

平成28年度シニア・リサーチフェロー

研究成果報告書

平成29年5月26日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団
理 事 長 堀 田 知 光 殿

報告者氏名 : 山野 莊太郎



研究課題 : 希少がん克服を目指した IER5-HSF1 経路を基軸とした挑戦的開発研究
(テーマ)

研究期間 : 自 平成28年4月1日

至 平成29年3月31日

研究指導者 : 氏名 大木 理恵子



公益財団法人 がん研究振興財団

(1) シニア・リサーチフェロー期間中の研究について

1) 要旨

希少がんは症例数の少なさから治療開発が遅れている。本研究では、当研究室で同定した新規 p53 下流遺伝子 IER5 を介した IER5-HSF1 経路について、種々の希少がん材料における発がん及び癌進展過程での役割を明らかにし、新規治療薬開発に繋げることを目的とする。

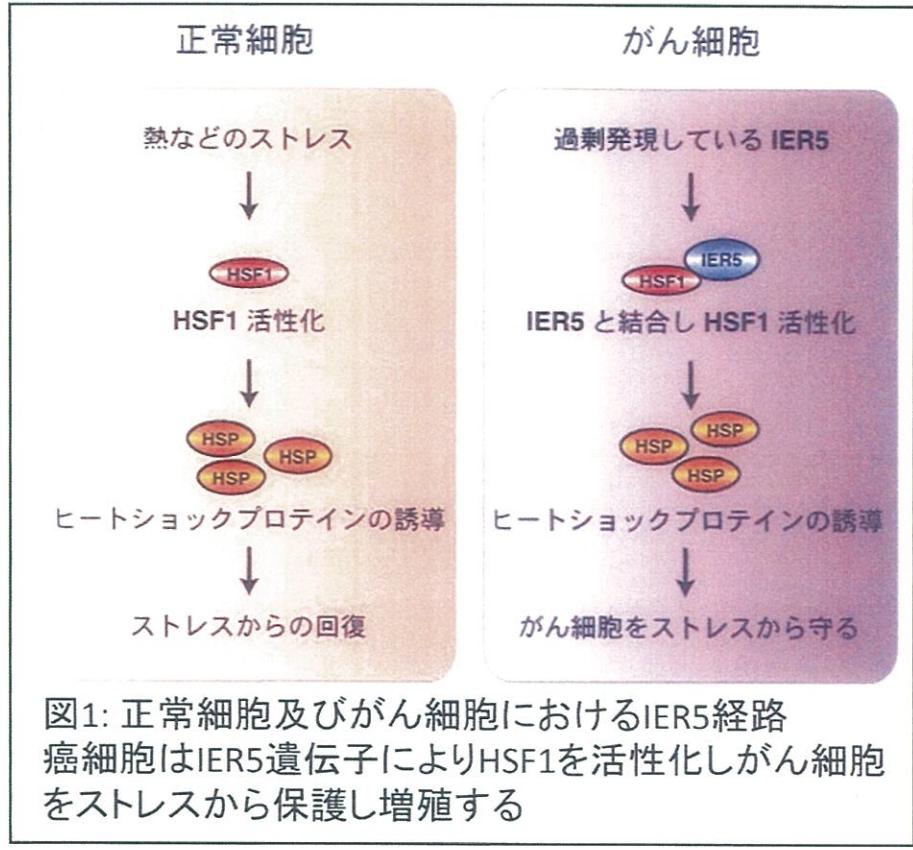
p53 は最も有名な癌抑制遺伝子の一つであり、DNA 修復や細胞周期の制御をする転写因子として知られている。p53 遺伝子変異はヒトに生じる様々ながんで最も高頻度に認められる遺伝子変異であり、がんの進展、特に悪性化機構獲得に重要であることが証明されている (IARC TP53 Database, Human Mutat. 2007)。

IER5 は世界に先駆けて我々の研究室で同定した新規 p53 標的遺伝子である。IER5 は、タンパク質毒性による細胞内ストレスを回避するための代表的分子であるヒートショックプロテイン (HSP) 群のマスター・レギュレーターである HSF1 を、今まで報告されていない低リン酸化状態にすることにより活性化する分子であることを明らかにした。さらに、これまでに発がん・癌悪性化との関連が解明されていなかった IER5 遺伝子が、種々の癌で正常組織と比較し癌部で発現亢進していること、また種々の癌細胞株を用いた足場非依存性増殖において、IER5 発現抑制により有意に増殖が低下すること、さらに脳腫瘍、肺癌及び乳癌等の様々な癌種のデータセットで、IER5 発現亢進群で有意に予後が悪いことが明らかとなった。以上をまとめると、興味深い事に IER5 は p53 の下流遺伝子にも関わらず種々の癌で発現亢進しており、HSF1 を介したストレス防御機構を活性化させることで、転移成立や薬剤耐性の獲得など癌悪性化に寄与する分子である可能性が示唆された。そこで今回我々は、希少がん材料に着目し、IER5 発現と予後について相関を検討した。その結果、検討したいずれの希少がんデータセットにおいても IER5 発現亢進群で有意な生存期間の短縮が認められた。さらに悪性黒色腫材料に着目し、マウス悪性黒色腫株 B16F10 細胞株を用いて IER5 を欠損させることに成功した。IER5 欠損株は尾静脈投与-肺転移系において、有意に肺転移能が抑制された。以上の結果より、IER5 は転移能の亢進等を介して希少がんのがん悪性化に寄与する可能性が示唆された。

2) 序

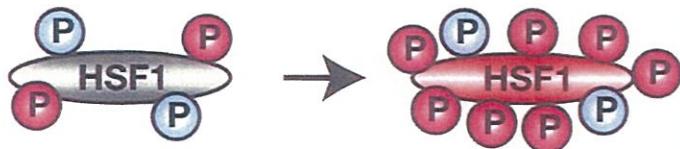
p53 は最も有名な癌抑制遺伝子の一つであり、DNA 修復や細胞周期の制御をする転写因子として知られている。p53 遺伝子変異はヒトに生じる様々なかんがんで最も高頻度に認められる遺伝子変異であり、がんの進展、特に悪性化機構獲得に重要であることが証明されている (IARC TP53 Database, Human Mutat. 2007)。

申請者は指導者である大木理恵子らと共に、現在新規 p53



下流遺伝子の研究に着手している。大木は、日本を代表する p53 研究者であり、これまでに Microarray と Chip-Seq を組み合わせることで、新規 p53 下流遺伝子 (Noxa, Reprimo, PHLDA3, IER5 等)

HSF1 activation by Heat shock



HSF1 activation by IER5

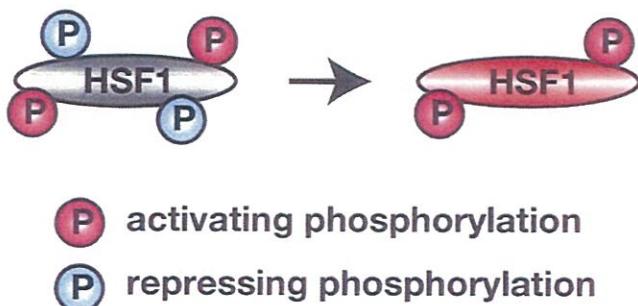
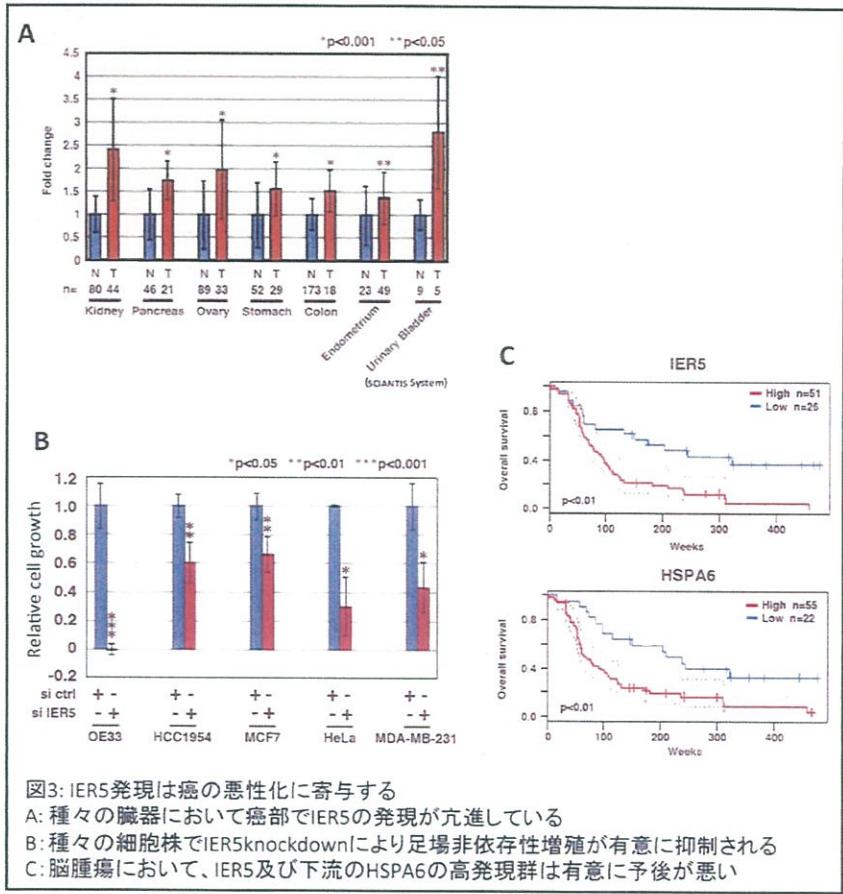


図2: IER5のHSF1活性化機構
IER5はHSF1を低リン酸化状態という、まったく新しい翻訳後修飾を行うことで、活性化させている

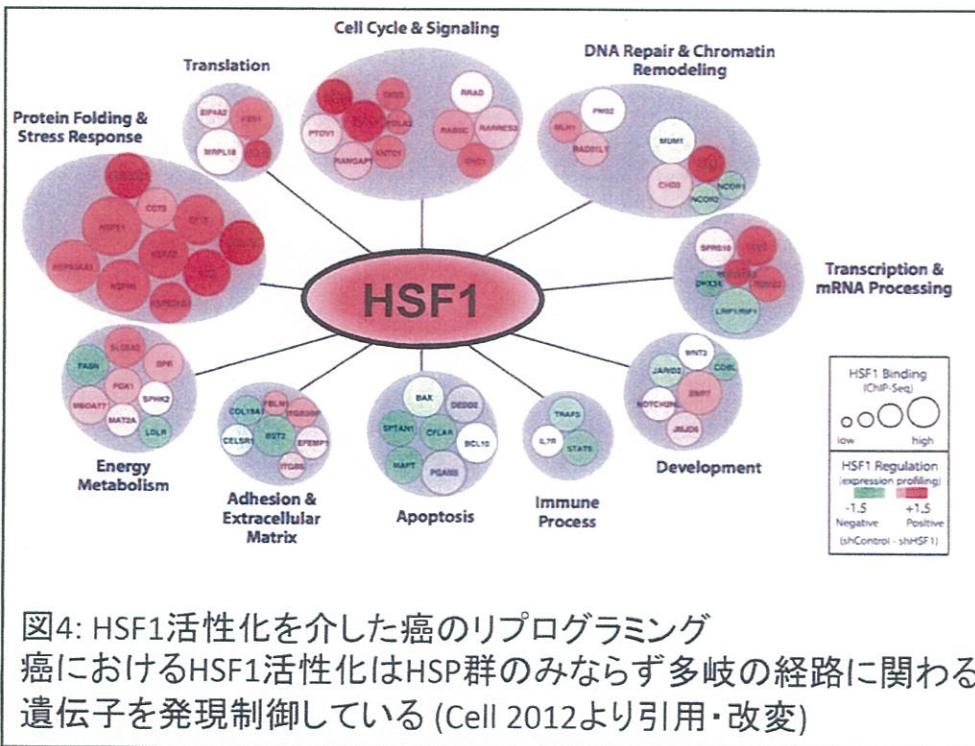
の同定及び機能解析を行い、癌における p53 経路の重要性を明らかにしてきた (Science 2000, Cell 2009, PNAS 2014, Sci Rep 2016 等)。IER5 は世界に先駆けて我々の研究室で同定した新規 p53 下流遺伝子である。IER5 は、タンパク質毒性による細胞内ストレスを回避するための代表的分子であるヒートショックプロテイン (HSP) 群のマスター リギュレーターである HSF1 を、今まで報告されていない低リン酸化状態にすることにより活性化する分子であること

を明らかにした（図1、2）。さらに、これまでに発がん・癌悪性化との関連が解明されていなかったIER5遺伝子が、種々の癌で正常組織と比較し癌部で発現亢進していること、また種々の癌細胞株を用いた足場非依存性増殖において、IER5発現抑制により有意に増殖が低下すること、さらに脳腫瘍、肺癌及び乳癌等の様々な癌種のデータセットで、IER5発現亢進群で有意に予後が悪いことが明らかとなった（図3）。以上をまとめると、興味深い事にIER5はp53の下流遺伝子にも関わらず種々の癌



で発現亢進しており、HSF1 を介したストレス防御機構を活性化させることで、転移成立や薬剤耐性の獲得など癌悪性化に寄与する分子である可能性が示唆された。

IER5 の下流分子である HSF1 の世界的な研究動向を記す。これまでに HSF1KO マウスの解析より HSF



1が発がん亢進に重要な役割を担っていることが知られていたが (Cell 2007, Cell Metab. 2011)、近年、ヒト臨床サンプルを用いた解析より、HSF1が種々の癌細胞で発現亢進し、ヒートショック時とは異なる転写プログラムにより癌進展に寄与することが明らかとされた

(Cell 2012, 図4)。これはすなわち HSF1 による転写制御は HSP のみならず、細胞周期、細胞接着や代謝に関連し癌進展に寄与する遺伝子が含まれていることになる。さらに、癌細胞のみならず、癌間質細胞での HSF1 活性化依存的な TGF β 及び SDF1 発現誘導も見出され、驚くべきことに肺及び乳癌の早期ステージですら、癌間質細胞での HSF1 発現亢進群で有意に再発リスクが高い事が明らかとなった (Cell 2014)。さらに、HSF1-Mek 経路による癌細胞内のタンパク質合成ストレス防御機構の同定 (Cell 2015)、mTORC1 安定化への関与 (Nat Cell Biol. 2016) 等、癌の恒常性維持において重要なシグナル経路とのクロストークが明らかにされつつある。一方で、ここまで HSF1 が注目されながら、癌細胞や癌間質細胞において HSF1 活性化を引き起こす上流の分子機序は未だ明らかにされていなかった。我々は、IER5 こそが HSF1 を上流から制御する分子だと考えている。また、現在世界中で HSF1 阻害剤の開発が精力的に進められているが、十分な効果が得られるものはまだ同定されていない。そのため、世界に先駆けて我々の研究室で同定・機能解析に成功した IER5 分子に対する分子標的治療薬を開発することで、IER5-HSF1 経路を標的にした治療薬開発で世界をリードできる可能性を秘めている。

そこで現在我々は、希少がんに焦点を絞り、IER5-HSF1 経路の重要性を明らかにしたいと考えている。

3) 実験方法

TCGA データベースを用いた各種希少がんにおける IER5 発現と予後の相関

cBioprotal (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE1210>)において、各種希少がんのデータセットを利用した（図5）。IER5 Z-score はいずれも EXP>0 で解析を行った。

Set lists	All Complete Tumor Numbers	Data sets
Bladder Urothelial Carcinoma (TCGA, Provisional)	126	mRNA Expression z-Scores (RNA Seq V2 RSEM)
Brain Lower Grade Glioma (TCGA, Provisional)	283	mRNA Expression z-Scores (RNA Seq V2 RSEM)
Glioblastoma Multiforme (TCGA, Provisional)	136	mRNA Expression z-Scores (RNA Seq V2 RSEM)
Ovarian Serous Cystadenocarcinoma (TCGA, Provisional)	182	mRNA Expression z-Scores (RNA Seq V2 RSEM)
Skin Cutaneous Melanoma (TCGA, Provisional)	287	mRNA Expression z-Scores (RNA Seq V2 RSEM)

図5: 解析に興じた各種TCGAデータセット
希少がんである上記5つのデータセットを用いて解析を行った。

CRISPR/Cas9 法を用いた IER5 knockout

マウス悪性黒色腫株 B16F10-luc G5 株を用いて IER5 遺伝子の knockout を試みた。

CRISPR gRNA Design tool を用いて PAM 配列 NGG に隣接する 20pb の配列を 3 セットデザインした。3 セットの oligo は制限酵素 FastDigest BbsI を用いて pX335ベクターにクローニング後、B16F10luc 細胞に Lipofectamine2000 を用いてトランスフェクション後、single cell cloning より subcloning を行った。得られた各クローンについて、cell lysate を用いて WB 法による IER5 蛋白質の発現を検討した。

肺転移能の検討

得られたB16F10luc IER5knockout クローンについて、C57BL/6J マウス、雄 7 週齢を用いて尾静脈より移植を行った。移植数は 5×10^5 cells/mouse とし、control 群及び IER5-KO 群各 6 匹ずつ行った。移植 3 週後に全匹の剖検を行い、肺転移巣について、実体顕微鏡を用いて黒色巣の評価を行った。

4) 結果

今回5種の希少がんデータセットにおいて、IER5 発現亢進群における生存曲線を解析した。その結果、いずれの癌種においても IER5 発現亢進群で非亢進群と比較し有意に予後が悪いことが明らかとなった（図6）。

List of dataset: Number of IER5 upregulated patients, P-value of OS curve

Bladder Urothelial Carcinoma: 47 cases, Logrank Test P-Value: 0.0406

Brain Lower Grade Glioma: 94 cases, Logrank Test P-Value: 1.05e-7

Glioblastoma Multiforme: 72 cases, Logrank Test P-Value: 0.0288

Ovarian Serous Cystadenocarcinoma: 90 cases, Logrank Test P-Value: 0.0130

Skin Cutaneous Melanoma: 97 cases, Logrank Test P-Value: 0.0364

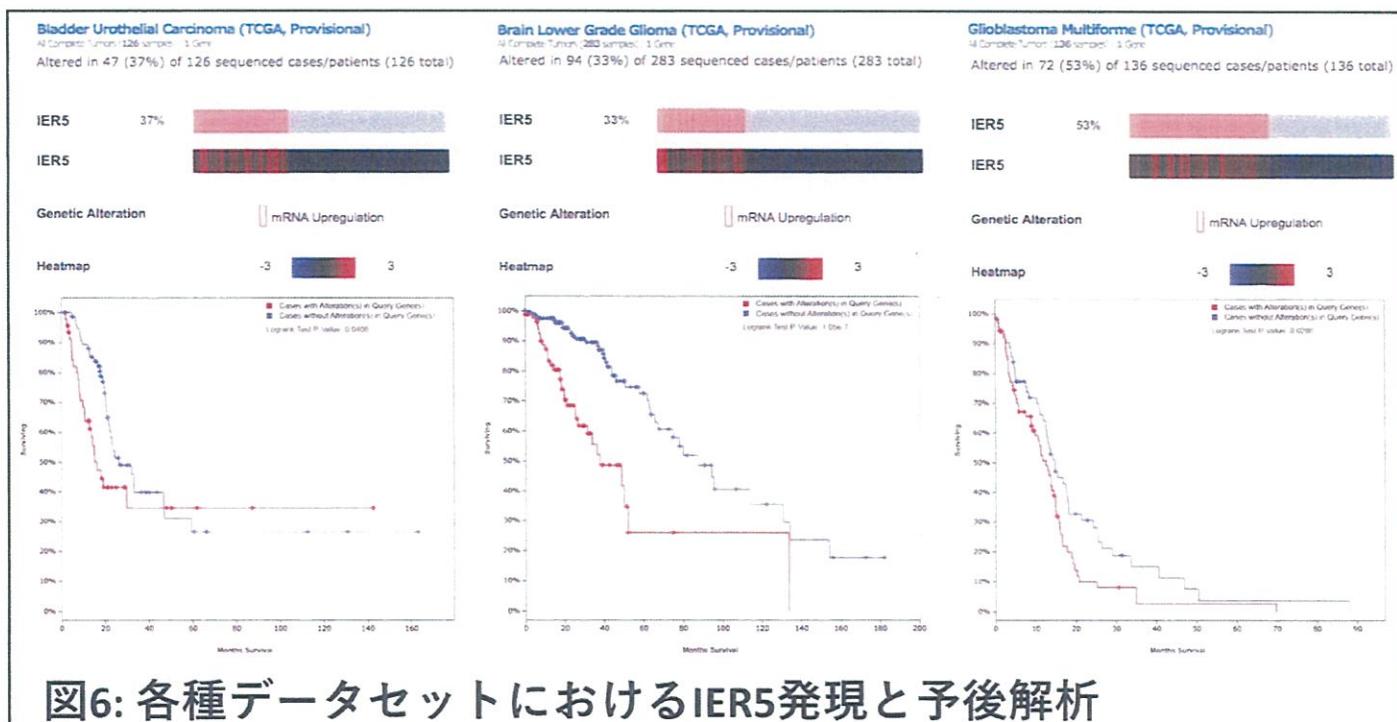
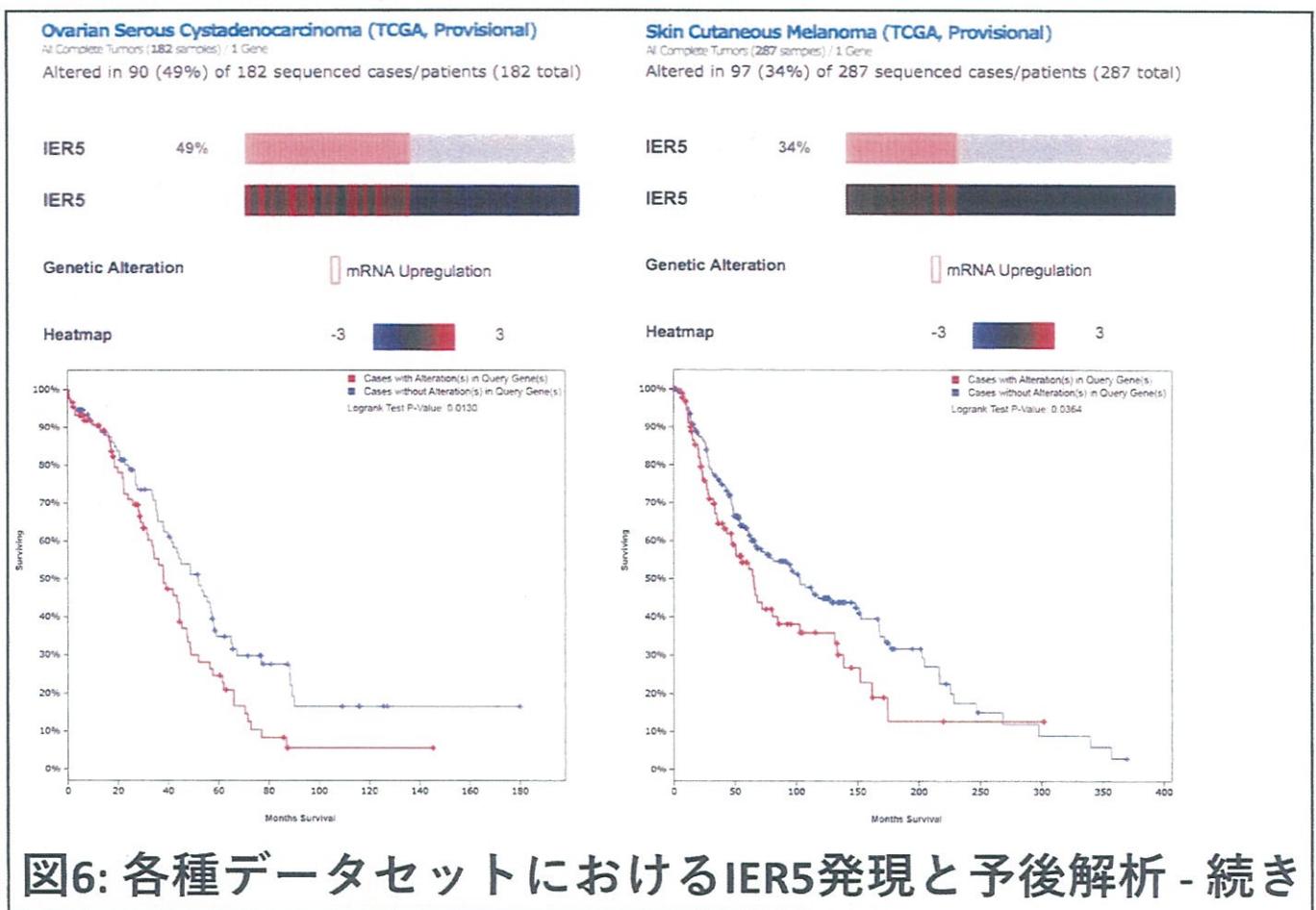


図6: 各種データセットにおけるIER5発現と予後解析

そこで有意な差が見られた悪性黒色腫に着目した。

同種移植が可能であることが知られているマウス悪性黒色腫株B16F10luc を用いてCRISPR/Cas9 systemによる IER5 の knockout を行った結果、蛋白質レベルにおいて IER5 の knockout が観察され、IER5 欠損亜株の作成に成功した (data not shown)。そこで、本 knockout 株と対照株を用いて野生型 C57BL/6J マウスを用いた尾静脈移植-肺転移系を用いて肺転移に対して評価した所、対照群と比較して IER5 knockout 群で有意に転移が抑制された (data not shown)。

以上の結果より、希少がんにおける IER5 発現が予後に影響すること、また悪性黒色腫において IER5 が転移成立に寄与している可能性が示唆された。

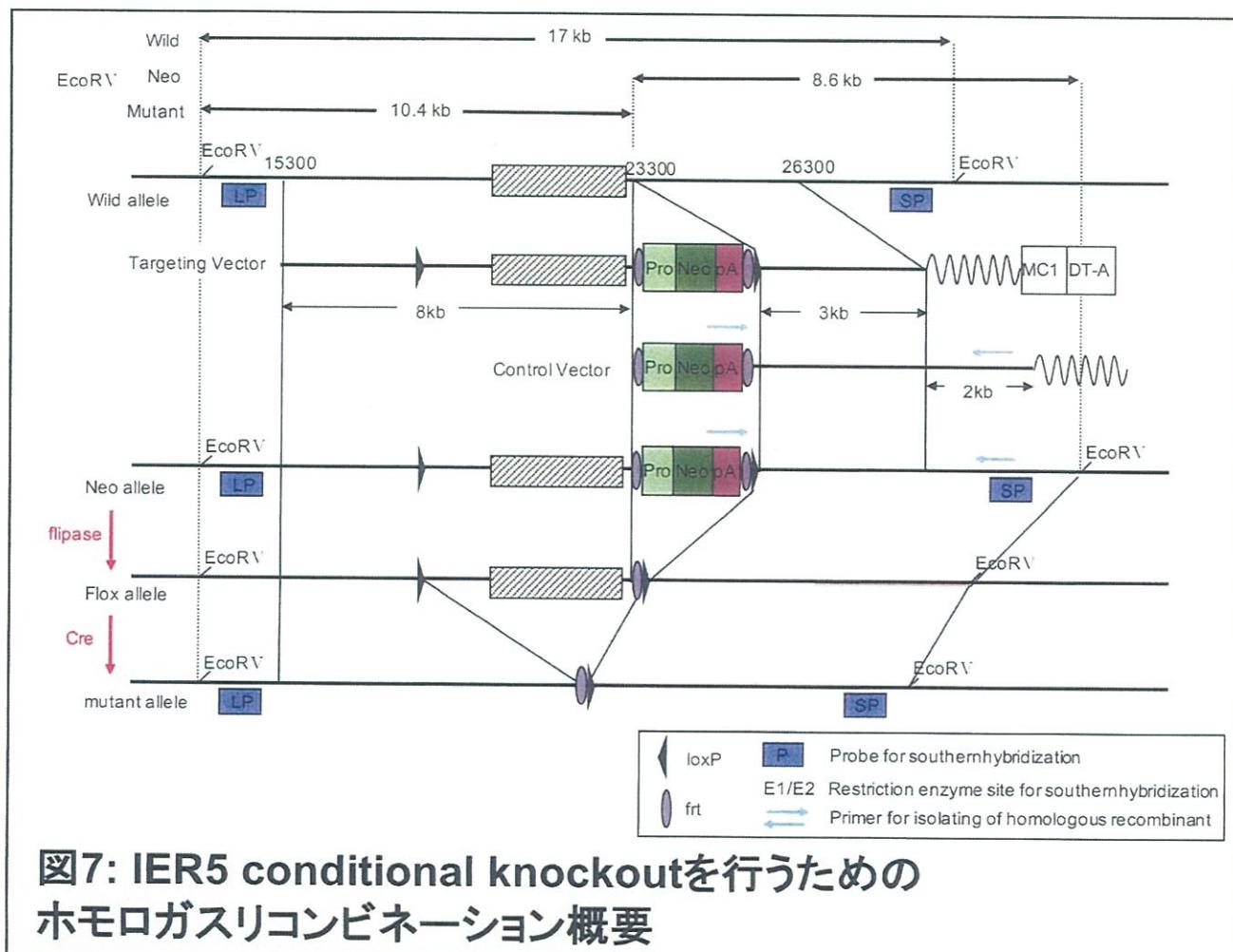


5) 考察

文部科学大臣、厚生労働大臣、経済産業大臣は、「がん対策推進基本計画」に基づき、平成26年度からの「がん研究10か年戦略」を定め、3省が一体となり日本における癌研究戦略を推進しているが、新規対策課題として、希少がんに関する研究戦略を重要視している。毎年の病気の発生率が人口10万人あたり6人未満と規定される希少がんは、適応外薬や未承認薬の実用化研究を含む、民間主導の研究開発が進みにくく、治療薬開発やバイオマーカー開発が5大がんと比較し、大きな遅れを取っている。

国立がん研究センターでは、本年4月から中釜新理事長の元、アンメットメディカルニーズである希少がんの各種課題解決のための研究を強化することを発表した。

希少がんの多くはp53遺伝子が野生型であり、変異は稀である。そのことから、希少がん材料では野生型p53が機能し、p53標的遺伝子が発現していると考えられる。そのため、希少がん材料においてp53標的遺伝子であり、かつがん促進因子であるIER5は、がん悪性化を助ける形で機能している可能性が高いと我々は考えた。



本年度の研究助成のおかげで希少がん材料における IER5 を介したがん悪性化機構の一端が明らかとなった。次年度はさらに研究を加速させ、がん悪性化促進機構をより詳細に解明したいと考えている。

現在、上記研究と並行し、

- 1, IER5 conditional knockout 及び IER5 knockout マウスの開発（図 7）
- 2, IER5 結合蛋白質の網羅的解析（図 8）
- 3, IER5 変異体を用いた機能ドメイン解析

を並行して行なっている。

次年度の個体レベルの解析目標として：

IER5KO マウスを用いて、マウスの全身諸臓器におけるホメオスタシスの維持に IER5 がどのように関わっているのかについて検討し、IER5 の欠損 (genotype) と疾患発症 (phenotype) をつなぐことで、IER5 のがんにおける機能に対してさらに考察したい。加えて、IER5CKO マウスが開発できたことより各種希少がん Gene engineering mouse (GEM) モデルを利用した個体レベルでの希少がん発症における IER5 の役割についても着目したいと考えている。

次年度の分子レベルの解析目標として：

IER5 に対する種々の変異体をすでに作成している。これらの変異体ベクターを利用し、Silac 法を利用した Proteome 解析を行うことで IER5 の各種ドメインに結合する蛋白質を網羅的に明らかにすることで IER5 の HSF1 活性化における翻訳後修飾および共因子のリクルートを含めた活性化制御機構をさらに追求したいと考えている。

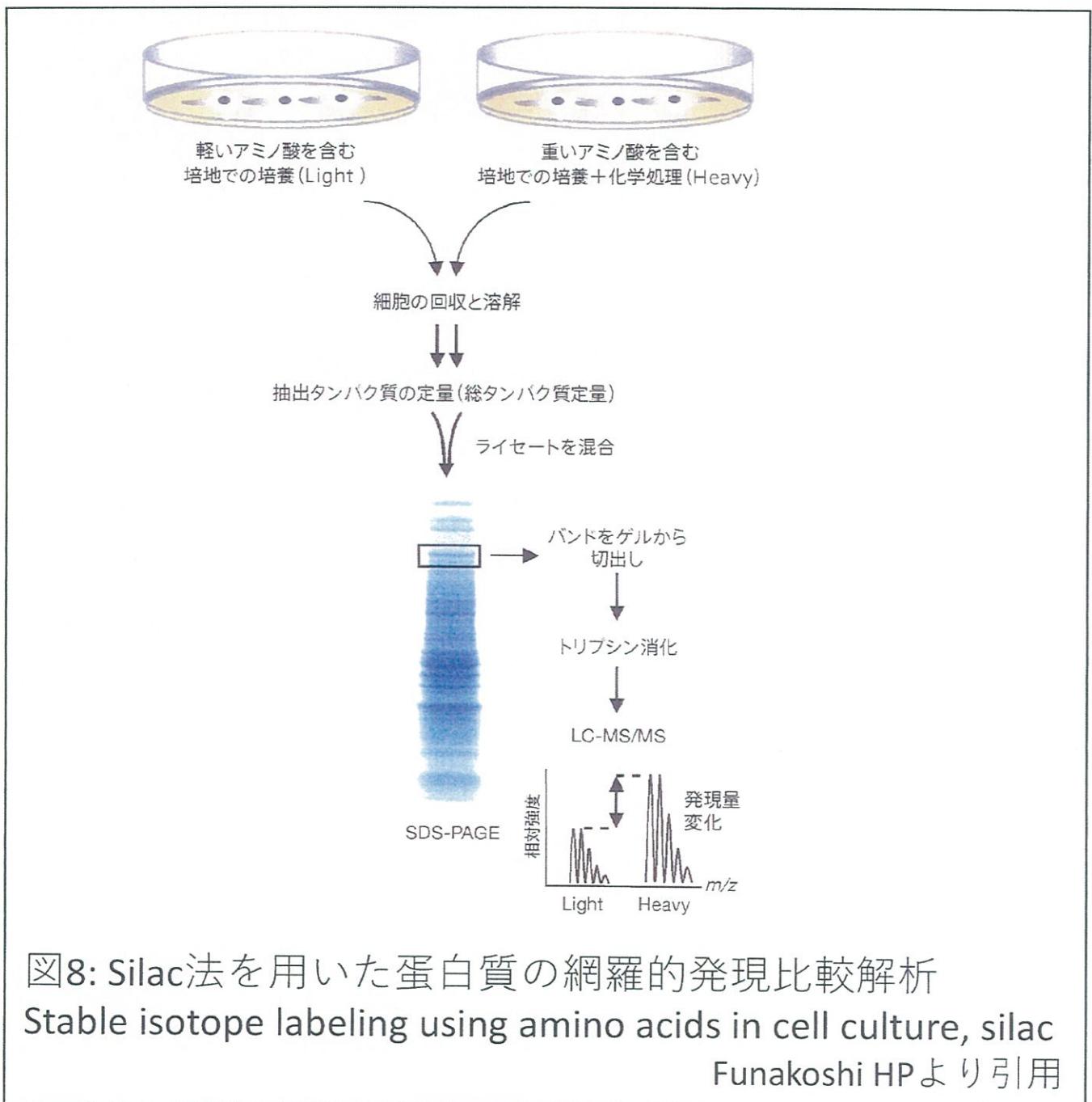


図8: Silac法を用いた蛋白質の網羅的発現比較解析
 Stable isotope labeling using amino acids in cell culture, silac
 Funakoshi HPより引用

(2) シニア・リサーチフェロー期間中の研究成果を、今後の研究に
どのように役立てたいと考えているか

がんは変異や転座を含む遺伝子異常に起因し発症する疾患である。

ヒトのゲノムの全塩基配列を解析するプロジェクトであるヒトゲノム計画が2003年に完了して以来、さまざまな疾患においてヒトゲノムが解読されてきた。がんにおいても疾患特異的ゲノム解析は潮流となり、近年まで急速に大規模な疾患特異的ゲノム異常の情報が蓄積されてきた。その成果として数多くのがん遺伝子、がん抑制遺伝子、及び新たな融合遺伝子が同定され、その一部は治療標的としての価値が見出され治療薬創出に貢献した。また現在も数多くのゲノムプロジェクトが国際的に継続・進展している。

ゲノム異常は不可逆的でかつ蓄積していく性質を有することから、現在国立がん研究センターが推進する個別化医療に代表されるように、ゲノムは「解析」する対象から、医療に「利用」できるものへと変遷を遂げている。

1958年にフランシスクリックが提唱したセントラルドグマは分子生物学における根本的概念であり、細菌からヒトにかけて、原核生物・真核生物に共通する基本原理である。実際に生体内でホメオスタシスに寄与する最終機能分子は遺伝子ではなく蛋白質である。さらに言えば、糖鎖やリン酸基等により高次修飾された蛋白質である。これらの細胞内での局在や機能はゲノム情報からのみでは完全に推察することが困難であり、今後新たな医療に貢献する基礎研究課題として蛋白質レベルでの疾患のバイオロジーを解くことは極めて重要だと考えている。

本シニアリサーチフェロー期間の研究を通じて、指導教官の大木から、蛋白質-蛋白質相互作用の重要性を学んでいる。

研究対象の IER5 蛋白質の発現亢進は、HSF1 の mRNA 発現レベルに影響を与えないが、HSF1 蛋白質が転写活性化する過程でのみその機能を亢進させる。すなわち、HSF1 はゲノム情報のみでは活性化を評価することは困難な分子である。本研究を通じて大木が長年にわたる p53 研究から学んだ分子研究に対する温故知新について学び、ゲノムを含む多層性オミクス解析からカタログ化された疾患臨床データの統合解析と双極を担う基礎研究を行える研究者として精進したいと考えている。加えて、本研究の将来展望として希少がんを含む HSF1 が活性化している癌種を対象にした新規 HSF1 阻害剤の開発を通じて臨床に貢献することを強く願っている。

本年度からシニアリサーチフェローに採用頂き、さらに研究を発展させるため、研究費申請を行つてきたが、悪性黒色腫病態進展における IER5-HSF1 経路の機能解析での表題で文部科学省科研費基盤 C H29-31 に研究代表者として採択いただいた。研究のみならずさらなる研究費獲得も視野にいれ、シニアリサーチフェローとしての研究期間を全うしたい。