

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：15501
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18H02681
研究課題名(和文) がん化の鍵となる増殖シグナル伝達の分子基盤解明

研究課題名(英文) Decoding the mechanisms of cancer cell growth

研究代表者

島田 緑 (Shimada, Midori)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：60444981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：カルシニューリン/NFAT (nuclear factor of activated T cells) 経路は、乳がんの発がん性や転移性に必須の役割を果たしている。しかし、カルシニューリン阻害による抗増殖効果の分子メカニズムは不明である。我々は、カルシニューリンの阻害により、G1/Sでの細胞周期の進行が遅延し、Thr286の脱リン酸化が阻害されることでサイクリンD1の分解が促進されることを発見した。サイクリンD1を過剰発現させると、G1/Sの進行遅延が部分的に回復したことから、サイクリンD1がカルシニューリン阻害の下流にある重要な因子であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

カルシニューリンがサイクリンD1の転写に重要であることが報告されているが、本研究成果からカルシニューリンがサイクリンD1を脱リン酸化し、タンパク分解を阻害することが明らかとなった。トリプルネガティブ乳がんを高活性化しているカルシニューリンを阻害すると、サイクリンD1の発現低下、細胞増殖を抑制できる。トリプルネガティブ乳がんの新たな治療薬の開発に繋げていくことが今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：The calcineurin/NFAT (nuclear factor of activated T cells) pathway plays an essential role in carcinogenesis and metastatic potential of breast cancer. However, the molecular mechanism of the antiproliferative effect of calcineurin inhibition is unknown. We have found that calcineurin inhibition delays cell cycle progression in G1/S and promotes cyclin D1 degradation by inhibiting dephosphorylation of Thr286. Overexpression of cyclin D1 partially rescued the delayed progression of G1/S, indicating that cyclin D1 is an important factor downstream of calcineurin inhibition.

研究分野：分子生物学

キーワード：カルシニューリン サイクリンD1 タンパク分解

1. 研究開始当初の背景

乳がんの 70%にはホルモン療法が有効であるが、その後に治療抵抗性である再発性乳癌が起こるといふ重大な課題がある。また、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体、HER2 全てが陰性のいわゆるトリプルネガティブ乳癌に対しては、薬物療法は化学療法に限定され、その予後は極めて不良である。したがって乳癌に対する有効な分子標的治療の開発が緊急課題となっている。

カルシニューリンは Ca^{2+} /カルモジュリン依存性に活性化され、免疫応答の活性化、細胞の分裂など多様な生命現象に参与する Ser/Thr 脱リン酸化酵素である。カルシニューリンは、免疫抑制剤 FK506 の標的分子として臨床的にも重要である。最近カルシニューリンが乳癌検体、特にトリプルネガティブ乳癌において活性化していると報告されており、カルシニューリンは乳癌治療における新規バイオマーカーとして期待される。

2. 研究の目的

細胞周期 G1/S 期の進行に重要であるサイクリン D1 はトリプルネガティブ乳癌を含め、多くのがんで高発現しており、その主な原因としてはタンパク質分解異常であると考えられている。カルシニューリンは細胞周期の進行、特に G1/S 期の進行に重要であることが報告されている。カルシニューリン阻害作用を持つシクロスポリン A、FK506 を用いた研究により、カルシニューリンがサイクリン D1 の転写に重要であることが報告されている。サイクリン D1 は Thr286 がリン酸化されると、SCF (Skp, Cullin, F-box containing) E3 コピキチンリガーゼによりコピキチン化され分解される。Thr286 をリン酸化する酵素としては GSK3、ERK、p38 が報告されているが、脱リン酸化の制御については不明である。本研究ではトリプルネガティブ乳癌治療における新たなターゲットを発見する目的で、トリプルネガティブ乳癌で高活性化されているカルシニューリンによるサイクリン D1 の発現調節の分子機構を解明した。

3. 研究の方法

カルシニューリン阻害薬である FK506、CN585 を用いた細胞周期制御の解析

トリプルネガティブ乳癌細胞株 Hs578T、MDA-MB-231 を FK506、CN585 で処理し、FACS を用いた細胞周期の解析および細胞周期因子の発現状態を検討した。G1/S 期同調下でカルシニューリンを阻害し、FACS による細胞周期の進行およびウェスタンブロットによるタンパク発現量を検討した。

カルシニューリン阻害薬によるサイクリン D1 発現抑制の解析

カルシニューリン阻害薬によるサイクリン D1 の発現減少について、FK506 と同時にプロテアソーム阻害薬 MG132 で処理し、サイクリン D1 発現量への影響をウェスタンブロットングで解析した。

カルシニューリン阻害薬存在下におけるサイクリン D1 過剰発現による細胞周期制御の解析
Flag-サイクリン D1 をドキシサイクリン添加により過剰発現できる Hs578T を作製し、ダブルチミジンプロック法により細胞周期を G1/S 期に同調させ、細胞周期の進行を FACS により解析した。

カルシニューリンによるサイクリン D1 の Thr286 脱リン酸化解析

脱リン酸化アッセイの基質に用いるサイクリン D1 を以下の方法で精製した。細胞内に Flag-サイクリン D1 を一過的に発現させ、lysate を調整し、Flag pull down 法を用いて Flag-サイクリン D1 を精製した。リコンビナントカルシニューリンと反応させ、サイクリン D1 の Thr286 脱リン酸化への影響についてウェスタンブロットにより解析した。

カルシニューリンノックダウンによるサイクリン D1 発現への検証

Hs578T、MCF7 細胞においてカルシニューリンをターゲットにした shRNA をレンチウイルスの系を用いて発現させ、カルシニューリンノックダウンによるサイクリン D1 発現への影響をウェスタンブロットにより解析した。

4. 研究成果

カルシニューリンはサイクリン D1 の発現および G1/S 進行に必要である

FK506 は FKBP12 との結合を介する間接的なカルシニューリン阻害薬、CN585 は直接的なカルシニューリン脱リン酸化酵素阻害薬として報告されている。Hs578T を FK506、CN585 で処理すると細胞増殖は顕著に抑制され、処理後 24 時間では細胞死が誘導された。そこで詳細

な細胞周期への影響について FACS を用い検討すると、カルシニューリン阻害薬存在下では S 期細胞が減少し、細胞死集団を意味する Sub G1 期細胞が増加することが分かった。細胞周期の進行に必須な複数のサイクリン、Cdk などの発現をウエスタンブロッティングで検討したところ、G1/S 期の進行に必要なサイクリン D1 の発現が減少し、サイクリン D1/Cdk4 の標的である Rb の Ser780 リン酸化が減少することが分かった。ダブルチミジンプロック法を用いて G1/S 期に細胞を同調させ FK506 で処理後にリリースすると、G1/S 期の進行が顕著に遅延した。G1/S 期に同調した系においてもサイクリン D1 の発現減少および Rb の Ser780 リン酸化が減少することが分かった。CN585 を用いた場合においても、サイクリン D1 の発現減少、G1/S 期の進行が遅延するなど、同様の結果が得られた。以上のことから、カルシニューリンはサイクリン D1 の発現および G1/S 期の進行に重要である可能性が示唆された。また、FK506 処理により cleaved caspase 3、cleaved PARP1 が増加し、アポトーシスが誘導されていることが判明した。

さらに我々はレンチウイルスの系を用いてカルシニューリンをノックダウンし、カルシニューリンがサイクリン D1 の発現に与える影響を検討した。その結果、カルシニューリン阻害によりサイクリン D1 の発現が減少したことから、カルシニューリンがサイクリン D1 の発現に必要であることが分かった。さらにカルシニューリンの発現を抑制すると細胞増殖は顕著に抑制され、処理後 24 時間では細胞死が誘導されていることが判明した。

カルシニューリンはサイクリン D1 のタンパク分解を阻害する

カルシニューリン阻害によりサイクリン D1 タンパク質分解が亢進している可能性について、プロテアソーム阻害剤 MG132 を用いて検討した。その結果、MG132 存在下では FK506 によるサイクリン D1 の発現減少が抑制されることが分かった。従ってカルシニューリンはサイクリン D1 のタンパク分解を抑制している可能性が示唆された。また細胞周期への影響を検討するために、M 期のマーカーであるヒストン H3-Ser10 のリン酸化状態を調べると、FK506 処理で減少していた H3-Ser10 のリン酸化は、MG132 を同時に処理することにより回復した。このことからサイクリン D1 の分解を抑制することにより、細胞周期の異常も回復することが示唆された。

カルシニューリン阻害時においてサイクリン D1 を過剰発現すると G1/S の進行遅延が回復する

カルシニューリン阻害によりサイクリン D1 の発現が減少することにより、G1/S 期の進行が遅延する可能性を検証するために、ドキシサイクリン添加により Flag-サイクリン D1 を過剰発現させ細胞周期の進行を FACS 解析により検討した。ダブルチミジンプロックで G1/S 期に同調させリリースすると、FK506 存在下においてサイクリン D1 を発現させると部分的に G1/S 期の進行遅延が回復した。この結果からカルシニューリンを阻害するとサイクリン D1 の発現が減少することにより、G1/S 期の進行が遅延する可能性が示された。

カルシニューリンはサイクリン D1 の Thr286 を脱リン酸化する

サイクリン D1 の安定性に重要な Thr286 をカルシニューリンが脱リン酸化する可能性を明らかにするため、in vitro ホスファターゼアッセイを行った。その結果、カルシニューリン存在下においてサイクリン D1-Thr286 のリン酸化が減少した。従ってカルシニューリンがサイクリン D1 を直接的に脱リン酸化する可能性が示され、カルシニューリンはこれまで未同定だったサイクリン D1 の脱リン酸化酵素であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Goshima T, Habara M, Maeda K, Hanaki S, Kato Y, Shimada M	4. 巻 9
2. 論文標題 Calcineurin regulates cyclin D1 stability through dephosphorylation at T286.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 12779
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-48976-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura K, Johmura Y, Deguchi K, Jiang Z, Uchida KSK, Suzuki N, Shimada M, Chiba Y, Hirota T, Yoshimura SH, Kono K, Nakanishi M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Cdk1-mediated DIAPH1 phosphorylation maintains metaphase cortical tension and inactivates the spindle assembly checkpoint at anaphase.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 981
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-08957-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Mikawa Takumi, Shibata Eri, Shimada Midori, Ito Ken, Ito Tomiko, Kanda Hiroaki, Takubo Keiyo, Leonart Matilde E., Inagaki Nobuya, Yokode Masayuki, Kondoh Hiroshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Phosphoglycerate Mutase Cooperates with Chk1 Kinase to Regulate Glycolysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101306-101306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.101306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Hanaki Shunsuke, Shimada Midori	4. 巻 -
2. 論文標題 Targeting EZH2 as cancer therapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvab007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hanaki Shunsuke, Habara Makoto, Shimada Midori	4. 巻 26
2. 論文標題 UV induced activation of ATR is mediated by UHRF2	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 447-454
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計12件(うち招待講演 4件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 花木 駿介、羽原 誠、正木 貴大、前田 啓介、佐藤 悠紀、中西 真、島田 緑
2. 発表標題 PP1脱リン酸化酵素を介した転写抑制機構
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 羽原 誠、五島 隆宏、正木 貴大、前田 啓介、花木 駿介、佐藤 悠紀、加藤 洋一、島田 緑
2. 発表標題 乳がんの予後不良因子サイクリンD1の発現調節機構の解明
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花木 駿介、正木 貴大、前田 啓介、佐藤 悠紀、羽原 誠、中西 真、島田 緑
2. 発表標題 PP1脱リン酸化酵素を介した転写抑制機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田 緑
2. 発表標題 カルシニューリンによる細胞増殖制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田 緑
2. 発表標題 PP1とNIPP1の相互作用を介したDNA損傷後のE2F1標的遺伝子の転写抑制機構
3. 学会等名 第63回大会日本放射線影響学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 正木 貴大、羽原 誠、花木 駿介、前田 啓介、佐藤 悠紀、島田 緑
2. 発表標題 カルシニューリンはエストロゲン受容体 の安定性と活性を制御する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 島田 緑
2. 発表標題 A Day in the Life
3. 学会等名 第43回分子生物学会年会サテライトシンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 花木 駿介、前田 啓介、佐藤 悠紀、羽原 誠、島田 緑
2. 発表標題 PP1脱リン酸化酵素を介した転写抑制機構
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田 啓介、花木 駿介、佐藤 悠紀、羽原 誠、島田 緑
2. 発表標題 プロリン異性化酵素による癌細胞の増殖制御機構の解明
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田 緑
2. 発表標題 遺伝情報の維持および発現制御の分子機構
3. 学会等名 日本学術会議（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 五島 隆宏、島田 緑
2. 発表標題 カルシニューリンによるThr286脱リン酸化を介したサイクリンD1制御について
3. 学会等名 NCUライフサイエンス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島田 緑
2. 発表標題 プロリン異性化酵素によるがん増殖制御機構の解明
3. 学会等名 日本女性科学者の会 学術大会
4. 発表年 2018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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
スペイン	Hospital Vall de Hebron		