

ストレス応答異常に起因する発がんの病態解明と治療戦略

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 分子腫瘍学分野

講師 河原 康一

(共同研究者)

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科

教授 古川 龍彦

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科

大学院生 南 謙太郎

鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科

大学院生 西澤 由紀彦

鹿児島大学大学院 理工学研究科

大学院生 上條 陽平

鹿児島大学大学院 理工学研究科

大学院生 堀口 史人

鹿児島大学 理学部

学部卒業研究学生 川畑 拓斗

はじめに

p53遺伝子は、約半数のヒト腫瘍で異常を認めるがん抑制遺伝子の代表格であり、様々なストレスを感知し、細胞増殖停止、細胞死、細胞老化等の防御反応を惹起することで、発がんの抑制に働く主要な“ゲートキーパー”である。

p53は放射線、化学物質などによるゲノム障害ストレスや、発癌遺伝子の活性化による発癌ストレスによって活性化される他、最近核小体を起点として活性化される核小体ストレス応答に関与することが明らかになってきた。

核小体ストレス応答は、ActinomycinD、フルオロウラシル (5FU)、ミコフェノール酸 (MPA) 等の薬剤によるリボソーム構築障害や栄養飢餓、接触抑制によって起動し、RPL5, RPL11, RPL23, RPS7等の特定のリボソーム蛋白質が核小体から放出され、これが核小体外の核質領域にあるMDM2と結合し、p53を分解するMDM2の機能抑制することで、p53の安定化による細胞増殖抑制を引き起こす(図1)。

私達はこれまでに、RPL11を核小体に留めることで核小体ストレス応答を抑制する新規分子PICT1を見出し、PICT1遺伝子の欠損はRPL11を核小体から放出させ、核小体ストレスを起すこと、その結果p53の増加による細胞増殖抑制を起こし、ES細胞の生育や個体の形成を不能とすることを示した。また、この機構はヒト腫瘍においても重要であり、PICT1の発現

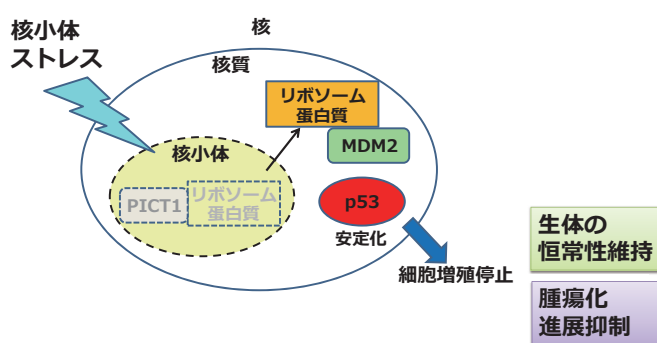


図1.p53を制御する核小体ストレス応答は恒常性維持や発がんの抑制に重要

低下による核小体ストレス応答は、腫瘍細胞の増殖やマウスの腫瘍化進展を著しく抑制すること、PICT1の発現が低下したヒト腫瘍患者の予後は良好になることを見出した。これらの結果から、核小体ストレス応答は発がんの抑制や生体の恒常性維持に極めて重要であると考えられた。

これらのことから、核小体ストレス応答がいつ、どこで、どの程度、起こっているのかを明らかにすることは、このストレス応答が制御する生理現象やその破綻によって生じる癌の発生機序を理解するうえで鍵となる極めて重要な課題と考えられた。また核小体ストレス応答はp53を増加させ腫瘍化進展を抑制することから、核小体ストレスを誘導する薬剤はこれまでにない抗腫瘍薬となると予想された。そこで私達は今回、核小体ストレス応答を簡便に、かつ特異的に検出できる可視化レポーターシステムの構築を行い、創薬の基盤となる研究を行った。

結 果

1) 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AzamiGreenを、MDM2にオリゴマー形成配列であるAsh配

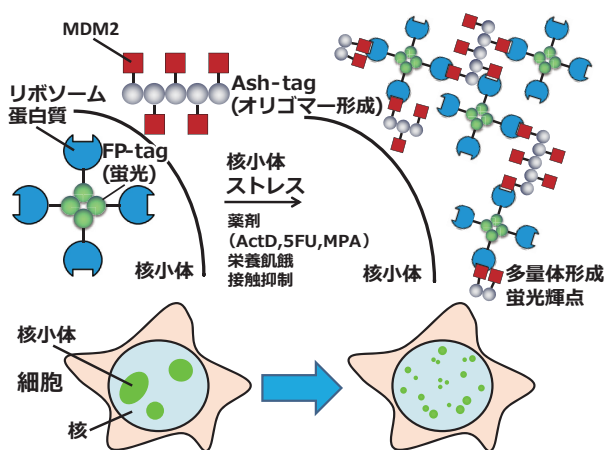


図2 Fluoppiを用いた核小体ストレス応答のレポーターシステムの原理

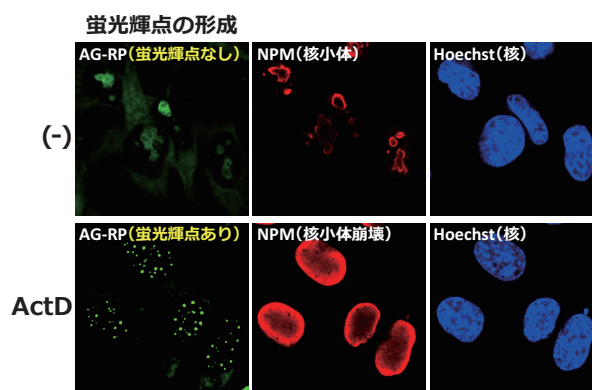


図3 核小体ストレス応答を蛍光輝点として検出

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2, 3)。

2) 核小体ストレス応答への特異性の検討

RNAポリメラーゼI によるrRNA合成を阻害するActnimycinDに加え、リボヌクレオチドアナログとして作用する5FU、リボヌクレオチドプールの枯渇を起こすMPAはいずれもrRNAの合成や成熟過程を阻害することで核小体ストレス応答を誘導する。そこで、5FU、MPAによって核小体ストレスを誘導し、プローブの反応性を検討した。その結果、DMSO添加によっては蛍光輝点の形成はみられないが、5FUとMPA添加によってActnimycinDと同様に蛍光輝点の形成を認めた(図4)。この結果から、本研究で作製したFluoppi プローブは核小体ストレス応答に特異性をもって検出できると考えられた。

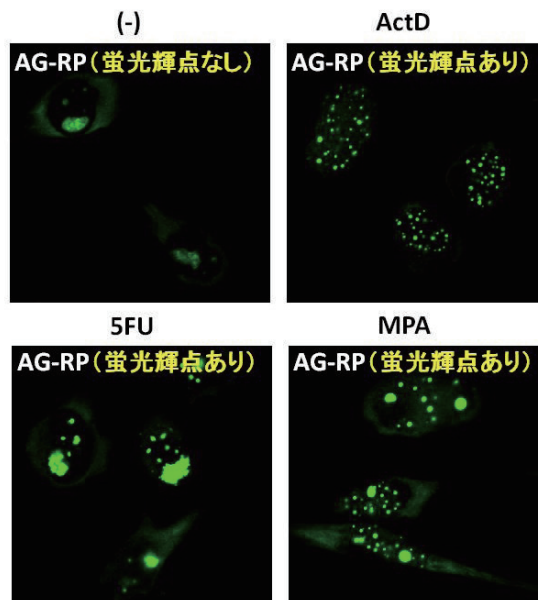


図4 核小体ストレス応答を特異的に検出

3) 蛍光輝点の定量化の検討

蛍光輝点は、セルイメージアナライザーを用いて定量化可能であることから、核小体ストレス応答によって起こる蛍光輝点の定量化の設定を行った。この結果、ActinomycinDの濃度や処理時間に応じて、蛍光輝点の定量値が増加することを認め、核小体ストレス応答の強さに応じた定量化測定が行えるものと考えられた(図5)。さらに、このシステムでは、定量値の正確性や感度を表す、 Z' factor >0.5 , $S/B>6$, $CV<0.15$ を再現性よく示し(図6)、大規模な化合物のスクリーニングに適応可能な精度、感度ともに優れたレポーターシステムであると考えられた。

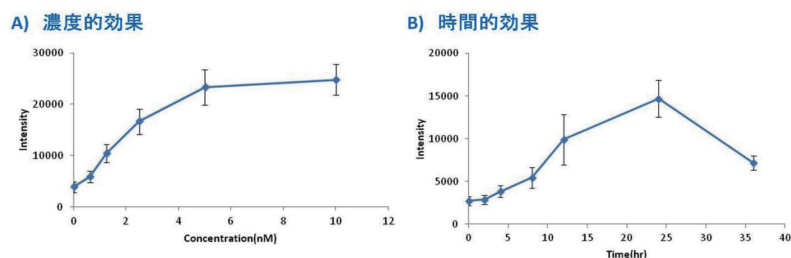


図5 蛍光輝点の定量化による核小体ストレスの強さ、時間に依存した検出

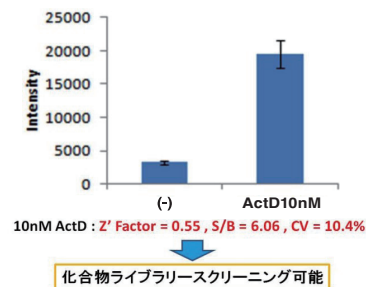
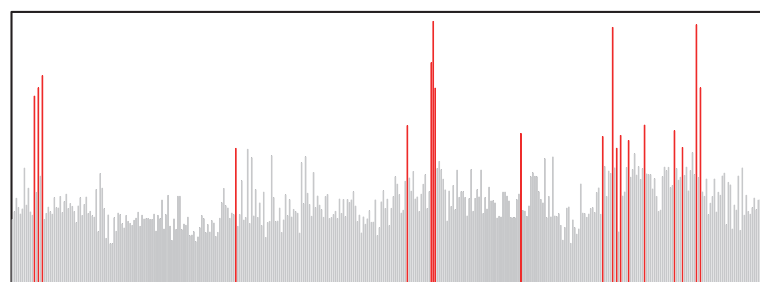


図6 レポーター活性の正確性の検討

4) 化合物ライブラリーのスクリーニング

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、既存の抗がん薬や阻害薬を含む400種の化合物を供与いただいた。上記のFluoppi導入細胞へ10 μ M, 500nM, 20nMの化合物を添加し、蛍



20種のヒット化合物を得た

ActinomycinD: RNA合成阻害 (報告済み)
Doxorubicin: DNA障害、RNA合成阻害 (報告なし)
Aclarubicin: DNA障害、RNA合成阻害 (報告なし)

図7 核小体ストレス応答を誘導する化合物スクリーニング

光輝点を定量したところ、陽性対照であるActinomycinDのほかに、Doxorubicin (DOXO)、Aclarubicin(ACM)等の19種の薬剤で有意なシグナルの増加を認めた(図7)。DOXOやACMは、核小体ストレス応答との関連の報告はないが、RNA合成を阻害することから、rRNA合成が作られずリボソーム構築を傷害し、核小体ストレス応答が誘導されたものと考えられた。このように核小体ストレス応答に関与する少数の化合物が選択されたことから、本システムは非特異的な検出が少なく、精度が高い化合物の探索システムと考えられた。また、これまで核小体ストレスとの関連の知られていない薬剤も複数得られたことから、新規な核小体ストレスを誘導する抗ガン剤として使用できることが考えられた。

考 察

以上の検討結果から、本研究で設計したFluoppiを検出原理とした蛍光プローブについて基礎検討を行い、本プローブが核小体ストレス応答を可視化計測できること、核小体ストレスに対して特異的であること、感度、精度ともに優れた定量化計測が可能であることを明らかにした。また、小規模な化合物ライブラリーのスクリーニングによって、これまで核小体ストレス応答への作用が知られていない化合物が複数得られたことから、薬理作用をさらに詳細に検討することで、新たな抗がん治療薬の開発につながる可能性もある。

今回作製したプローブは生体内で核小体ストレス応答を可視化できることから、いつ、どこで、どれくらい核小体ストレス応答が起こっているかという作動機構を明らかにすることで、核小体ストレス応答の生体での役割の解明につながることを期待される。本プローブが近い将来、多くの研究者に活用され、このようなストレス応答を基軸とした生命科学、医学、創薬研究に大いに貢献できることを切に望む。

要 約

近年、核小体を起点としてp53を活性化する核小体ストレス応答機構の存在が明らかになり、p53経路を制御する新たな機構として注目されている。我々はこれまでに、核小体ストレス応答を制御する新規分子PICT1を同定し、核小体ストレス応答が生体の恒常性維持や腫瘍化進展の抑制に極めて重要である可能性を見出している。そこで新たに、Fluoppiシステムを用いて、核小体ストレス応答を検出できる蛍光可視化レポーターシステムの構築を試みた。検討の結果、このシステムが核小体ストレス応答を特異的に、高感度、高精度に定量的に検出できることを示した。さらに、小規模化合物ライブラリーを用いた検討から、既知の核小体ストレスを誘導する薬剤のほかに、これまで核小体ストレス応答への関与が知られていない複数の薬剤が核小体ストレス応答を誘導することが示唆されたことから、新規作用機序をもつ抗がん剤として開発できる可能性も考えられた。今後は本研究の成果を更に発展させ、核小体ストレス応答を誘導する新規抗がん剤のより広範な探索や、核小体ストレス応答が示す新たな生理機能の解明を行い、がん化学療法やストレス応答分野に新展開をもたらすよう、研究に励みたいと考えている。

最後に、本研究を遂行するにあたり、大和証券ヘルス財団より調査研究助成を賜りましたことを深く感謝いたします。貴財団の益々のご発展を祈念いたします。

文 献

1. 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
2. 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
3. Uchi R, Kogo R, Kawahara K, Sudo T, Yokobori T, Eguchi H, Sugimachi K, Maehama T, Mori M, Suzuki A, Komune S, Mimori K., PICT1 regulates TP53 via RPL11 and is involved in gastric cancer progression., *Br J Cancer*. 109 (8) :2199-206, 2013
4. Sasaki M*, Kawahara K*, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, Itoh B, Wangjia J, Komatsu Y, Yang R.Y, Hikasa H, Horie Y, Yamashita T, Kamijo T, Zhang Y, Prives C, Nakano T, Mak W.T, Sasaki T, Maehama T, Mori M and Suzuki A., Regulation of the MDM2-p53 Pathway and Tumor Growth by PICT1/GLTSCR2 via Nucleolar RPL11., *Nature Medicine*, 17 (8) :944-51, 2011 (*:These two authors are contributed equally to this work as a first author)