び 67.5% 減少した。また、Pdc4 のノックダウンが、T47D 細胞にて機能的に働いていることを AP-1 転写活性、浸潤能及び遊走能の増強により確認した。

上記の Pdc4 ノックダウン T47D 細胞より抽出した mRNA を、ショ糖密度勾配遠心により 22 のフラクションに分画した。非翻訳 mRNA 画分の指標としてリボソーム 40S 及び 80S サブユニット構成分子である 18S mRNA 量を測定し、翻訳が活発に行われている mRNA 画分の指標として GAPDH mRNA 量を測定し、18S mRNA の発現が多く認められたフラクション 3~10 を非翻訳 mRNA 画分、GAPDH mRNA の発現が多く認められたフラクション 17~22 を翻訳 mRNA 画分とした。

非翻訳 mRNA 画分及び翻訳 mRNA 画分を用いて、Affymetrix Human gene U133 plus 2.0 Array を行い、Pdc4 が翻訳を阻害している遺伝子候補群を得た。Quantitative RT-PCR 法にてマイクロアレイの結果を確認し、p53 遺伝子ファミリーである p73 遺伝子の N 末端の転写活性化ドメインを欠損している $\Delta Np73$ 遺伝子を同定した。

そこで、Pdc4 ノックダウン T47D 細胞を用いて $\Delta Np73$ タンパク質発現量を検討したところ、コントロールと比較して 2.5 倍増加した。さらに、MDA-MB-231 ヒト乳がん細胞に Pdc4 を過剰発現させて T47D 細胞と同様の実験を行ったところ、コントロールと比較して $\Delta Np73$ 遺伝子の翻訳及びタンパク質発現量は減少した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Hatai M, Yoshikawa N, Kinoshita E, Horiyama S, Kagota S, Shinozuka K, Nakamura K. Invasion-inhibiting effects of gaseous components in cigarette smoke on mouse rectal carcinoma colon-26 cells. *In Vivo*, 32(3), 493-497 (2018), DOI : 10.21873/invivo.11266 査読あり

〔学会発表〕(計 20 件)

菅野莉央, 関子菜月, 吉川紀子, 岩田恵理子, 畑井麻友子, 籠田智美, 篠塚和正, 中村一基
マウス大腸がん細胞およびマウスメラノーマ細胞の遊走能に及ぼす炎症性刺激の影響
第 92 回日本薬理学会, 大阪, 2019. 3. 14-16.

木下恵理子, 吉川紀子, 畑井麻友子, 籠田智美, 篠塚和正, 中村一基
がん抑制遺伝子 Pdc4 がマウス線維芽細胞の遊走能に及ぼす影響
第 68 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 兵庫, 2018. 10.13.

Kinoshita E, Yoshikawa N, Hatai M, Kagota S, Shinozuka K, Nakamura K
The effect of tumor suppressor Pdc4 knockdown on the malignancy of mouse melanoma cells
18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (Kyoto, Japan), 2018. 7.1-6

Yoshikawa N, Kinoshita E, Hatai M, Kagota S, Shinozuka K, Nakamura K
Tumor suppressor Pdc4 attenuates delta Np73 translation in human breast cancer cells
18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (Kyoto, Japan), 2018. 7.1-6

西風香那, 後藤美紀, 吉川紀子, 木下恵理子, 畑井麻友子, 籠田智美, 篠塚和正, 中村一基
抗がん剤耐性を獲得したマウスメラノーマ細胞における Pdc4 発現量の比較
日本薬学会第 138 年会, 金沢, 2018. 3.25-28.

木下恵理子, 吉川紀子, 畑井麻友子, 籠田智美, 篠塚和正, 中村一基
マウスメラノーマ細胞に対するがん抑制遺伝子 Pdc4 ノックダウンの影響
日本薬学会第 138 年会, 金沢, 2018. 3.25-28.

Yoshikawa N, Hatai M, Kinoshita E, Kagota S, Shinozuka K, Nakamura K.
Anti-metastatic effect of Clopidogrel is associated with inhibition of invasiveness in
B16-BL6 mouse melanoma cells
6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2017
(Stockholm, Sweden), 2017.5.21-24

Kinoshita E, Yoshikawa N, Inoue Y, Kita S, Kuribayashi C, Hatai M, Kagota S,
Shinozuka K, Nakamura K.
Effect of tumor suppressor Pdc4 on tumor malignancy
6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2017
(Stockholm, Sweden), 2017.5.21-24

木下恵理子, 吉川紀子, 井上侑香, 北佐知子, 栗林千尋, 畑井麻友子, 籠田智美, 篠塚和正,
中村一基
がん細胞の悪性化に対するがん抑制遺伝子 Pdc4 の影響
日本薬学会第 137 年会, 仙台, 2017.3.24-27

井上侑香, 北佐知子, 栗林千尋, 木下恵理子, 畑井麻友子, 籠田智美, 篠塚和正, 中村一基,
吉川紀子
がん抑制遺伝子 Pdc4 がマウスメラノーマ細胞の浸潤能に与える影響
第 66 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 大阪, 2016. 10. 15

〔その他〕

武庫川女子大学薬学部薬理学 1 研究室 ホームページ

<http://ph.mukogawa-u.ac.jp/~yakuri1/>

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。