

令和 3 年 10 月 18 日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K18234

研究課題名(和文) 腫瘍進展における新規プロテアソーム制御経路の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a novel regulatory axis of a proteasome in cancer development

研究代表者

和久 剛 (Waku, Tsuyoshi)

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号：40613584

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)：タンパク質恒常性の破綻はがん増悪の要因になることが推察されていたが、その分子基盤は不明であった。本研究では転写因子NRF3(NFE2L3)が20Sプロテアソームのアッセンブリ因子であるPOMPを直接転写し、がん抑止因子であるp53やRetinoblastoma(Rb)のタンパク質をユビキチン非依存的に分解していることを見出した。さらに、このNRF3-POMP-20Sプロテアソーム経路の上昇は、腫瘍増悪や転移促進、およびがん患者の予後不良と関連することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

20Sプロテアソーム阻害剤ボルテゾミブは、難治性あるいは再発した多発性骨髄腫に有効な抗がん剤として臨床使用されているが、肝機能障害など重篤な副作用が必発する。これらの副作用は、正常細胞中のプロテアソームが非特異的に阻害されたことが原因であると考えられている。しかし、がん細胞中のプロテアソームに対する特異性のみを向上させることは非常に困難である。一方、NRF3発現はがん組織で亢進しており、ものの正常組織では低く抑えられている。したがって本研究成果である、NRF3-POMP-20Sプロテアソーム活性化経路は、より副作用を軽減した抗がん剤開発の新機軸として発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：We demonstrate that transcription factor NRF3 (NFE2L3) induces the gene expression of 20S proteasome chaperone POMP. The upregulation of the NRF3-POMP axis enhances the 20S proteasome assembly, leading to the ubiquitin-independent degradation of tumor suppressor proteins, including retinoblastoma (Rb) and p53. The upregulated axis further causes tumorigenesis and metastasis, and poor prognosis of colorectal cancer patients. These results uncover the significance of this novel 20S proteasome assembly axis in cancer development.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん 20Sプロテアソーム ユビキチン非依存的タンパク質分解 p53 Retinoblastoma (Rb) NRF3 (NFE2L3)

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、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

がんの発生や進行は、増殖能や血管新生能、浸潤能、転移能といった特徴的な細胞性質の獲得によって惹起される。近年ではさらに、エネルギー代謝や免疫系にもがん特性が見出されている。またタンパク質恒常性（プロテオスタシス）の破綻もがん増悪の要因になることが、プロテアソーム阻害剤ベルケイドが抗がん作用を有することなどから推察されている。しかしながら、プロテオスタシスがなぜ破綻し、どのようにがん増悪を惹起するのか、詳細な分子基盤はほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、転写因子 NRF3 はがん細胞の増殖を亢進させることを明らかにしている。さらに、NRF3 はユビキチン非依存的なタンパク質分解を担っている 20S プロテアソームの発現を促進し、p53 タンパク質の分解を亢進させる。それにより、アポトーシス誘導や血管新生などの様々ながん抑制シグナルが阻害される可能性を *in vitro* 解析から見出した。そこで本研究では NRF3 による新たなプロテアソーム発現制御を介した腫瘍増大メカニズムを *in vivo* で検証することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) NRF3 過剰発現および発現抑制細胞株の樹立。ヒト肺がん細胞株 H1299 あるいはヒト大腸がん細胞 HCT116 に FLAG-NRF3 あるいは FLAG-GFP プラスミドを導入し、NRF3 過剰発現細胞あるいはコントロール GFP 安定発現細胞を樹立した。また、ヒト大腸がん細胞 HCT116 と、p53 欠損 HCT116 細胞に NRF3 あるいは Control shRNA 発現プラスミドを導入し、shNRF3 あるいは shCont 細胞を樹立した。
- (2) 20S プロテアソーム活性測定。各細胞を 10%-40%グリセロール密度勾配超遠心にて分画した後、各画分の蛍光プロテアソーム基質 Suc-LLVY の分解強度を測定する。
- (3) リアルタイム qPCR 解析。各細胞から ISOGEN II を用いてトータル RNA を精製した。各トータル RNA から M-MLV RTase を用いて cDNA 合成した後、各プロテアソームサブユニット遺伝子プライマーと SYBR Premix Ex Taq II によってリアルタイム qPCR を行った。
- (4) クロマチン免疫沈降 (ChIP) -qPCR 解析。各細胞をホルマリン固定後に溶解し、抗 NRF3 抗体を結合させたビーズを加え免疫沈降を行う。抗体ビーズを洗浄、脱クロスリンク、タンパク質除去し、NRF3 が結合したゲノム DNA を抽出する。その後、各ゲノム領域プライマーと SYBR Premix Ex Taq II によってリアルタイム qPCR を行った。NRF3-POMP 軸の亢進とがん増悪との関連を、マウス移植モデルを用いて解析した。
- (5) CRISPR/Cas9 を用いた POMP-ARE 変異細胞株の樹立。POMP プロモーター内の NRF3 応答配列 (POMP-ARE) を標的とした guide DNA を、Cas9 発現プラスミド pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 に組み込む。次に、POMP-ARE-Cas9 発現プラスミドを NFE3 過剰発現 H1299 細胞に導入し、ゲノム DNA シークエンスによって POMP-ARE が変異しているクローン細胞株を単離する。
- (6) 腫瘍系性能試験。各細胞を BALB/cAJcl-nu/nu マウス (4 週齢雌) の腹側皮下に移植する。28 日飼育した後、摘出腫瘍の重量を測定する。
- (7) 脾-肝転移解析。各細胞を BALB/cAJcl-nu/nu マウス (4 週齢雌) の脾臓に移植する。28 日飼育した後、肝臓を摘出しリアルタイム qPCR によって転移度合いを定量した。
- (8) ユビキチン活性化酵素阻害剤 TAK-243 を用いたタンパク質分解解析。各細胞を、10 μ M TAK-243 もしくは DMSO (コントロール) 含有培地で培養する。24 時間後、p53 と Rb タンパク質をウェスタンブロットにて検出した。
- (9) ヒトがん患者における発現相関および生存率解析。The cancer genome atlas の登録されている遺伝子発現データを用いて、 Kaplan-Meier プロットによる NRF3 発現と患者の生存曲線解析を癌腫別に実施した。

4. 研究成果

- (1) NRF3 安定発現細胞株はヒト大腸がん細胞 HCT116 とヒト肺がん細胞 H1299 で樹立に成功した。また発現抑制株は、当初計画していた薬剤誘導性ではないものの、恒常的ノックダウン細胞をヒト大腸がん細胞 HCT116 および p53 欠損 HCT116 細胞で樹立した。
- (2) プロテアソームは、ユビキチン鎖を認識し基質タンパク質を ATP 依存的に巻き戻す 19S 複合体と、ペプチド結合活性を有している 20S プロテアソームから構成されている。また 20S プロテアソームは、複数の会合因子によって効率的に組み上げられている。NRF3 と同じ CNC ファミリー転写因子である NRF1 は、これらプロテアソーム構成因子や会合因子の大部分を発現誘導することが知られている。そこで NRF3 がこれら構成因子あるいは会合因子の発現誘導を介している可能性を検討した。上記(1)

で樹立した NRF3 過剰発現およびコントロール GFP 過剰発現の各 H1299 細胞を用いたリアルタイム qPCR 解析の結果、NRF3 過剰発現によって 20S プロテアソーム会合因子の一つである POMP の mRNA 量が増加していることを見出した (図 1)。

- (3) NRF3 は抗酸化剤応答配列 (ARE) に結合する転写因子である。POMP 遺伝子の転写開始点付近に ARE 様配列が存在していたことから、NRF3 が当該配列に結合して POMP 遺伝子の転写を直接誘導しているのかを、NRF3 過剰発現細胞およびコントロール GFP 過剰発現細胞を用いた ChIP-qPCR 解析によって調べた。その結果、当該 POMP-ARE における有意な NRF3 結合が確認できた (図 2)。

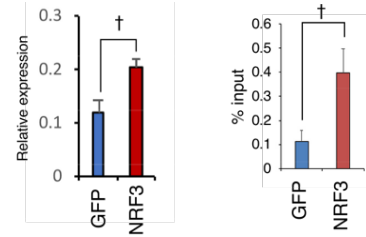


図1. POMP遺伝子のリアルタイムqPCR解析

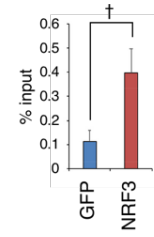


図2. POMP-AREへのNRF3 ChIP-qPCR解析

- (4) 上記(2)および(3)の結果を厳密に検証するため、NRF3 過剰発現細胞の POMP-ARE

配列に CRISPR/Cas9 システムを用いて変異導入した (図 3A)。その結果、NRF3 過剰発現しているにも関わらず当該 ARE 変異によって POMP 発現上昇は消失した (図 3B)。以上の結果は、NRF3 が POMP 遺伝子の転写を直接誘導することを示している。次に、NRF3 による POMP 発現誘導が 20S プロテアソーム活性上昇におよぼす影響を検証した。コントロール GFP 過剰発現、NRF3 過剰発現、POMP-ARE 変異 NRF3 過剰発現の各細胞を 10%-40%グリセロール密度勾配超遠心にて分画した後、各画分の蛍光プロテアソーム気質 Suc-LLVY の分解強度を測定した。その結果、NRF3 過剰発現による 20S プロテアソーム活性の上昇が、POMP-ARE 変異で完全に消失することを見出した (図 3C)。

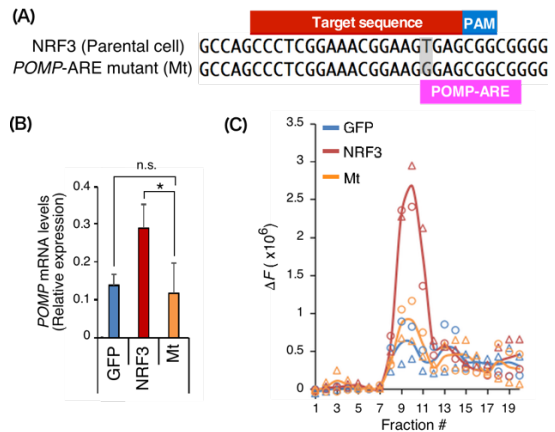


図3. POMP-ARE変異解析 (A) POMP-ARE変異NRF3過剰発現細胞株(Mt)の樹立 (B) POMPのリアルタイムqPCR解析 (C) 20Sプロテアソーム活性測定

- (5) NRF3-POMP 経路が腫瘍形成におよぼす影響を調べるため、コントロール GFP 過剰発、NRF3 過剰発現、POMP-ARE 変異 NRF3 過剰発現の各細胞を BALB/cAJcl-nu/nu マウスの腹側皮下に移植した。移植後 28 日目に腫瘍を摘出し重量を測定した結果、NRF3 過剰発現で増加した腫瘍重量が、POMP-ARE 変異で有意に減少することを見出した (図 4)。同様の結果は、脾・肝転移解析からも得られた。以上の結果から、NRF3-POMP-20S プロテアソーム会合経路の促進はがん増悪に寄与することが実証された

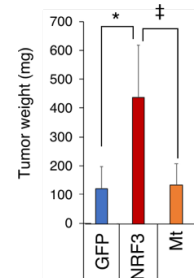


図4. 腫瘍形成能試験

- (6) NRF3-POMP 経路で活性化する 20S プロテアソームの基質タンパク質を探索した。興味深いことに、先行知見である p53 同様にがん抑制因子 Rb のタンパク質も NRF3 過剰発現で減少していた (図 5A、DMSO)。さらに NRF3 過剰発現は p53 や Rb の mRNA 量に影響しないことから (図 5B)、NRF3 は 20S プロテアソームを介してこれらがん抑制因子のタンパク質を分解していることが示唆された。20S プロテアソームはユビキチン認識ユニットである 19S 複合体を持たない。そこで次に NRF3 過剰発現による p53 および Rb タンパク質の減少がユビキチン非依存的であるのかを、ユビキチン活性化酵素阻害剤 TAK-243 を用いて検証した。その結果、ユビキチン化阻害条件下においても NRF3 過剰発現による p53 および Rb タンパク質低下が観察された (図 5A、TAK-243)。

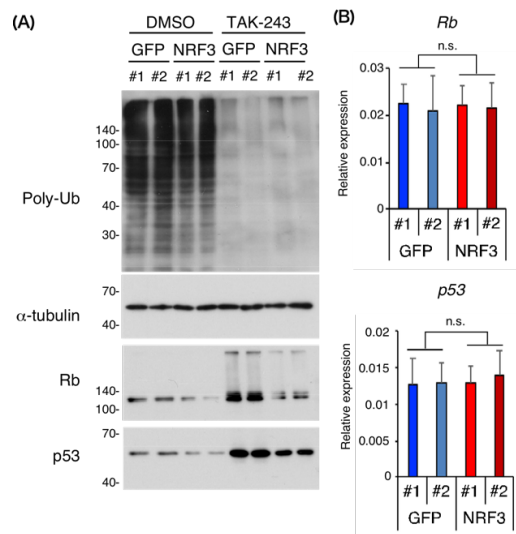


図5. p53およびRbタンパク質分解解析 (A) ユビキチン活性化酵素阻害剤TAK-243存在下におけるp53およびRbのウェスタンブロット解析 (B) p53およびRbのリアルタイムqPCR解析

- (7) ヒトがん患者解析は、当初計画していた腫瘍アレイではなくデータベース The cancer genome atlas を用いた。その結果、大腸および結腸がんにおいて NRF3 と

POMP の mRNA 量には正の相関があること、さらには POMP/NRF3 高発現患者群の生存率および再発率が低下することを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 4 件)

- ① Azami T, Matsumoto K, Jeon H, Waku T, Muratani M, Niwa , Takahashi S, Ema M.
Klf5 suppresses ERK signaling in mouse pluripotent stem cells
PLoS One 13 e0207321 2018 年
- ② Taniguchi H, Okamuro S, Koji M, Waku T, Kubo K, Hatanaka A, Sun Y, Chowdhury AM, Fukamizu A, Kobayashi A.
Possible roles of the transcription factor Nrf1 (NFE2L1) in neural homeostasis by regulating the gene expression of deubiquitinating enzymes.
Biochem Biophys Res Commun. 484 176-183 2017 年
- ③ Azami T, Waku T, Matsumoto K, Jeon H, Muratani M, Kawashima A, Yanagisawa J, Manabe I, Nagai R, Kunath T, Nakamura T, Kurimoto K, Saitou M, Takahashi S, Ema M.
Klf5 maintains the balance of primitive endoderm versus epiblast specification during mouse embryonic development by suppression of Fgf4.
Development 144 3706-3718 2017 年
- ④ Chowdhury AMMA, Katoh H, Hatanaka A, Iwanari H, Nakamura N, Hamakubo T, Natsume T, Waku T, Kobayashi A.
Multiple regulatory mechanisms of the biological function of NRF3 (NFE2L3) control cancer cell proliferation.
Sci. Rep. (7) 12494 2017 年

〔学会発表〕 (計 9 件)

- ① タンパク質分解制御による新規ガン生存機構の解明と創薬応用
和久 剛
イノベーション・ジャパン 2017 2017 年 8 月
- ② 転写因子 NRF3 (NFE2L3) はプロテアソーム活性亢進を介して腫瘍増大に寄与する
和久 剛
先端モデル動物プラットフォーム若手支援技術講習会 2017 2017 年 9 月
- ③ Transcription factor NRF3 (NFE2L3) promotes tumorigenesis through 20S proteasome activation
和久 剛
ConBio2017 2017 年 12 月
- ④ 腫瘍増大に寄与するプロテオスタシス制御機構
和久 剛
第 6 回がんと代謝研究会 2018 年 5 月
- ⑤ NRF3-POMP-20S proteasome axis enhances tumor growth
和久 剛
日本癌学会第 77 回学術総会 2018 年 9 月
- ⑥ プロテオスタシスの破綻による新たな腫瘍増大メカニズム
和久 剛
日本生化学会第 91 回大会 2018 年 9 月
- ⑦ NRF3-POMP-20S プロテアソーム軸の異常によるプロテオスタシスの破綻は腫瘍増大に寄与する
和久 剛
先端モデル動物プラットフォーム若手支援技術講習会 2018 2018 年 9 月
- ⑧ 転写因子 NRF3 (NFE2L3) は 20S プロテアソームアッセムブリを亢進して腫瘍増大に寄与する

和久 剛

第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月

⑨ タンパク質恒常性(プロテオスタシス)の破綻による 新たな癌増悪メカニズム

和久 剛

第一回 日本医学会連合 Rising Star リトリート 2019 年 3 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 3 件)

名称: 抗がん剤

発明者: 和久 剛 (代表)

権利者: 同志社大学

種類: 特許

番号: 特願 PCT/JP2017/010445

出願年: 2017 年

国内外の別: 国外

名称: 抗 HIV 治療薬を利用した抗がん剤

発明者: 和久 剛 (代表)

権利者: 同志社大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-087470

出願年: 2017 年

国内外の別: 国内

名称: 細胞抽出装置、細胞抽出プログラム及び細胞抽出方法

発明者: 和久 剛 (共同)

権利者: 同志社大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-236063

出願年: 2017 年

国内外の別: 国内

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者 なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 小林 聡

ローマ字氏名: Kobayashi Akira

研究協力者氏名: 村田 茂穂

ローマ字氏名: Murata Shigeo

研究協力者氏名: 濱崎 純

ローマ字氏名: Hamazaki Jun

研究協力者氏名: 浜窪 隆雄

ローマ字氏名: Hamakubo Takao

研究協力者氏名: 渡辺 亮

ローマ字氏名: Watanabe Akira

※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。