

令和 2 年 4 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08650

研究課題名(和文) 癌の発症/再発を担うERKシグナル制御性遺伝子群の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of ERK-regulated genes responsible for onset/relapse of cancers

研究代表者

久保田 裕二 (Kubota, Yuji)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：70614973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ERK経路(Raf-MEK-ERK)は増殖刺激により活性化されて細胞増殖を誘導する一方で、経路上流に位置する増殖因子受容体、Ras、Rafなどの遺伝子変異はERKシグナルの異常活性化を導き、発癌を駆動する。しかし、これらの変異体の出現がどのようなプロセスを経て細胞の癌化や多様な悪性形質を誘導するのか、その分子機序には不明な点が多い。本研究ではERKシグナルが異常活性化を示す細胞株について、網羅的な遺伝子発現解析を実施した。その結果、癌遺伝子による強力かつ継続的なERK活性化が、発癌のみならず抗癌剤耐性獲得を導く様々な蛋白質や非翻訳性RNAの発現制御に寄与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ERK経路を構成する遺伝子の多くは様々な癌で高率に変異が認められる。その多くはERKシグナルを異常活性化して癌化や抗癌剤抵抗性を誘導するが、その分子的基盤は不明な点が多かった。本研究により、癌遺伝子に由来する強力なERKシグナル下流において、発癌および抗癌剤抵抗性の獲得に寄与する様々な遺伝子とその機能が明らかにされた。これらの知見は新たな分子標的や癌治療法の開発を促進すると期待される。

研究成果の概要(英文)：The ERK pathway (Raf-MEK-ERK) is activated by mitogenic stimuli and mediates proliferative and pro-survival signals. Somatic mutations in this pathway are frequently found in various cancers, and most of these oncogenes, such as EGFR, Ras and Raf, induce abnormal activation of ERK. However, the detailed molecular mechanism of the process by which they cause carcinogenesis.

In this study, I performed global gene expression analysis of human cell-lines with high ERK activity and found that the oncogene-induced strong and constitutive ERK activation increases the expression of proteins and non-coding RNAs that promote carcinogenesis or acquired anticancer drug resistance.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん MAPK経路 ERK経路

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ERK経路(Raf-MEK-ERK)は、各キナーゼ分子がリン酸化により段階的に活性化される細胞内シグナル伝達システムである(図1)。このERKシグナルは増殖刺激により活性化され細胞増殖を誘導する一方で、その制御異常は発癌を導く。実際に、ERK経路上流に位置する増殖因子受容体(EGFR)の遺伝子増幅や、Ras、Rafなどの遺伝子変異が様々な癌で高率に報告されている。しかし、これらの変異体による強力かつ持続的なERKシグナルが、どのような

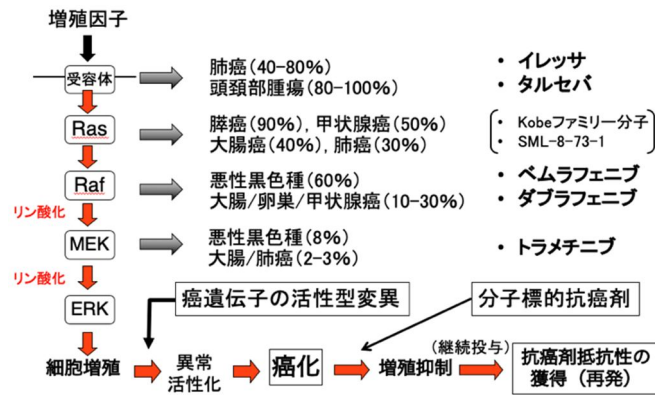


図1. ERK経路を構成する癌遺伝子の活性型変異と分子標的抗癌剤(Ras阻害剤は開発中)。癌遺伝子によるERK経路の異常活性化は発癌の根本原因であり、早期癌の段階で認められる。分子標的抗癌剤の腫瘍抑制能は多くの場合一過的であり、やがて抵抗性を獲得して再発する。

プロセスを経て癌化を誘導するのか、その分子基盤は未だ不明である。また近年、これらの癌細胞にERK経路の阻害剤(抗癌剤)を処理すると、生存シグナルであるAKT経路の異常活性化を誘発することが報告された。この現象は癌の抗癌剤抵抗性を示す機序として注目されているが、その分子機構の詳細については明らかになっていない。これまでに研究代表者は、低、中、高度の三種のERK活性強度を示すヒト細胞株群の作出に成功しており、ERKシグナルが高活性化している細胞株のみ、悪性形質転換能を保有していることを見出してきた。また、これらの細胞株を用いたゲノムレベルでの遺伝子発現解析を実施することで、ERKシグナル強度の相違が遺伝子発現プロファイルをどのように変化させ、発癌や抗癌剤抵抗性を導くか検証を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究ではERKシグナルの異常活性化により発現亢進、減少する遺伝子を網羅的に探策・解析することで、癌の発生や再発の分子プロセスを解明することを目的とした。また、ERK高活性化により発現変動した遺伝子群の中には、既知遺伝子の他にも現在まで機能が報告されていない新規遺伝子も多く含まれていたため、これらの基礎的データを取得すると共に、その機能的意義についても同様に検証した。

3. 研究の方法

まず、上述した網羅的遺伝子発現解析のデータから、高度なERK活性下においてのみ有意な発現変動を示した遺伝子群を選抜した。次に、これらの遺伝子についてERK高活性化の各種癌細胞株や臨床癌組織における実際の発現動態を検証するため、ウェスタンブロットやq-PCR、組織染色、in silico解析を実施した。また、各遺伝子に対するsiRNAによるノックダウンや、一過的・恒常発現系を駆使して、各遺伝子が細胞の増殖能や生存能に寄与するか検証するとともに、これらの遺伝子発現が癌の生存や抗癌剤抵抗性など、癌の悪性形質に関与する可能性についても検討した。

4. 研究成果

まず始めに、高度なERK活性に依存して発現量が有意に増加あるいは減少する遺伝子群を選抜した(20遺伝子)。次にこれらの遺伝子の癌臨床検体における発現レベルを調査するため、癌の公共データベース(TCGA)によるin silico解析を行うとともに、癌組織マイクロアレイの免疫染色を実施した。その結果、今回解析した遺伝子の多くは、ERK経路の活性型遺伝子変異が高率

に認められる癌種（膵臓癌・大腸癌・肺癌など）において、正常組織に比べて有意に発現亢進していることが明らかとなった。そこで次に、これらの遺伝子が実際に ERK 経路の活性型変異を有する様々な癌細胞株（悪性黒色腫:A375/G361/sk-Mel28、非小細胞肺癌:H1299/A549、膵臓腺癌:Panc1/Aspc1、大腸癌:WiDr/RK0、扁平上皮癌:A431）で発現しているか検証した。ウェスタンブロットおよび q-PCR による検討の結果、コントロール細胞（HEK293：低 ERK シグナル）と比較して、今回検討した遺伝子のほぼ全てがこれらの癌細胞で発現亢進していることを確認した。また、これらの遺伝子発現は、癌細胞株を MEK 阻害剤（トラメチニブ）を処理し ERK シグナルを停止させることで、著明に抑制されることも確認した。

次に、今回の解析対象の遺伝子の中でも特に、現在まで機能が解明されていない分子に着目した。これらが癌細胞の増殖・生存能に関与するか検証するため、各遺伝子を標的とした siRNA を上述の癌細胞株群に導入し、ノックダウンによる影響を観察した。その結果、特定のファミリー分子（Gene A, B：現在論文投稿中）の発現を抑制した癌細胞株では、増殖能や生存能を担うシグナル伝達経路の中でも特に AKT 経路の活性が亢進していることを見出した。これらの遺伝子は、HEK293 細胞（ERK 活性：低）に生理的な ERK 活性化因子である Epidermal Growth Factor（EGF）を与えても殆ど発現誘導されなかったが、Ras や Raf などの癌由来の活性型変異体の導入や、発がんプロモーターである TPA（Phorbol-12-Myristate-13-Acetate）処理による強力かつ継続した ERK シグナル下においては強く誘導されることが分かった。また、これらの分子はいずれも ERK シグナルの収束に伴い急速に消失したことから、転写あるいは蛋白質レベルにおいて発現量を厳密に制御する未知の機構が存在することが予想された。そこで次に、これらの遺伝子を一過的または恒常的に発現するプラスミドベクターを作成し、HEK293 細胞に導入したところ、生理的な AKT シグナル活性強度が明らかに減弱することが分かった。興味深いことに、AKT シグナルに対する抑制効果は、Gene A, B 分子の単独発現よりも共発現した際に著明に認められたことから、両分子は本機構において協同的に機能することが示唆された。さらに、これらの遺伝子を恒常発現させた癌細胞では、トラメチニブを添加しても AKT の活性化が生じず、癌細胞の増殖が抑制されることを見出した（図 2B）。以上の結果から、これらの分子は通常、強力な ERK シグナルによる発癌を抑制するブレーキとして作用しているが、抗癌剤により ERK 経路が阻害された癌細胞では、その遺伝子発現が停止することで AKT シグナルの活性化を導き、生存に寄与することが示唆された。

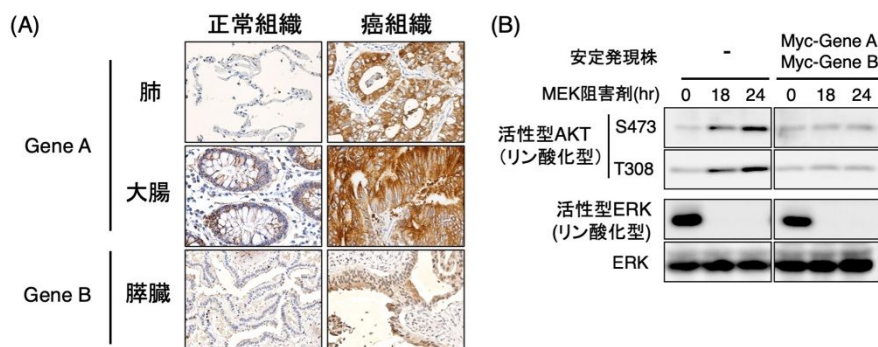


図2. Gene A, Bの癌組織における発現動態、および抗癌剤抵抗への寄与

- (A) 癌臨床検体におけるGene-A, Bの組織染色像。各正常組織と比較して、癌組織ではGene-A, B遺伝子の高発現が認められる。
- (B) AKT活性化に対する作用。肺癌細胞(H1299; NRas^{Q61K}変異陽性)へのMEK阻害剤(抗癌剤)処理は、Gene-A, Bの発現を抑制し、AKT活性化を誘導する。一方、Gene-A, Bを安定発現させたH1299細胞株では、抗癌剤によるAKT活性化が抑制される。

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 0件）

1. 著者名 Ko Fujioka, Yuji Kubota, Mutsuhiro Takekawa	4. 巻 Vol 8
2. 論文標題 Wheat Germ Agglutinin (WGA)-SDS-PAGE: A Novel Method for the Detection of O-GlcNAc-modified Proteins by Lectin Affinity Gel Electrophoresis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 Iss 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21769/BioProtoc.3098	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 Kubota Yuji, Fujioka Ko, Takekawa Mutsuhiro	4. 巻 12
2. 論文標題 WGA-based lectin affinity gel electrophoresis: A novel method for the detection of O-GlcNAc-modified proteins	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0180714
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0180714	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 Iijima Masatomi, Kubota Yuji, Sawa Ryuichi, Kubota Yumiko, Hatano Masaki, Igarashi Masayuki, Kawada Manabu, Momose Isao, Takekawa Mutsuhiro, Shibasaki Masakatsu	4. 巻 71
2. 論文標題 A guanine derivative as a new MEK inhibitor produced by Streptomyces sp. MK63-43F2	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 135 ~ 138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/ja.2017.100	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15件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 久保田 裕二, 藤岡 興, 武川 睦寛
2. 発表標題 O-GlcNAc化蛋白質の検出と定量的解析を可能にするレクチン親和性ゲル電気泳動法の開発と応用
3. 学会等名 第69回日本電気泳動学会総会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Kubota, Yusuke Takagi and Mutsuhiro Takekawa
2. 発表標題 Quantitative gene expression analysis in cells that express cancer- or congenital Ras/MAPK syndrome-derived MEK mutants
3. 学会等名 新学術領域「数理シグナル」第一回国際シンポジウム（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田 裕二, 武川 睦寛
2. 発表標題 ERK経路の異常活性化により誘発される新規癌増殖シグナル機構の解明
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Kubota, Fujioka Yuko, Yusuke Takagi, Daisuke Matsubara, Ashwini Patil, Eiji Kinoshita, Kenta Nakai, Nobuo N. Noda and Mutsuhiro Takekawa
2. 発表標題 Qualitative and quantitative analysis of cancer- and congenital Ras/MAPK syndromes-associated MEK mutants
3. 学会等名 第77回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田 裕二, 藤岡 興, 武川 睦寛
2. 発表標題 O-GlcNAc化蛋白質の定量的解析を可能にするレクチン親和性ゲル電気泳動法の開発と応用
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Kubota, Ko Fujioka and Mutsuhiro Takekawa
2. 発表標題 A novel method for the detection of O-GlcNAc-modified proteins: WGA-based lectin affinity gel electrophoresis (WGA-SDS-PAGE)
3. 学会等名 プロテイン・アイランド松山（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久保田裕二、武川睦寛
2. 発表標題 癌および先天性Ras/MAPK 症候群におけるMEK 変異体の異常活性化機構の解明と特異的阻害剤の同定
3. 学会等名 新学術領域「数理シグナル」 第1回若手ワークショップ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久保田裕二、木下栄司、武川睦寛
2. 発表標題 癌に由来するMEK遺伝子変異体の 異常リン酸化の機能解析および 病理学的意義の解明
3. 学会等名 東京大学医科学研究所共同研究拠点事業 平成29年度成果報告会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuji Kubota, Tomoyuki Tsuchiya and Mutsuhiro Takekawa
2. 発表標題 Negative regulation of the ERK pathway by caspase-mediated cleavage of MEK1 during apoptosis.
3. 学会等名 第76回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yuji Kubota, Ko Fujioka and Mitsuhiro Takekawa
2. 発表標題 WGA-based lectin affinity gel electrophoresis. A novel method for the detection of O-GlcNAc-modified proteins
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 (第40回 日本分子生学会、第90回 日本生化学会大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 久保田裕二、武川睦寛
2. 発表標題 フィードバック・リン酸化によるERKシグナル制御機構の数理シミュレーション解析
3. 学会等名 第1回 MMDS、医科学研究所、新領域創成科学研究科合同ワークショップ
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久保田 裕二、武川 睦寛
2. 発表標題 レクチンアフィニティーゲル電気泳動法を利用したO-GlcNAc化タンパク質の解析
3. 学会等名 日本プロテオーム学会2019年大会・第70日本電気泳動学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久保田 裕二、武川 睦寛
2. 発表標題 O-GlcNAc化蛋白質の網羅的探索技術の開発と細胞内シグナル伝達解析への応用
3. 学会等名 新学術領域「数理シグナル」第3回若手ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Kubota, Ko Fujioka, Mitsuhiro Takekawa
2. 発表標題 Aberrant protein O-GlcNAcylation promotes the activation of MAPK signaling and cancer growth
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 Yuji Kubota, Ko Fujioka, Mitsuhiro Takekawa
2. 発表標題 Aberrant protein O-GlcNAcylation promotes the activation of MAPK signaling and cancer growth
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

〔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