

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：81303
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2012～2015
課題番号：24300326
研究課題名(和文) ESCRT小胞輸送系による発がん制御の解明

研究課題名(英文) Roles of ESCRT in Oncogenesis

研究代表者

田中 伸幸 (TANAKA, NOBUYUKI)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん先進治療開発研究部・部長

研究者番号：60280872

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000円

研究成果の概要(和文)：小胞輸送は癌の発生に密接に関連するが、生物学的意義は不明の点が多い。ユビキチン依存性小胞輸送系ESCRTによる発がん、細胞悪性化、細胞死制御について解析した。遺伝子改変細胞マウスを用い解析を行った結果、1)ESCRT-0およびESCRT-IIはEGFR受容体分解に重要である、2)ESCRT-0およびESCRT-IIIに結合性脱ユビキチン化酵素AMSH-LPは発癌を誘導する可能性が高い、3)ESCRT-0は神経系の発がんに関与しないが、ネクロプトーシスおよびアポトーシスという2つの細胞死メカニズムを負に制御することを見いだした。ESCRTは発がんおよび細胞死を制御することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Vesicular transport is tightly related with oncogenesis, malignant transformation and cell death. In the present study, we analyzed roles of ESCRT in vitro and in vivo. First, we found that ESCRT-0 and ESCRT-II both regulate EGFR degradation. Second, AMSH-LP, a deubiquitination enzyme associated with ESCRT-0 and ESCRT-III, may be involved in oncogenesis, and AMSH-LP knockout mice manifested shorter life span. Third, ESCRT-0 defect did not induce tumor formation, but cells defective for ESCRT-0 showed enhanced necroptosis and apoptosis, partly through the enhanced ER stress. Together, this study showed a pertinent role of ESCRT in cellular growth and death.

研究分野：腫瘍学

キーワード：ESCRT 増殖因子受容体

1. 研究開始当初の背景

(1)生体内では、タンパク質を的確に生産し輸送・分解する小胞輸送により、タンパクが適正な細胞内分画に最適で配置されている。酵母を始めとする生物種において、小胞輸送系は遺伝学的に解析されており、輸送の異常により細胞内小胞の形態異常や受容体タンパク過剰が誘導される。ヒトやマウスのような哺乳類においても、小胞輸送の異常が発癌や細胞死に関連すると予想されてきた。しかしながら、病態モデルの作成が困難であることから、具体的な関係は殆ど知られていなかった。

(2)ユビキチン化によってタンパクを認識し輸送する ESCRT 系 (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) の哺乳類における分子同定を行い、その生物学的な役割を解析してきた。当初の解析では ESCRT 分子 STAM1, STAM2 および Hrs の欠損によって原腸陥入などの発生・分化異常がおこることが明らかとなった。一方、癌関連受容体の輸送・分解異常を求めて検索してところ、EGFR 分解過程において ESCRT が重要な役割を果たしており、小胞輸送によって輸送のみならず分解が制御されることが明らかとなった。しかしながら、以上のような細胞株主体の解析には限界があり、生体としての炎症、シグナル異常、アポトーシス異常などの結果としての悪性化や発癌との関連は十分な解明がなされていない。

2. 研究の目的

(1) ESCRT を中心とした輸送分解系を対象とし、癌の発生と悪性化に密接に関連する小胞輸送の役割を解析する。ユビキチン依存性小胞輸送系を中心とする輸送系に関する生物学的意義と分子機構の解明に取り組み、発がんにおける意義を明らかにする。

(2) 遺伝子改変マウスを用いた解析によって ESCRT による受容体制御の異常が炎症、細胞死、発癌・悪性化を誘導するかについて検討する。一方、細胞株を用いた検討により、炎症やオートファジーに異常を来し悪性化を誘導するか調べる。炎症の誘導・遷延化によって細胞死誘導や発がんに導くかについてその機序を解明する。これらのアプローチにより、ESCRT 輸送系を介した発がんや悪性化形質制御を明らかにする。発がんに関連する輸送関連遺伝子を同定することにより、新規癌治療・予防法開発のための基盤となるデータを収集することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ESCRT 欠損マウスを用いた発癌モデルの解析：発癌と悪性化における小胞輸送系 ESCRT の意義を明らかにするため、マウス発癌モデルを用いて発がんや生存率等の解析を行う。Hrs, Vps37, AMSH-LP 欠損マウスを用いる。

(2) 神経腫瘍に関する ESCRT の役割の解析：神経系特異的 Cre を用いて ESCRT が神経系に与える影響を解析する。さらに、各種抗体および阻害薬を用いて細胞死の誘導メカニズムを明らかにする。

(3) ESCRT-I による増殖因子制御について CRISPR/Cas9 システムを用いたノックアウト細胞と条件付き欠損マウスを用いた解析を行う。

(4) 薬剤耐性腫瘍における小胞輸送を調べるため、EGFR-TKI (Afatinib) と EGFR 抗体 (Cetuximab) による併用療法に関する細胞生物学的解析を行う。

4. 研究成果

(1) ESCRT-0 欠損による悪性化解析のため、ESCRT-0 分子 Hrs に着目し、条件付き Hrs 欠損マウス (Hrs-flox) の解析を行った。肺特異的に Cre リコンビナーゼを誘導し、発がんに対する影響を検討した。LoxP-Cre-LoxP (LCL) システムによる特異的 K-Ras 発現モデルを用い、気道・肺特異的な Hrs 欠損のため Hrs-flox:LSL-KrasG12D:SPC-TetOTg:rTT ATg を得るために多数の交配を試みた。これまで 4 遺伝子をすべて持つマウスを得られていない。この原因として同じ染色体に載った遺伝子があるためと思われる。一方、Hrs を肺特異的に欠損させたマウスは正常に産まれたことから、肺の発生においては必要ではないと考えられた。

(2) 神経腫瘍形成における ESCRT-0 の機能解析のため CAMKII α -Cre: Hrs-flox を作成したが、観察期間において発癌した個体はなかった。脳腫瘍の自然発症には関与しないものと考えられた。一方、マウス個体には神経変性が認められた。脳神経細胞内に異常蛋白が蓄積し運動機能低下および寿命短縮が認められた。この原因を探索した結果、Hrs の欠損は小胞体ストレスと JNK ストレスキナーゼによるアポトーシスとネクロプトーシスという 2 種類の細胞死メカニズムを活性化することがわかった。さらに Hrs 欠損細胞ではオートファジーによる異常タンパク質分解が停滞していることを発見した。細胞死の抑制は、多くのがん細胞においても重要な役割を果たしていることが知られており、上記所見は発がんや悪性化と密接な関係があると考えられる。

(3) ESCRT-I による増殖因子受容体制御について解析を行った。CRISPR/Cas9 法によって VPS37 欠損細胞を複数樹立することに成功した。EGFR 刺激後の受容体分解を解析したところ、欠損細胞では大きな遅延が認められた。VPS37 欠損細胞では EGFR シグナルの遷延化が認められたため、EGFR シグナルの過剰が惹起されることが期待されたため、ESCRT-I 欠損

マウスを作成した。条件付き VPS37 欠損マウスの樹立に成功し、肺特異的 Cre マウスと交配した。得られた CCSP-CreER:Vps37-flox マウスは、これまでの解析では肺初期発生には大きな異常はない。肺癌の自然発症については生後短時間での発症は認めない。今後さらに観察期間を延長することが必要である。

(4)ESCRT-0 および ESCRT-III に結合する脱ユビキチン化酵素である AMSH および AMSH-LP について発がんとの関係を解析した。いずれも乳がん易発症系統である BALB/c バックグラウンドに戻し交配した。長期観察モデルでは、AMSH-LP ヘテロおよびホモマウスの生存率が低く、乳がんの自然発症率が高い傾向があった。P53^{+/-}:AMSH-LP マウスにおいても発がん起因する生存期間短縮が認められた。AMSH-LP の特異的標的蛋白については不明であるが、同遺伝子が癌抑制遺伝子である可能性が示唆された。

(5)リサイクリング小胞に関する解析として細胞内輸送と腫瘍細胞の薬剤耐性を解析した。EGFR に対するチロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) の薬剤耐性において、小胞輸送のうちリサイクリング小胞と呼ばれる特殊小胞が重要は働きをしていることを明らかにした。第2世代 EGFR-TKI に対して効果不十分な EGFR 変異体においては、ESCRT ではなく Rab11 依存性のリサイクリングが活性化することを突き止めた。この事実をもとに抗 EGFR 抗体を同時併用したところ、耐性細胞に対する併用療法の有効性が *in vitro* 解析で有効であった。薬剤耐性変異を有する EGFR 陽性の肺癌では小胞輸送が停滞し細胞内小胞に EGFR が貯留しているが、EGFR-TKI はリサイクリングを活性化することにより EGFR 細胞膜上への輸送を誘導することが明らかとなった。今後の併用療法に対し示唆的な知見であると考えられた。

(6)下咽頭癌の癌幹細胞マーカーとして CD271 を同定した。CD271 は細胞表面の NGF 増殖因子受容体であることから、細胞内輸送による制御が存在すると想定されたため、タンデムタグ法を用いた CD271 輸送制御因子の精製を行った。TOF-MS 解析によって、VPS35 断片を同定することに成功した。VPS35 は Rab7 および CD271 とともにエンドソームに存在した。VPS35 はレトロマー複合体構成分子であるため、CD271 はレトロマーで輸送され発現制御をうけることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Oshima, R., Hasegawa, T. Tamai, K. Sugeno, N. Yoshida S., Kobayashi, J. Kikuchi, A. Baba, T. Futatsugi, A. Sato, I. Satoh, K. Takeda, A. Aoki, M. Tanaka N.

ESCRT-0 dysfunction compromises autophagic degradation of protein aggregates and facilitates ER stress-mediated neurodegeneration via apoptotic and necroptotic pathways Scientific Reports 査読有,2016, 6, 24997 DOI:10.1038/srep24997

Mizuguchi M, Sasaki Y, Hara T, Higuchi M, Tanaka Y, Funato N, Tanaka N, Fujii M, Nakamura M. Induction of Cell Death in Growing Human T-Cells and Cell Survival in Resting Cells in Response to the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax. PLoS One. 査読有, 2016,11(2):e0148217.

DOI: 10.1371/journal.pone.0148217

Kojima, K., Amano, Y., Yoshino, K., Tanaka, N., Sugamura, K., Takeshita, T. ESCRT-0 protein hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate (Hrs) is targeted to endosomes independently of signal-transducing adaptor molecule (STAM) and the complex formation with STAM promotes its endosomal dissociation. J Biol Chem. 査読有,2014,289, 33296-33310.

DOI: 10.1074/jbc.M114.578245

Sugeno, N., Hasegawa, T., Tanaka, N., Fukuda, M., Wakabayashi, K., Oshima, R., Konno, M., Miura, E., Kikuchi, A., Baba, T., Anan, T., Nakao, M., Geisler, S., Aoki, M., Takeda, A. Lys-63-linked ubiquitination by E3 ubiquitin ligase Nedd4-1 facilitates endosomal sequestration of internalized alpha-synuclein. J Biol Chem 289, 査読有, 2014,18137-18151

DOI: 10.1074/jbc.M113.529461

Tamai, K., Nakamura, M., Mizuma, M., Mochizuki, M., Yokoyama, M., Endo, H., Yamaguchi, K., Nakagawa, T., Shiina, M., Unno, M., Muramoto, K., Sato, I., Satoh, K., Sugamura, K., and Tanaka, N. Suppressive expression of CD274 increases tumorigenesis and cancer stem cell phenotypes in cholangiocarcinoma. Cancer Science 105, 査読有,2014,6, 667-674.

DOI: 10.1111/cas.12406

Nagata T, Murata K, Murata R, Sun SL, Saito Y, Yamaga S, Tanaka N, Tamai K, Moriya K, Kasai N, Sugamura K, Ishii N. Hepatocyte growth factor regulated tyrosine kinase substrate in the peripheral development and function of B-cells. Biochem Biophys Res Commun. 2014, 査読有,443:351-356.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.029

Watanuki, Z. Kosai, H., Osanai, N., Ogama, N., Mochizuki, M., Tamai, K., Yamaguchi, K., Satoh, K., Fukuhara, T., Maemondo, M.,

Ichinose, M., Nukiwa, T., Tanaka, N. Synergistic cytotoxicity of afatinib and cetuximab against EGFR T790M involves Rab11-dependent EGFR recycling. Biochem Biophys Res Commun. 455, 査読有, 2014, 269-276.

DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.003

Imai, T.Tamai, K.Oizumi, S.Oyama, K.Yamaguchi, K.Sato, I.Satoh, K.Matsuura, Saijo, S.Sugamura, K.Tanaka, N. CD271 defines a stem cell-like population in hypopharyngeal cancer. PLoS One, 査読有, 2013, 8, e62002.

DOI: 10.1371/journal.pone.0062002

Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, Watanabe M, Sakurada A, Endo C, Uruno A, Sasano H, Nakagawa T, Satoh K, Tanaka, N., Kubo H, Motohashi H, Yamamoto M. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. Cancer Science. 査読有, 2012, 103, 760-766. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2012.02216.x

Tamai K, Shiina M, Tanaka N, Nakano T, Yamamoto A, Kondo Y, Kakazu E, Inoue J, Fukushima K, Sano K, Ueno Y, Shimosegawa T, Sugamura K. Regulation of hepatitis C virus secretion by the Hrs-dependent exosomal pathway. Virology 査読有, 2012, 422, 377-385.

DOI: 10.1016/j.virol.2011.11.009.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

〔学会発表〕(計5件)

Funaki, Tanaka, N. The molecular insights into degradation of ErbB3. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌市、2012.9.20.

Tanaka, N. PDX model for Head and Neck Cancer reveals CD271-positive cancer stem cells. 第73回日本癌学会学術総会. 横浜市、2014.9.27.

Mochizuki, M, Tamai, K and Tanaka, N. CD271 plays critical roles in invading cancer cells in hypopharyngeal carcinoma. 第73回日本癌学会学術総会. 横浜市 2014.9.27. 2014.9.24-27.

ホームページ等

Tamai, K. Mochizuki, M. and Tanaka, N. BEX2 plays critical roles for maintaining dormant cancer stem cells. 第73回日本癌学会学術総会. 横浜市、2014.9.24-27.

望月麻衣、今井隆之、山口壹範、田中伸幸ほか. 下咽頭がん細胞マーカーCD271の同定. 日本細菌学会東北支部会、仙台市、2014.8.22.

Tanaka, N.ほか. Combining afatinib and Cetuximab synergistically increases their cytotoxicity for EGFR T790M-harboring cells. AACR2014. 米国カリフォルニア州サンディエゴ市、2014.4.5-9.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 伸幸 (TANAKA, Nobuyuki)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・部長

研究者番号：60280872

(2) 研究分担者

小鎌 直子 (OGAMA, Naoko)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん先進治療開発研究部・主任研究員

研究者番号：30390892

玉井 恵一 (TAMAI, Keiichi)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・がん幹細胞研究部・上席主任研究員

研究者番号：40509262

山口 壹範 (Yamaguchi, Kazunori)

地方独立法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター (研究所)・発がん研究部・上席主任研究員

研究者番号：80373215