

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07560

研究課題名（和文）タンパク質シトルリン修飾の破綻が大腸がんの発生と進行に果たす役割の解明

研究課題名（英文）PADI2 regulates cell death in colorectal cancer cells in the tumor microenvironment

研究代表者

舟山 亮（Funayama, Ryo）

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20452295

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）：タンパク質のシトルリン修飾酵素Peptidyl arginine deiminase 2 (PADI2) は、腫瘍環境下で大腸がん細胞の細胞死を誘導していた。大腸がん細胞が腫瘍を形成するためにはPADI2の発現を抑制する必要があると考えられた。また、PADI2の発現は培養環境下では大腸がん細胞の細胞死を引き起こさないことから、免疫細胞や細胞外マトリクスなどの腫瘍微小環境とPADI2との相互作用が細胞死の誘導に寄与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は大腸がんの進行の過程でシトルリン修飾酵素PADI2の発現量が低下することを報告したが、その機能的な役割については不明であった。本研究では、シトルリン修飾酵素PADI2が腫瘍環境下で大腸がん細胞の細胞死を誘導しており、PADI2の発現抑制が大腸がん細胞の腫瘍形成に必要であることが示唆された。低分子化合物を用いてPADI2の酵素活性を増強することができれば、大腸がん細胞の腫瘍形成能を抑制できる可能性があり、大腸がんの新たな治療戦略のシーズを提供することができるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：The expression of peptidyl arginine deiminase 2 (PADI2), a protein citrulline-modifying enzyme, induced cell death in colorectal cancer cells in a tumor microenvironment. The interactions between PADI2 and the tumor microenvironment, such as immune cells and extracellular matrix, contribute to the induction of cell death, since PADI2 expression does not cause cell death in a cell culture condition. Our data thus suggest that the repression of PADI2 expression might be required for colorectal cancer cells to form tumors.

研究分野：細胞生物学

キーワード：PADI2 シトルリン化 大腸がん 翻訳後修飾 マイクロエクソン スプライシング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) タンパク質のシトルリン化はアルギニン残基がシトルリン残基へ変化する翻訳後修飾で、酵素 Peptidyl arginine deiminase (PADI) が触媒する反応である。ヒトには細胞内局在と基質特異性の異なる 5 種類の PADI 遺伝子がある。例えば、PADI4 は核に局在し、ヒストンのシトルリン化を介して、幹細胞の未分化性の維持や好中球細胞外トラップの形成に機能する。一方、PADI2 は主に細胞質に局在し、vimentin などの細胞骨格タンパク質をシトルリン化する。

タンパク質シトルリン修飾の異常は疾患の発症に寄与している。アルツハイマー病では、病気の進行に伴い脳内にシトルリン化タンパク質が蓄積し、これが神経細胞を傷害して病態に影響する可能性が指摘されている。また自己免疫疾患の関節リウマチでは、関節局所でシトルリン化タンパク質を認識する自己抗体が検出され、特異性の高い診断マーカーとして活用されている。がんとの関わりも報告されており、乳がん、前立腺がんや皮膚がんシトルリン修飾との関連が調べられている。したがって、シトルリン修飾の異常が疾患に及ぼす影響とそのメカニズムを解明し、新たな治療戦略や早期診断方法の開発へ取り組むことは重要な課題である。

我々は、大腸の正常組織とがん組織のトランスクリプトームデータを解析する過程で偶然、PADI 遺伝子の特徴的な発現変化を観察した¹⁾。大腸正常組織では、5 種類の PADI 遺伝子ファミリーのうち PADI2 だけが発現しているが、大腸がん組織ではその発現量が著しく低下していた。そこで、大腸がん細胞に PADI2 遺伝子を導入すると、酵素活性に依存して細胞の増殖能が低下した。このことから、PADI2 によるタンパク質のシトルリン修飾は正常な大腸上皮細胞のがん化を抑制していると考えられ、その成果を報告した¹⁾。

しかし、正常な大腸上皮細胞でどのようなタンパク質が PADI2 によりシトルリン化されるのか、シトルリン修飾の破綻がどのように大腸がんの発生と進行に寄与するのか、については不明であった。

(2) ヒトゲノムには転写されて mRNA を形成する約 23 万個のエクソンが存在するが、その中には長さが 3~15 塩基の微小なエクソンが数千個存在する。これをマイクロエクソンという。マイクロエクソンのスプライシング異常は自閉症の発症と関連することが報告されているが、がんとの関連はほとんど調べられておらず、不明であった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、大腸がん組織の単一細胞 RNA-sequencing (RNA-seq) データの解析、および大腸がん細胞を用いた PADI 酵素活性の解析を通して、大腸上皮細胞における PADI2 の発現および活性の制御機構を解明する。また、マウスの腫瘍形成実験により、PADI2 の発現が大腸がん細胞の腫瘍形成能に果たす役割を明らかにする。本研究を発展させて、タンパク質のシトルリン修飾に着目した新しいがん治療戦略や、大腸がんの早期診断のための新たな手法の開発を目指す。

(2) 大腸がん組織のトランスクリプトームデータを活用した新たな試みとして、ゲノムに存在する微小なマイクロエクソンのスプライシング変化、スプライシングの制御機構、およびその機能的な役割を明らかにすることを目的に研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 大腸がん組織の大規模トランスクリプトーム解析では、The Cancer Genome Atlas (TCGA) の RNA-seq データセット colon adenocarcinoma (TCGA-COAD) を使用した。単一細胞のトランスクリプトーム解析では、Single Cell Portal (https://singlecell.broadinstitute.org/single_cell) の RNA-seq データセット Human Colon Cancer Atlas (c295) を使用した。大腸がん細胞株 HCT 116 に PADI2 cDNA を導入し、PADI2 過剰発現細胞を作製した。得られた細胞を FBXW7 shRNA または小胞体ストレス誘導剤 (Tunicamycin および Thapsigargin) で処理し、PADI2 のタンパク質発現量または PADI2 の酵素活性を抗 PADI2 抗体および抗シトルリン修飾抗体を用いたイムノプロット解析により調べた。

(2) 大腸がん組織におけるマイクロエクソンの解析では、大腸がん組織の RNA-seq データセット (GSE50760) を Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) からダウンロードした。また、TCGA のスプライシングデータをデータベース TCGA SpliceSeq (<https://bioinformatics.mdanderson.org/TCGASpliceSeq/index.jsp>) からダウンロードした。本研究では、長さが 15 塩基以下のエクソンをマイクロエクソンと定義し、そのスプライシングパターンをソフトウェア vast-tools を用いて解析した。大腸がん細胞を用いたスプライシング因子の解析では、HCT 116 および HCT 15 細胞に各種スプライシング因子の cDNA または shRNA を導入し、スプライシング因子の過剰発現またはノックダウンがマイクロエクソンのスプライシングに与える影響を RT-PCR により調べた。

4. 研究成果

(1) 大腸がん組織における PADI2 の発現および活性の制御

大腸がん組織では正常組織より PADI2 の発現量が低下していることをすでに報告した¹⁾。本研究では、より大規模な TCGA-COAD RNA-seq データセットを解析し、大腸がん組織の PADI2 mRNA 発現量は正常組織の約 1/10 に低下していることを明らかにした (図 1A)。また、大腸がん組織の単一細胞 RNA-seq データの解析の結果、PADI2 は正常上皮細胞で

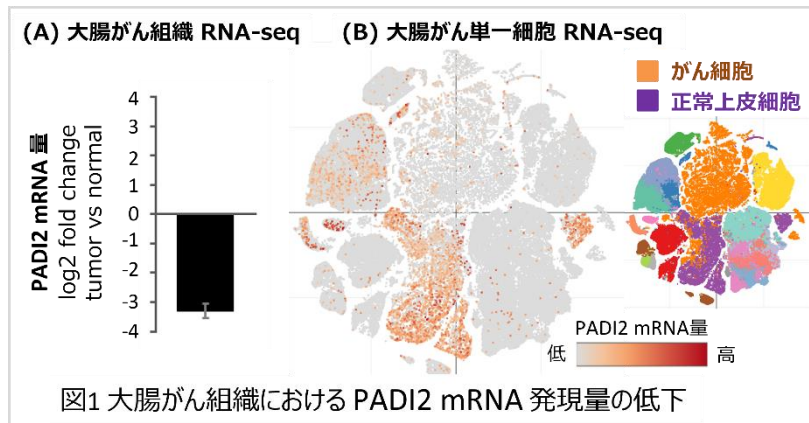


図1 大腸がん組織における PADI2 mRNA 発現量の低下

高発現しているが、がん化した上皮細胞では発現が低下していることを見出した (図 1B)。したがって、大腸がん組織で観察された PADI2 mRNA 発現量の低下は、上皮細胞の PADI2 発現量の変化を反映していることが明らかとなった。

転写レベルでの発現制御に加えて、PADI2 はユビキチン化酵素 FBXW7 を介したタンパク質分解の制御を受けることが報告されている。しかし、本研究の結果、FBXW7 のノックダウンは大腸がん細胞の PADI2 タンパク質量に影響しないことから、大腸がん細胞では FBXW7 は PADI2 の安定性制御に寄与していないと考えられた。

PADI2 は酵素活性に Ca^{2+} イオンを必要とする。免疫染色の結果、PADI2 タンパク質は細胞の Ca^{2+} 貯蔵庫である小胞体様の構造に局在することを見出した。そこで、PADI2 の酵素活性が小胞体ストレスに応答して制御される可能性を検討したが、小胞体ストレス誘導剤 (Tunicamycin および Thapsigargin) は PADI2 の酵素活性に影響を与えなかった。PADI2 の酵素活性が細胞内でどのように制御されているのかを明らかにすることはできなかった。

(2) PADI2 の発現は腫瘍環境下で大腸がん細胞の細胞死を誘導する

大腸正常組織と比べて大腸がん組織では PADI2 の発現が抑制されていることから、この発現抑制が大腸がん細胞の腫瘍形成に寄与しているという仮説を立てた。そこで、PADI2 が大腸がん細胞の腫瘍形成に果たす役割を、免疫不全ヌードマウスを用いた腫瘍形成実験により検証した (図 2A)。PADI2 を過剰発現する大腸がん細胞および発現しない対照細胞をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成能を調べた。その結果、PADI2 発現細胞の腫瘍と、発現しない対照細胞の腫瘍との間で腫瘍サイズに有意な変化は認められなかった。しかしながら、PADI2 発現細胞の腫瘍を免疫組織染色により詳しく調べた結果、腫瘍組織の中には PADI2 の発現を喪失した細胞が出現していることが判明した (図 2B)。また、PADI2 の発現を保持した細胞は腫瘍内で細胞死を起

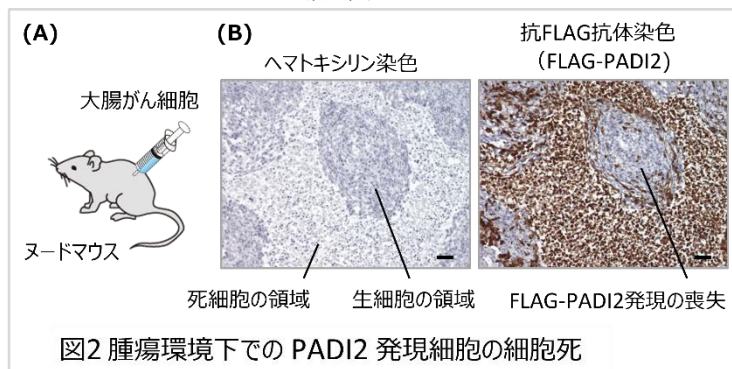


図2 腫瘍環境下での PADI2 発現細胞の細胞死

こしていることが明らかとなった (図 2B)。以上のことから、PADI2 は腫瘍細胞の細胞死を誘導しており、大腸がん細胞の腫瘍形成には PADI2 の発現を抑制する必要があると考えられた。また、PADI2 の発現は培養環境下では大腸がん細胞の細胞死を引き起こさないことから¹⁾、腫瘍環境下で観察された PADI2 発現細胞の細胞死は、免疫細胞や細胞外マトリクスなどの腫瘍微小環境と PADI2 との相互作用により誘導されていることが示唆された。

(3) 大腸がんにおけるマイクロエクソンのスプライシング変化は腫瘍細胞の転移を制御する

大腸がん組織のトランスクリプトームデータを活用した新たな試みとして、微小なマイクロエクソンのスプライシングパターンを解析した。ソフトウェア vast-tools を用いて大腸のがん組織と正常組織の RNA-seq データを解析し、各マイクロエクソンが mRNA に取り込まれる割合 percent spliced-in (PSI) 値を算出した。がん組織と正常組織との間で PSI 値を比較し、がん組織でスプライシングパターンが変化するマイクロエクソンを「腫瘍特異的マイクロエクソン」として同定した (図 3A)。gene ontology 解析の結果、腫瘍特異的マイクロエクソンは細胞接着に関わる遺伝子に多く存在することが明らかとなった。また、このスプライシング変化は大腸がん患者の転移の有無と関連することを見出した。

マイクロエクソン周辺のイントロン配列のモチーフ解析、および大腸がん細胞を用いたノックダウン実験と過剰発現実験により、スプライシング因子 RBFOX2 と PTBP1 がマイクロエクソ

ンのスプライシングを制御していることが明らかになった (図 3B)。さらに、大腸組織検体を用いたイムノブロット解析の結果、RBFox2 と PTBP1 の発現量はがん組織と正常組織との間で変化しており、この発現量の変化がマイクロエクソンのスプライシング変化を引き起こしていることが明らかとなった。以上の結果から、スプライシング因子 RBFox2 と PTBP1 は、腫瘍特異的マイクロエクソンの選択的スプライシングを制御することで、大腸がん細胞の転移に寄与していることが示唆され、この成果を論文発表した²⁾。

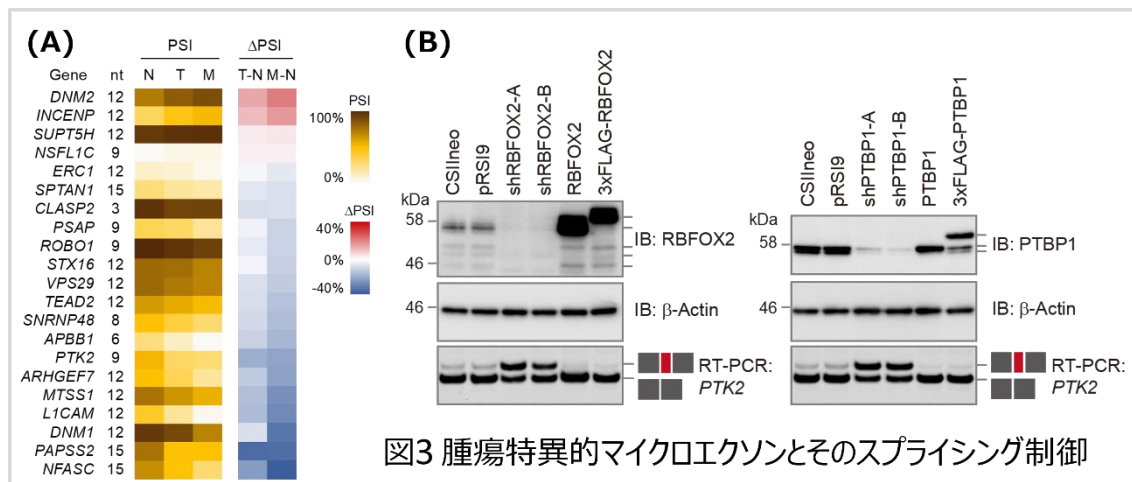


図3 腫瘍特異的マイクロエクソンとそのスプライシング制御

<引用文献>

- 1) Funayama R, Taniguchi H, Mizuma M, Fujishima F, Kobayashi M, Ohnuma S, Unno M, Nakayama K. Protein-arginine deiminase 2 suppresses proliferation of colon cancer cells through protein citrullination. *Cancer Sci.* 2017;108(4):713-718.
- 2) Mochizuki Y, Funayama R, Shiota M, Kikukawa Y, Ohira M, Karasawa H, Kobayashi M, Ohnuma S, Unno M, Nakayama K. Alternative microexon splicing by RBFox2 and PTBP1 is associated with metastasis in colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2021; 149(10):1787-1800.

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 Mochizuki Y*, Funayama R*, Shirota M, Kikukawa Y, Ohira M, Karasawa H, Kobayashi M, Ohnuma S, Unno M, Nakayama K. *Equal contribution.	4. 巻 149
2. 論文標題 Alternative microexon splicing by RBFOX2 and PTBP1 is associated with metastasis in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 1787-1800
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.33758.	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 舟山亮
2. 発表標題 マイクロエクソンの選択的スプライシングは大腸がん細胞の転移を制御する
3. 学会等名 東北大学創生応用医学研究センター 基盤研究部門 第1回オンラインセミナー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 舟山亮, 望月保志, 城田松之, 菊川柚奈, 大平優丈, 中山啓子
2. 発表標題 マイクロエクソンの選択的スプライシングは大腸がん細胞の転移を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中山啓子, 舟山亮, 望月保志, 小林実
2. 発表標題 大腸がん患者から学んだこと
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学大学院医学系研究科細胞増殖制御分野ホームページ
<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/index.html>

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