

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07398

研究課題名(和文)核膜孔複合体因子を介した子宮内膜がん悪性化機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of endometrial cancer transformation mediated by nuclear pore complex factor

研究代表者

小林 亜紀子(Kobayashi, Akiko)

金沢大学・新学術創成研究機構・特任助教

研究者番号：00345662

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)：核膜に存在する核膜孔複合体は約30種類のヌクレオポリンと呼ばれるタンパク質から成る巨大複合体であり、核-細胞質間の物質輸送を担っている。ヌクレオポリンの一つであるRAE1はmRNAの核外搬出の制御を行っているが、近年様々ながんにおいて高発現しており、がんの悪性化に関与していることが明らかとなってきた。研究代表者は子宮内膜がんにおいて、がんの悪性化とRAE1の発現レベルとに相関があることを見出し、がん悪性度の違いにより、RAE1がパートナー分子をスイッチングし、mRNAの搬出を制御することで遺伝子発現制御を行っていることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究代表者は、子宮内膜がんにおいて核膜孔複合体因子RAE1の発現がグレード依存的に上昇していること、がんの悪性化に伴いRAE1が相互作用分子を変えていることを見出した。これらのことから、RAE1が将来的に子宮内膜がんの悪性化のマーカーとなりうること、RAE1の発現制御によりがんの悪性化を防ぐ可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The nuclear pore complex existing in the nuclear membrane is a huge complex composed of about 30 kinds of proteins called nucleoporins and is responsible for the transport of molecules between the nucleus and the cytoplasm. RAE1 is one of the nucleoporins and controls the nuclear export of mRNA. It was reported that RAE1 was highly expressed in various cancers and involved in the malignant transformation of cancers. We found that there is a correlation between the malignant transformation of cancer and the expression level of RAE1 in endometrial cancer. It is suggested that RAE1 switches partner molecules and controls exporting mRNA depend on malignancy.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：核膜孔複合体 ヌクレオポリン

## 1. 研究開始当初の背景

子宮がん、特に子宮内膜がんは先進国の女性において乳がん、大腸がん、肺がんに続いて4番目に多いがんである。国立がん研究センターによる2018年がん罹患予測によると、日本では14000例以上が子宮内膜がんである。子宮内膜がんには二つのタイプが存在し、そのうちタイプ2はエストロゲンレセプター(ER)やプロゲステロンレセプター(PR)の高頻度の陰性化がみられ、低分化型であり、悪性度が高く予後が悪い。タイプ2の子宮内膜がんのPR発現陰性化にはPR遺伝子プロモーターなどのCpG islandの高メチル化やヒストン脱アセチル化が関与しており(Ren Y *et al.*, *Cancer Genet Cytogenet.* 175, 107-116, 2007) またp53が変異を起こしている頻度が高い(The Cancer Genome Atlas Research Network, *Nature* 497, 67-73, 2013)。このように、子宮内膜がんの悪性化に関わる多くの因子が見出されてきたが克服にはいたっておらず、悪性化した子宮内膜がんの病態制御に向けたターゲット因子の探索は重要な課題である。

研究代表者は、がんの悪性化に関与する新たな制御因子として核膜孔複合体(Nuclear Pore Complex: NPC)因子に着目した。NPCは真核生物において核細胞質間の物質輸送・転写を調節しており、ヒトでは約30種類のNPC因子により構成されている。近年、様々ながんにおいていくつかのNPC因子が腫瘍の形成と進行に関与していることが報告されている。研究代表者はNPC因子の一つTPRが、がんにおいて過剰発現し遺伝子不安定性・腫瘍の進行を誘発するAurora kinase Aと相互作用することから、TPRの抗がん剤標的としての可能性を示した(Kobayashi *et al.*, *Cell cycle* 14(9), 1447-58, 2015)。前立腺がんにおいては、NPC因子の一つであるPOM121が高発現することによりNPC組成が変化し、がんの悪性度を上昇させるという論文が発表されている(Rodriguez-Bravo *et al.*, *Cell* 174, 1200-1215, 2018)。子宮内膜がん患者サンプルによる大規模マイクロアレイ解析によると、悪性度が高い患者サンプルにおいていくつかのNPC因子に顕著な発現上昇が見られる(The Cancer Genome Atlas Research Network, *Nature* 497, 67-73, 2013)。このNPC因子の発現上昇が子宮内膜がんの悪性化の制御にどのように関与しているのかは明らかとはなっていなかった。

## 2. 研究の目的

研究代表者は子宮内膜がんの悪性化とNPC因子の関わりについて、子宮内膜がん患者サンプルにおけるmRNA発現プロファイルを解析したところ(TCGA, Provisional)このNPC因子の発現と子宮内膜がんタイプ2において発現が低下している遺伝子群の発現に負の相関があり、NPC因子の発現が子宮内膜がんの悪性化に関わることが示唆された。そこで研究代表者はNPC因子が子宮内膜がんの悪性化に何らかの役割を果たしていると仮説を立てた。本研究の目的は、NPC因子に着目し子宮内膜がんの悪性化メカニズムを解明することである。

## 3. 研究の方法

### (1) NPC因子による子宮内膜がん悪性化への関与の解明

NPC因子の発現レベルが異なる細胞株を購入もしくは樹立し、悪性化の指標となる細胞増殖能・未分化能等について解析し、NPC因子の悪性化への関与を明らかにする。

### (2) NPC因子を含む悪性化シグナル経路・ターゲット分子の同定

計画1で樹立した細胞株における遺伝子発現プロファイルと相互作用分子を解析し、NPC因

子が関わる悪性化シグナル経路とターゲット分子を同定する。さらに NPC 因子とターゲット分子との相互作用メカニズムを明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) NPC 因子について、TCGA における子宮内膜がん患者の mRNA 発現データから腫瘍グレードごとの発現量について比較解析を行った(図1)。この中から、グレード依存的に発現量が上昇していた RAE1 に着目した。RAE1 タンパク質は NPC 因子として、mRNA の核外輸送を担っていることが知られている。近年、乳がんにおいて RAE1 の過剰発現が Epithelial Mesenchymal Transition: EMT を介して、がん悪性化に関与している(Oh JH et al., *Sci Rep.* 2019, 9(1):2977) ほか、大腸がんにおいてもアポトーシスの抑制を介して腫瘍進展に関与していることが報告されている(Kobayashi Y et al., *Cancer Sci.* 2021, 112(8):3173-3189)。子宮内膜がん細胞株の中から、グレード1由来の Ishikawa 細胞(ESR1+)、グレード3由来の Hec50B 細胞(ESR1-)において、細胞増殖能と RAE1 発現量に差があることを見出した(図2)。RAE1 の発現が高い Hec50B 細胞を用い、RAE1 のノックダウンを行ったところ、細胞増殖能が低下すること、幹細胞マーカーの割合が減少することを見出した(図3)。これらのことから、RAE1 の発現量と子宮内膜がんの悪性化に相関があることが示唆された。

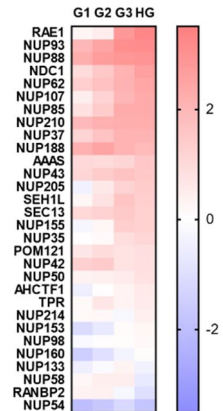


図1 子宮内膜がんグレード別 NPC 因子発現量の比較解析

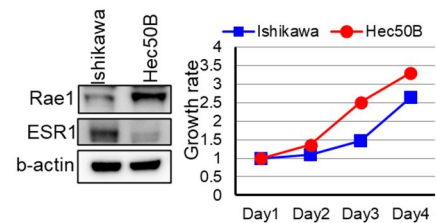


図2 RAE1発現量が異なる細胞の細胞増殖能

(2) 次に、RAE1 が関わる子宮内膜がん悪性化シグナル経路・ターゲット分子を同定するため、RAE1 の相互作用分子を MS 解析により探索した。これにより、RAE1 は悪性度の高い細胞内において、悪性度の低い細胞と比較しある種の RNA 修飾因子とより多く相互作用していることが判明し、がん悪性化に関与している可能性を見出した。すなわち、RAE1 の状態により、相互作用分子 (= RNA 修飾因子) がスイッチし、がんの悪性化や表現型につながる遺伝子の発現制御を行っている可能性が示唆された。現在、RAE1 と相互作用する RNA 修飾因子

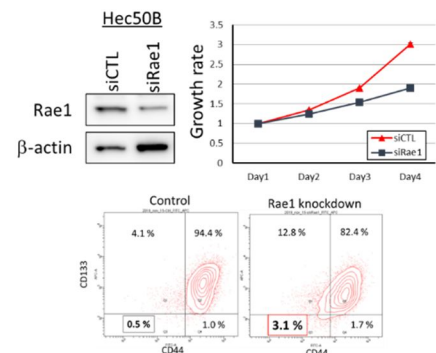


図3 RAE1発現量が異なる細胞における幹細胞マーカー発現

について解析を続けている。RAE1 に関する研究を続ける中で、新型コロナウイルスタンパク質と宿主タンパク質との大規模相互作用解析により、RAE1 が新型コロナウイルスタンパク質 ORF6 と相互作用するという論文が発表され(Gordon DE et al., *Nature* 583(7816):459-468, 2020)。この論文に着目し、ORF6 による RAE1 の機能抑制について研究を行った。これにより、ORF6 が RAE1 と結合することにより、RAE1 の核膜局在を妨害し、結果として RAE1 による mRNA の核外搬出を阻害していることを見出し、論文発表した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kato Koki, Ikliptikawati Dini Kurnia, Kobayashi Akiko, Kondo Hiroya, Lim Keesiang, Hazawa Masaharu, Wong Richard W.	4. 巻 536
2. 論文標題 Overexpression of SARS-CoV-2 protein ORF6 dislocates RAE1 and NUP98 from the nuclear pore complex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 59 ~ 66
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.11.115	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 Lim Keesiang, Kodera Noriyuki, Wang Hanbo, Mohamed Mahmoud Shaaban, Hazawa Masaharu, Kobayashi Akiko, Yoshida Takeshi, Hanayama Rikinari, Yano Seiji, Ando Toshio, Wong Richard W.	4. 巻 20
2. 論文標題 High-Speed AFM Reveals Molecular Dynamics of Human Influenza A Hemagglutinin and Its Interaction with Exosomes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 6320 ~ 6328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.0c01755	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 Mohamed Mahmoud Shaaban, Hazawa Masaharu, Kobayashi Akiko, Guillaud Laurent, Watanabe-Nakayama Takahiro, Nakayama Mizuho, Wang Hanbo, Kodera Noriyuki, Oshima Masanobu, Ando Toshio, Wong Richard W.	4. 巻 256
2. 論文標題 Spatiotemporally tracking of nano-biofilaments inside the nuclear pore complex core	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomaterials	6. 最初と最後の頁 120198 ~ 120198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biomaterials.2020.120198	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 Dewi FRP, Jiapear S, Kobayashi A, Hazawa M, Ikliptikawati DK, Hartono, Sabit H, Nakada M, Wong RW	4. 巻 24
2. 論文標題 Nucleoporin TPR (translocated promoter region, nuclear basket protein) upregulation alters MTOR-HSF1 trails and suppresses autophagy induction in ependymoma.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2020.1741318	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 Hazawa M, Sakai K, Kobayashi A, Yoshino H, Iga Y, Iwashima Y, Lim KS, Voon DC, Jiang YY, Horike S, Lin DC, Wong RW	4. 巻 39
2. 論文標題 Disease-specific Alteration of Karyopherin- Subtype Establishes Feed-Forward Oncogenic Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 2212-2223
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-019-1137-3.	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 Lim KS, Mohamed MS, Wang H, Hartono, Hazawa M, Kobayashi A, Voon DC, Kodera N, Ando T, Wong RW	4. 巻 1864(2)
2. 論文標題 Direct Visualization of Avian Influenza H5N1 Hemagglutinin Precursor and Its Conformational Change by High-Speed Atomic Force Microscopy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Gen Subj	6. 最初と最後の頁 129313-129313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbagen.2019.02.015.	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 Hartono, Hazawa M, Lim KS, Dewi FRP, Kobayashi A, Wong RW	4. 巻 14
2. 論文標題 Nucleoporin Nup58 Localizes to centrosomes and mid-bodies during mitosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Division	6. 最初と最後の頁 eCollection
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13008-019-0050-z.	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小林 亜紀子、Dewi Firli、Jiapaer Shabierjiang、羽澤 勝治、Ikliptikawati Dini、Sabit Hemragul、中田 光俊、Richard Wong
2. 発表標題 上衣腫における核膜孔複合体因子TPRの役割について
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会 (京都、オンライン)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 近藤 寛弥、三代 憲治、羽澤 勝治、小林 亜紀子、Richard Wong
2. 発表標題 NUP210ががん細胞の核サイズと増殖能力を調節する
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会（京都、オンライン）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西出 梧朗、Keesiang Lim、Mahmoud Shaaban Mohamed、羽澤 勝治、小林 亜紀子、Richard Wong
2. 発表標題 高速原子間力顕微鏡によるヒストンH2A動態の実時間イメージング
3. 学会等名 第72回日本細胞生物学会大会（京都、オンライン）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keesiang Lim, Noriyuki Kodera, Hanbo Wang, Mahmoud Shaaban Mohamed, Masaharu Hazawa, Akiko Kobayashi, Takeshi Yoshida, Rikinari Hanayama, Seiji Yano, Toshio Ando, Richard Wong
2. 発表標題 High-Speed AFM Reveals Molecular Dynamics of Human Influenza A Hemagglutinin and Its Interaction with Exosomes
3. 学会等名 NanoLSI Symposium (4th) (Kanazawa)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西出梧朗, Keesiang Lim, Mahmoud Shaaban Mohamed, 小林亜紀子, 羽澤勝治, Hanbo Wang, 中山隆宏, 古寺哲幸, 安藤敏夫, Richard Wong
2. 発表標題 Elucidation of histone H2A topography and its nanomechanics with DNA compaction using high-speed atomic force microscopy
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（オンライン）
4. 発表年 2020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
---------	---------