

令和元年6月10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15018

研究課題名(和文) 肺癌における翻訳開始因子eIF2の分子機構の解明と新規治療薬の開発応用

研究課題名(英文) Molecular mechanism of eIF2gamma in Lung cancer

研究代表者

栗本 遼太 (KURIMOTO, Ryota)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：10753957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：翻訳開始因子eIF2gammaをsiRNAによって抑制することで、eIF2aのリン酸化及びその下流因子の発現がタンパク質レベルで促進され、肺癌細胞株の腫瘍増殖が抑制された。また、eIF2のshRNAによるノックダウン細胞株を作成し、マウスXenograftモデルによる腫瘍増殖能を検討したところ、皮下移植モデルにおいて腫瘍の増殖能の抑制が認められた。さらに、eIF2gammaのHA配列を有するノックイン細胞をCRISPR-Cas9法を用いて樹立した。現在のところ、個別のタンパク質翻訳解析のため、樹立した細胞を用いてリボソームフットプリント法の条件を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の特色は、腫瘍の治療として翻訳機能を直接標的としている点である。eIF2を抑制することで、直接タンパク質翻訳を抑制する効果とeIF2リン酸化抑制の解除による間接的効果の2つの効果によって、効率よく腫瘍増殖の抑制が期待される。実際、eIF2の抑制により、click-it反応を用いた系においてタンパク質合成全体の抑制が確認され、さらにeIF2のリン酸化抑制の解除が確認された。本研究は、肺癌のみならず難治とされる他の悪性腫瘍の新規治療戦略にもつながり、悪性腫瘍の研究に大きく貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：By suppressing eIF2gamma by siRNA, the phosphorylation of eIF2a and its downstream factors (ATF-4, CHOP) was promoted at the protein level, and the tumor growth of lung cancer cell lines was suppressed. When knockdown cell lines were generated by shRNA and the tumor growth ability was examined by mouse Xenograft model, suppression of tumor growth ability was observed in the subcutaneous transplantation model. In addition, they have the HA sequence of eIF2gamma-established using the Cas9 method. In addition, knockout mouse eIF2s3y, which is a homologue in mice, was created using the CRISPR-Cas9 method, and it was confirmed that spermatogenesis was strongly suppressed. Confirmed that the current translation. Therefore, conditions of ribosomal footprinting are being studied using established cells.

研究分野：腫瘍学

キーワード：RNA eIF2gamma 肺癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌は本邦におけるがん死亡の第1位である。分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬(ニボルマブなど)の登場で飛躍的に治療成績が向上したが、なお治癒は困難である。いずれの治療でも薬剤耐性が生じるため、新規治療標的の同定が求められる。

真核生物の翻訳開始因子 eIF2 は、リボソームへ開始メチオニン tRNA (Met-tRNA_i) を運搬する、翻訳開始のステップを担っている。GTP 結合により Met-tRNA_i と結合し、eIF2-GTP-Met-tRNA_i の3者複合体 (ternary complex : TC) を形成する。eIF2 はヘテロ3量体 (eIF2₁・eIF2₂・eIF2₃) であり、eIF2₂ が GTP 結合部位を有する。

悪性腫瘍においては、増殖能に関わるタンパク質の翻訳が亢進しており、TC の高発現が報告されている (Dua K, et al. Proteomics, 2001., E.C. Holland, et al. Oncogene, 2004.)。これまで悪性腫瘍においては eIF2 のリン酸化抑制や、eIF2 に特異的な GTPase 活性化タンパク質 (eIF5) の活性化により、細胞増殖、浸潤を亢進することが報告されている。このように、eIF2 複合体は悪性腫瘍の病態に深く関与している。

その一方、eIF2 の制御機構は不明である。当研究室では、世界で初めて eIF2 のマウスホモログである eIF2s3y のノックアウトマウスを樹立した。eIF2s3y のノックアウトによって顕著な精子低形成と未分化精原細胞の段階での分化抑制が認められた (Matsubara Y, et al. Stem Cells Dev, 2015)。我々は予備実験として、ヒト肺癌細胞株 (A-549) を用いて siRNA による eIF2 抑制を行い、細胞増殖能が著しく低下するという結果を得た。

eIF2 は、悪性腫瘍で活性化が示唆されている eIF2 複合体のコアタンパク質であり、その細胞増殖能や分化能への関与が強く示唆され、有力な治療候補であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 肺癌細胞株における eIF2 の発現及び機能の評価、関与する機能分子の同定

肺癌細胞株と siRNA 及び CRIPR/Cas9 により樹立した eIF2 ノックアウト肺癌細胞株を用いて、mRNA・タンパク質レベルでの eIF2 とその関連する主要因子 (eIF2₁、eIF2 関連 p67、eIF2 リン酸化等) の発現状況を明らかにする。さらに、ピューロマイシン類似体の翻訳抑制作用を利用した click-iT 反応や次世代シーケンサーを用いたリボソームフットプリント法により、タンパク質翻訳の変化をトランスクリプトームレベルで明らかにする。

さらに、免疫沈降法と質量分析機により eIF2 と関与する機能分子の同定を行う。

(2) In vitro における eIF2 の増殖能、浸潤能、分化能へ与える影響

eIF2 ノックアウト肺癌細胞株を用いて、細胞増殖能、マトリゲル浸潤アッセイによる浸潤能への影響を解明する。さらに、増殖能に関わるシグナル伝達経路への影響をタンパク質レベルで明らかにする。

また、本研究代表者は、肺癌細胞株を TGF β と FGF2 の共刺激により効果的に未分化な細胞へと分化転換させる系を確立している (Kurimoto R, et al. Int J Oncol, 2016., Kurimoto R, et al. Oncol Letters, 2016 in press)。この系において、eIF2 のノックアウトが分化誘導へ与える影響を明らかにする。

(3) In vivo における eIF2 の増殖能、転移形成能へ与える影響

Xenograft マウスモデルを用いて eIF2 ノックアウト肺癌細胞株の皮下移植法及び尾静注法による移植実験を行い、腫瘍形成能、増殖能、転移形成能へ与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 肺癌細胞株における eIF2 の発現及び機能の評価

eIF2 の抑制により起こると予想される下の2つの機序の分子生物学的、生化学的な検討を行う。

eIF2 リン酸化抑制の検証

eIF2 を抑制することで、eIF2 リン酸化抑制が解除されることが予想される。A-549 細胞株において、eIF2 を siRNA で抑制することで、eIF2 リン酸化およびそれに伴うストレス応答への影響を検討する。

直接タンパク質翻訳を抑制する効果の検証

さらに、eIF2 抑制による全タンパク質翻訳抑制効果を、以下の手法で評価する。

・ピューロマイシン類似体の翻訳抑制作用を利用した click-iT 反応

翻訳途上の新生タンパク質をピューロマイシン類似体 (OP-puro: 40 μ M, 30 分) に結合させ、アジド-アルキン反応を利用して可視化し、新生タンパク質翻訳を評価する。

・次世代シーケンサーを用いたリボソームフットプリント法

リボソームが結合した翻訳途上の mRNA はヌクレアーゼから保護されている。これを利用し、RNaseI 処理 (1U/ μ L) の後にシヨ糖密度勾配法 (超遠心 36000rpm, 2 時間, 4 $^{\circ}$ C) を行う。「リボソーム-mRNA 結合体」を単離し、翻訳途上の標的 mRNA 配列を次世代シーケンサーで解析する。これにより、翻訳中の mRNA の配列、種類を網羅的に確認する

(2) In vitro における eIF2 の増殖能、浸潤能、分化能へ与える影響

eIF2 を抑制することで、効果的に細胞増殖を抑制することが期待される。我々は先述のように、siRNA による eIF2 抑制で著しい増殖抑制効果 (MTT アッセイ) を確認した。今後、複数の細胞種で増殖能 (MTT アッセイ)、浸潤能 (マトリゲル浸潤アッセイ) の評価を行う。

また、本研究代表者が既に確立している TGF β と FGF-2 (共に 10ng/ml, 48 時間) による分化転換 (Kurimoto R, et al. Int J Oncol, 2016., Kurimoto R, et al. Oncol Letters, 2016 in

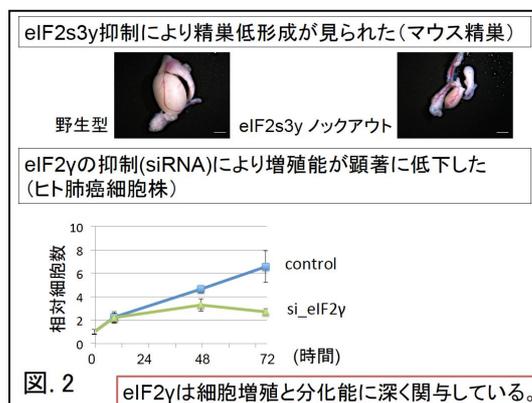
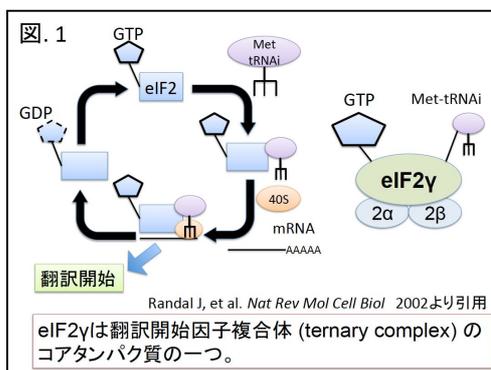
press)で、eIF2 のノックアウトが分化誘導へ与える影響を評価する。分化転換によって、上皮系悪性腫瘍の肺癌細胞がその上皮系細胞の特徴を失い、間葉系細胞の特徴を獲得する。eIF2 のノックアウト細胞にこの分化転換の刺激を与え、その前後における上皮系マーカー (E-カドヘリン) と間葉系マーカー (ビメンチン、フィブロネクチン) 転写因子 (slug, Zeb1) の発現変化を、qRT-PCR 法、ウェスタンブロット法、蛍光免疫染色法で評価する。スクラッチアッセイにより細胞移動能を評価する。

(3) In vivo における eIF2 の増殖能、転移形成能へ与える影響

本研究に先立ち肺癌細胞株に luciferase 遺伝子を導入し、luciferase による蛍光によってマウス xenograft モデルの腫瘍を視覚化する技術を確立している。これを用いて、肺癌細胞株及び eIF2 ノックアウト肺癌細胞株を SCID マウスへ皮下注及び尾静注による移植実験を行う。この系で、腫瘍形成能、増殖能 (腫瘍径)、転移形成能を評価する。

(4) eIF2 に関与する機能分子の同定

eIF2 はタンパク質翻訳の中樞を担っていることが明らかとなっているが、その制御機構は不明である。その一方で、eIF2 リン酸化を制御する eIF2 関連 p67 (MetAP2) のように、eIF2 と結合して機能する特有の分子が発見されている。この目的のために、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集技術によってフラグ付加 eIF2 を有する細胞株を樹立し、免疫沈降法と質量分析機により eIF2 と関与する機能分子の同定を行う。



4. 研究成果

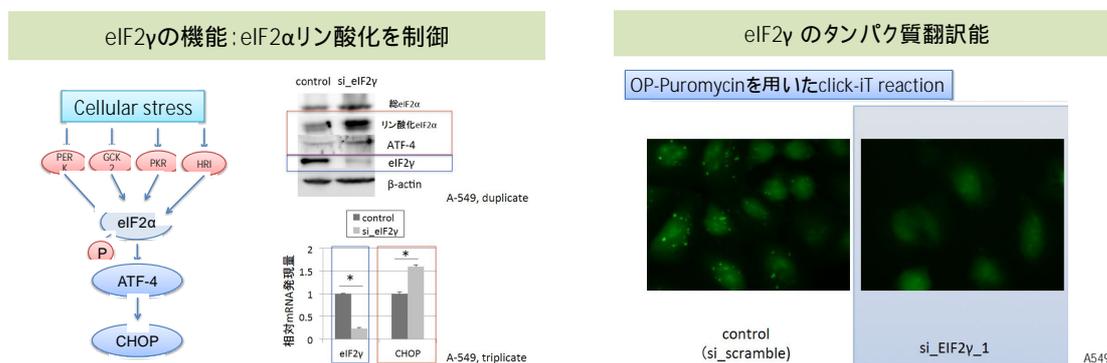
(1) 肺癌細胞株における eIF2 の発現及び機能の評価

eIF2 リン酸化抑制の検証

A-549 細胞株において、eIF2 を siRNA で抑制することで eIF2 リン酸化抑制が解除され、下流因子としてストレス応答因子の重要な因子である ATF-4 およびその下流の CHOP 遺伝子の発現が亢進することを、mRNA、タンパク質発現の双方で確認することができた。このことから、肺癌細胞株において eIF2 は、eIF2 のリン酸化抑制を介して、ストレス応答の制御を行うことが示唆される。

直接タンパク質翻訳を抑制する効果の検証

eIF2 抑制による全タンパク質翻訳抑制効果を、ピューロマイシン類似体の翻訳抑制作用を利用した click-iT 反応を用いて解析した。翻訳途上の新生タンパク質をピューロマイシン類似体 (OP-puro: 40 μM, 30 分) に結合させ、アジド-アルキン反応を利用して可視化し、新生タンパク質翻訳を評価した。その結果、A549 細胞で siRNA による eIF2 の抑制により、新生タンパク質によるリボソームへの集積が顕著に減少した。



次に、eIF2 により制御を受ける翻訳中の mRNA の配列、種類を網羅的に確認するために、次世代シーケンサーを用いたリボソームフットプリント法を計画した。リボソームが結合した翻訳途上の mRNA はヌクレアーゼから保護されているため、RNaseI 処理の後にシヨ糖密度勾配法 (超遠心 36000rpm, 2 時間、4) を行う。現在のところ、RNaseI 処理の条件により RNA の検出感度が大きく異なるため、条件検討を続けている。類似技術として RNA と RNA 結合タンパ

ク質の結合部位を同定する HITS-CLIP 法 (High-through put cross-linked immunoprecipitation) を確立しており、同様に検証を続ける。

(2) In vitro における eIF2 の増殖能、浸潤能、分化能へ与える影響

eIF2 を抑制することで、効果的に細胞増殖を抑制することが期待される。siRNA による eIF2 抑制により、A549 細胞において著しい増殖抑制効果 (MTT アッセイ) が認められた。同様の結果が、293FT 細胞でも認められた。また、TGF と FGF-2 (共に 10ng/ml、48 時間) による分化転換においては、eIF2 抑制によっても細胞の形態に変化は認められず、上皮系マーカー (E-カドヘリン) と間葉系マーカー (ビメンチン、フィブロネクチン)、転写因子 (slug) の発現に有意な変化は認められなかった。このことから、eIF2 は増殖能へ影響を及ぼすと考えられるが、浸潤、分化への影響は確認できなかった。しかし、これらは siRNA による一過性ノックダウンの系のみでの検討であり、より長期的なノックダウンによる効果を shRNA やノックアウト細胞株によって検証する必要があると考えられる。

(3) In vivo における eIF2 の増殖能、転移形成能へ与える影響

eIF2 の抑制による in vivo における影響を検証するために、レトロウイルス shRNA による eIF2 のノックダウン細胞を樹立した。この細胞をヌードマウスへ皮下移植を行い、in vivo における腫瘍増殖能を検証した。その結果、レトロウイルス shRNA による eIF2 の抑制 (約 40%) により、有意な腫瘍増殖能の低下が認められた。さらに、CRISPR/Cas9 による eIF2 ノックアウト肺癌細胞株 (eIF2 -KO-A549 細胞) を樹立した。この eIF2 -KO-A549 細胞を用いた Xenograft モデルによる腫瘍増殖の検証を行ったものの、eIF2 -KO-A549 細胞の皮下への定着が乏しく、腫瘍増殖の評価が困難であった。今後は、腫瘍の定着への影響、すなわち幹細胞性や周囲環境との interaction との関連性を検討する必要がある。

(4) eIF2 に関与する機能分子の同定

この他、CRISPR/Cas9 を用いて eIF2 のマウスホモログである eIF2s3y への HA タグノックインマウスを樹立した。さらに、A549 細胞の eIF2 への HA タグノックイン細胞を樹立した。今後はこのマウスおよび細胞を用いて、eIF2s3y と直接 interact する機能分子を in vivo、in vitro 双方において検討する予定である。

(5) 肺がん細胞における RNA 階層の新しい制御機構の解明

今回 eIF2 による RNA 階層における遺伝子発現の制御、翻訳開始制御を検討するとともに、同様に RNA 階層において遺伝子発現の制御を行う機構を解明するため、新たにスクリーニングシステムを構築した。肺がん細胞において抑制されている腫瘍抑制 microRNA である let-7a を標的として、これを RNA 階層で制御する因子を、microRNA の発現レポーターとしての luciferase レポーターと全 RNA 結合タンパク質を発現するライブラリーベクターとの共発現系を用いて検証した。その結果、これまで既知であった Lin28a/b の他、新たに let-7 の成熟化を制御する候補遺伝子を複数同定した。現在これら複数の遺伝子を標的としてさらなる解析を行なっている (若手研究 19K16794)。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Ablation of miR-146b in mice causes hematopoietic malignancy. Mitsumura T, Ito Y, Chiba T, Matsushima T, Kurimoto R, Tanaka Y, Kato T, Uchida K, Ito T, Yamamoto K, Eishi Y, Kitagawa M, Miyazaki Y, Inase N, Asahara H. Blood Advances. 2018 2:3483-3491. doi: 10.1182/bloodadvances.2018017954. 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

栗本遼太、堤大樹、伊藤義晃、浅原弘嗣、microRNA let-7 family の新たな制御機構の解明、第 5 回 JCR ベーシックリサーチカンファレンス、2018 年 12 月、東京
Sho Mokuda, Yoshiaki Ito, Masafumi Inui, Ryo Nakamichi, Tomoki Chiba, Ryota Kurimoto, Takahide Matsushima, and Hiroshi Asahara. miRNAs in arthritis pathogenesis and therapy. Keystone Symposia, Small Regulatory RNAs (D7), 2019 年 4 月、韓国

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称：ハイスルーブット遺伝子編集技術
発明者：浅原弘嗣、栗本遼太、松島隆英、堤大樹
権利者：浅原弘嗣、栗本遼太、松島隆英、堤大樹
種類：特許
番号：特願 2019-41177
出願年：2019 年
国内外の別：国内

6 . 研究組織

該当なし

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。