

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：37401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07700

研究課題名(和文)核膜孔因子Nup88によるソニックヘッジホッグ経路を介したがん悪性化の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of cancer malignancy via the activation of the hedgehog signaling pathway by the nucleoporin Nup88

研究代表者

牧瀬 正樹(Makise, Masaki)

崇城大学・薬学部・准教授

研究者番号：80433001

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)：ヌクレオポリンNup88の発現促進機構およびがん悪性化への関与を、前立腺癌細胞株およびHeLa細胞を用いて調べた。前立腺癌細胞におけるNup88の発現は、当初予想とは異なりアンドロゲンに依存して抑制された。一方、HeLa細胞に過剰発現したNup88はKif7の発現を抑制し、Gli1の発現を促進した。すなわち、がん促進にはたらくヘッジホッグ経路を活性化することを見出した。Gli1の発現促進はKif7の発現抑制に依存していたので、過剰発現したNup88はKif7の発現抑制を介してヘッジホッグ経路を活性化することによりがんを悪性化する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Nup88の発現量とがんの悪性度には正の相関があると報告されている。しかしながら、Nup88ががんの悪性化にどのように寄与しているのかは不明であった。本研究は、Nup88がヘッジホッグ経路を活性化してがんを悪性化するという全く新しい可能性を示した点で重要である。この可能性に基づいた今後の研究展開によりNup88依存的なヘッジホッグ経路の活性化が明確になれば、ヘッジホッグ経路を標的にした新たな抗腫瘍薬の開発の基礎的知見となり得るだろう。

研究成果の概要(英文)：We investigated the regulatory mechanism of Nup88 expression and its involvement in the progression of the cancer malignancy using prostate cancer cell lines and HeLa cells. In the former, the expression of Nup88 was unexpectedly suppressed by androgen, an exacerbation factor for prostate cancer, so we abandoned the analysis. For the latter, we found that overexpression of Nup88 suppressed Kif7 expression and promoted Gli1 expression, indicating that the hedgehog signaling pathway associated with cancer malignancy is activated. Since the knockdown of Kif7 promoted the Gli1 expression, it was suggested that overexpression of Nup88 may contribute to cancer malignancy by activating the hedgehog signaling through suppression of Kif7 expression.

研究分野：分子生物学、細胞生物学、生化学

キーワード：Nup88 Kif7 ヘッジホッグ経路 がん Gli1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Nup88 は核膜孔を構成するヌクレオポリンの一つとして核-細胞質間の分子輸送を担う一方、種々のがん腫瘍細胞に異所性に高発現していることが報告されている。この発現レベルはがんのグレードや予後不良と正に相関することから、Nup88 はがん進展に重要な役割を果たしていると考えられている。しかしながら、運動性や浸潤性などの「がんの悪性化」に關与するかどうかはほとんど不明である。実際これまでに、Nup88 は細胞骨格因子 vimentin を介してわずかに細胞の運動性を亢進する効果が確認されたのみであり、全く未知の仕組みによってがんを悪性化する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、腫瘍細胞に過剰発現した Nup88 が、ヘッジホッグ (HH) 経路を活性化してがんを悪性化する分子機序を解明することである。いくつかの癌では HH 経路の異常亢進が悪性化に關与している。我々は、HeLa 細胞に強制発現させた Nup88 が、HH 経路の調節因子であるキネシン様タンパク質 Kif7 の遺伝子発現を抑制する現象を見出したので、Nup88 が HH 経路の活性化を導いてがんを悪性化する可能性を考えた。本研究では、前立腺癌細胞株と HeLa 細胞を用いて、Nup88 の過剰発現から HH 経路の調節異常に至る一連の分子機序の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) Nup88 発現のホルモン応答性の検討

前立腺癌細胞である LNCaP 細胞をホルモン不含培地で培養し、これにアンドロゲンの一つであるジヒドロテストステロン (DHT) を加えた際の、Nup88 の発現量変化をウエスタンブロットイング (WB) 法によって検討した。

(2) Nup88 の発現調節機構の解析

Nup88 の発現がアンドロゲン受容体 (AR) に依存するか否かを、AR を発現していない HeLa 細胞および AR を発現している前立腺癌細胞(PC-3)を用いて検討した。また、推定される AR 結合エレメントを少なくとも 9 カ所含む *NUP88* のプロモーター領域を用いてレポーターアッセイを行い、AR 応答エレメントの同定を試みた。

(3) Kif7 の発現抑制機構の解析

Nup88 の持続的な過剰発現に依存した Kif7 の発現抑制が、LNCaP 細胞で見られるか否かを WB 法によって検討した。HeLa 細胞については、*KIF7* プロモーターのメチル化状態をバイサルファイトシーケンスによって調べた。

(4) HH 経路のシグナル伝達の解析

Kif7 の発現抑制が HH 経路を活性化するか否かを、本経路の最終標的遺伝子 (*GLI1*) の発現増加を指標に調べた。さらに、HH 経路を構成する転写因子 Gli2 および Gli3 の活性化状態を WB 法によって検討した。

4. 研究成果

(1) Nup88 発現の男性ホルモン応答性の検討

前立腺癌において Nup88 の高発現が見られること、および *NUP88* のプロモーター配列には推定されるアンドロゲン受容体(AR)の結合配列が少なくとも 9 カ所存在することが示唆されている(図 1A)。そこで Nup88 の発現がアンドロゲンやアンドロゲン受容体を介して促進される可能性を考え、前立腺癌(LNCaP)細胞を用いて検討した。アンドロゲン枯渇状態で培養した LNCaP 細胞に DHT を添加して Nup88 発現変化を調べたところ、DHT を加えていない時(0 時間)に Nup88 の発現量が最も多く、DHT を加えるとその発現量が時間依存的に減少することがわかった。すなわち、当初予想であったアンドロゲン依存的な Nup88 発現の増加ではなく、減少が確認された(図 1B)。

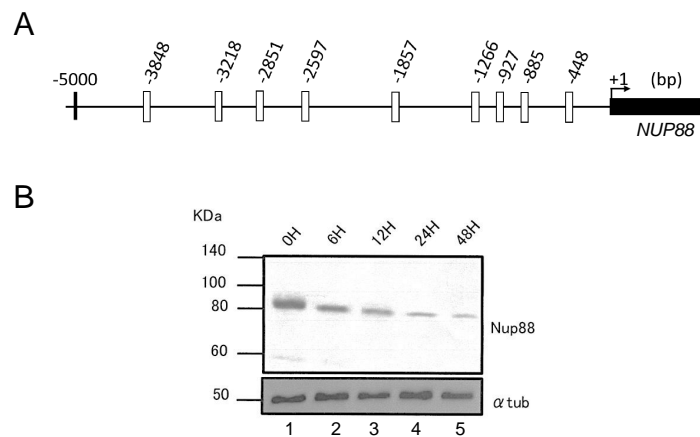


図 1 DHT に依存した Nup88 の発現抑制

(A) *NUP88* のプロモーター領域に存在する推定される 9 カ所の AR 結合配列。(B) DHT 依存的な Nup88 の発現変化。LNCaP 細胞をホルモン不含培地で 2 日間培養した後、DHT を 10 nM 加えて、Nup88 のタンパク質量変化を継時的に調べた。

(2) Nup88 の発現調節機構の解析

遺伝子発現レベルでの *NUP88* の発現が DHT によって抑制されるか否かをルシフェラーゼレポーターアッセイによって検討した。アッセイには *NUP88* の上流-4003~-1 の領域を用いた。このプラスミドをアンドロゲン枯渇状態の LNCaP 細胞に導入し、DHT への応答性を確かめようと試みた。しかしながら、信頼できるデータを得られなかった。一方、Nup88 のタンパク質発現が DHT に応答したことから(図 1B)、この応答は AR を介していると考えられた。そこでこの点を、AR を発現していない HeLa 細胞および AR を多く発現している前立腺癌(PC-3)細胞を用いて検討した。その結果、HeLa 細胞に対して PC-3 細胞の Nup88 発現量は約 70%程度にまで減少していることがわかった(図 2)。以上をまとめると、Nup88 の発現抑制は、DHT および AR が関与することが示唆された。

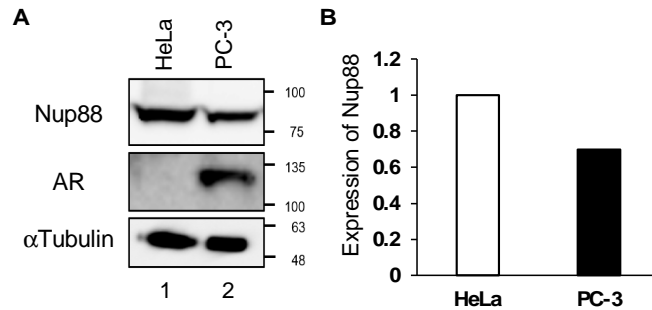


図 2 AR 依存的な Nup88 の発現変化

(A)血清入り培地で通常培養した HeLa 細胞および PC-3 細胞における Nup88 の発現量を WB 法によって比較した。(B)(A)に基づき Nup88 のバンド強度を定量した。

(3) Kif7 の発現抑制機構

Nup88 の過剰発現に依存した Kif7 の発現減少が HeLa 細胞同様に前立腺癌細胞でも見られるか否かを、Nup88 を transient あるいは stable に過剰発現する LNCaP 細胞を用いて確認しようと試みた。Nup88 を一過性に過剰発現した LNCaP 細胞では Kif7 の発現抑制は起こらなかった。一方、LNCaP 細胞の stable transfectant の樹立はうまくいかなかった。以上から、LNCaP 細胞での *KIF7* プロモーター解析は中止した。この代わりに、HeLa 細胞の Nup88 過剰発現株における *KIF7* プロモーターのメチル化解析を進めた。その結果、Nup88 の持続的な過剰発現によって、CpG のメチル化が著しく亢進することがわかった (図 3)

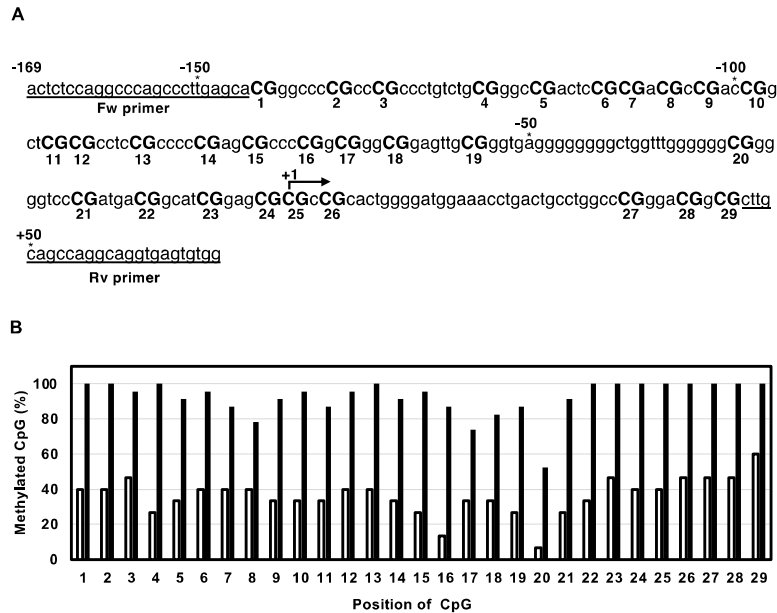


図 3 HeLa 細胞の Nup88 過剰発現細胞株における *KIF7* プロモーターのメチル化解析

(A) *KIF7* プロモーター (-169~+70) の DNA 配列ならびにメチル化され得る 29 カ所の CpG 配列のポジションを示す。(B)Nup88 発現細胞 (■) とコントロール細胞 (□) の各 CpG 配列のメチル化率を示す。いずれも 20 クローンを取得し、CpG メチル化をバイサルファイトシーケンスによって解析した。

(4) Nup88 の過剰発現が与えるヘッジホッグ(HH)経路のシグナル伝達への影響

LNCaP 細胞の Nup88 過剰発現株が構築できなかったことから、HeLa 細胞の Nup88 過剰発現

細胞を用いて HH 経路の活性化状態を検討した。その結果、HH 経路を構成する因子であり、本経路の最終標的因子でもある Gli1 の発現が、Nup88 を過剰発現することによって増加した(図 4A)。さらに *KIF7* をノックダウンすると、Gli1 の発現が増加した(図 4B)。以上から、HeLa 細胞において Nup88 の過剰発現は、Kif7 の発現抑制を介して HH 経路を活性化する可能性が示された。

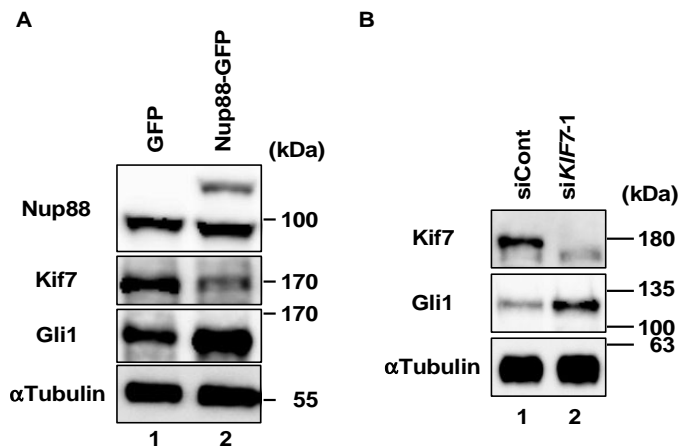


図 4 Nup88 の過剰発現および Kif7 の発現減少に依存した HH 経路の活性化

(A)Nup88 を過剰発現した HeLa 細胞における Kif7 及び Gli1 の発現変化。(B)Kif7 をノックダウンした細胞における Gli1 の発現変化

(5) 高発現した Nup88 によるがん悪性化効果の検討

LNCaP 細胞の Nup88 過剰発現株が構築できなかったため、細胞運動性を検討できなかった。代わりに Nup88 の過剰発現が HeLa 細胞の遊走性および浸潤性を促進することを報告した (Makise et al. 2021)。

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 1件）

1. 著者名 Makise M, Uchimura R, Higashi K, Mashiki Y, Shiraishi R, Shutoku Y, Kuniyasu A.	4. 巻 156
2. 論文標題 Overexpression of the nucleoporin Nup88 stimulates migration and invasion of HeLa cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Histochem Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 409-421
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00418-021-02020-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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 牧瀬正樹、國安明彦
2. 発表標題 Nucleoporin Nup88 promotes cell motility via stimulating Matrix metalloproteinase 12 expression in HeLa cells
3. 学会等名 第93回生化学会大会（横浜）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 牧瀬正樹、國安明彦
2. 発表標題 ヌクレオポリンNup88は Matrix metalloproteinase-12の発現を介してHeLa細胞の運動性を促進する
3. 学会等名 日本薬学会第141年会（広島）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧瀬正樹、國安明彦
2. 発表標題 核膜孔因子Nup88の過剰発現はHeLa細胞の遊走性と浸潤性を促進する
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（横浜）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧瀬正樹、安藤早織、國安明彦
2. 発表標題 腫瘍マーカーNup88はHeLa細胞におけるヘッジホッグシグナル経路の活性化に寄与する
3. 学会等名 日本薬学会第 140回大会（京都）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Abraham AKONNOR, Ryota Uchuimura, Masaki MakiseAkihiko Kuniyasu
2. 発表標題 Intracellular Delivery of Proapoptotic Peptide Induces a Caspase-independent Cell Death in Breast Cancer Cells
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会（熊本）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國安明彦、Akonnor Abraham、安田日向子、前田裕香、牧瀬正樹
2. 発表標題 アポトーシス誘導ペプチドが引き起こすカスパーゼ非依存性ミクログリア細胞死の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（横浜）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國安明彦、牧瀬正樹
2. 発表標題 アルツハイマー病モデルマウスにおける脳内レドックス状態とレドックス関連分子の発現解析
3. 学会等名 第38回日本薬学会九州山口支部大会（熊本）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧瀬正樹、内村亮太、國安明彦
2. 発表標題 ヌクレポリンNup88の過剰発現が与えるHeLa細胞の遊走性と浸潤性への影響
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（名古屋）
4. 発表年 2022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
研究分担者	國安 明彦 (Kuniyasu Akihiko) (90241348)	崇城大学・薬学部・教授 (37401)	

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
---------	---------