

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860191

研究課題名(和文)小胞体ストレスセンサーBBF2H7による細胞増殖制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of cell proliferation regulated by the endoplasmic reticulum stress sensor BBF2H7

研究代表者

張 工キ宙 (Zhang, Yizhou)

広島大学・医歯薬保健学研究院(医)・研究員

研究者番号：70711117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞が低酸素、低グルコースなど劣悪な環境に曝されたとき、小胞体ストレスセンサー遺伝子として機能するBBF2H7蛋白は小胞体膜上で切断され、一部の断片が細胞外へ分泌される。今回我々は、分泌されたBBF2H7断片が数種類の固形癌の増殖を促進できることを見出した。そのBBF2H7分泌断片をターゲットとして、癌の増殖を抑制できる中和抗体を作製し、作成した抗体は神経膠腫細胞の増殖や侵襲を抑制できることを実証した。今回作成したBBF2H7中和抗体には、がん分子標的抗体製剤としての可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Triggered by cellular stress like being exposed to hypoxia or low glucose environments, the membrane-anchored BBF2H7 protein, a member of endoplasmic reticulum stress sensors, undergoes cleavage, and subsequently a portion of the cleaved fragments is secreted into the extracellular matrix. According to our investigation, these secreted fragments were able to promote the growth of several kinds of solid tumor. Using the BBF2H7 secreted fragment as a target, we developed neutralizing antibodies which can inhibit the growth of glioma, prostate cancer and hepatocarcinoma. And we demonstrated that these antibodies can inhibit the proliferation and invasion of glioma cells. The BBF2H7 neutralizing antibodies we developed showed intriguing potential to be a candidate for molecularly-targeted cancer therapy.

研究分野：消化器内科学

キーワード：BBF2H7 小胞体ストレス 抗体医薬 がん分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

虚血、酸化ストレス、感染などの様々な異常環境に曝されると、小胞体の働きに破綻を来し、不完全なタンパク質が小胞体に大量に生み出される(小胞体ストレス)。小胞体に局在する小胞体ストレスセンサーBBF2H7は、小胞体ストレス依存的に膜内切断を受け、細胞質側ドメインが細胞核へ移行し転写因子として機能する。切断されたもう一方の小胞体内腔側のドメインはジャンクとして速やかに分解されると考えられていたが、膜内切断後の内腔ドメインの局在を詳細に観察すると、小胞体から輸送小胞に内包され細胞外に分泌されていることがわかった。さらに、このドメインを含む分泌液には軟骨細胞の増殖を促進させる働きがあることも明らかになった。このような事実から、小胞体ストレスセンサーBBF2H7には細胞単体のレベルで小胞体ストレスに反応するだけでなく、周辺細胞に小胞体ストレスの情報を伝達する役割があることが予想された。

2. 研究の目的

(1)小胞体内腔ドメインの生理活性解明：細胞外に分泌されたBBF2H7の小胞体内腔ドメインと結合する細胞膜表面タンパク質(受容体)を同定し、結合後に起こる細胞内イベント(細胞内シグナル伝達)と細胞機能変化を明らかにする。

(2)小胞体内腔ドメインの機能制御：BBF2H7小胞体内腔ドメインに対するモノクローナル抗体を作成し、小胞体ストレスの細胞間情報伝達をブロックすることで細胞増殖等の機能制御を図る。

3. 研究の方法

(1)BBF2H7小胞体内腔ドメインの細胞機能に及ぼす効果：BBF2H7小胞体内腔ドメインを含む培養上清を継代後すぐの細胞に添加し、その後の細胞増殖速度や形態変化を観察した。これにより小胞体内腔ドメインが有する生物活性を見出した。

(2)小胞体ストレスセンサーBBF2H7の癌組織での発現：固形癌では低酸素および低栄養状態のため小胞体ストレスが起こっていることは良く知られているが、固形癌のどの部位に小胞体ストレスが最も強く負荷され、BBF2H7が大量に発現しているのかを確認することは治療法を確立する上で貴重な情報となる。よって、今回は主に固形癌を対象にBBF2H7の発現を免疫染色法によって調べた。

(3)ポリクローナル抗体の作成：BBF2H7の小胞体内腔ドメインタンパク質を組換え技術を用いて作成し、これを抗原としてポリクローナル抗体を作成した。作成できた抗体は、小胞体内腔ドメインと特異的に結合する膜受容体を免疫沈降するために使用した。

(4)小胞体内腔ドメインの受容体結合部位の決定：BBF2H7は細胞膜上でPTCH1及びIHHとcomplexを形成し、軟骨細胞の増殖を促進

することは既に共著論文(発表論文4)で証明されたが、BBF2H7小胞体内腔ドメインはPTCH1と結合する部位のアミノ酸配列は示していない。それを解明するため、各種のBBF2H7 deletion 変異体を作成し、PTCH1と結合できかつ生物学的作用を示す最小のアミノ酸配列を決定した。その結合部位を含むリコンビナントタンパク質および合成ペプチドを作成し、受容体との結合活性および生物学的機能の有無について解析した。

(5)小胞体内腔ドメインに対するモノクローナル抗体の作成：(4)で決定した結合部位を含むリコンビナントタンパク質を抗原としてモノクローナル抗体を作成した。モノクローナル抗体のスクリーニングでは、小胞体内腔ドメインが有する生物活性に対する抑制を指標にして目的クローンを得た。作成したモノクローナル抗体が実際に小胞体内腔ドメインの機能を効果的に抑制できるかを細胞生物学的に確認した。

4. 研究成果

(1)BBF2H7小胞体内腔ドメインの細胞機能に及ぼす効果：BBF2H7小胞体内腔ドメインを含む培養上清をU251MG細胞に添加後7日間観察した結果、細胞形態には著明な変化はなかったが、細胞増殖は約30%亢進したことが分かった。

(2)小胞体ストレスセンサーBBF2H7の癌組織での発現：神経膠腫、前立腺癌、子宮頸癌、肝細胞癌組織を用いて、BBF2H7の発現を免疫染色で調べた。これらの癌組織において、BBF2H7の発現が亢進し、膜内切断された細胞質側ドメインが核へ移行することが確認された(図1)。

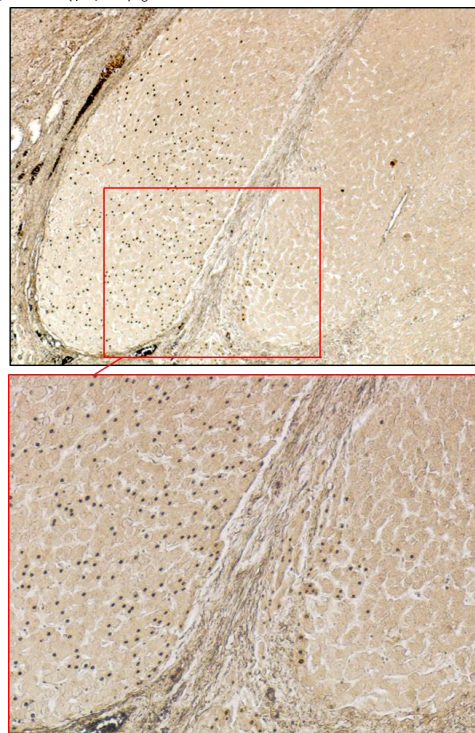


図1. 原発性肝細胞癌における小胞体ストレスセンサーBBF2H7の発現(上：弱拡大、下：強拡大)。

(3) ポリクローナル抗体の作成：BBF2H7 の小胞体内腔ドメインの GST 融合蛋白を作成し、GST タグを除いた蛋白を抗原としてポリクローナル抗体を作成した。

(4) 小胞体内腔ドメインの受容体結合部位の決定：BBF2H7 小胞体内腔ドメインの deletion 変異体および IHH と競合的に結合できる合成ペプチドをつくり、PTCH1 との結合部位を同定した。その結合部位を含むリコンビナントタンパク質を大腸菌で作成し、U251 細胞の培養上清に添加したところ、細胞増殖は顕著に亢進したことが確認された。

(5) 小胞体内腔ドメインに対するモノクローナル抗体の作成：(4) で決定した結合部位を含むリコンビナントタンパク質を抗原としてモノクローナル抗体を作成した。U251MG 細胞の増殖への抑制能力を基準として抗体のスクリーニングを行い、得られたもっとも細胞増殖を抑制できる 2 種の抗体は濃度依存的に抗腫瘍効果を示した (図 2)。この 2 種の抗体で処理した細胞において、細胞周期遺伝子 Cyclin D1, Cyclin E1, CDK2 および Hedgehog signaling 関連遺伝子 GLI1 の mRNA レベルが抑制されたことが確認された (図 3)。

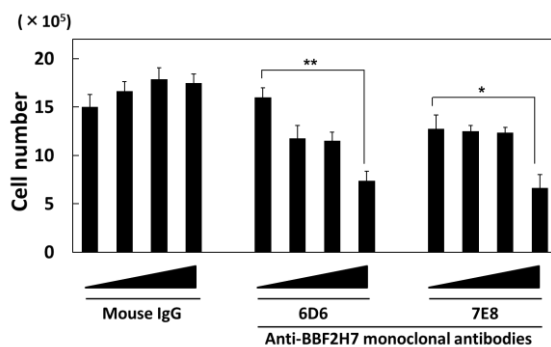


図 2. 抗 BBF2H7 モノクローナル抗体 6D6 および 7E8 を、それぞれ U251MG 細胞の培養上清に添加した。抗体濃度依存的な抗腫瘍効果が観察された。

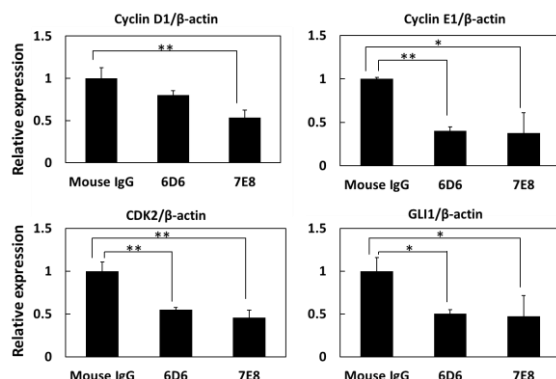


図 3. 抗 BBF2H7 モノクローナル抗体 6D6 および 7E8 で処理された U251MG 細胞から mRNA を抽出し、細胞周期および Hedgehog signaling 関連遺伝子の発現を測定した。

以上の結果から、今回作成したモノクローナル抗体には、ヘッジホッグシグナルが活性化している固形癌細胞の増殖を抑制する働きがあり、新たながん分子標的抗体製剤としての可能性が示唆された。今後は神経膠腫細

胞を移植した担癌マウスモデルを樹立し、BBF2H7 モノクローナル抗体の抗癌剤としての効果を *in vivo* で評価する予定である。

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 4 件)

(1). Tsuge M, Hiraga N, Uchida T, Kan H, Miyaki E, Masaki K, Ono A, Nakahara T, Abe-Chayama H, Zhang Y, Naswa MG, Kawaoka T, Miki D, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Antiviral effects of anti-HBs immunoglobulin and vaccine on HBs antigen seroclearance for chronic hepatitis B infection. *J Gastroenterol*. 2016 Mar 4. [Epub ahead of print] (査読有).

DOI:10.1007/s00535-016-1189-x

(2). Hayes CN*, Zhang Y*, Makokha GN*, Hasan MZ*, Omokoko MD*, Chayama K. Early events in hepatitis B virus infection: from the cell surface to the nucleus. *J Gastroenterol Hepatol* 2015. 2016 Feb;31(2):302-9. (査読有). *: 共同第一著者.

doi:10.1111/jgh.13175.

(3). Yohji Honda, Shoichi Takahashi, Yizhou Zhang, Atsushi Ono, Eisuke Murakami, Niu Shi, Tomokazu Kawaoka, Daiki Miki, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Hiromi Abe, Hidenori Ochi, Michio Imamura, Hiroshi Aikata and Kazuaki Chayama. The effects of bisphosphonate zoledronic acid in hepatocellular carcinoma, depending on mevalonate pathway. *J Gastroenterol Hepatol* 30 (2015) 619-627. (査読有).

doi:10.1111/jgh.12715.

(4). Atsushi Saito, Soshi Kanemoto, Yizhou Zhang, Rie Asada, Kenta Hino, Kazunori Imaizumi. Chondrocyte Proliferation Regulated by Secreted Luminal Domain of ER Stress Transducer BBF2H7/CREB3L2.

Molecular Cell 53, 127-139, January 9, 2014. (査読有).

doi:10.1016/j.molcel.2013.11.008

[学会発表] (計 6 件)

(1). Yizhou Zhang, Nelson Hayes, Masataka Tsuge, Nobuhiko Hiraga, Takuro Uchida, Daiki Miki, Hiromi Abe, Kazuaki Chayama. Hepatocellular Carcinoma promotion by Endoplasmic Reticulum stress transducer BBF2H7. American Association for the Study of Liver Diseases (*AASLD*). Nov 14th, 2015. San Francisco, USA.

(2). Daiki Miki, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Sakura Akamatsu, Atsushi Ono, Takashi Nakahara, Yizhou Zhang, Keiichi Masaki, Hatsue Fujino,

Eisuke Miyaki, Hiromi Kan, Takuro Uchida, Nobuhiko Hiraga, Masataka Tsuge, Tomokazu Kawaoka, Michio Imamura, Yoshiiku Kawakami, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama. The impact of HLA-DQs and IFNL4 variant on hepatitis C virus-induced liver inflammation. American Association for the Study of Liver Diseases (*AASLD*). Nov 14th, 2015. San Francisco, USA.

(3). Daiki Miki, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Sakura Akamatsu, Atsushi Ono, Takashi Nakahara, Yizhou Zhang, Keiichi Masaki, Hatsue Fujino, Eisuke Miyaki, Hiromi Kan, Takuro Uchida, Nobuhiko Hiraga, Masataka Tsuge, Tomokazu Kawaoka, Michio Imamura, Yoshiiku Kawakami, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama. Genome-wide scan of miRNA polymorphisms revealed a suggestive association of miR-3143 with chronic hepatitis B virus infection. American Association for the Study of Liver Diseases (*AASLD*). Nov 14th, 2015. San Francisco, USA.

(4). Daiki Miki, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Sakura Akamatsu, Atsushi Ono, Takashi Nakahara, Yizhou Zhang, Keiichi Masaki, Hatsue Fujino, Eisuke Miyaki, Hiromi Kan, Takuro Uchida, Nobuhiko Hiraga, Masataka Tsuge, Tomokazu Kawaoka, Michio Imamura, Yoshiiku Kawakami, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama. Genetic association study failed to confirm an association between the NTCP S267F mutation and persistence of hepatitis B virus or development of hepatocellular carcinoma in the Japanese population. American Association for the Study of Liver Diseases (*AASLD*). Nov 14th, 2015. San Francisco, USA.

(5). Daiki Miki, Hidenori Ochi, C. Nelson Hayes, Hiromi Abe, Sakura Akamatsu, Atsushi Ono, Takashi Nakahara, Yizhou Zhang, Keiichi Masaki, Hatsue Fujino, Eisuke Miyaki, Hiromi Kan, Takuro Uchida, Nobuhiko Hiraga, Masataka Tsuge, Tomokazu Kawaoka, Michio Imamura, Yoshiiku Kawakami, Hiroshi Aikata, Kazuaki Chayama. The relationship between hepatocellular carcinoma development and reduced expression levels of the major germline genotype of PROSC, which is frequently deleted in hepatocellular carcinoma. American Association for the Study of Liver Diseases (*AASLD*). Nov 14th, 2015. San Francisco, USA.

(6). Yizhou Zhang, Kazuaki Chayama. Hepatocellular Carcinoma promotion by Endoplasmic Reticulum stress transducer BBF2H7. World Conference on Interventional Oncology (*WCI*). May

10th, 2015. New York, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

張 奕宙 (ZHANG YIZHOU)

広島大学大学院 医歯薬学総合研究科・研究員

研究者番号：70711117

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：