

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15211

研究課題名(和文) リボソーム異常によるがんの発症・進展機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms of tumor initiation and progression by ribosomal stresses

研究代表者

大谷 淳二(Otani, Junji)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：10770878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：リボソーム生合成に異常が生じた際に、核小体からリボソーム蛋白質が核質に放出され、p53活性化を介して細胞増殖を抑制する、核小体ストレス経路が明らかになり注目されている。一方で、リボソーム蛋白質遺伝子の異常が、がん化を亢進する可能性が示唆されている。本研究ではリボソームRNAの転写阻害により、がんの発症や進展に促進的に作動する転写共役因子YAP1/TAZの活性が上昇することを見出し、リボソーム生合成の異常に、がん促進的な一面がある可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、エネルギーの最大の消費過程であるリボソーム生合成過程と、近年がん治療の標的として大きな注目を浴びているHippo-YAP経路の関連が示唆された。これはリボソーム病の病態把握のみならず、リボソーム病に起因する悪性疾患の治療薬開発にもつながる可能性がある。また一般のがん細胞の多くでも、染色体異数性に伴うリボソーム蛋白質遺伝子のコピー数変化や、発現異常がみられ、核小体ストレス作動状態にあると考えられる。そのため、本研究が、幅広いがんの病態把握や治療薬開発の一助になることも期待できる。

研究成果の概要(英文)：During the last decade, increasing attention has been focused on the nucleolar stress pathway that releases ribosomal proteins from the nucleolus to the nucleoplasm when ribosome biosynthesis is abnormal and suppresses cell proliferation through p53 activation. On the other hand, it has been suggested that an abnormality in the ribosomal protein gene may promote canceration in studies of ribosomal protein mutants with Zebrafish model system and in epidemiological studies of ribosomopathy patients. In this study, we found that transcriptional inhibition of ribosomal RNA by an RNA polymerase inhibitor actinomycin D enhances the expression of down-stream target genes of the oncogenic transcriptional co-factors YAP1/TAZ and nuclear accumulation of YAP1 protein. Promoting effect of actinomycin D on the oncogenic growth signaling pathway may underlie the cancer promoting effect of ribosomal stress conditions and ribosomopathies.

研究分野：生化学

キーワード：Hippo経路 核小体ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

多種類のがんで転写共役因子 YAP/TAZ の異常な活性化が認められ、その活性を抑制する Hippo 経路の構成因子欠損マウスにおいて、種々のがんが早期から高率に発症することから、Hippo-YAP 経路のがんの発症、進展における役割に注目が集まっている。転写共役因子である YAP1 と TAZ は互いに相関するパラログであり、Hippo 経路と呼ばれるリン酸化シグナルカスケードの下流でその活性が制御される。YAP1/TAZ は CTGF、FGF、TGF $\beta$  などの種々の成長因子や、がん遺伝子 c-Myc の転写を制御して、細胞増殖亢進、細胞死抵抗性、幹細胞性維持、染色体不安定性等を介して、多種類のがんの発生・進展に寄与する。

核小体はリボソーム生産の中心地としての側面とともに、ストレス応答にも重要な役割を持つことが知られている。古くから核小体の形態は、熱、DNA 損傷、rRNA 合成の阻害などのストレスにより崩れることが知られていたが、近年、rRNA 量の減少やプロセッシング障害、RP の生合成異常などによって、RPL11 や MYBBP1A などの平常時は核小体に局在する蛋白質が核質へ移行し、核質において、がん抑制蛋白質 p53 を分解する MDM2 に結合、その機能を阻害することで、あるいは p53 の多量体を安定化することで、細胞周期停止・アポトーシスを引き起こす「核小体ストレス経路」の存在が明らかになってきた (Boulon S., *et. al.*, *Mol. Cell*, 2010)。核小体におけるリボソーム生合成は、細胞における最大 (70-80%) のエネルギー消費過程であることから、核小体ストレス経路は、生体の恒常性維持機構として極めて重要であると考えられるものの、その作用機序については未だ不明な点が多い。

リボソーム生合成に関わる遺伝子異常疾患としては、Diamond Blackfan 貧血 (DBA) をはじめとする先天的なものや、5q-症候群をはじめとする後天的なものなど、約 10 種類近いリボソーム病が知られている。これらの病態を再現するマウスモデルを用いた研究からも、RP の異常が、p53 経路の活性化、細胞周期の停止、アポトーシスを誘導し、貧血や形態形成異常などを引き起こすことが明らかにされた

(McGowan KW. *et. al.*, *Semin. Hematol.*, 2011)。一方、DBA の患者群では、p53 の活性化が見られるにも関わらず、がんの罹患率が顕著に上昇し、中でも急性白血病、骨肉腫、結腸がんの発症リスクは 28-36 倍高くなることが知られている

(Vlachos A., *et. al.*, *Blood*, 2012)。

また一般のがん臨床検体でも、種々の RP ミスセンス変異が見つかり、43%のがん検体およびがん細胞株で、RP 遺伝子の片アレル欠失をみる (Ajore R., *et. al.*, *EMBO Mol. Med.* 2017)。さらに、RP 遺伝子の発現量異常もしばしば見られ、例えば膵管腺癌における RPL15 の低発現は予後不良となることから (Goudarzi KM. and Lindstrom MS., *Int. J. Oncol.*, 2016)、リボソームの異常が、異常な細胞増殖やがん化に寄与することが示唆される。これはリボソームの機能が細胞の活発な増殖に必要であることと一見矛盾しており、その効果や背景にある分子機構は不明である。

## 2. 研究の目的

(1) Hippo-YAP 経路は発がん、がんの悪性化、がん細胞の薬剤耐性において非常に重要であることが示されてきており、Hippo-YAP 経路を標的とした薬剤の開発が盛んに行われているが、臨

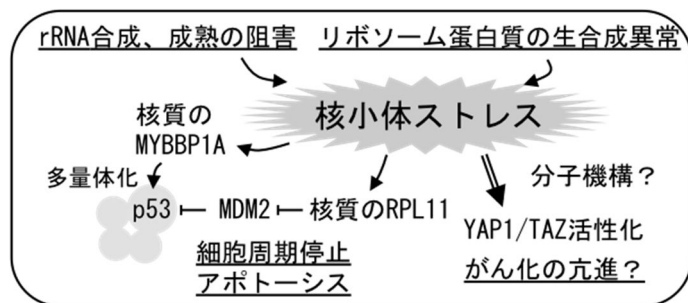


図1. 本研究の概略図

床応用には至っていない。そこで、Hippo-YAP 経路の活性を簡便にモニターするため、YAP/TAZ 依存的な遺伝子転写活性に応じて発光蛋白質を発現するレポーター細胞を利用して、Hippo-YAP 経路に作用する新規薬剤の標的となる遺伝子の同定を目指した。

(2) 上記のレポーター細胞を用いた探索から、リボソーム生合成を阻害する低分子化合物および、いくつかのリボソーム蛋白質のノックダウンが、Hippo-YAP 経路下流のがん促進的な遺伝子発現を誘導する可能性が示唆された。マウス、ゼブラフィッシュのリボソーム蛋白質遺伝子の変異体解析から、リボソーム生合成の異常によるがん促進的な効果が示唆されていたため、本研究では、その背景に Hippo-YAP 経路の役割がある可能性を検討した。

### 3. 研究の方法

(1) Hippo-YAP 経路の阻害剤の標的となりうる遺伝子を同定する目的のため、YAP/TAZ 依存的な遺伝子転写活性に応じて発光蛋白質を発現するレポーター細胞を構築し、ヒトの全遺伝子を標的とした siRNA ライブラリースクリーニングを行なった。

(2) リボソーム生合成過程での異常により、リボソーム蛋白質などが核小体から核質へ放出されることで、p53 依存的な細胞周期停止、細胞死が起こることが知られる。リボソーム生合成過程の異常を再現する実験系として、リボソーム RNA の合成を担う RNA ポリメラーゼ I の阻害剤であるアクチノマイシン D を用いられる。本研究ではアクチノマイシン D を作用させた培養細胞株における Hippo-YAP 経路の活性を、YAP/TAZ の局在、標的遺伝子の発現量の変化から評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 配列特異的翻訳抑制蛋白質による Hippo-YAP 経路の制御

YAP/TAZ 依存的な遺伝子転写活性

を指標とした siRNA スクリーニングにおいて、配列特異的 RNA 結合ドメインを持つ翻訳抑制因子である SAMD4B のノックダウンにより、最も強く YAP/TAZ 活性が抑制された (図 2a, b)。SAMD4B およびそのパラログ SAMD4A は、進化的によく保存された代表的な配列特異的翻訳抑制因子であり、そのホモログ遺伝

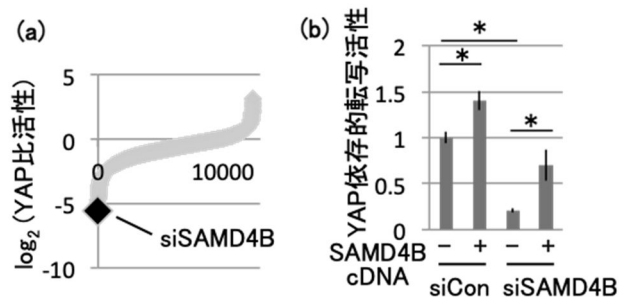


図2 siRNAスクリーニングによるHippo-YAP制御因子の同定  
(a) siRNAスクリーニングの結果  
(b) レスキュー実験の結果 (\* P < 0.05)

子は、ショウジョウバエの初期胚の発生、マウスの骨芽細胞の分化に関わることから (Tadros W., *et. al.*, *Dev. Cell*, 2007; Niu N., *et. al.*, *Cell Discov.*, 2017)、分化の制御因子であると考えられるが、がんにおける役割は知られていない。興味深いことに、SAMD4A/4B の過剰発現により、Ras 経路の阻害耐性が獲得されることが、網羅的な cDNA スクリーニングによって示されており (Johannessen CM., *et. al.*, *Nature*, 2013, Shao DD., *et. al.*, *Cell*, 2014)、Raf, MEK 阻害剤による治療を経て再発したがん症例において、SAMD4B 遺伝子の増幅の起きた例が見つかっている (Wagle N., *et. al.*, *Cancer Discov.*, 2014)。これらの報告から、SAMD4A/4B も Ras 経路の阻害耐性へ寄与することが示唆されるが、これは SAMD4A/4B の過剰発現による YAP 依存的な転写の活性化で説明できる可能性がある。今後、SAMD4A/4B による Hippo-YAP 経路制御の分子機構、がんにおける役割などの解析を進める。

## (2) Hippo-YAP 経路による細胞競合現象

癌遺伝子である YAP/TAZ の活性化は細胞間の競合現象に重要であることが知られている (Gumbiner BM. and Kim NG., *J. Cell Sci.*, 2014)。YAP/TAZ を抑制的に制御する Hippo 経路の欠損マウスを用いた研究により、YAP 活性化細胞が場合によっては正常細胞との競合に負けること、YAP 活性が皮膚移植片の生着効率に影響を与えることを示した。

## (3) リボソーム異常によるがんの発症・進展機構の解明

RNA ポリメラーゼ I 阻害剤であるアクチノマイシン D を培養細胞に作用させると、p53 依存的に細胞周期が停止する (Boulon S., *et. al.*, *Mol. Cell*, 2010)。対数増殖期にある細胞におけるアクチノマイシン D 処理への YAP/TAZ 活性の応答は、不安定で実験ごとの再現性が悪かった。アクチノマイシン D 処理による細胞増殖停止の間接的な影響を低減するため、細胞密度の高い、細胞増殖の接触阻害の状態にある細胞に対してアクチノマイシン D を添加し、リボソーム RNA の転写を阻害すると、YAP/TAZ 活性が再現性良く上昇することが明らかになった。この条件において YAP/TAZ 依存的に転写される標的遺伝子 CTGF, CYR61, LATS2 の mRNA 量がアクチノマイシン D 処理により増加することが確認された。また、YAP1 蛋白質の核内への集積が認められたことから、細胞増殖の接触阻害の際に YAP/TAZ 蛋白質に対して抑制的に働く Hippo 経路がアクチノマイシン D 処理により阻害されていると考えられる。リボソーム生合成過程の破綻による、代表的な細胞増殖シグナル経路のひとつである Hippo-YAP 経路の下流にあるがん促進的な遺伝子発現の活性化は、これまでに知られているリボソーム病や、リボソーム蛋白質遺伝子の変異体モデルにおける悪性腫瘍の形成がみられる原因となっている可能性がある。リボソーム生合成の異常により引き起こされる現象の解明は、リボソーム病の病態把握のみならず、リボソーム病に起因する悪性疾患の治療薬開発にもつながる。また一般のがん細胞の多くでも、染色体異数性に伴うリボソーム蛋白質遺伝子のコピー数変化や、発現異常がみられ、核小体ストレス作動状態にあると考えられる。そのため、核小体ストレスと Hippo-YAP 経路の相互作用の理解は、幅広いがんの病態把握や治療薬開発の一助になることも期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishio Miki, Miyachi Yousuke, Otani Junji, Tane Shoji, Omori Hirofumi, Ueda Fumihito, Togashi Hideru, Sasaki Takehiko, Mak Tak Wah, Nakao Kazuwa, Fujita Yasuyuki, Nishina Hiroshi, Maehama Tomohiko, Suzuki Akira	4. 巻 33
2. 論文標題 Hippo pathway controls cell adhesion and context-dependent cell competition to influence skin engraftment efficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 5548 ~ 5560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201802005R	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 該当する

1. 著者名 Mishima Yuichi, Brueckner Laura, Takahashi Saori, Kawakami Toru, Otani Junji, Shinohara Akira, Takeshita Kohei, Garvilles Ronald Garingalao, Watanabe Mikio, Sakai Norio, Takeshima Hideyuki, Nachtegaeel Charlotte, Nishiyama Atsuya, Nakanishi Makoto, Arita Kyohei, Nakashima Kinichi, Hojo Hironobu, Suetake Isao	4. 巻 25
2. 論文標題 Enhanced processivity of Dnmt1 by monoubiquitinated histone H3	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 22 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12732	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西尾美希、宮地洋佑、大森裕文、上田史仁、大谷淳二、前濱朝彦、藤田恭之、仁 科博史、鈴木聡
2. 発表標題 Hippoシグナル経路による細胞増殖変化と細胞間コミュニケーション
3. 学会等名 第6回新学術領域「細胞競合」班会議 2018年6月14-15日 神戸
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
---------------------------	-----------------------	----