

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201
 研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22390071
 研究課題名（和文）腫瘍における多能性維持転写因子 NACC1 発現の意義と活性阻害剤開発に関する研究
 研究課題名（英文）Studies for NACC1, a pluripotent transcriptional factor, in tumor cells
 研究代表者
 前沢 千早 (MAESAWA CHIHAYA)
 岩手医科大学・医学部・教授
 研究者番号：10326647

研究成果の概要（和文）：NACC1 は多能性維持に関連する転写因子ネットワークの一員として認識され、その過剰発現は腫瘍の悪性形質と関連が指摘されている。本研究では、NACC1 が細胞質内ヒストン脱アセチル化酵素 HDAC6 と結合し、細胞骨格関連分子（ α -tubulin、cortactin）のアセチル化制御により腫瘍の浸潤・転移能の制御に関与していた。また、NACC1 は乳癌の HSP90 のアセチル化制御により ERBB2 の発現の維持にも関与していた。核内では SUMO 化を受けた PML 分子と結合し細胞増殖、アポトーシスに影響を与えていた。NACC1 の過剰発現は腫瘍の悪性形質を誘導し、細胞運動・浸潤・増殖能に影響を与えており格好の治療的分子となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：NACC1 is a member of pluripotent transcription factor, and associates with malignant phenotypes of tumor cells. The present study investigated the molecular mechanisms of NACC1 in malignant tumors. We represented that NACC1 directly bound to HDAC6, and deacetylated tubulin and cortactin. This deacetylation introduced acceleration of motility and invasion of tumor cells. NACC1 also contributed to stabilization of ERBB2 protein expression through the deacetylation of HSP90. The SUMOylation of NACC1 introduced the binding with PML protein. Our study demonstrated that overexpression of NACC1 protein contributes to motility, invasion, proliferation activities of tumor cells, and may be a good candidate for molecular target medicine in cancer therapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：人体病理

キーワード：NACC1, ケミカルバイオロジー, 多能性, 病理, 翻訳後修飾, 転写因子

- | | |
|---------------------------------------|--|
| 1. 研究開始当初の背景
近年、ES 細胞を初めとした幹細胞の多能性 | 維持に関連する転写因子ネットワーク (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Dax1, Rex1, |
|---------------------------------------|--|

Zpf281, NACC1) の活性化が、腫瘍の分化度や予後と密接な関連を持つことが報告されている。このネットワークのダイナミクスは、がん幹細胞の持つ自己複製能ばかりでなく、周辺部の大多数を占めるがん細胞への分化誘導・増殖に関与する事が予測されている。多能性維持に関連する転写因子ネットワークを制御することが可能であれば、がん幹細胞の活動を休眠させ、がんと共生するドーマントセラピー（休眠療法）を開発する糸口となる。

NACC1(nucleus accumbence associated 1) は大脳辺縁系の側坐核で過剰発現し、軸索輸送/神経伝達物質の分解に関わる蛋白質として単離された。アミノ酸配列は BCL6 などの BTB/POZ family と高い相同性を示し、HDAC-3, -4, CoREST/Sim3 などと巨大な複合体を形成し、抑制型の転写因子として働く。

腫瘍の生物学的特性との関連では、過剰発現の見られる卵巣癌、子宮体癌の予後は不良である。細胞周期関連蛋白質 GADD45/GIP1 の発現制御により、細胞増殖能を抑制する。taxane 系抗がん剤に対する抵抗性の原因となる、などの報告があった。

NACC1 は腫瘍の生物学的悪性度と密接な関連を持ち格好の治療標的分子となる可能性がある。本研究では、NACC1 の腫瘍の生物学的特性に係る分子機構の解析に併せて、治療標的となる阻害薬のスクリーニングを行った。

2. 研究の目的

本研究課題では、悪性腫瘍における NACC1 過剰発現の生物学的意義を明らかにするとともに、臨床応用戦略として NACC1 の予後予測バイオマーカーあるいは治療標的分子としての妥当性を検証した。

3. 研究の方法

NACC1-HDAC6 系による、がん関連遺伝子の機能に与える生物学的影響の検討：細胞運動能、浸潤・転移能に関連する HDAC6 との直接結合ならびに形質誘導に係る分子機構を、生化学的手法 (IP-western, pull-down assay, scratch assay, Matrigel invasion assay) ならびに細胞生物学的解析 (共焦点レーザー顕微鏡) による解析を行った。標的分子としては、HDAC6 の標的分子である α -チューブリン、cortactin のアセチル化に係る研究を中心に行った。また、HSP90 のアセチル化に係る分子制御とそのクライアント蛋白 ERBB2 (HER2) の発現についても上記の手法を用いて検討した。

NACC1 の翻訳後修飾としては SUMO 化に係る解析を in vitro SUMOylation assay によって行った。

NACC1-HDAC6 間阻害薬のスクリーニングに

は、cherry-NACC1、GFP-HDAC6 の double transfectant を作成し、HCA (High content analysis) システム (In Cell Analyzer 2000, GE) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) HDAC6 との結合とその標的分子の機能に与える影響

NACC1 は HDAC6 の DAC domain と BTB/POZ domain で結合していた (図 1)。NACC1 の発現抑制は、HDAC6 の α -tubulin および cortactin の脱アセチル化作用を抑制し、細胞運動、浸潤能を低下させた (図 2)。これらの形質は、上皮系悪性腫瘍、脳腫瘍、骨肉腫、悪性黒色腫すべてで観察され細胞の浸潤・転移能に大きな影響を与えていることが明らかとなった。中でも悪性黒色腫に於いて focal adhesion kinase の活性および FA の形成、F-actin filament の再構築に影響を及ぼしているとの研究成果は国内外に於いて高く評価されている。悪性黒色腫は、比較的早期から転移が生じ予後不良の疾患である。NACC1 を標的とした新規転移制御法の解析が期待される。

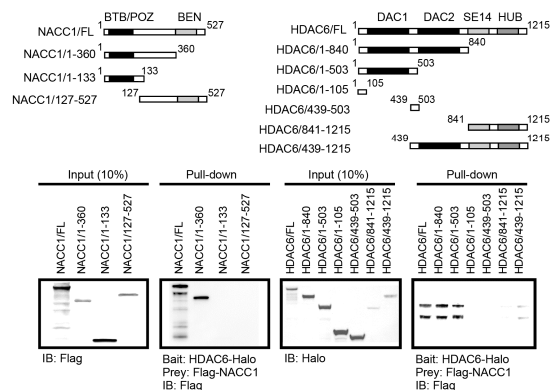


図 1

C

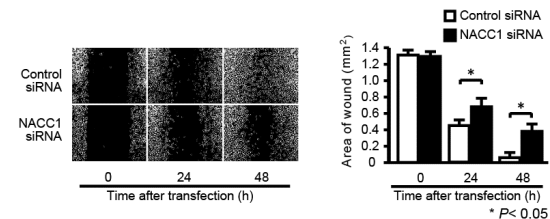


図 2

(2) HSP90 との結合とその標的分子の機能に与える影響

NACC1 は HSP90 と結合し HSP90 の脱アセチル化に関与することで膜状での ERBB2 の発現を安定化させている。NACC1 の発現抑制は、ERBB2 の脱アセチル化を抑制し、プロテアソーム系でのユビキチン化を誘導することに

より、細胞膜状での発現抑制に働いた (図3)。

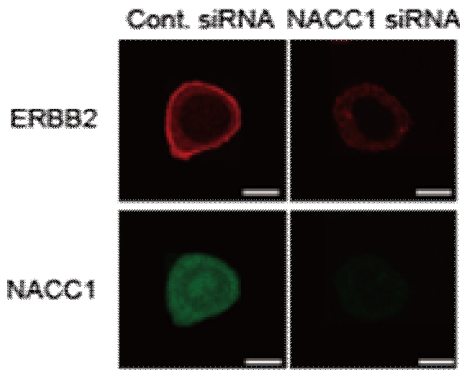


図3 NACC1の発現抑制下で行った、トラスツマブとの併用効果は乳癌の増殖能を抑制した。本研究成果は、乳癌の新たな治療法の開発にNACC1が標的分子となる可能性が示唆された点で新規性がある。

(3) NACC1の翻訳後修飾

NACC1は3カ所のSUMOylation siteの候補の内、K167でSUMO化修飾を受けることが明らかとなった (図4)。

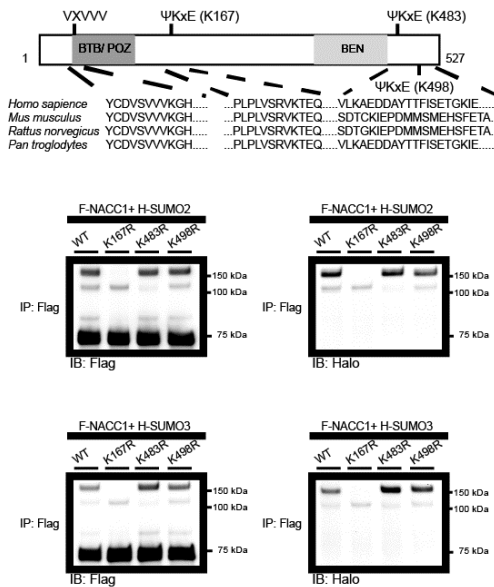


図4 SUMO化修飾を受けたNACC1は核内でPML蛋白と結合し (図5) 細胞の増殖、アポトーシスに影響を与えていた。

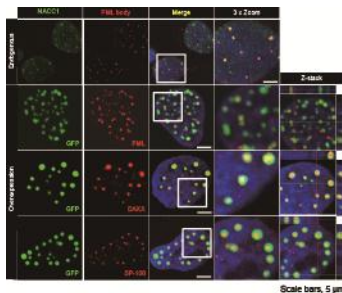


図5

SUMO化修飾はNACC1が核内でdot状の局在を示す最大の原因となっている可能性を示唆しており、locus-specificな遺伝子発現制御機構に関連している可能性が示され今後の研究に期待が持たれるところである。

(4) HCAシステムによる阻害薬のスクリーニング

ケミカルバイオロジー的解析による阻害薬のスクリーニングに係る研究を展開した。結晶化が難しい蛋白質であり、x-ray構造解析はできなかった。HCAによるスクリーニングではHDAC6の阻害薬として知られるtuabcinに比較してtubulinの脱アセチル化能の高い分子を2分子スクリーニングできた。今後、この分子の薬理効果、誘導体等の作成を行い、新規抗がん薬の開発につなげる研究を展開したい。

(5) バイオマーカーとしての妥当性の検証

各種悪性腫瘍に於いて免疫染色によるNACC1の過剰発現の予後予測マーカーとしての妥当性を検証した。悪性黒色腫、肝癌において再発、転移、予後との関連を認めその有効性が示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計6件)

- ① Nakayama I, Shibasaki M, Yashima-Abo A, Miura F, Sugiyama T, Masuda T, Maesawa C. Loss of HOXD10 expression induced by upregulation of miR-10b accelerates the migration and invasion activities of ovarian cancer cells. *Int J Oncol*. 2013;43(1):63-71. Doi: 10.3892/ijo.2013.1935. (査読有り)
- ② Ishida K, Nishiduka S, Chiba T, Ikeda M, Kume K, Endo F, Katagiri H, Matsuo T, Noda H, Iwaya T, Yamada N, Fujiwara H, Takahashi M, Itabashi T, Uesugi N, Maesawa C, Tamura G, Sugai T, Otsuka K, Koeda K, Wakabayashi G. Molecular marker identification for relapse prediction in 5-FU-based adjuvant chemotherapy in gastric and colorectal cancers. *PLoS One*. 2012;7(8):e43236. Doi:10.1371/journal.pone.0043236. (査読有り)
- ③ Kanno K, Kanno S, Nitta H, Uesugi N, Sugai T, Masuda T, Wakabayashi G, Maesawa C. Overexpression of histone

deacetylase 6 contributes to accelerated migration and invasion activity of hepatocellular carcinoma cells. *Oncol Rep.* 2012 28(3):867-73. Doi: 10.3892/or.2012.1898. (査読有り)

④ Yasuhira S, Saito T, Maesawa C, Masuda T. Sensor and effector kinases in DNA damage checkpoint regulate capacity for homologous recombination repair of fission yeast in G2 phase. *DNA Repair (Amst)*. 2012;11(8):666-75. Doi:10.1016/j.dnarep.2012.05.006. (査読有り)

⑤ Ishikawa Y, Tsunoda K, Shibazaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. Downregulation of cylindromatosis gene, CYLD, confers a growth advantage on malignant melanoma cells while negatively regulating their migration activity. *Int J Oncol*. 2012 41(1):53-60. Doi: 10.3892/ijo.2012.1424. (査読有り)

⑥ Tsunoda K, Oikawa H, Tada H, Tatemichi Y, Muraoka S, Miura S, Shibazaki M, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. Nucleus accumbens-associated 1 contributes to cortactin deacetylation and augments the migration of melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 2011 131(8):1710-9. Doi:10.1038/jid.2011.110. (査読有り)

[学会発表] (計3件)

① 前沢 千早, 多田 広志, 角田 加奈子, 柴崎 晶彦, 安平 進士, 及川 弘樹, 菅野 公德, 石川 雄一, 増田 友之. NACCI/HDAC6 脱アセチル化機構はアクチンおよび微小間依存性の腫瘍細胞の運動能に影響を与える (NACCI/HDAC6 deacetylation system accelerates tumor cell migration via an actin- and microtubule-dependent process) (英語). 第70回日本癌学会総会記事, 2011/10/3~5, 名古屋.

② 前沢 千早, 舘道 芳徳, 及川 浩樹, 増田 友之. NACCI 蛋白質の SUMO 化は PML nuclear body への取り込みに関連している (NACCI recruitment within the PML nuclear body is mediated by covalent and non-covalent binding through SUMO modification) (英語). 第 69 日本癌学会総会記事, 2010/9/22~24, 大阪.

③ 前沢 千早, 舘道 芳徳, 及川 浩樹, 小谷 康慈, 増田 友之. 転写因子 NACCI(nucleus accumbens associated 1) の SUMO 化修飾とその生物学的意義に関する検討. 第 99 回日本病理学会, 2010/4/27~29, 東京.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等: <http://miast.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前沢 千早 (MAESAWA CHIHAYA)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 10326647

(2) 研究分担者

西塚 哲 (NISHIDUKA SATOSHI)
岩手医科大学・医学部・講師
研究者番号: 50453311

若林 剛 (WAKABAYASI GO)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50175064

野中 孝昌 (NONAKA TAKAMASA)
岩手医科大学・薬学部・教授
研究者番号: 30242457