

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K07648

研究課題名(和文) 新たながん治療を目指したがん細胞特異的細胞死誘導分子の局在制御機構の解析

研究課題名(英文) Regulation mechanism of apoptosis-inducing death receptor localization allowing for survival in tumor cells

研究代表者

小島 裕子 (Kojima, Yuko)

順天堂大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60231312

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)：TRAILと細胞膜で結合して腫瘍細胞に対して細胞死を誘導するDR5が、TRAIL抵抗性ヒト腫瘍細胞株では主に核に発現して細胞死を免れ、インポーチン(Imp) 1を介する経路で核内に運ばれることを基に、ヒト腫瘍細胞移植マウスでImp 1を抑制し、腫瘍を拒絶することに成功した。更に、DR5が核に発現する際の調節分子を同定すべく、ヒトshRNAライブラリをTRAIL抵抗性ヒト腫瘍細胞株に遺伝子導入後、コントロール細胞に比べて有意に細胞膜DR5発現の高い細胞集団を濃縮し、その鍵となる分子を絞り込んだ。腫瘍細胞がTRAIL抵抗性になる理由の一つに、DR5分子のSUMO化が関係している可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常細胞には細胞死を誘導せず腫瘍細胞にのみ細胞死を誘導する、TRAIL分子のレセプターであるDR5分子は、試験管内だけでなくマウスの生体内でも、インポーチン 1分子を抑制することでDR5の核内への移行を抑制して、生着したヒト腫瘍細胞に細胞死を誘導して腫瘍を拒絶できることがわかった。従って、TRAIL抵抗性の腫瘍細胞に対して、DR5の核内移行を抑制する薬物は、分子標的がん治療の一つになる可能性が考えられる。また、DR5の核内移行への関与が示唆された、DR5タンパク質のSUMO化についても、腫瘍細胞に対してそれをコントロールすることができれば、がん治療の分子標的になる可能性があるだろう。

研究成果の概要(英文)：DR5 is known to bind TRAIL at the plasma membrane and induces cell death against tumor cells without affecting normal cells. In addition, DR5 is predominantly expressed in the nucleus of TRAIL-resistant human tumor cell lines and has been shown to escape cell death and be transported to the nucleus via the importin (Imp) 1-mediated pathway. Based on this fact, suppression/inhibition of Imp 1 in a human tumor cell xenograft mouse model resulted in rejection of human tumor cells.

Furthermore, in order to identify regulatory molecules for nuclear expression of DR5, a human shRNA library was gene-transfected into TRAIL-resistant human tumor cell lines, and a cell population with significantly higher plasma membrane DR5 expression than control cells was enriched to narrow down the key molecules. As a result, SUMOylation of the DR5 molecule may be involved as one of the reasons why tumor cells acquire TRAIL resistance.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Tumor cells Cell death DR5 Localization Nucleus Intracellular transport Cancer therapy SUMOylation

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) TRAIL は、TNF ファミリーに属する II 型細胞表面膜タンパク質で、mRNA レベルではほとんどの正常組織・細胞に発現が認められる。TRAIL 分子の最も注目すべき特徴は、“腫瘍細胞や形質転換細胞にはアポトーシスを誘導するが、正常細胞にはアポトーシスを誘導しない”という機能の発現における特異性で、且つ最大の長所である。

(2) TRAIL に対するレセプターの 1 つで TNF レセプターファミリーに属し、細胞内領域に細胞死のシグナルを伝達するドメイン(DD)を有してアポトーシス誘導能を持つ重要なレセプターが、DR5 である。DR5 に対するアゴニスティック抗体を用いたがん抗体療法が、基礎実験を経て、既に海外では臨床試験が行われているが、副作用の報告も出ており、TRAIL ノックアウトマウスと DR5 ノックアウトマウスを用いた動物実験において、一部の系統のマウスで、胆管及び肝臓に重篤な副作用が出ることを報告した。従って、がん抗体療法が安全に効果を発揮できるような工夫が望まれる。

(3) DR5 も TRAIL と同様に、mRNA レベルでは広範な組織に見られるが、抗がん剤の中には DR5 の発現を増加させる薬剤も多い。また、発現量だけではなく、分子の局在が機能発現に重要なことが明らかになった。即ち、TRAIL 感受性の高い腫瘍細胞では、DR5 が細胞膜と細胞質に局在しているのに対し、感受性の低い腫瘍細胞では主に核内に局在していた。核内へは Importin (Imp) $\beta 1$ により運ばれ、Imp $\beta 1$ のノックダウンによって細胞膜 DR5 の発現が上昇、TRAIL 感受性が有意に上昇した。また、実際のヒトの肺がん組織でも、DR5 の核内局在が報告され、ヒト乳がん組織では、進行に伴って核への移行が顕著になることが報告されている。難治性膵がん細胞では、核内 DR5 ががん抑制遺伝子として働く microRNA と結合してその働きを抑制し、がん細胞の増殖に寄与している報告も出て、乳がん、肺がん、胃がん、直腸がんなどでも同様のことが指摘されている。

(4) これまでの基礎実験と臨床研究から、DR5 の核内移行を阻害し、腫瘍細胞の細胞膜表面に発現させることができれば、効率良く腫瘍細胞に細胞死を誘導することが可能になると考えられ、それが腫瘍の拒絶やがん治療へ繋がることが期待される。

2. 研究の目的

(1) *in vitro* の系のみならず、薬剤誘導性に Imp $\beta 1$ の発現をノックダウンするヒト腫瘍細胞株を作製してマウスに移植した *in vivo* の系においても、DR5 に対するアゴニスティック抗体の投与により、生着した腫瘍の有意な退縮または消失が認められることを証明する。

(2) 核内 DR5 は細胞膜に発現してから細胞内に取り込まれ、細胞質に放出されて Imp に結合したのか、或いは合成の段階で何らかのストレスにより本来の経路から逸脱して、細胞膜に運ばれずに Imp との結合が可能になったのか、を見極める。

(3) (2) で前者の場合、細胞膜から細胞内への取り込みを促進する因子が考えられ、その働きを抑制すると、DR5 の核内移行を阻害できるかを検討する。

(4) (2) で後者の場合は、DR5 を細胞膜に運ばずに細胞質に留まるように働く因子、もしくは細胞膜に運ぶのを妨げる因子の存在が考えられ、その働きを抑制すると、DR5 の局在を核から細胞膜に変えられるかを検討する。

(5) 前述の因子を突き止めて、その働きを調節する方法を検討し、分子標的がん治療のターゲット分子になり得るかを絞り込み、これまでにない新たながん治療のツールを獲得できる可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) Doxycycline 誘導性に Imp $\beta 1$ の発現をノックダウンする、2 種類の HeLa 細胞株：#B1、#C14 およびコントロール細胞株を作成、RAG-2(-/-) マウスの皮下生着後、Doxycycline 飲水投与群と非投与群に分け、各群で抗 DR5 アゴニスティック抗体：CS-1008 またはコントロール抗体：hIgG を腹腔内投与して、4 群の腫瘍増殖を比較した。

(2) RAG-2(-/-) に HeLa 細胞株または HepG2 細胞株を皮下生着させた後、実験 1 で用いた 2 種類の Imp $\beta 1$ ノックダウン配列 B、C およびコントロール配列、移入したベクタープラスミド DNA を、アテロコラーゲンと共に腫瘍周囲に接種し徐放性にノックダウンを誘導、Doxycycline 飲水投与と CS-1008 または hIgG を腹腔内投与し、各群で腫瘍の増殖を比較した。

(3) RAG-2(-/-) に HeLa または HepG2 を皮下生着させた後、CS-1008 または hIgG と Imp $\beta 1$ 阻害剤：Importazole または溶媒の接種を開始し、各群で腫瘍の増殖を比較した。

(4) 細胞内で合成された DR5 タンパク質が、細胞膜に発現後、細胞内に取り込まれて核に運ばれるのか、合成後に細胞膜を経ずに核内に運ばれるのかを明らかにする目的で、Imp $\beta 1$ と結合する 2 箇所の核移行シグナル(NLS)をそれぞれ変異させた、GFP-DR5 を発現する 2 種類の変異型 HeLa 細胞株(MT)と野生型 GFP-DR5 を発現する HeLa 細胞株(WT)を用いて、Brefeldin A(BFA)の効果をフローサイトメトリー(FACS)で比較検討した。

(5) 合成された DR5 の輸送先を、核か細胞膜かに仕分ける機能を持つ分子を探索する目的で、

バーコード化された約6,500種類のヒトタンパク質に対する約55,000種類のshRNAを含む、ヒトゲノムワイドshRNAライブラリーをHEK293T細胞株に移入し、偽レンチウイルス粒子を調製、濃縮した。それを、1個の細胞に対して複数のshRNAを持つウイルスが感染しないような条件で、HeLa細胞株に感染させて遺伝子導入した。shRNAと同時に導入された薬剤耐性遺伝子発現細胞を、ピューロマイシン添加により選択して増殖後、抗DR5抗体で細胞膜に発現するDR5を蛍光標識し、shRNAと同時に遺伝子導入されたTag RFPを発現する細胞の中から、親株のHeLa細胞よりも細胞膜のDR5発現が高い細胞集団をFACSでソートした。採集した細胞を増殖後、再び同様のソートを行った。

(6) (5)のソートを繰り返しても目的の細胞集団が濃縮されないことから、細胞膜のDR5発現が高い細胞は細胞死を起こして脱落している可能性を考え、HeLa細胞株にDD欠損GFP-DR5を予め遺伝子移入した細胞に対して(5)と同様にshRNAを遺伝子導入した。shRNAの選択薬剤であるDoxycyclineとGFP-DR5の選択薬剤であるG418共存下で培養、細胞膜に発現するDR5をPacific blue標識抗体で蛍光標識し、shRNAと共に遺伝子導入したTag RFP発現細胞で、且つGFP発現細胞の中で、親株の細胞よりも細胞膜のDR5発現が高い細胞集団(DR5 high)をFACSで繰り返しソートした。

(7) (6)で濃縮したDR5 highと、同様にshRNA遺伝子移入したものの細胞膜の発現が低い細胞集団をControlとして、遺伝子受託解析を依頼した。

(8) (7)の解析結果に基づき、Controlに比べてDR5 highに有意に発現しているshRNAの中からDR5の細胞内輸送や局在に関連する分子を絞り込み、(5) (6)で導入したshRNA標的配列とは異なる遺伝子配列を使ったsiRNAで、候補分子を各々単独、または組み合わせで(5)で用いた親株に導入してノックダウンを誘導した。

(9) (8)の結果、単独で核から細胞膜に劇的にDR5が移行する分子はなかったが、複数の分子を組み合わせるとノックダウンするとDR5が細胞膜に移行する分子があり、そのうちの1つ：SUMO-2について、HeLa細胞株のWhole cell可溶化液を抗DR5抗体で免疫沈降した後Western blotを行い、DR5がSUMOタンパク質の修飾を受けているかを調べた。

4. 研究成果

(1) RAG-2(-/-)マウス皮下に生着した Doxycycline 誘導性 Imp β 1 ノックダウン HeLa 細胞株:#B1, #C14 腫瘍は、コントロール細胞株腫瘍に比べ、Doxycycline 投与且つ CS-1008 投与群で有意に腫瘍の増殖が抑制され、#C14 腫瘍は完全に拒絶された。

(2) RAG-2(-/-)マウス皮下に生着した、HeLa 細胞株腫瘍と HepG2 細胞株腫瘍に対して、*in vivo* で Doxycycline 誘導性 Imp β 1 ノックダウンを誘導すると、Doxycycline 投与且つ CS-1008 投与により、HeLa 細胞株腫瘍の増殖抑制が、HepG2 細胞株腫瘍は拒絶された。

(3) RAG-2(-/-)マウス皮下に生着した、HeLa 細胞株と HepG2 細胞株の腫瘍は、CS-1008 と Importazole の投与により、HeLa 細胞株腫瘍で増殖抑制が、HepG2 細胞株腫瘍では拒絶された。

(4) (1)から(3)より、*in vitro* だけでなく *in vivo* でも、Imp β 1 のノックダウンまたは阻害により、生着した腫瘍の退縮や拒絶が誘導できることが明らかになった。腫瘍細胞に対する Imp β 1 の抑制は、がん治療への応用の可能性があることが示された。

(5) Imp β 1 と結合する2箇所の核移行シグナル(NLS)をそれぞれ変異させた、GFP-DR5を発現する2種類の変異型 HeLa 細胞株(MT)と野生型 GFP-DR5を発現する HeLa 細胞株(WT)を用いて、Brefeldin A(BFA)の効果を見ると、この実験に用いた全ての細胞株で、細胞全体に発現する DR5の量には変化がなく、細胞膜の発現のみが BFA によって抑制された。

(6) 更に、BFA と ER Tracker を用いたレーザー顕微鏡による GFP-DR5 の局在解析では、WT は BFA の添加に関わらず核内 DR5 を大量に発現していたのに対して、MT は細胞膜の他に細胞内に集積し、その一部は ER と重なった。

(7) (5)と(6)より、核内に発現する DR5 は、一旦細胞膜に発現した後に細胞内に取り込まれて核内に運搬されるのではなく、細胞膜を経由せずに Imp β 1 と結合して核内に輸送される可能性が高いと考えられた。

(8) バーコード化されたヒトゲノムワイドshRNAライブラリーモジュール#2(標的遺伝子：疾患関連遺伝子、薬剤標的遺伝子)を用いた偽ウイルス粒子を介してHeLa細胞株に遺伝子導入し、DR5 highの細胞分画を集めるべくFACSソートを繰り返しても、DR5 highの細胞を濃縮することができなかった。しかし、予めDDを欠損させたGFP-DR5を遺伝子移入したHeLa細胞株(WT)にshRNAを遺伝子導入すると、初回のソートではわずか0.7%だったDR5 highを5回のソートで50%に濃縮できた。この結果から、核内のDR5発現が減って細胞膜のDR5発現が増えると、細胞死を起こしやすくなると思われる。

(9) (8)で得られた各細胞分画をレーザー顕微鏡(LSM)で観察すると、GFP-DR5の蛍光がDR5 highの細胞では核に観察されず、ER領域と細胞膜に極めて明るく検出された。一方、Control細胞は、主に核にGFP-DR5が観察され、細胞質や細胞膜の発現は弱く、ER領域の集積は認められなかった。

(10) DR5 highとControlの細胞分画の遺伝子受託解析結果より、細胞膜からエンドゾーム、エンドゾームからトランスゴルジ装置、細胞質から核膜と核膜孔及び核内への細胞内輸送に関係するタンパク質の有意な発現低下が見られ、それらのタンパク質の中から、有意差が大きかった分子と、同じタンパク質に対して複数のshRNAが検出され、有意差も大きかった分子の計11分

子にターゲットを絞る，当初用いたshRNAとは異なる遺伝子配列でタンパク質の発現を抑えるsiRNAを用いて，各々の分子を単独で，または機能の似た分子を組み合わせで，或いは，機能の異なる分子を組み合わせで，DDを欠損させたGFP-DR5を遺伝子移入したHeLa細胞株(WT)でノックダウンを行い，DR5の局在を解析した．単一の分子のノックダウンで，一斉にDR5の局在が核から細胞膜に変化する分子はなかったが，分子を組み合わせでノックダウンした際に，DR5の細胞膜への局在変化が見られた．その組み合わせを見ると，2つの共通する分子があり，1つがSUMO2，もう1つがAP2 2であった．

(11) タンパク質がSUMO化されると核内に移行する例が知られており，DR5もSUMOによる修飾を受けて核移行が亢進しているのかを明らかにすべく，現在詳細を解析中である．

(12) (10)と(11)より，DR5のSUMO化が，DR5の腫瘍細胞での細胞膜発現を抑えて核内での発現に導いて細胞死を免れているとなると，SUMO化の阻害ががん治療の1つになる可能性が考えられる．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuko Kojima, Takashi Nishina, Hiroyasu Nakano, Ko Okumura, Kazuyoshi Takeda	4. 巻 19-5
2. 論文標題 Inhibition of Importin 1 Augments the Anticancer Effect of Agonistic Anti-Death Receptor 5 Antibody in TRAIL-Resistant Tumor Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1123-1133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-19-0597	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 -

〔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 Yuko Kojima, Takashi Nishina, Hiroyasu Nakano, Ko Okumura, Kazuyoshi Takeda
2. 発表標題 Importin 1 inhibition augments anticancer effect of anti-DR5 agonistic antibody in TRAIL resistant tumor cells
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019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
---------	---------