

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430113

研究課題名(和文) 癌におけるPTENリン酸化異常の分子機構とその役割の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism involved in dysregulation of PTEN phosphorylation and its physiological role 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：NDRG2はATLを含む癌において発現低下し、PTENの抑制的なリン酸化(STT)亢進を介してPI3K/AKT経路の活性化に関わる。NDRG2は、PTENリン酸化を介して新規のPI3K経路の負のフィードバック制御因子として働く事を見出し、PI3K-SGK1-NDRG2経路がPI3K経路の活性化制御に重要である事を見出した。PTEN-STTをリン酸化するキナーゼ候補としてSCYL2を同定し、SCYL2の発現上昇がPTEN-STTリン酸化を誘導する事を見出した。ATL細胞におけるNDRG2発現低下は、低酸素環境下で持続的なAKT活性化を保つ事により、細胞増殖や生存に有利に働いている事を示した。

研究成果の概要(英文)：NDRG2 is frequently down-regulated in various type of cancers including ATL. NDRG2 regulates PI3K/AKT pathway by dephosphorylation of PTEN via recruitment of PP2A. In this study, we found that NDRG2 acts as a novel negative feedback regulator in the PI3K/AKT pathway. PI3K-activated SGK1 phosphorylates NDRG2-Ser332 to promote PP2A binding to NDRG2 and dephosphorylation of PTEN, which plays a crucial role in the control of level of AKT activation. In addition, we identified Ser/Thr kinase SCYL2 as a novel PTEN interacting protein that functions in phosphorylation of PTEN-STT. SCYL2 expression is up-regulated in ATL cells and is essential for the enhanced PTEN-STT phosphorylation. As a potential physiological relevance of NDRG2 down-regulation, we demonstrated that NDRG2 inactivation renders ATL cells resistant to growth inhibition under hypoxic condition through sustained AKT activation, which may play a role in ATL development and progression.

研究分野：腫瘍生化学

キーワード：NDRG2 PTEN リン酸化修飾 ATL

1. 研究開始当初の背景

成人 T 細胞白血病(ATL)発症機構の解明を目的として、急性型 ATL 患者由来白血病細胞の統合的ゲノム解析を行い、高頻度染色体切断点集中領域として、10p11, 14q11, 14q32 領域を同定した。14q11 領域の網羅的遺伝子発現解析より、ATL 細胞で発現低下する遺伝子として、NDRG2 を同定した。ATL において NDRG2 遺伝子は、ゲノム及びエピジェネティック異常により発現低下しており、PI3K/AKT シグナル経路の恒常的な活性化をもたらす事を明らかにした。NDRG2 は PTEN に結合し、PP2A をリクルートすることで、PTEN-STT の脱リン酸化を促進し、PI3K/AKT 経路を抑制する。ATL 細胞における NDRG2 発現低下は、PTEN-STT のリン酸化を亢進させ、恒常的な AKT 活性化を誘導することが分かり、さらに NDRG2 欠損マウスは、T リンパ腫を含む様々な癌を発症することを見出し、NDRG2 の癌抑制遺伝子としての機能を初めて証明した (Nature Commun 2014)。NDRG2 は ATL のみならず様々な癌においてプロモーターメチル化により発現低下しており、PI3K/AKT 活性化の要因の一つとしてなる事が示唆され、PTEN-STT リン酸化が新規の PI3K 阻害薬の候補となる事が推測される。PTEN-STT をリン酸化するキナーゼとして、CK2 等いくつかのタンパク質が同定されているものの、ATL や他の癌における PTEN-STT リン酸化制御の詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、PI3K/AKT 経路における PTEN-STT リン酸化及び脱リン酸化の分子機構の全容を明らかにし、さらに白血病・癌発症における NDRG2 発現低下による PTEN リン酸化の制御異常の生理的役割を解明することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究は、ATL を含む癌における PTEN リン酸化異常の分子機構およびその役割の全容を解明し、PI3K/AKT 経路を標的にした新たな分子標的薬の開発に繋げる事を目的に、1) NDRG2 による PTEN 脱リン酸化制御の分子機構を解明する事、2) PTEN リン酸化を担うキナーゼを同定し、その制御機構および癌におけるその異常の分子機構を明らかにする、3) 癌の分子病態における NDRG2 発現低下による PTEN リン酸化異常の生理的役割を明らかにする。

ATL 細胞および様々な癌細胞を用いた解析により、プロモーターメチル化等による NDRG2 遺伝子の発現低下は、PTEN Ser380/Thr382/Thr383(STT) のリン酸化亢進を介して、恒常的な PI3K/AKT シグナル経路の活性化を誘導し、癌細胞の増殖や生存を促進する事を明らかにした。NDRG2 は新規の PTEN 結合タンパク質であり、PP2A ホスファターゼを PTEN にリクルートする事で、PTEN の抑制的なリン酸化となる STT の脱リン酸化を促進し、PI3K/AKT 経路の活性化を抑制する負の制御因子として機能する。正常細胞では、

PI3K/AKT 経路は細胞増殖、代謝、血管新生等、多岐にわたる細胞プロセスを制御している。NDRG2 による PTEN リン酸化を介した PI3K/AKT 経路の制御がどのような局面において機能しているのか、その機能的な意義の解明は、NDRG2 発現低下が関わる癌の分子病態を解明する上で重要と考えられる。NDRG2 は AKT や SGK 等の AGC ファミリーキナーゼによりリン酸化される事が報告されており、これらはいずれも PI3K の下流で働くシグナル分子であることから、NDRG2 のリン酸化修飾が PI3K 経路の負のフィードバック機構として働く可能性もまた推測される。

PI3K/AKT 経路は、様々の癌細胞で活性化しており、癌細胞の生存や増殖に重要な役割を果たしている。PI3K 経路に対する阻害剤は癌の治療薬として、乳癌等、いくつかの癌で臨床試験が進められている。ATL 細胞やその他の癌細胞における NDRG2 発現は、PTEN-STT リン酸化の低下をもたらす PI3K/AKT 経路の活性化の抑制および細胞増殖を抑制することから、PTEN-STT リン酸化は有望な分子標的となる可能性が示唆される。PTEN-STT をリン酸化するキナーゼを同定する目的で、ATL 細胞抽出液を用いた PTEN 結合タンパク質の網羅的解析を行い、セリン・トレオニンキナーゼ SCYL2 を単離した。SCYL2 は、エンドサイトーシスの被覆小胞形成に関わるクラスリンに結合し、AP2 をリン酸化する事や HIV 感染を抑制的に作用する事が明らかにされている一方で、その機能に関する報告は少ない。そこで、本研究では、PTEN-STT のキナーゼ候補として、SCYL2 に着目し、ATL 細胞における SCYL2 の機能解析を行い、PTEN リン酸化の分子機構を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

細胞株および培養方法

本研究では、HTLV-1 感染 T 細胞株 (HUT102, MT2) ATL 細胞株 (ED, KOB, S04, KK1, Su9T, S1T) および HTLV-1 陰性 T 細胞株として、急性 T リンパ球性白血病細胞株、Jurkat および MOLT4 を用い、癌細胞株として、乳癌細胞株 MCF7, 神経芽細胞株 TGW および SKNSH, 骨肉腫細胞株 U2OS, および正常細胞由来細胞株として、ヒト胎児腎臓由来 293T およびケラチノサイト由来 HaCaT 細胞株を使用した。HTLV-1 感染 T 細胞株、ATL 細胞株、HTLV-1 陰性 T 細胞株は 10%FBS および Penicillin-Streptomycin を含む RPMI1640 培地を使用し、IL2 依存性の細胞株に対しては 500IU/ml の濃度のヒトリコンビナント IL2 添加した。固形癌細胞株および正常細胞由来の接着細胞株に対して、10%FBS、Penicillin-Streptomycin 添加 DMEM または RPMI1640 培地を使用した。細胞培養は、5%CO₂、37 のインキュベーター内で行い、低酸素処理は、低酸素インキュベーターを使用した。

遺伝子導入法

細胞株における一過性の遺伝子発現の目的には、HiLYmax 試薬(Dojindo)を用いたリポフェクション法により遺伝子導入を行った。ATL 細胞株等、トランスフェクション効率に低い細胞株に対して、Amaza nucleofector (Lonza)または Electroporation 法を使用した。また、レトロウイルスを用いて shRNA 導入発現株を樹立した。

遺伝子ベクターの作成

NDRG2 およびその各種変異体、または SCYL2 の発現ベクターとして、3XFLAG 配列をもつ pCMV26 ベクター(Sigma)を用い、shRNA ベクターには、pSIREN-ZsGreen (Clontech)を使用した。安定発現株の作成には、pCMV26 のもつ Neomycin 耐性により薬剤選択し、shRNA 発現株は、GFP 蛍光を用いてセルソーティングを行い、細胞のクローン化を行った。

免疫共沈降実験

細胞をリン酸バッファー(PBS)により洗浄後、タンパク質分解酵素阻害剤カクテルおよび脱リン酸化酵素阻害剤を添加した細胞抽出バッファー(10 mM Tris, pH7.5, 150 mM NaCl, 0.5% TritonX100)により、タンパク質を抽出した。遠心分離後、細胞抽出液に FLAG アフィニティレジン(Sigma)を加え、4℃で一晩インキュベートした。ビーズを細胞抽出バッファーで3回洗浄後、SDS サンプルバッファーを混合し、95℃で5分間煮沸処理を行った。サンプルを SDS-PAGE に供し、PVDF 膜に転写後、5%スキムミルクまたは 1% BSA を含む TBS バッファーを用いてブロッキングを行い、ブロッキングバッファーで希釈した一次抗体を加え 4℃で一晩インキュベートした。TBS により膜を3回洗浄後、二次抗体との反応を室温で2時間行い、TBS で3回洗浄後、EzWestLumi plus 試薬を添加し、RAS3000 システムにて検出した。

4. 研究成果

(研究の主な成果)

NDRG2 による PTEN-Ser380/Thr382/Thr383 のリン酸化を介した PI3K/AKT 活性化制御の生理的役割を明らかにするために、NDRG2 C 末端に存在するセリン・トレオニンリン酸化部位に着目し、どのようなシグナルにより PTEN の脱リン酸化が誘導されるかについて検討した。HTLV-1 感染細胞株 HUT102 における NDRG2 の過剰発現は、PTEN-STT の脱リン酸化を促進し、AKT の活性化および細胞増殖を抑制したのに対して、NDRG2 の C 末端の2つのリン酸化部位のうち(Ser332 および Thr348)、Ser332 をアラニンに置換した NDRG2 変異体では、PTEN-STT および AKT のリン酸化の低下は見られず、また細胞増殖も高く保たれていたことから、NDRG2 Ser332 のリン酸化修飾が PTEN のリン酸化制御に関わることが示唆された。興味深いことに Ser332 のリン酸化は、SGK1 や AKT 等の AGC キナーゼファミ

リーによりリン酸化されることが報告され、これらのキナーゼは PI3K 下流のシグナル伝達分子であり、NDRG2 リン酸化を介した新規の PI3K 経路のネガティブフィードバック機構の可能性が推測される。そこで、これらのキナーゼに対する特異的阻害剤を用いて検討したところ、SGK1 阻害剤 GSK650394 は、HUT102 において NDRG2 発現による PTEN-STT 脱リン酸化および AKT リン酸化低下等の効果を減少させた。これらの現象は、PI3K 阻害剤 LY294002 を用いた場合においても同様に見られ、一方、AKT 阻害剤である MK2206 では見られなかったことから、PI3K 経路のフィードバックループとして、PI3K-SGK1-NDRG2 経路が機能することが示唆された。SGK1 は NDRG2 に結合し、NDRG2 の Ser332 リン酸化修飾により、NDRG2 と PP2A の結合を促進することが明らかとなり、さらに、正常細胞由来の細胞株 HaCaT のインスリン刺激は、NDRG2 Ser332 のリン酸化を上昇させ、それに伴い PTEN-STT リン酸化レベルの低下が見られた。一方で、AKT の活性化レベルに顕著な低下は見られなかったことから、NDRG2 を介した負のフィードバック機構は、PI3K 経路の活性化レベルの調節に働いている事が示唆された。

NDRG2 による PTEN リン酸化制御およびその異常の生理的役割を明らかにするために、NDRG2 は低酸素応答のマスターレギュレーターである HIF1 により転写活性化される事が知られており、また癌の発生や進行過程において低酸素ストレスは重要な役割を果たしていることから、NDRG2 は PI3K/AKT 経路を介して、低酸素応答を制御する可能性について検討した。その結果、正常細胞の低酸素処理は、NDRG2 発現を上昇させ、PTEN-STT リン酸化の低下および AKT 活性化を誘導し、細胞増殖を遅延したのに対して、HTLV-1 感染細胞株 HUT102 や神経芽細胞腫 SK-N-SH や TGW では、NDRG2 遺伝子のプロモーターメチル化により、低酸素においても NDRG2 発現の誘導は起こらず、PTEN-STT および AKT Ser473 のリン酸化は高いレベルに保たれ、また細胞増殖も亢進した状態であった。また、PI3K 経路の下流の標的分子の活性化を調べたところ、AKT と SGK1 は、共に PI3K により活性化を受けた PDK1 により活性化され、基質特異性が類似しているのにも関わらず、GSK3 や S6K のリン酸化は AKT により行われていることが分かり、SGK1 は AKT と異なり、標的分子のリン酸化を介した oncogenic な機能を持たず、NDRG2 のリン酸化を介して、PI3K 経路の負のフィードバック制御に機能することが示唆され、ATL を含む癌細胞における NDRG2 発現低下は、PI3K/AKT の持続的活性化により、正常な低酸素応答に異常を来し、細胞増殖や生存に有利に働いていることが示唆された。正常造血幹細胞において、幹細胞ニッチの低酸素環境および HIF1 が重要な役割を果たしており、造血幹細胞における PTEN の欠損や AKT の異常活性化は、幹細胞を枯渇させる事

が知られている。興味深い事に、NDRG2 発現は造血幹細胞分画で発現亢進しており、低酸素により転写活性化された NDRG2 が PTEN-STT のリン酸化制御を介して、PI3K/AKT 活性化を制御している事が推測される。このことは、白血病幹細胞の制御機構の解明にもつながる事から、今後の重要な課題の一つである。

ATL 細胞において PTEN-STT のリン酸化を担うキナーゼを同定するために、FLAG タグをもつ PTEN を発現する KK1-ATL 細胞株を用いて、PTEN 結合タンパク質を FLAG アフィニティレジンにより精製し、質量分析計を用いて解析を行ったところ、セリン・トレオニンキナーゼ SCYL2 を単離した。ATL 細胞において SCYL2 は高発現しており、KK1 細胞において SCYL2 shRNA により SCYL2 の発現を抑制したところ、PTEN-STT のリン酸化が低下し、AKT の活性化も抑えられた。一方、正常細胞として 293T 細胞における SCYL2 の過剰発現により、PTEN-STT および AKT のリン酸化が亢進したことから、SCYL2 は PTEN-STT のリン酸化に働くことが示唆された。また、上流シグナル経路の解析として、SCYL2 はクラスリンに結合し、エンドサイトーシスの被覆小胞の形成に関わることが知られている事から、クラスリンとの関連について解析したところ、クラスリンの高発現が PTEN-STT のリン酸化誘導に関わっていることが示唆され、一方、KK1 細胞抽出液から SCYL2 タンパク質を精製し、PTEN を基質に *in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、SCYL2 は PTEN をリン酸化することがわかった。しかしながら、その活性はこれまでに PTEN のキナーゼ候補として知られていた CK2 と比較し、弱く、今後の検討課題として考えられる。

(得られた成果の国内外における位置づけとインパクト、今後の展望)

PI3K/AKT 経路は癌細胞の増殖、生存など様々な過程において重要な役割を果たしている。癌細胞における PI3K/AKT 経路の活性化のメカニズムとして、PI3K, PTEN の点突然変異や AKT の増幅等が報告されている。本研究が着目した PTEN リン酸化異常は、多くの癌における新たな PI3K/AKT 経路の活性化の分子機構となるものであり、その全容解明は、癌細胞の分子病態の解明や分子標的薬の開発につながるものと推測される。今回同定した SGK1 による NDRG2 のリン酸化を介した PI3K 経路の負のフィードバック機構は、未だ明らかにされていない PI3K 経路の活性化調節をなすもので、今後、ノックアウトマウスや様々な細胞系を用いた解析により、この調節機構がもつ生体内における機能や重要性が明らかになるものと思われる。そのうちの一つの候補として、本研究では、NDRG2 が低酸素誘導因子 HIF1 により転写活性化されることから、低酸素応答に着目し、癌発症過程における NDRG2 発現低下による PTEN リン酸化異常および AKT 活性化の生理的意義につ

いて検討を行った。NDRG2 は低酸素ストレスに応答して、PI3K/AKT 経路を介して、細胞の増殖、生存を制御する一方で、癌細胞は、NDRG2 の発現低下によりこの低酸素応答が破綻し、細胞増殖抑制を回避しているものと思われる。今後、これらの現象が癌の発症や進行のどのような過程において起こっているか等、詳細な解析を行い、その中で、白血病幹細胞における NDRG2 の機能解明は重要な課題の一つであると思われる。

PTEN 結合タンパク質の網羅的解析から、セリン・トレオニンキナーゼ SCYL2 を同定した。PTEN-STT をリン酸化するキナーゼは CK2 等、いくつかの候補が報告されているものの、細胞内におけるその実体は明らかでない。本研究により、SCYL2 は、ATL 細胞やその他の癌細胞において、PTEN-STT のリン酸化に必須の役割を果たしていることが示唆され、今後より詳細なその分子機構の解析により、新たな PI3K 阻害剤の開発に繋がるものと思われる。ATL の分子標的薬の開発は急務の課題となっており、PTEN リン酸化キナーゼの阻害剤は、ATL 治療薬の開発の有力な候補の一つ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3件)

Ichikawa T, Nakahata S, Tamura T, Manachai N, Morishita K. The loss of NDRG2 expression improves depressive behavior through increased phosphorylation of AKT and GSK3. *Cell Signal*. 2015; 10, 2087-2098. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.07.012. 査読有り

Ichikawa T, Nakahata S, Fujii M, Iha H, Morishita K. Loss of NDRG2 enhanced activation of the NF- κ B pathway by PTEN and NIK phosphorylation for ATL and other cancer development. *Sci Rep*. 2015; 5, 12841. doi: 10.1038/srep12841. 査読有り

*Nakahata S, *Ichikawa T, Maneesaay P, Saito Y, Nagai K, Tamura T, Manachai N, Yamakawa N, Hamasaki M, Kitabayashi I, Arai Y, Kanai Y, Taki T, Abe T, Kiyonari H, Shimoda K, Ohshima K, Horii A, Shima H, Taniwaki M, Yamaguchi R, Morishita K. Loss of NDRG2 expression activates PI3K-AKT signalling via PTEN phosphorylation in ATLL and other cancers. *Nature Commun*. 2014; 5, 3393. doi: 10.1038/ncomms4393. (* co-first authors) 査読有り

〔学会発表〕(計 10 件)

中畑新吾 他、NDRG2 は PI3K シグナル伝達系の負のフィードバック因子として働く 低酸素ストレス抵抗性への関与 第 2 回 HTLV-1 学会学術集会、2015 年 8 月 22 日～23 日、東京大学医科学研究所、東京

中畑新吾 他、Down-regulation of NDRG2 plays an important role in ATLL leukemogenesis via the PTEN-mediated PI3K/AKT signaling pathway. 44th International Society for Experimental Hematology Annual Scientific Meeting、2015 年 9 月 17 日～19 日、京都国際会館、京都

中畑新吾 他、ATL における NDRG2 発現低下による低酸素応答の異常調節 第 77 回日本血液学会学術集会、2015 年 10 月 16 日～18 日、石川県立音楽堂 他、石川

中畑新吾 他、ATL における NDRG2 発現低下による低酸素応答の異常調節 第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会、2015 年 12 月 1 日～4 日、神戸ポートアイランド、神戸

中畑新吾 他、PI3K 活性化は NDRG2 リン酸化を促進させ、PTEN の抑制的リン酸化の解除を誘導する。第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 25 日～27 日、パシフィコ横浜、神奈川

中畑新吾 他、ATL やその他のがんにおける NDRG2 発現低下は PTEN リン酸化異常を来らし、PI3K/AKT 経路を活性化させる。第 76 回日本血液学会学術集会、2014 年 10 月 31 日～11 月 2 日、大阪国際会議場、大阪

中畑新吾 他、PI3K 系のフィードバックループにおける NDRG2 Ser332 のリン酸化は、PTEN 脱リン酸化を誘導する PP2A リクルートメントに必須である。第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日～27 日、パシフィコ横浜、神奈川

中畑新吾 他、NDRG2 plays a pivotal role in ATLL leukaemogenesis by regulating the PTEN-mediated PI3K/AKT signalling pathway. 16th International Conference on Human Retrovirology: HTLV and Related Retroviruses、2013 年 6 月 26 日～30 日、Montreal、Canada

中畑新吾 他、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 75 回日本血液学会学術集会、2013 年 10 月 11 日～13 日、さっぽろ芸文館 他、札幌

中畑新吾 他、癌細胞における NDRG2 の不活性化は PTEN の恒常的なリン酸化を促し、PI3K/AKT 経路の活性化を引き

起こす。第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日～5 日、パシフィコ横浜、神奈川

〔図書〕(計 2 件)

中畑新吾、森下和広、日本臨床 日本臨床社、成人 T 細胞白血病/リンパ腫(ATLL)発症の分子機構、2015 年、168-171 頁

中畑新吾、森下和広、血液内科 7 1 巻 科学評論社 ATLL 発症機構解析研究の進歩、2015 年、244-249 頁

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：成人 T 細胞白血病の診断方法および成人 T 細胞白血病の治療薬のスクリーニング方法

発明者：宮崎大学：森下和広、市川朝永、中畑新吾

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2014/061548

出願年月日：2014 年 4 月 24 日

国内外の別：国外

〔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