

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670160

研究課題名(和文) 生体イメージングによるストレス応答の調節機構の解明と創薬基盤技術の確立

研究課題名(英文) Development of a bio-imaging system for mechanistic assessment of the nucleolar stress response and construction of novel technology for therapeutics

研究代表者

河原 康一 (Kawahara, Kohichi)

鹿児島大学・医歯学域医学系・講師

研究者番号：00400482

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂後に核小体が再構築されるが、その意義は不明である。近年、核小体の異常により、癌抑制因子p53依存的に細胞増殖を停止させ、核小体の機能を維持する核小体ストレス応答機構が明らかになった。我々は新たにレポーターシステムを構築し、細胞分裂阻害剤が核小体ストレス応答を誘導することを見出した。細胞分裂の阻害は、p53を増加させ、核小体ストレス応答に依存性に癌細胞の増殖を抑制した。以上から核小体ストレス応答が、分裂後の核小体の再構築の有無によって、分裂異常細胞を除去する新たな分裂監視機構と考えられた。また本レポーターシステムにより、核小体ストレス応答を利用したがん治療薬の開発も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The nucleolus is disorganized at mitosis and reassembled at the beginning of interphase. Nucleolar stress response is a maintenance mechanism for nucleolar homeostasis to induce TP53 dependent growth inhibition during the nucleolar abnormality. However physiological relevance between mitotic nucleolar disassembly/assembly and nucleolar stress response is unknown. We developed a fluorescent reporter system and found mitotic inhibitors as a novel nucleolar stress inducer by chemical screening. Mitotic abnormality by inhibitors of mitosis increased p53 protein and inhibited cancerous cell growth on Nucleolar stress response dependent manner. Taken together, our results provide Nucleolar stress response as a novel mitotic surveillance mechanism depend on nucleolar reassembly. These results also suggested that our reporter system might enable to identified novel cancer therapeutics utilizing the nucleolar stress.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：核小体 細胞分裂 p53 核小体ストレス応答 蛍光レポーター 創薬スクリーニング

1. 研究開始当初の背景

がん抑制因子 p53 の活性化はゲノム障害やがん遺伝子の過剰発現時に起こり、細胞増殖抑制・老化を導き、がんの発症を防御する機構に加えて、近年核小体を起点として p53 が活性化される核小体ストレス応答機構によって制御されることが報告された。この核小体ストレス応答は、リボソーム構築障害による蛋白質合成異常と細胞増殖のバランスを調節する機構であり、ActinomycinD 等の薬剤によるリボソーム RNA 量の不足時や、栄養飢餓時、細胞接触抑制時等に作動し、RPL5, RPL11 等のリボソーム蛋白質が、核小体から放出され、これらが核小体外の領域において p53 ユビキチンリガーゼである MDM2 と結合し、MDM2 の活性を抑制する。この機構によって、p53 が安定化して細胞増殖が抑制される。申請者は、核小体ストレス応答を制御する新規分子 PICT1 を同定し、PICT1 が生理機能や腫瘍化進展を制御することを見いだした(Suzuki, Kawahara *et al.* *Cancer Sci* 103, 2012; Uchi, Kawahara *et al.* *Br J Cancer*. 109, 2013; Maehama, Kawahara *et al.* *J Biol Chem*,)。このことから核小体ストレス応答に適切に応答することが、生体の恒常性維持や疾患の抑制に極めて重要と考えられた。そこで申請者は、蛍光エネルギー共鳴移動(FRET)を用いた核小体ストレス応答の可視化レポーターシステムを作製した。

2. 研究の目的

核小体ストレス応答は、p53 経路を制御する新たな仕組みとして最近注目されている。我々はこれまでに、核小体ストレス応答が生体の恒常性維持や腫瘍化進展抑制に極めて重要であることを見出した(Kawahara *et al.* *Nature Med* 17, 2011)。しかしながら、生体でこのストレス応答がいつ、どこで、どの程度活性化されるか?、ストレスを感知する機構は?、この応答はがんの発症のどの過程を防御するのか?等は不明である。本研究では申請者が独自に確立しつつある核小体ストレス応答の可視化レポーターシステムを利用し、この応答のダイナミクスを検出することで、(1)生体が核小体ストレスに適切に応答する仕組みの解明、(2)この応答が発癌を防御する役割の解明、(3)核小体ストレスを標的とした新規抗がん剤開

発を目指す。

3. 研究の方法

Fluoppi 法を検出原理とする核小体ストレス応答の蛍光レポーターシステムを導入したヒトグリオーマ U251 細胞を作製し、蛍光輝点シグナルはセルイメージアナライザーによって計測した。次に、ActinomycinD、ミコフェンール酸、BMH21 等の既知の核小体ストレス応答を誘導する薬剤を添加し、蛍光レポーター活性の特異性や、定量性の精度、感度を検討した。さらに、約 400 種の既知の酵素や生化学反応に対する阻害剤のライブラリー(文部科学省・新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』化学療法基盤支援活動班より供与)を添加し、細胞イメージアナライザーによって蛍光輝点を定量化することで、核小体ストレス応答性を変化させる阻害剤を探索した。細胞周期 M 期の停止を誘導する複数の化合物をヒット化合物として得たことから、蛍光レポーターシステム導入細胞へ M 期停止を誘導する Aurora kinase 阻害剤、CDC2 阻害剤、微小管重合阻害剤を添加後、ウェスタンブロットによって p53 発現量や MTT アッセイに細胞増殖性の変化を検討した。

4. 研究成果

核小体ストレス応答を検出する蛍光プローブの設計

核小体ストレス応答には MDM2 とリボソーム蛋白質との結合という特異的な分子変化が存在するので、これら分子の結合を検出することができれば、核小体ストレス応答のレポーターシステムとなると考えられた。そこで、まず蛋白質分子間結合を蛍光エネルギー共鳴移動の原理で検出する FRET システムの構築を行った。しかしながら一過性の発現による FRET 効率に比べ、安定発現株の FRET プローブの発現量は低く、高い FRET シグナルが得ることができなかった。このことから、より高効率に核小体ストレス応答を検出できる新たなレポーターシステムを再構築する必要が考えられた。

そこで次に、Fluoppi を検出原理とする核小体ストレス応答を検出するレポーターシステムの構築を試みた。リボソーム蛋白質に蛍光蛋白質である Mont iRed を、MDM2 にオリゴマー形成配列である Ash 配列を付加した蛋白質を発現させたところ、通常状態では、両者は結合せず、リボソーム蛋白質が局在する核小体や細胞質に、蛍光蛋白質が

拡散し弱い蛍光を認めたが、ActinomycinDの添加により核小体ストレスを付与すると、両分子が結合することで、多量体を形成し、蛍光蛋白質の集積により多数の蛍光輝点が観察された(図1)。

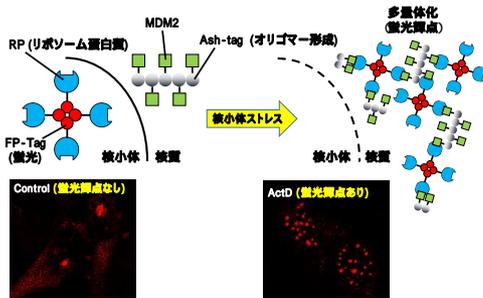


図1. Fluoppi法により核小体ストレス応答の蛍光レポーターシステムの構築 ActD (ActinomycinD)

既知の阻害剤ライブラリーによる核小体ストレス応答が関与する新たなシグナル経路の探索

核小体ストレス応答のレポーターシステムを用いて、約400種の既知の酵素等の阻害剤をスクリーニングした。ActinomycinD等の作用既知の核小体ストレス応答を誘導する化合物に加えて、cdc2、Aurora kinase阻害剤等をヒット化合物として得た(図2)。cdc2、Aurora kinase阻害剤は、いずれも細胞周期のM期の停止を誘導する。M期の進行に伴い、核小体が消失/再構築されることが古くから知られているが、これまで核小体ストレス応答とM期の関連性は報告がない。核小体ストレス応答はM期の核小体のダイナミックな変容から制御を受ける新たな機構と考えられた。

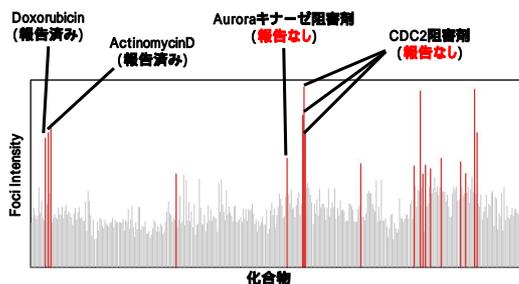


図2. 既知の阻害剤ライブラリーによるスクリーニング

細胞分裂期における核小体ストレス応答の役割の検討

正常な p53 を発現するヒト骨肉腫細胞株 U2OS 細胞へM期停止を誘導する薬剤である CDC2 阻害剤、Aurora kinase 阻害剤を添加し、ウェスタンブロット法を用いて生化学的な検討を行った。その結果、溶媒のみを添加した陰性コントロールに比べ、CDC2 阻害剤、

Aurora kinase 阻害剤を添加した細胞では陽性コントロールである DNA 損傷を与える Gemcitabine や、ActinomycinD と同程度の p53 タンパク質量が著しい増加を認めた(図3A)。さらに、これらの M 期停止薬剤を添加した細胞では DNA 損傷マーカーである -H2AX 蛋白質の有意な発現はみられなかった(図3A)。このように、細胞周期M期の停止はDNA損傷によらない p53 の増加を来すことが判明した。

次に、細胞周期M期に停止させる薬剤による癌細胞の増殖を抑制する機構をさらに検討した。U2OS 細胞へ CDC2 阻害剤、Aurora kinase 阻害剤を添加し、細胞増殖を MTT 法により測定したところ、これらの阻害剤は癌細胞の増殖を抑制する事、そこに核小体ストレス応答を誘導する必須の因子である RPL11 をあらかじめ siRNA で発現抑制すると、阻害剤でみられた癌細胞の増殖抑制が部分的に抑えられることを見出した(図3B)。これらの結果から、細胞周期M期の停止は核小体ストレス応答を誘導し、部分的にこのストレス応答依存性に癌細胞増殖を抑制する事が示された。

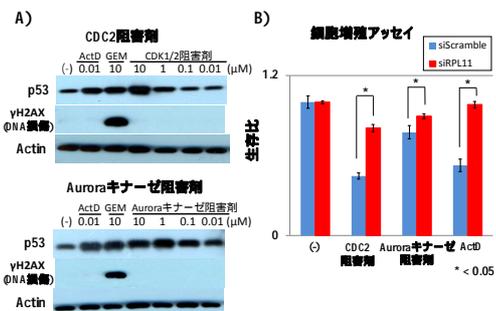


図3 細胞周期M期の停止は核小体ストレス応答を誘導する
A) CDC2あるいはAuroraキナーゼ阻害剤を添加したU2OS細胞でのp53や yH2AXの発現量。なお、GEM (Gemcitabine) はDNAに損傷を与え、アポトーシスを誘導する薬剤であり、陽性コントロールの薬剤である。B) RPL11 siRNAを導入したU2OS細胞へCDC2あるいはAuroraキナーゼ阻害剤を添加し、3日後のMTTアッセイの相対的測定値。

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 9件)

Tanabe K, Shinsato Y, Furukawa T, Kita Y, Hatanaka K, Minami K, Kawahara K, Yamamoto M, Baba K, Mori S, Uchikado Y, Maemura K, Tanimoto A, Natsugoe S., Filamin C promotes lymphatic invasion and lymphatic metastasis and increases cell motility by regulating Rho GTPase in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 8(4):6353-6363, 2017 査読あり

Moinuddin FM, Shinsato Y, Komatsu M, Mitsuo R, Minami K, Yamamoto M, Kawahara K, Hirano H, Arita K, Furukawa T., ATP7B

expression confers multidrug resistance through drug sequestration., *Oncotarget*. 2016 査読あり

Murata Y, Kotania T, Supriatn Y, Kitamura Y, Imada S, Kawahara K, Nishio M, Daniwijay E.D, Sadakata H, Kusakari S, Mori M, Kanazawa Y, Saito Y, Okawa K, Takeda-Morishita M, Okazawa H, Ohnishi H, Azuma T, Suzuki A, and Matozaki T., The protein tyrosine phosphatase SAP-1 protects against colitis through regulation of CEACAM20 in the intestinal epithelium., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 112(31):E4264-71, 2015 査読あり

Minami K, Shinsato Y, Yamamoto M, Takahashi H, Zhang S, Nishizawa Y, Tabata S, Ikeda R, Kawahara K, Tsujikawa K, Chijiwa K, Yamada K, Akiyama S, Pérez-Torras S, Pastor-Anglada M, Furukawa T, Takeda Y., Ribonucleotide reductase is an effective target to overcome gemcitabine resistance in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells with dual resistant factors., *J Pharmacol Sci*. 127(3):319-25, 2015 査読あり

河原康一., 核小体ストレス応答機構による腫瘍化進展制御と抗がん治療戦略, *JAMTTC News Letter* No.19-2, 2015年 査読なし

河原康一、古川龍彦., 核小体ストレス応答と腫瘍化進展制御 新たな抗がん治療薬開発を目指して., *医学のあゆみ*, 254, 5, 375-381, 2015年 査読なし

Minami K, Kamijo Y, Nishizawa Y, Tabata S, Horikuchi F, Yamamoto M, Kawahara K, Shinsato Y, Tachiwada T, Chen ZS, Tsujikawa K, Nakagawa M, Seki N, Akiyama S, Arima K, Takeda Y, Furukawa T, Expression of ABCB6 is related to resistance to 5-FU, SN-38 and vincristine., *Anticancer Res*. 34(9):4767-73. 2014 査読あり

Maehama T, Kawahara K, Nishio M, Suzuki A, Hanada K., Nucleolar Stress Induces Ubiquitination-Independent Proteasomal Degradation of PICT1., *J. Biol. Chem*, 289(30):20802-20812, 2014 査読あり

Okamura K, Takayama K, Kawahara K, Harada T, Nishio M, Otsubo K, Ichijo K, Kohno M, Iwama E, Fujii A, Ota K, Koga T, Okamoto T, Suzuki A, Nakanishi Y., PICT1 expression is a good prognostic factor in non-small cell lung cancer., *ONCOSCIENCE* 1(5):375, 2014 査読あり

〔学会発表〕(計 13 件)

川畑 拓斗、河原 康一、下川 倫子、白石 岳大、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、核小体ストレス応答の分裂期チェックポイ

ント機構としての役割の解明とこの応答を標的とした新たな抗がん剤の開発、平成 28 年度新学術領域研究「学術研究支援基盤形成【先端モデル動物支援プラットフォーム】」若手支援技術講習会、2016 年 9 月、蓼科グランドホテル(長野県茅野市)

河原康一、川畑拓斗、下川倫子、上條陽平、白石岳大、山本雅達、新里能成、南 謙太郎、有馬一成、濱田季之、古川龍彦、核小体ストレス応答による細胞分裂監視機構とこれを利用した抗がん剤の開発、日本ケミカルバイオロジー学会 第 11 回年会、2016 年 6 月、京都テルサ(京都府京都市)

濱崎 研悟、河原 康一、川畑 拓斗、下川 倫子、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、武井 孝行、吉田 昌弘、古川 龍彦、核小体を起点としたストレス応答の新たな生理機能の解明と抗がん剤の開発、平成 28 年度日本生化学会九州支部例会、2016 年 5 月、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)

優秀ポスター発表賞

Kamijo Y, Kawahara K, Kawahata T, Shiraishi T, Horikuchi F, Yamamoto M, Shinsato Y, Minami K, Hamada T, Arima K, Furukawa T, Identification of novel regulatory genes on nucleolar stress response by combination analysis of shRNA library screening in vitro and cancer patient gene expression data base in silico., Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics. 2016. February, Hawaii(USA)

Kawahata T, Kawahara K, Horikuchi F, Kamijo Y, Shiraishi T, Yamamoto M, Shinsato Y, Minami K, Arima K, Hamada T, Furukawa T. Discovery of Tumor Suppressive Function and Therapeutics by a Novel Reporter System for Nucleolar Stress Response., Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics. 2016. February, Hawaii(USA)

川畑拓斗、河原康一、上條陽平、白石岳大、堀口史人、山本雅達、新里能成、南謙太郎、有馬一成、濱田季之、古川龍彦、癌抑制因子 p53 を制御する核小体ストレス応答の可視化レポーターシステムの構築と新たな生理作用の解明、BMB2015、2015 年 12 月、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

若手優秀発表賞

河原康一、川畑拓斗、古川龍彦、核小体ストレス応答による腫瘍化進展制御と治療薬の開発、第10回臨床ストレス応答学会大会、2015年11月、東京農工大学(東京都小金井市)

河原康一、川畑拓斗、上條陽平、白石岳大、堀口史人、山本雅達、新里能成、南謙太郎、有馬一成、濱田季之、古川龍彦、核小体ストレス応答の可視化レポーターシステムの構築とバイオイメージングによる新たな生理作用の解明、第24回日本バイオイメージング学会学術集会、2015年9月、東京理科大学(東京葛飾区)

河原康一、川畑拓斗、堀口史人、上條陽平、新里能成、南謙太郎、有馬一成、濱田季之、古川龍彦、核小体ストレス応答機構による腫瘍化進展制御と抗癌治療、第19回日本がん分子標的治療学会学術集会、2015年6月松山全日空ホテル(愛媛県松山市)

優秀演題賞

Kawahara K, Kawahata T, Horikuchi F, Kamiyo Y, Yamamoto M, Shinsato Y, Minami K, Arima K, Hamada T, Furukawa T. Ribosomal protein-p53-MDM2 signaling by nucleolar stress response and drug discovery, American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2015, 2015 April, Philadelphia(USA)

河原康一、有馬一成、核小体ストレス応答を起点とした新規がん関連分子の同定と創薬., BMIRC研究会(招待講演)、2014年8月九州工業大学(福岡県飯塚市)

堀口史人、河原康一、上條陽平、新里能成、南謙太郎、有馬一成、古川龍彦、核小体ストレス応答の新規制御機構の解明とこれを利用した抗癌治療薬探索系の構築、日本がん分子標的治療学会、2014年6月仙台市情報・産業プラザ(宮城県仙台市)

若手優秀演題賞

河原康一、上條陽平、堀口史人、山本雅達、新里能成、南謙太郎、西澤由紀彦、鈴木聡、有馬一成、古川龍彦、p53経路を制御する核小体ストレス応答を標的とした癌治療薬スクリーニング系の構築., 化学療法基盤支援活動 第3回シンポジウム、2014年5月、万国津梁館(沖縄県名護市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2件)

名称: Combination of polypeptides for screening for agents to induce nucleolar stress response and screening methods
発明者: Kawahara K, Furukawa T, Arima K, Kamiyo Y, Horikuchi F
権利者: 鹿児島大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-172195
出願年月日: 2015年5月27日
国内外の別: 国外(US Provisional Patents Application)

名称: 抗がん剤の感受性及び癌の予後に対する診断マーカー
発明者: 河原康一、古川龍彦、下川倫子、川畑拓斗、白石岳大、濱崎研悟
権利者: 鹿児島大学
種類: 特許
番号: 特願 2016-172195
出願年月日: 2016年9月2日
国内外の別: 国内

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://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~molonc12/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 康一 (Kohichi Kawahara)
鹿児島大学, 医歯学域医学系 講師
研究者番号: 00400482

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし