

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06560

研究課題名(和文)がん生育に有利に働く低頻度遺伝子変異の効率的同定戦略

研究課題名(英文)Efficient identification of low-frequency gene mutations that favor cancer growth

研究代表者

樋野 展正 (HINO, Nobumasa)

大阪大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：90469916

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：低頻度がん変異に起因する蛋白質間相互作用の異常と細胞機能との関連との解析を通じ、がん生育に有利に働く低頻度変異を同定することを目指した。我々は、KEAP1蛋白質表面のがん変異がRab8aとの相互作用を減弱させることを示した。しかし、KEAP1変異体の安定発現は、細胞増殖および腫瘍生育に有意な影響を与えなかった。一方で、KEAP1の発現抑制はがん細胞株の増殖を亢進させ、その亢進はRab8aの発現抑制によりキャンセルされた。以上より、KEAP1はRab8aの持つ細胞増殖促進能を抑制するものの、KEAP1点変異による両者の相互作用の減弱は細胞増殖に影響を与えるほどの効果は持たないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんゲノム変異大部分を占める低頻度変異とがんとの関連を明らかにする戦略は確立されておらず、新たな治療標的の探索は進んでいない。我々は、独自手法によりがん低頻度変異により異常をきたすKEAP1-Rab8a間相互作用を同定した。KEAP1点変異による細胞増殖や腫瘍生育への影響はみられなかったものの、KEAP1がRab8aの腫瘍増殖促進を抑制する結果が得られた。本結果は、KEAP1とRab8aが属するそれぞれの蛋白質間相互作用ネットワークのクロストークを示すものであり、KEAP1の発現低下が見られるがんに対して、Rab8aもしくはその下流の因子が新たな治療標的となる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：The relationship between aberrant protein-protein interactions caused by low-frequency cancer mutations and cellular functions was investigated, with the objective of identifying low-frequency mutations that favor cancer growth. It was demonstrated that low-frequency cancer mutations on the surface of KEAP1 protein found in cancer patients attenuate its interaction with Rab8a. However, stable expression of the KEAP1 mutant did not significantly affect cell proliferation and tumor growth. On the other hand, suppression of KEAP1 expression enhanced proliferation of cancer cell lines, and this enhancement was canceled by suppression of Rab8a expression. These results suggest that KEAP1 suppresses Rab8a's ability to promote cell proliferation, but that the weakening of its interaction with Rab8a by the KEAP1 point mutation is not significant enough to affect cell proliferation.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：がんゲノム タンパク質立体構造 タンパク質間相互作用 クロスリンク 人工アミノ酸 KEAP1

### 1. 研究開始当初の背景

がんゲノム医療とは、がん細胞で起きている遺伝子の変異を調べることで「個々の患者に最適な治療方法」を提案する医療のことである。近年、日本でもがんゲノム医療の1つであるNCCオンコパネル検査が保険適応されたが、この検査を受けた患者に最適な医療を提供することができた割合は13.4%にとどまっている(図1)。この原因としては、適切な分子標的薬が存在しないことに加え、遺伝子変異ががん細胞機能に影響を及ぼすメカニズムが不明瞭であることが挙げられる。このことから、遺伝子変異に起因するタンパク質の機能異常およびタンパク質間相互作用ネットワークの異常とがんの発生や進行との関連を解明し、新たな治療標的探索の基礎とすることが必要であると考えられる。

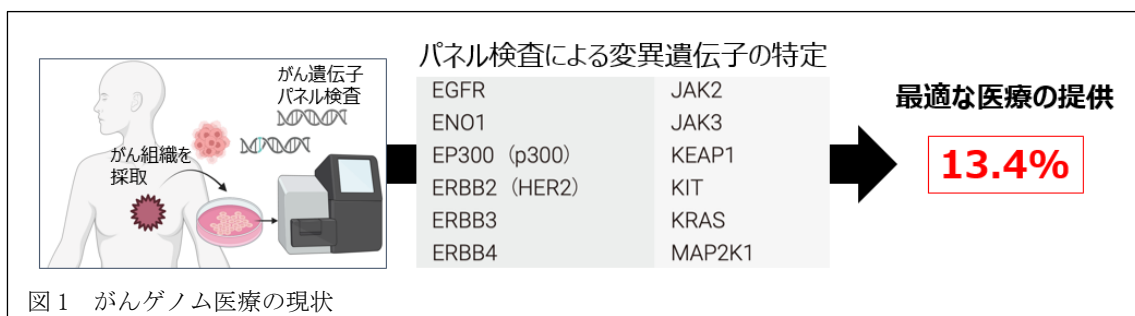


図1 がんゲノム医療の現状

がんゲノム変異の90%以上は機能未知の低頻度変異が占めている。これまでに、遺伝子中の低頻度変異がタンパク質機能に与える影響を類推することを目的に、がんゲノム解析から得られた遺伝子変異情報とタンパク質立体構造を組み合わせた *in silico* 解析が広く行われてきた。その結果、遺伝子上の変異部位をタンパク質構造上へプロットすると他因子との相互作用領域に集積することが明らかとなった(図2①)。そこで我々は、変異により異常をきたすタンパク質間相互作用を効率よく同定することを目的に、低頻度変異が集中するタンパク質構造領域(変異集積領域)を *in silico* 解析により特定し、次いで、その領域で実際に生じるタンパク質間相互作用を独自の「細胞内光クロスリンク法」により特異的に捕捉する手法を開発した(図2②)。実際に、非小細胞肺癌患者の20~30%で変異が見られ、がんの生育を抑制する機能を持つKEAP1タンパク質に本手法を適用し、新規相互作用因子として複数のsmall GTPaseを同定した。さらに、実際にがん患者で見られる点変異をKEAP1に導入すると、small GTPaseのひとつであるRab8aとの相互作用が顕著に抑制されることも示した。以上より、タンパク質構造上の変異集積領域に着目した解析から、がん変異により異常をきたす新たなタンパク質間相互作用を効率よく同定できることを示した。

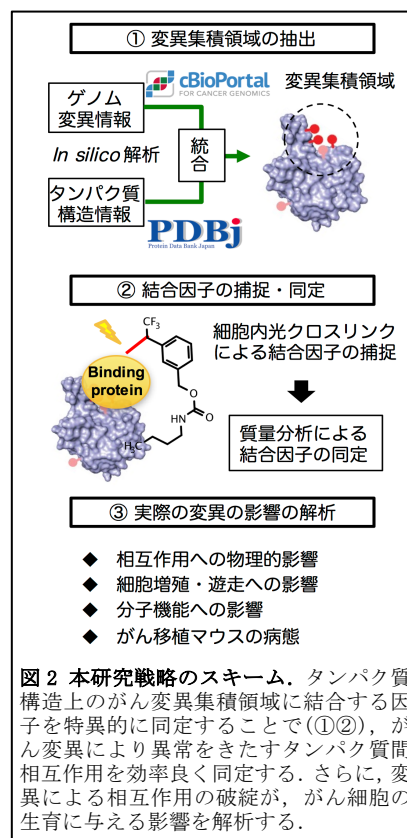
### 2. 研究の目的

本研究では、低頻度変異がタンパク質間相互作用に及ぼす影響を迅速に評価することで、がん生育に有利に働く変異を効率よく同定する戦略の確立を目的とした。具体的には、これまでに明らかにしたKEAP1-Rab8aの相互作用に着目し、KEAP1変異によるRab8aとの相互作用の破綻ががんの生育に与える影響を解析することで、低頻度変異とがんとの関連を相互作用異常の観点から明らかにすることを目指した。

### 3. 研究の方法

#### (1) KEAP1がRab8aの分解を誘導する可能性の検証

Rab8aはトランスゴルジ網から細胞膜への小胞輸送の重要な制御因子として知られており、メタロプロテアーゼや受容体チロシンキナーゼを輸送することでがんの進行に関与している。Rab8aががん抑制性因子であるKEAP1と相互作用する、がん点変異が両者の相互作用を破綻させるというこれまでの研究成果より、我々は、定常状態においてKEAP1がRab8aの機能を抑制しているのではないかと考えた。KEAP1は、Cullin 3 E3ユビキチンリガーゼによるタンパク質分解を仲介するアダプタータンパク質として機能する。そこで、KEAP1がRab8aの分解を促進するかどうかを検討した。



## (2) KEAP1-Rab8a 相互作用およびその破綻が細胞増殖に与える影響の検証

KEAP1 は腫瘍増殖を抑制する機能を持ち、Rab8a は増殖を促進することが報告されている。そこで、KEAP1 が Rab8a と相互作用することで細胞増殖能を抑制する可能性を考えた。この検証のため、野生型 KEAP1 が発現する肺がん細胞株 NCI-H23 に対する遺伝子発現抑制が、細胞増殖に与える影響を解析した。

## (3) KEAP1 変異が腫瘍増殖に与える影響の検証

がん変異による KEAP1-Rab8a 相互作用の破綻が細胞増殖に及ぼす影響を調べるため、KEAP1 の発現が見られない肺がん細胞株 A549 に対して野生型もしくはがん変異型 KEAP1 を安定発現させ、細胞および腫瘍増殖に与える影響を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) KEAP1 が Rab8a の分解を誘導する可能性の検証

まず、KEAP1 の既知の基質である NRF2 を用い、KEAP1 による分解誘導を検証できるかを確認した。293c18 細胞に対して KEAP1 および NRF2 を過剰発現させたところ、NRF2 のタンパク質量は KEAP1 の共発現によって減少し、さらにプロテアソーム阻害剤 MG132 の処理によって回復したことから、KEAP1 が NRF2 のプロテアソーム分解を促進することが確認された。一方、同様の実験条件下において、Rab8a のタンパク質量は KEAP1 の共発現により影響を受けなかった。この結果から、KEAP1 が Rab8a の分解に関与していないことが示された。

### (2) KEAP1-Rab8a 相互作用およびその破綻が細胞増殖に与える影響の検証

内因性 Rab8a または KEAP1 の発現抑制が細胞増殖に及ぼす影響を評価した。KEAP1 タンパク質の正常な発現レベルを有するヒト肺腺がん細胞株 NCI-H23 細胞に、KEAP1、Rab8a または NRF2 の siRNA を、単独または組み合わせて導入し、細胞増殖への影響を WST-8 アッセイで解析した。KEAP1 の単独ノックダウン (KD) により、NCI-H23 細胞の増殖率はコントロール siRNA 処理細胞の約 2 倍に増加したことから、KEAP1 が細胞増殖抑制機能を持つことが確認された。Rab8a または NRF2 を単独で KD した場合には、細胞増殖がわずかに減少した。さらに、KEAP1 KD による細胞増殖能の亢進は、Rab8a との同時 KD によりほぼキャンセルされた。この効果は、KEAP1 と NRF2 の同時 KD と同程度であった。この結果より、KEAP1-Rab8a 間相互作用は細胞増殖に対して抑制的な効果を示すことが示唆された。

### (3) KEAP1 変異が腫瘍増殖に与える影響の検証

がん変異による KEAP1-Rab8a 相互作用の破綻が細胞増殖に及ぼす影響を調べるべく、内在性 KEAP1 の発現が見られない肺がん細胞株である A549 に対して、野生型 KEAP1 ならびに Rab8a との相互作用が減弱する変異型 KEAP1 を安定発現させた。これらの細胞株間で足場依存性増殖能には差が無かったが、野生型 KEAP1 発現株は A549 親株および変異型 KEAP1 発現株と比較して足場非依存性増殖能が減弱することが明らかとなった。さらに、マウス xenograft モデルを作製し、KEAP1-Rab8a 相互作用が腫瘍増殖能に与える影響を調べたところ、野生型 KEAP1 発現株は A549 細胞に比べて腫瘍増殖が抑制される傾向にあった。一方で、変異型 KEAP1 発現細胞株においても腫瘍増殖抑制が見られ、その抑制能は野生型 KEAP1 発現株と有意な差は無かった。このことから、Rab8a との相互作用を減弱させる変異は KEAP1 の腫瘍増殖抑制能に大きな影響を与えないことが示唆された。

本研究では、新たに同定した KEAP1-Rab8a 相互作用の機能解析を進め、KEAP1 が Rab8a の持つ細胞増殖促進活性を抑制することを示唆する結果を得た。一方で、がん患者で見られる KEAP1 タンパク質の点変異は、Rab8a との相互作用を減弱させるものの、その効果は細胞および腫瘍の増殖に対して大きな影響を与えないことが示唆された。本研究の意義のひとつに、KEAP1 と Rab8a が属するそれぞれのタンパク質間相互作用ネットワークがリンクしていることを示したことにある。現時点では、Rab8a に対する特異的阻害剤は存在しないが、Rab8a は細胞増殖に関わる複数のチロシンキナーゼやプロテアーゼを細胞表層に輸送するという活性を持つ。すなわち、KEAP1 の発現抑制が Rab8a の機能を亢進させ、がん増殖を促進するのであれば、Rab8a の下流にあるチロシンキナーゼの特異的阻害剤が、KEAP1 変異がんに対して有効に機能する可能性がある。今後、本解析手法を変異集積を示すさまざまなタンパク質に適用することにより、「あるグループに属するがん点変異を持った患者にはこの治療が有効である」という関係性を明確なメカニズムとともに説明し、より精度の高い個別化医療へと応用できればと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishimoto Kenji, Shimada Yukiko, Ohno Akane, Otani Shuichi, Ago Yukio, Maeda Soya, Lin Bangzhong, Nunomura Kazuto, Hino Nobumasa, Suzuki Masayuki, Nakagawa Shinsaku	4. 巻 9
2. 論文標題 Physicochemical and Biochemical Evaluation of Amorphous Solid Dispersion of Naringenin Prepared Using Hot-Melt Extrusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Nutrition	6. 最初と最後の頁 850103
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnut.2022.850103	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 Morita M, Yoneda A, Tokunoh N, Masaki T, Shirakura K, Kinoshita M, Hashimoto R, Shigesada N, Takahashi J, Tachibana M, Tanaka S, Obana M, Hino N, Ikawa M, Tsujikawa K, Ono C, Matsuura Y, Kidoya H, Takakura N, Kubota Y, Doi T, Takayama K, Yoshioka Y, Fujio Y, Okada Y.	4. 巻 120
2. 論文標題 Upregulation of Robo4 expression by SMAD signaling suppresses vascular permeability and mortality in endotoxemia and COVID-19 models	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2213317120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2213317120	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 -
1. 著者名 Ishimoto Kenji, Konishi Yuma, Otani Shuichi, Maeda Soya, Ago Yukio, Hino Nobumasa, Suzuki Masayuki, Nakagawa Shinsaku	4. 巻 77
2. 論文標題 Suppressive effect of black tea polyphenol theaflavins in a mouse model of ovalbumin-induced food allergy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicines	6. 最初と最後の頁 604 ~ 609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11418-023-01686-x	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 -
1. 著者名 Kashio Taito, Shirakura Keisuke, Kinoshita Mayumi, Morita Maaya, Ishiba Ryosuke, Muraoka Kosuke, Kanbara Tomoaki, Tanaka Masato, Funatsu Risa, Hino Nobumasa, Koyama Shohei, Suzuki Ryo, Yoshioka Yasuo, Aoshi Taiki, Doi Takefumi, Okada Yoshiaki	4. 巻 9
2. 論文標題 HDAC inhibitor, MS-275, increases vascular permeability by suppressing Robo4 expression in endothelial cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Tissue Barriers	6. 最初と最後の頁 1911195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/21688370.2021.1911195	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 -

1. 著者名 Sakamoto Kotaro, Chen Lu, Miyaoka Tatsunori, Yamada Mei, Masutani Teruaki, Ishimoto Kenji, Hino Nobumasa, Nakagawa Shinsaku, Asano Satoshi, Ago Yukio	4. 巻 12
2. 論文標題 Generation of KS-133 as a Novel Bicyclic Peptide with a Potent and Selective VIPR2 Antagonist Activity that Counteracts Cognitive Decline in a Mouse Model of Psychiatric Disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 751587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2021.751587	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 Tanaka Masato, Shirakura Keisuke, Takayama Yui, atsui Miki, Watanabe Yukio, Yamamoto Takuya, Takahashi Junya, Tanaka Shota, Hino Nobumasa, Doi Takefumi, Obana Masanori, Fujio Yasushi, Takayama Kazuo, Okada Yoshiaki	4. 巻 7
2. 論文標題 Endothelial ROBO4 suppresses PTGS2/COX-2 expression and inflammatory diseases	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-024-06317-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4件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 高田 理沙、尾上遥南、鈴木喬介、石本憲司、大竹 和正、坂本 健作、吉岡 靖雄、中川 晋作、樋野 展正
2. 発表標題 新型コロナウイルス変異株に対応する次世代型ACE2-Fc製剤の開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石田 莉子、喜多 絢海、原田 和生、土井 啓生、池山 直輝、西浦 崇史、石本憲司、藤尾 慈、中川 晋作、樋野 展正
2. 発表標題 細胞内カルシウム流入に伴うDNA脱メチル化関連酵素TET1の活性調節機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 樋野 展正、高田 理沙、徳納 渚沙、小野 慎子、大竹 和正、尾上 遥南、鈴木 喬介、西浦 崇史、塚本 智仁、石本 恵司、松浦 善治、坂本 健作、吉岡 靖雄、中川 晋作
2. 発表標題 SARS-CoV-2に不可逆的に結合し不活性化する次世代型ACE2-Fcの開発
3. 学会等名 第39回日本DDS学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nobumasa Hino
2. 発表標題 Cross-linkable amino acid into proteins for disease pathology research and disease treatment
3. 学会等名 The 8th International Conference on Pharmacy and Advanced Pharmaceutical Sciences and the 14th Annual Conference of the Indonesian Society for Cancer Chemoprevention (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

大阪大学大学院薬学研究科薬剤学分野ホームページ <a href="https://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b011/">https://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b011/</a>
--

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