

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16373

研究課題名（和文）翻訳開始因子 Int6/eIF3e のリン酸化修飾を介した癌悪性化機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of molecular mechanism for cancer progression through phosphorylation of Int6/eIF3e

研究代表者

齊藤 紗希（後藤紗希）（SAITO, Saki）

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医学研究センター・研究員

研究者番号：60756609

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）：本研究は乳癌関連因子 Int6 のリン酸化による低酸素応答性転写因子 HIF2 の制御を介した癌悪性化の機序解明を目的として、Int6 のリン酸化の解析を行うとともに、これと並行して癌悪性化と密接に関係する上皮間葉転換における Int6/HIF2 の制御について検討した。その結果、Int6 によりタンパク質レベルで制御された HIF2 が、上皮系マーカーである細胞接着因子 E-cadherin 遺伝子の発現を抑制して上皮間葉転換を促進することを見出した。さらに、リン酸化した Int6 は HIF2 活性化のオン・オフのスイッチとなって上皮間葉転換の制御に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、Int6 のノックダウン癌細胞株の樹立により、INT6/HIF2 経路の機能解析を可能にし、上皮間葉転換の重要なプロセスである E-cadherin 遺伝子の発現抑制メカニズムを明らかにした。この中で、HIF2 が他の転写因子のコレギュレーターとして機能することを新たに見出した。加えて、Int6 が種々のシグナル経路によってリン酸化されることを明らかにし、Int6 のリン酸化が HIF2 活性化のスイッチとなり、EMT をはじめとした癌の悪性化に関与する可能性が考えられた。本研究の成果は、Int6/HIF2 制御を標的とした癌の新たな治療法および治療薬の開発へと繋げるものである。

研究成果の概要（英文）：This study has aimed to reveal a function of Int6 phosphorylation in cancer progression focusing on Int6-mediated regulation of HIF2. To this end, we established stable Int6 knockdown A549 cells which increased expression of HIF2. In Int6 knockdown cells, we found that increased HIF2 bound to transcription factor TWIST1 and repressed E-cadherin expression during the process of EMT. Furthermore, we found that Int6 was phosphorylated after treatment with a known EMT inducer, TGF α . Subsequently, phosphorylated Int6 bound to HIF2, resulting in a decrease of HIF2 protein levels. This observation suggests that phosphorylation of Int6 may be a switch for HIF2 activation and control downstream targets involved in cancer progression such as EMT.

研究分野：分子生物学

キーワード：Int6 HIF2 遺伝子発現制御 上皮間葉転換 癌の悪性化 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

Int6/eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E (Int6) は、ほぼ全ての細胞に普遍的に発現する翻訳開始因子複合体の構成因子で、タンパク質の翻訳開始機構における機能的役割が知られている。加えて、Int6 はマウス乳癌ウイルス (MMTV) が宿主ゲノムに組み込まれる際の標的遺伝子としても報告されている。MMTV により Int6 遺伝子が破壊された結果、宿主細胞が癌化することから Int6 は癌抑制遺伝子として機能すると考えられている。これと一致して、ヒト乳癌組織においても Int6 の発現減少が報告されている (*Int J Oncol* 2001)。一方、骨肉腫のような非上皮性細胞から発生する癌では、Int6 は癌遺伝子として機能することが報告 (*Nucleic Acids* 2016) されており、癌における Int6 の機能に関して意見が分かれている。

タンパク質のリン酸化修飾は、細胞の恒常性維持に主要な役割を果たし、リン酸化の異常は癌化の直接的な原因となる。翻訳開始因子のリン酸化の異常もまた癌と密接に関連していることが報告されているが (*Biochim Biophys Acta* 2015, *Proc Natl Acad Sci* 2010)、Int6 のリン酸化に関してはこれまで全く明らかにされていない。

所属研究室ではこれまでに、Int6 が低酸素応答性転写因子 HIF2 α の発現を酸素濃度非依存的に負に制御する分子機構 (Int6/HIF2 α 経路) を同定し、Int6 を介した HIF2 α による血管新生制御を明らかにした (図 1. *J Biol Chem* 2007, *Circulation* 2010)。Int6 および HIF2 α はそれぞれ癌と関連した知見が蓄積していることから、Int6/HIF2 α 経路が癌の発症や悪性化

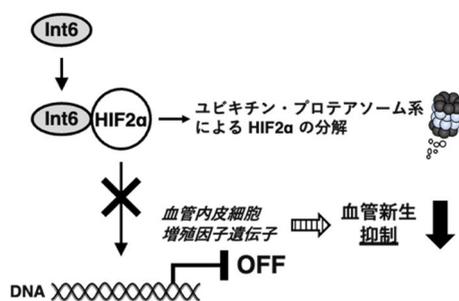


図 1. Int6 による HIF2 α 制御を介した血管新生機構

の制御に関与する可能性が考えられる。癌悪性化機構の一つとして知られる上皮間葉転換 (EMT) に、Int6 および HIF2 α が関与することが個別に報告されている (*Oncogene* 2013, *Mol Cancer Res* 2015) が、両者の関係は検討されていない。そこで本研究では、Int6 のリン酸化を解析して、その機能を HIF2 α 制御に焦点をあてて検討し、EMT を中心とした癌悪性化との関連について追究する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Int6 のリン酸化の機能的役割を HIF2 α 制御と関連させて理解し、Int6 を介した発癌および癌の悪性化の機序を明らかにすることである。そのために本研究では (1) Int6 のリン酸化の解析を行い、Int6 のリン酸化の機能的役割を HIF2 α 制御に焦点を置いて明らかにする。さらに、(2) 癌悪性化における Int6 を介した HIF2 α 制御の機能的役割を明らかにするために、EMT に焦点をおいて検討を行う (図 2.)。

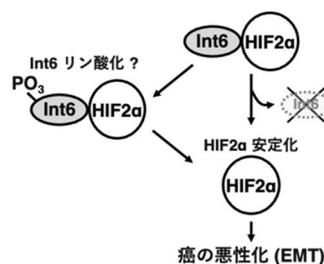


図 2. 目的

3. 研究の方法

(1) 【Int6 のリン酸化に関する検討】

癌細胞株（ヒト肺癌 A549 細胞, ヒト肝癌 HepG2 細胞, ヒト乳癌 MCF7 細胞）から抽出した細胞溶解液を用いて Phos-tag SDS-PAGE を行い、抗 Int6 抗体による ウェスタンブロット解析を行なった。また、細胞内シグナルを活性化または抑制化する薬剤を細胞に暴露して、Int6 のリン酸化レベル、HIF2 α タンパク質発現量および共免疫沈降法による Int6 と HIF2 α の結合性への影響を検討した。また、抗 Int6 抗体を用いた A549 細胞の免疫沈降サンプルを SDS-PAGE により分離し、リン酸化プロテオーム解析を行った。

(2) 【Int6/HIF2 α 経路を介した癌悪性化機序の探索】

レンチウイルス発現システムを用いて、A549 細胞および HepG2 細胞の Int6 ノックダウン (Int6 KD) 細胞株を樹立し、ウェスタンブロット法により Int6 および HIF2 α のタンパク質発現量を検出した。続いて、qRT-PCR および ウェスタンブロット法により EMT 関連遺伝子の発現量への変化を検証した。さらに、siRNA を用いたノックダウン実験により、EMT 関連遺伝子発現に与える HIF2 α の影響について検討した。また、細胞接着因子 *E-cadherin* (*E-cad*) に焦点をおいて、HIF2 α の遺伝子制御領域をルシフェラーゼレポーター (*Luc*) アッセイおよびクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により探索した。加えて、*In silico* 解析および共免疫沈降法によって HIF2 α と相互作用するタンパク質を解析した。

4 . 研究成果

(1) 【Int6 のリン酸化に関する検討】

はじめに、リン酸化タンパク質の分離が可能な Phos-tag SDS-PAGE の解析により、種々のヒト癌細胞株において Int6 のリン酸化が観察された。次に、Int6 のリン酸化レベルの増減に影響を与える細胞内シグナルを明らかにするために、種々の薬剤を細胞に暴露

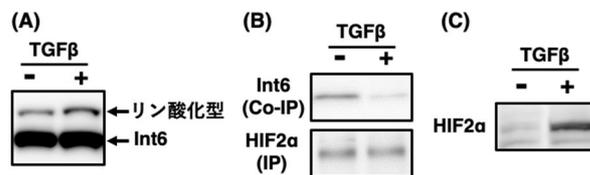


図 3. Int6 のリン酸化に関する解析 (A549 細胞)
A. TGF β 処置による Int6 リン酸化の増加, B. Int6 と HIF2 α 結合の減弱, C. HIF2 α 発現量の増加

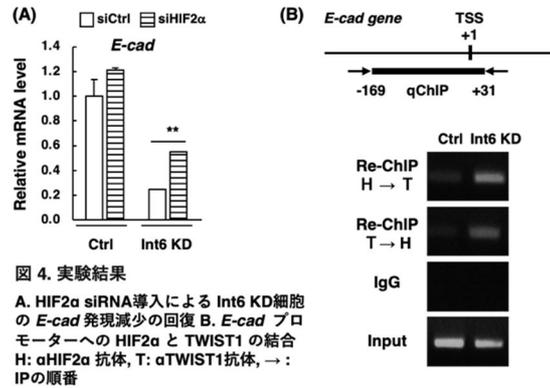
したところ、EMT を促進するトランスフォーミング増殖因子 (TGF β) によって、リン酸化 Int6 の増加がみられた。さらにこの際、Int6 と HIF2 α の結合性は減弱し、HIF2 α の発現量が増加した (図 3.)。以上より、TGF β 誘導性の Int6 のリン酸化は、HIF2 α 発現量の変動スイッチとして機能する可能性が示唆された。一方、Int6 タンパク質のリン酸化プロテオーム解析では、検出条件が定まらず、リン酸化部位の同定には至らなかったが、試料の調製方法を変更して継続する予定である。

(2) 【Int6/HIF2 α 経路を介した癌悪性化機序の探索】

Int6 KD 細胞株の樹立と表現型の検討

はじめに、Int6 タンパク質の発現量が 50%程度低下した細胞株を樹立したところ、A549 細胞および HepG2 細胞ともに HIF2 α の発現量および転写活性の増加がみられた。Int6 の発現が低下した A549 細胞は EMT 様の変化が起こることが報告されている (*Oncogene* 2013)。この

既報と一致して、A549 細胞の Int6 KD 細胞において、敷石状から紡錘状への EMT 様形態変化および EMT 関連遺伝子の発現変動がみられた。続いて、HIF2 α の siRNA を用いたノックダウン実験により、HIF2 α が Int6 KD 誘導性の *E-cad* 遺伝子発現抑制に関与していることを明らかにした (図 4A.)。



HIF2 α を介した *E-cad* 遺伝子発現制御機構の解明

HIF2 α の siRNA を用いた Luc アッセイにより、*E-cad* 遺伝子のプロモーター近傍に HIF2 α の制御領域が存在することを明らかにした。この領域周辺には、HIF2 α の DNA 結合モチーフは存在しないが、種々の EMT 関連転写因子が結合する配列 (E-box) が存在する。*In silico* 解析により、HIF2 α と相互作用する EMT 関連転写因子として TWIST1 が推定されたため、共免疫沈降法により HIF2 α と TWIST1 の結合性を実際に確認した。さらに、複数のタンパク質の同時存在を検出する連続的な ChIP 解析 (Re-ChIP) により、*E-cad* 遺伝子の E-box に HIF2 α と TWIST1 が共局在することを示した (図 4B.)。したがって、HIF2 α は TWIST1 を介した *E-cad* 遺伝子の転写抑制を高めることを見出した (図 5.)。以上より、Int6/HIF2 α 経路が *E-cad* 遺伝子の発現を抑制して EMT を促進する機序を明らかにするとともに、HIF2 α がコアクチベータとして機能する新たな知見を提供した。今後、リン酸化 Int6 を介した HIF2 α 制御に関して詳細に検討することにより、EMT をはじめとした種々の癌の悪性化機序における Int6/HIF2 α 経路の役割を追究する。

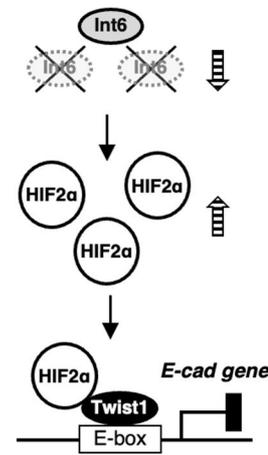


図 5. Int6/HIF2 α 経路を介した *E-cad* 遺伝子発現抑制機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Gotoh Saito Saki, Sadato Daichi, Shibasaki Futoshi	4. 巻 27
2. 論文標題 INT6/eIF3e represses E-cadherin expression through HIF2 in lung carcinoma A549 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 689 ~ 705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12984	査読の有無 無
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 齊藤紗希
2. 発表標題 Identification of the mechanism by which Int6/HIF2 -regulated E-cadherin expression in A549 lung cancer cells
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------