

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 30日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23701061

研究課題名（和文） NDRG2に着目した癌におけるPI3K/Aktシグナル伝達異常の解明

研究課題名（英文） NDRG2 inactivation and PI3K/Akt pathway activation in cancers

研究代表者

中畑 新吾（NAKAHATA SHINGO）

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：80437938

研究成果の概要（和文）：本研究で広範な固形腫瘍でPTENのリン酸化異常が起こっていること、さらにNDRG2の発現回復でPTENのリン酸化、PI3K/Aktの活性化を抑制することが示された。さらに、NDRG2が腫瘍抑制因子として働くことを初めて証明した。これらの研究成果は、PTENのリン酸化/脱リン酸化を標的にした新薬の開発に結びつけられる可能性がある新しい知見である。

研究成果の概要（英文）：This study showed that PTEN is highly phosphorylated in a variety of cancers and restoring expression of NDRG2 suppresses phosphorylation of PTEN and Akt. We also demonstrate for the first time that NDRG2 acts as a tumor suppressor. These results could contribute to the development of new drug targeting PTEN phosphorylation and dephosphorylation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：NDRG2, PTEN, PI3K/Akt, がん

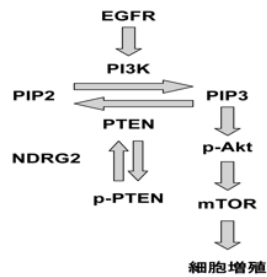
1. 研究開始当初の背景

我々はこれまでに成人T細胞白血病(ATL)発症機構を解明するため、ATLの統合的ゲノム解析を行い、高頻度で起こる染色体切断点領域として10p11、14q11を同定した(Hidaka, Nakahata et al. Blood 2008)。10p11からはTCF8遺伝子を単離し、この遺伝子がATL細胞でゲノム・エピジェネティック異常により転写が低下しており、TGF-beta情報伝達経路の異常に関与していることを明らかにした(Nakahata et al. Oncogene 2010)。次に14q11領域の染色体切断点集中領域のゲノム・遺伝子発現解析によりATLで特異的に発現低下する遺伝子としてNDRG2を単離した。ATLでは

PI3K/Akt情報伝達系が恒常的に活性化しているが、PTENタンパク質は正常リンパ球と同レベルの発現があり、また点突然変異はみつかっていない。NDRG2を異所的に発現させると細胞増殖は抑制され、PI3K/Aktシグナル経路の不活性化が起こることを見出した。また、PTENタンパク質は高率にリン酸化されており、NDRG2発現はPTENの脱リン酸化を介したPI3K/Akt経路の活性化の抑制を引き起こすことを示唆した。

我々はまた口腔がんにおいて、NDRG2はプロモーターメチル化により高頻度に転写が低下しており、PI3K/Akt活性化とNDRG2発現低下に正の相関関係があることを同定した

(Furuta, Nakahata et al. BBRC 2010)。本研究は、ゲノム・エピゲノム異常を伴わない PTEN 不活化機構の一つとして、PTEN リン酸化修飾による発癌機構を提唱し、その仮説を証明することを目的とする。



2. 研究の目的

本研究は様々ながんでみられる PI3K/Akt 活性化機構における NDRG2 の関与性を検証し、NDRG2 の不活化による PTEN リン酸化異常ががん共通した PI3K/Akt 経路活性化の要因であることを明らかにし、新規がん治療法を開発するための基盤を確立する。本研究計画では、

- (1) 各種がん細胞における NDRG2、リン酸化 PTEN、PI3K/Akt 活性化の関連性の検討、
- (2) 様々ながん細胞での NDRG2 発現回復による抗腫瘍効果の検討、
- (3) NDRG2 欠損マウスを用いた発がんにおける NDRG2 の役割の解明、を行う。

3. 研究の方法

- (1) NDRG2 に着目した各種がん細胞における PI3K/Akt シグナル経路異常の解析
 - ① 各種がん細胞株、患者検体を用いたリン酸化 Akt、リン酸化 PTEN、PTEN、NDRG2 タンパク質の発現解析 様々ながん細胞株を用いて NDRG2 発現量、リン酸化 PTEN、リン酸化 Akt (PI3K/Akt の活性化) のレベルをウェスタンブロットにより解析し、これら発現レベルの比較検討を行う。NDRG2 及び PTEN の遺伝子変異の解析も行い、NDRG2 の発現低下によりリン酸化 PTEN、PI3K/Akt が亢進しているがん細胞がどの程度あるのかを検証する。患者検体においても同様のタンパク発現、遺伝子変異の解析を行う。
 - ② 固形腫瘍で NDRG2 ががん抑制遺伝子として機能するかを検証する。NDRG2 の発現が低く、リン酸化 PTEN、リン酸化 Akt が亢進している細胞株を用いて NDRG2 発現ベクターの導入実験を行う。NDRG2 安定発現株を作製し、NDRG2 の発現を上昇させることにより脱リン酸化型の PTEN の量が増えるのか、Akt のリン酸化が減少するのかを検討する。また、この安定発現株を用いて、NDRG2 を発現するがん細胞株は対照のがん細胞株と比較して細胞増殖が遅くなっているか、低酸素状態や無血清などのストレスをかけた条件下でアポトーシスが起りやすくなるのかを検討し、NDRG2

のがん抑制遺伝子としての作用を明らかにする。

- ③ NDRG2 による PTEN リン酸化、PI3K/Akt の活性化の抑制機構の解明 NDRG2 結合タンパク質の解析から、PTEN と NDRG2 は結合することが明らかになった。そこで、NDRG2 にはホスファターゼ活性があるか、またはどのような分子が関与するかを、種々の試験管内ホスファターゼアッセイ、タンパク質結合実験などにより明らかにする。
- (2) NDRG2 ががんの責任遺伝子であることを NDRG2 欠損マウスを用いて検証する。NDRG2 遺伝子をノックアウトしたマウスは腫瘍がどのくらいの頻度で発生するか、どの組織がそのターゲットになるか、さらには既知のがん関連遺伝子との二重変異はがん発症を加速させるかなどを調べ、NDRG2 遺伝子の異常が *in vivo* で発がんに結びついているかを検討する。

4. 研究成果

- (1) 各種固形がん由来のがん細胞を用いてリン酸化 Akt、リン酸化 PTEN、PTEN、NDRG2 の網羅的発現解析、NDRG2、PTEN の遺伝子変異解析を行い、NDRG2 発現低下と PTEN のリン酸化レベル、並びに PI3K/Akt 活性化との関連を明らかにする。膵臓癌 (KLM1, PK45P)、口腔癌 (SAS, HSC3)、肝臓癌 (HepG2, Huh7)、乳癌 (SKBR3)、胃癌 (KATOIII)、大腸癌 (COLO205)、卵巣癌 (SKOV3)、子宮頸癌 (HeLa) 細胞株を用いたウェスタンブロット解析で HepG2 を除いた全ての細胞株において NDRG2 の発現低下に伴い、活性を負に制御する PTENS380/T382/T383 のリン酸化の亢進、並びに Akt の活性化の指標である AKTS473 のリン酸化の上昇が認められた。また、これらの細胞株における NDRG2、PTEN の遺伝子変異について検討したところ、PTEN の変異は認められず、また NDRG2 の変異が口腔がん細胞株 1 例においてのみ認められた (A336S)。更に、膵臓がん患者 10 症例の解析で、PTEN の遺伝子変異は検出されなかったことから、ATL を含む多くのがんにおいて PTEN の恒常的リン酸化は PTEN の不活性化、更には PI3K/Akt の活性化に関連性があることが示唆された。
- (2) NDRG2 低発現、高リン酸化 PTEN、高リン酸化 Akt を示す癌細胞株に NDRG2 を強制発現させることで、PI3K/Akt の不活性化、細胞増殖抑制が起こるかを検討し、各種がん細胞での PI3K/Akt 活性化が NDRG2 に依存しているかを明らかにする。口腔癌 (SAS)、子宮頸癌 (HeLa) の細

胞株を用いて NDRG2 安定発現株を樹立し PI3K/AKT 系の活性化について検討した。その結果、双方の NDRG2 発現株において PTEN 並びに Akt リン酸化の顕著な減少が認められた。

- (3) NDRG2 発現低下による PTEN リン酸化、PI3K/Akt の活性化の分子機構を明らかにする。大腸菌で作製した NDRG2 組換えタンパク質、293T 細胞で過剰発現させ精製した NDRG2 タンパク質を用いて、PNPP、PTEN リン酸化ペプチドを基質に試験管内脱リン酸化実験を行った。その結果、試験したどの条件下においても NDRG2 の脱リン酸化活性を認めることができなかった。そこで、哺乳動物細胞の大部分の脱リン酸化を担うとして知られる PPI 及び PP2A に対する阻害剤オカダ酸で検討した。同様の試験管内脱リン酸化実験で、オカダ酸は ATL 細胞抽出液に存在する PTEN リン酸化ペプチドに対する脱リン酸化活性を有意に抑制した。また、ATL 細胞株をオカダ酸で処理したところ、NDRG2 導入による PTEN リン酸化の抑制が著しく緩和された。次に、PTEN リン酸化を制御する脱リン酸化酵素を同定するために、293T 細胞で PP1/PP2A ファミリー分子を過剰発現させ精製した後、PTEN リン酸化ペプチドを用いた脱リン酸化実験を行った。その結果、PP2A が特異的に PTEN を脱リン酸化することが分かった。リコンビナント PP2A と ATL 細胞より精製したリン酸化型 PTEN を用いた脱リン酸化実験により、PP2A は PTEN の C 末端部位を特異的に脱リン酸化することがわかり、PP2A が PTEN の脱リン酸化酵素であると考えられた。NDRG2 の機能を検討するために免疫共沈降実験を行ったところ、NDRG2 は PP2A と結合することが分かった。PP2A は直接 PTEN に結合しないことから、NDRG2 は PP2A との結合を介して、PP2A を PTEN にリクルートすることにより C 末端部の脱リン酸化を促進すると考えられた。従って、NDRG2 の発現が低下するがん細胞では、PP2A が PTEN にリクルートされない状態になり、恒常的な PTEN のリン酸化が起こり、Akt の活性化を導いているものと思われる。
- (4) 発がんにおける NDRG2 の役割を検討するために NDRG2 欠損マウスの解析を行い、発がんや発達異常などが生じるかを調べる。ターゲティングベクターとして第 2 エクソンを loxP ではさみ、PGK-neo につなげたものを作成し、エレクトロポレーション法により ES 細胞に導入、キメラマウスを得た。C57BL/6 マウスへのバッククロスを行い、ヘテロ欠損マウス

を作製した後、ヘテロマウス同士をかけ合わせ、ホモマウスを得た。ホモマウスはメンデルの法則に従って出生し、体重や体長は野生型と変わらず、また外見上の異常もなく成長した。しかし、ヘテロ、ホモマウスは生存期間が有意に短縮した。部検により、これらのマウスで高頻度に癌が発症していることが分かった。癌の種類は肺や肝臓など多岐にわたり、また半数以上のマウスでリンパ腫を合併していた。浸潤性も高く、表面マーカーの解析から、CD3 陽性 T リンパ腫であることが判明した。癌発生と PI3K/AKT 経路の活性化の関連を検討するため、腫瘍を発症する前の臓器を摘出し、ウェスタンブロット解析を行ったところ、大半の臓器で、PTEN 末端リン酸化の上昇、Akt の高度なリン酸化がみられた。さらに、マウス胎児繊維芽細胞 (MEF) を単離し、細胞増殖能について解析したところ、PI3K シグナルの上昇に伴い、細胞増殖が促進された。以上のことから、NDRG2 の発現低下は PTEN リン酸化異常、Akt の持続的活性化を導き、癌発生に関わることが示唆された。以上の結果は、癌、特に PTEN などの遺伝子変異を持たない癌における PI3K/Akt 異常活性化に NDRG2 の発現低下が関わることを示唆した。PI3K/Akt 経路の分子標的治療薬は mTOR 阻害剤などいくつか開発され、臨床試験に進んでいるが、PTEN リン酸化もまた有望な標的であることが示唆された。従って、そのキナーゼの同定が、PI3K/Akt 経路の分子標的療法を開発する上において重要であると考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 中畑新吾 ATL における NDRG2 発現低下は PTEN 不活性化に伴う恒常的な PI3K 情報伝達系活性化を導く。第 5 回 HTLV-1 研究会 2012 年 08 月 25 日～2012 年 08 月 26 日 東京大学医科学研究所
- ② 中畑新吾 NDRG2, a novel regulator of phosphorylation of PTEN at S380/T382/T383, works as a tumor suppressor. 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 09 月 19 日～2012 年 09 月 21 日 札幌市教育文化会館
- ③ 中畑新吾 NDRG2, a novel regulator of phosphorylation of PTEN at S380/T382/T383, works as a tumor

suppressor. 第74回日本血液学会学術集会 2012年10月19日～2012年10月21日 国立京都国際会館

- ④ 中畑新吾 ATLにおけるNDRG2発現低下はPTEN不活性化に伴う恒常的なPI3K情報伝達系活性化を導く。第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11日～2012年12月14日 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
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://biochem.med.miyazaki-u.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中畑 新吾 (NAKAHATA SHINGO)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号：80437938