



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（薬科学）
報告番号	甲第 1503 号
学位記番号	第 309 号
氏名	宮嶋 ちはる
授与年月日	平成 27 年 7 月 27 日
学位論文の題名	細胞がん化と免疫反応におけるスキャフォールドタンパク質 TRB1 の生理機能の解析
論文審査担当者	主査： 平嶋 尚英 副査： 林 秀敏，服部 光治，長田 茂宏，井上 靖道

学位論文内容要旨

細胞がん化と免疫反応における スキャフォールドタンパク質 TRB1 の生理機能の解析

宮嶋 ちはる

【序論】

TRBs は *Drosophila* の発生や増殖を制御する Tribbles の哺乳類におけるオルソログであり TRB1、TRB2、TRB3 の 3 種類が存在する。キナーゼと似た構造をしているが、キナーゼとしての活性に必要な ATP 結合ドメインを欠くため pseudokinase として捉えられている。TRBs は主にスキャフォールドタンパク質として、ユビキチン・プロテアソームによるタンパク質分解やキナーゼ活性を制御した細胞内シグナル伝達を制御し、細胞の増殖や分化に関与することが示唆されている。TRB ファミリー分子の中でも、TRB1 は脂質代謝への関与が知られるなど生活習慣病と深く関与する一方で、がんとも密接に関係することが明らかにされつつある。特に、骨髄系のがん遺伝子として注目され、Mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路ならびに CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) 経路の制御を介した白血病の発症制御についての研究が進んでいる。また、前立腺がんにおいて、TRB1 が小胞体ストレスを制御し前立腺がんの生育に関与することや、高い造腫瘍能を持つ腫瘍源細胞の維持に関与することが示唆されている。一方で、他の固形がんにおける細胞がん化の制御やがんにおける TRB1 の生理機能はまだ明らかにされていない点も多い。そこで本研究では、細胞がん化における TRB1 の生理機能の解明を目指し研究を進めた。

また TRB ファミリーは脾臓、リンパ節、胸腺などの免疫系組織において発現が高いことが知られている。中でも、TRB1 はリンパ球などの免疫細胞において高発現することが明らかになっている。現在までに、TRB1 と、免疫応答を負に制御する制御性 T 細胞の分化や機能の主要な調節因子である Foxp3 との相互作用が明らかになり、TRB1 が免疫応答に何らかの作用を及ぼすことが示唆されている。しかしながら、免疫応答における TRB1 の機能や発現制御に関してはほとんど報告されていない。当研究室では、抗原提示を模倣した phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) と ionomycin (PMA/Io) 処理において、TRB ファミリーのうち TRB1 の mRNA のみが強く誘導されることを明らかにしている (Fig 7A)。本研究では、機能解析が比較的進んでいない TRB1 の免疫応答における機能、ならびにその発現制御に関しても解析を進めた。

【本論】

1 TRB1 による p53 活性制御機構の解明

ヒト乳がん細胞株 MCF7 に siRNA を用いて TRB1 をノックダウンさせると、著しく細胞増殖が損なわれることをすでに見出していた。そこで、細胞周期を制御する分子群の発現を調べたところ、サイクリン依存性キナーゼインヒビターである p21 の発現が TRB1 ノックダウンで著しく上昇していた (Fig1A, B)。p21 はがん抑制遺伝子 p53 の標的遺伝子の一つとしてよく知られている。そこで、低濃度のアクチノマイシン D (Act D) で p53 を活性化させて調べたところ、TRB1 ノックダウンで Act D による p21 ならびに p53 の別の標的として知られている MDM2 の発現誘導の増強が見られた。そこで、TRB1 ノックダウンによる p21 の Act D による誘導の増強が p53 を介したのか検討するため、p53 を同時にノックダウンさせて検討したところ、TRB1 ノックダウンによる p21 発現誘導はキャンセルされたことから、TRB1 は p53 を介して p21 の発現を抑制していることが明らかになった (Fig 1A, B)。次に、p21 のプロモーターを含むレポータープラスミドを用いて、p53 の転写活性化能に対する TRB1 の影響を検討したところ、p53 の活性は、TRB1 の発現により抑制されることがわかった (Fig 1C)。以上のことから、TRB1 は p53 の転写活性化を負に制御し、p21 の発現を抑制することが考えられた。

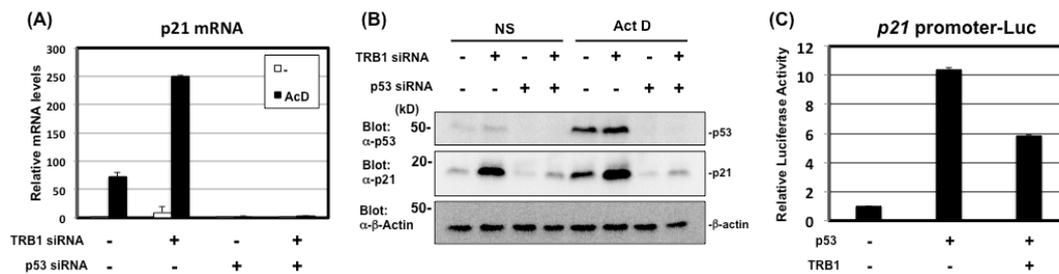


Figure.1 TRB1 suppresses the transactivation ability of p53

(A) MCF7 cells were transfected with the indicated siRNAs and treated with vehicle or 2 nM Act D for 8 h. p21 mRNA levels were analyzed by quantitative real-time PCR and normalized to the *HPRT1* mRNA levels. (B) MCF7 were transfected with the indicated siRNAs and treated with vehicle or 5 nM Act D for 8 hours. The cell lysates were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. (C) H1299 cells were transiently transfected with WWP-Luc (including p21 promoter), pCMV- β -gal and the expression plasmid for TRB1. After 24 hours, the luciferase activity was measured. Luciferase activity was normalized to β -galactosidase activity. Relative activities were shown as mean \pm SD.

p53 の活性化は、p53 のタンパク発現レベルや DNA 結合能、細胞内における局在等により制御されている。まず、p53 のタンパク発現量について調べたが、TRB1 はほとんど影響しなかった。そこで、p53 の DNA 結合能に対する TRB1 の影響についてクロマチン免疫沈降法を用いて検討した。Act D 存在下及び非存在下共に、p21 並びに MDM2 のプロモーターへの p53 の結合は、TRB1 ノックダウンにより増強されていた (Fig 2A)。p53 タンパクは様々な翻訳後修飾を受けてその活性を変化させることが知られ、その中でも p53 のアセチル化は、その DNA 結合能を高めることが知られている。

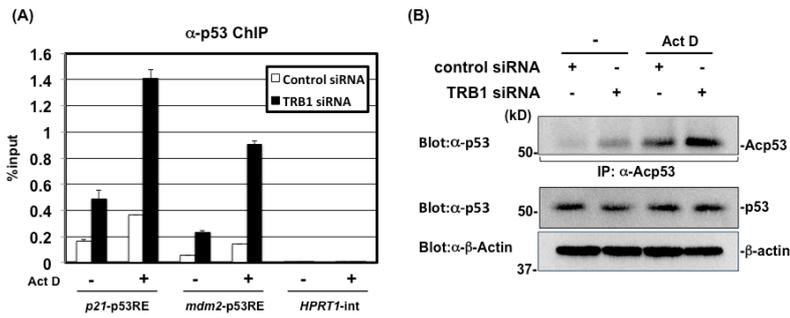


Figure.2 TRB1 knockdown promotes the acetylation of p53 and enhances the DNA binding activity of p53
 (A) MCF7 cells were transfected with the indicated siRNAs and treated with vehicle or 2 nM Act D for 8h. ChIP was performed using an anti-p53 antibody, and quantitative real-time PCR was performed for the indicated promoters. (B) MCF7 cells were transfected the indicated siRNAs and treated with vehicle or 2 nM Act D for 8 hours. The levels of acetylated p53 were determined by immunoprecipitation with an anti-acetylated p53 antibody (IP: a-Acp53) and then Western blotting with an anti-p53 antibody.

そこで、p53のアセチル化にTRB1が影響を及ぼすか検討したところ、TRB1ノックダウンによりp53のアセチル化が促進され (Fig 2B)、逆にTRB1の過剰発現でp53のアセチル化の

減少が見られた。以上の結果から、TRB1はp53のアセチル化を抑制し、p53のDNA結合能を低下させることが明らかになり、TRB1はがん抑制遺伝子p53の活性を抑制することで細胞がん化に関与することが考えられた (Fig 3)。

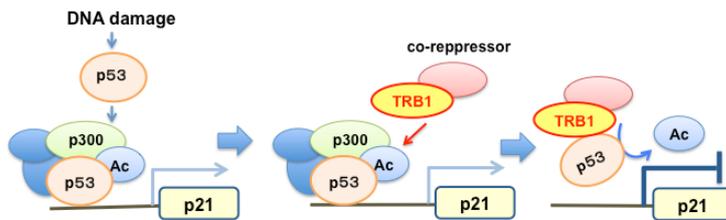


Figure.3 Schematic representation of a mechanistic model for TRB1-mediated repression of p53

2 ゲノム編集を用いたTRB1の細胞がん化における機能解析

分子生物学の研究において汎用される small RNA は特定の分子機能を解析する上で非常に有用であり研究の発展に大きく貢献してきたが、siRNA や shRNA による遺伝子発現制御は標的遺伝子の発現を完全に抑制することはできない。そこで、遺伝子をゲノムレベルで不活性化する Clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated 9 (Cas9) システムと呼ばれる新規のゲノム編集法を用い、MCF7におけるTRB1ノックアウト(KO)細胞株の作成を行った。ごく最近、前立腺がんにおいて、TRB1ががん細胞の増殖とがん幹細胞の維持に影響することが報告されたことから、まず樹立したMCF7-TRB1 KO細胞の増殖

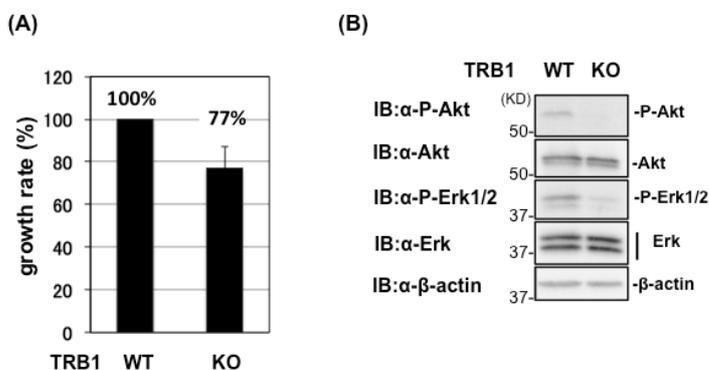


Figure.4 TRB1 knockout suppresses phosphorylation of Akt and Erk and reduces cell growth
 (A) The cell growth of MCF7 cells and MCF7-TRB1 KO cells were measured by crystal violet staining. (B) MCF7 cells and MCF7-TRB1 KO cells lysates were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies.

、MCF7におけるTRB1ノックアウト(KO)細胞株の作成を行った。ごく最近、前立腺がんにおいて、TRB1ががん細胞の増殖とがん幹細胞の維持に影響することが報告されたことから、まず樹立したMCF7-TRB1 KO細胞の増殖

能を親株と比較検討した。平面培養では、TRB1 KO 細胞の増殖速度は、親株に比べおよそ 4 分の 3 に低下しており、MCF7 細胞においても TRB1 ががん細胞の増殖や生存に寄与することが明らかとなった (Fig 4A)。TRB1 は、MEK1/2 を介した MAPK 経路の活性化や AKT のシグナルに関与し、細胞増殖を制御することが示唆されている。そこで、MCF7-TRB1 KO 細胞における Erk 及び Akt のリン酸化レベルを検討したところ、親株に比べ Erk、Akt ともにリン酸化が抑制されていた (Fig 4B)。以上の結果から、TRB1 は MAPK 経路ならびに AKT 経路を活性化することにより、乳がん細胞の生存・増殖に寄与することが考えられた。

近年、がん患者の予後にはがん細胞の薬剤耐性が大きく影響することが明らかにされている。がん細胞の薬剤耐性メカニズムには様々な機構の存在が知られ、MAPK 経路や AKT 経路の関与も報告されている。そこで、TRB1 KO 細胞における種々の抗がん剤に対する抵抗性を検討した。親株に比べて TRB1 KO 細胞では、程度こそ様々であるが、作用点の異なる多くの薬剤において薬剤抵抗性の低下が観察された (Fig 5)。以上の結果から TRB1 のがん細胞における発現は薬剤抵抗性に対し一助を担っていることが示唆された。

次に、TRB1 は乳がん細胞においてもがん幹細胞の維持に関与する可能性について検討した。正常組織において、細胞は規則正しく整列し秩序だった分化を示す一方で、がん組織におけるがん幹細胞は、自己複製能と多分化能を有し無秩序な増殖によってスフェロイドを形成する。TRB1 のスフェロイド形成能に対する影響を、3 次元培養において検討したところ、親株に比べ TRB1 KO 細胞のスフェロイド形成能の低下が観察された (Fig 6A)。TRB1 が乳がん幹細胞の維持に関与することが示唆されたため、いくつかのがん幹細胞マーカーの発現について検討したところ、TRB1 KO 細胞において代表

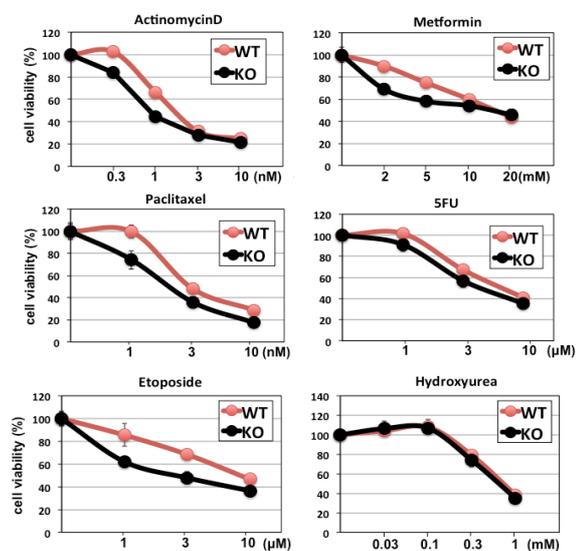


Figure.5 TRB1 knockout reduces drug resistance
MCF7 cells and MCF7-TRB1 KO cells were treated with indicated drugs. After 72h, the percentage of adherent cells was measured by crystal violet staining.

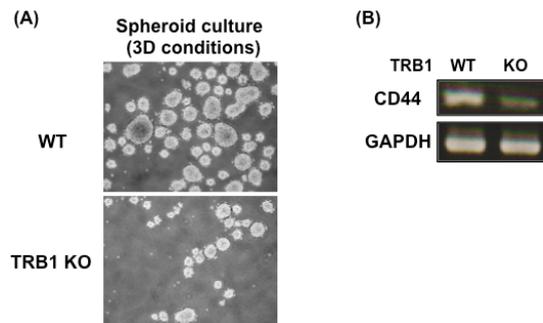


Figure.6 TRB1 knockout decrease the expression of CD44 mRNA and suppresses spheroids formations in the breast cancer.
(A), Morphologies of MCF7 cells and MCF7-TRB1 KO cells under spheroid(3D) culture conditions. (B), MCF7 cells and MCF7-TRB1 KO cells were lysed ,and RNA was purified from each sample .Expression of each gene was determined by semi-quantitative PCR.

的な乳がん幹細胞のマーカーの一つである CD44 の mRNA 発現が抑制された (Fig 6B)。以上の結果から、TRB1 は乳がん細胞において、がん幹細胞の維持にも関与することが示唆された。CD44 は MAPK 経路により、その発現が制御されることが報告されていることから、TRB1 は MAPK 経路ならびに AKT 経路の活性化、または直接的に CD44 の転写活性化を制御することで、乳がんにおけるがん幹細胞の機能維持に寄与することが示唆された。

3 IL-2 発現に対する TRB1 の正の制御機構

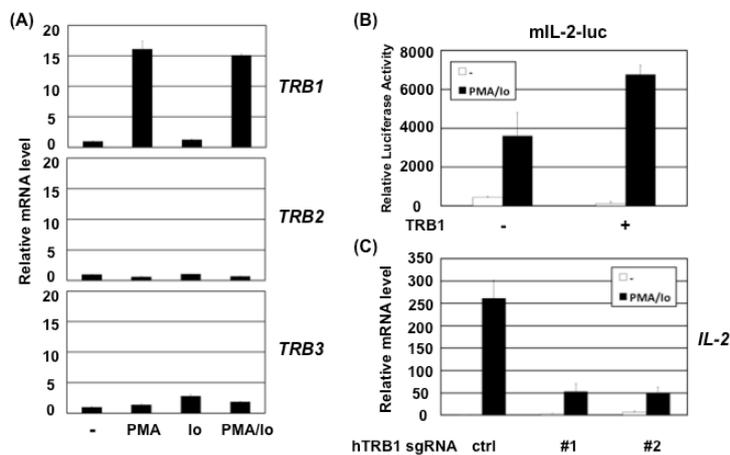


Figure.7 TRB1 induces expression of IL-2 mRNA by activating transcription. (A), Jurkat cells were treated for 6 hours with vehicle, 40 nM PMA and/or 1 mM Ionomycin (Io). Total RNA was extracted and real-time PCR was performed. The expression level of TRB1, TRB2 or TRB3 mRNA was normalized to the expression level of GAPDH mRNA. Results were shown as mean \pm SD. (B), Jurkat cells were transiently transfected with mIL-2-Luc (-303/+45), pCMV- β -gal and the expression plasmid for TRB1. After 24 hours cells were treated with vehicle or 40 nM PMA/1 mM Io for 6 hours and cells were lysed. Luciferase activity was normalized to β -galactosidase activity. Relative to Results were shown as mean \pm SD. (C), Total RNA was extracted from Jurkat cells stably expressing both Cas9 and *hTRB1* gRNA (#1, and #2) or control Jurkat cells stably expressing Cas9 and real-time PCR was performed. The expression level of IL-2 mRNA was normalized as in (A). Cells were treated with vehicle or 40 nM PMA/1 mM Io for 6 hours and total RNA was extracted. Results were shown as mean \pm SD.

発現に特異的な上昇が見られた (Fig 7A)。そこで、同じく抗原提示により上昇する IL-2 のプロモーター活性化に対する TRB1 の影響について検討した。抗原提示の際の IL-2 の発現誘導は主に、Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) という転写因子によって制御されているため、NFAT の結合サイトを有する IL-2 プロモーター(-303 ~ +45) を含むレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った。Jurkat 細胞において、PMA/Io 処理により上昇する IL-2 のプロモーター活性を、TRB1 がさらに上昇させることがわかった (Fig 7B)。また、CRISPR/Cas9 システムを用いて Jurkat

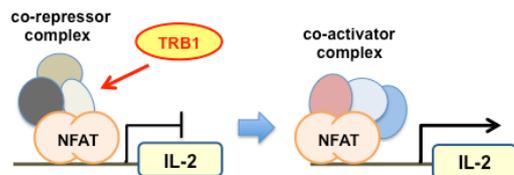


Figure.8 Schematic representation of a mechanistic model for TRB1-mediated expression of IL-2

T 細胞が抗原刺激を受けると免疫増強性のサイトカインであるインターロイキン 2 (IL-2) などの産生が亢進する。IL-2 は免疫細胞の分化や増殖、活性化に働き、免疫反応の正の制御において中心的な役割を果たしている。

まず、ヒト白血病 T 細胞株 Jurkat 細胞に抗原提示を模倣した刺激 (PMA/Io) を加えたところ、TRB ファミリー分子の中でも、TRB1 の mRNA

細胞における TRB1 KO 細胞株を樹立し、IL-2 の発現に対する TRB1 KO の影響を検討した。PMA/Io 処理により誘導された IL-2 mRNA は、Jurkat-TRB1 KO 細胞で

は親株に比べ、その発現の低下がみられた (Fig 7C)。以上の結果より、T 細胞が抗原提示により TRB1 の発現を上昇させ、IL-2 の転写活性化を促進していることが示唆された (Fig 8)。

【総括】

1. TRB1 は p53 のアセチル化を抑制し DNA 結合能を低下させることで、p53 の転写を抑制した。TRB1 はがん細胞において細胞増殖を制御する一つのメカニズムであると考えられる。
2. TRB1 は MAPK 経路や AKT 経路の活性化を介してがん細胞の増殖・生存に寄与していた。また、CD44 の発現に関与し、乳がん幹細胞の維持に寄与することが示唆された。
3. T 細胞において、TRB1 は抗原提示により発現が上昇し、T 細胞の IL-2 産生を誘導する免疫応答における正の制御因子であることが示唆された。

【基礎となる報文】

1. Chiharu Miyajima, Yasumichi Inoue and Hidetoshi Hayashi
Pseudokinase tribbles 1 (TRB1) negatively regulates tumor-suppressor activity of p53 through p53 deacetylation
Biol. Pharm. Bull., **38**(4), 2015, 618-624
2. Yasumichi Inoue*, Chiharu Miyajima*, Hiromi Iwanaka and Hidetoshi Hayashi
(* equally contribution)
TRB1 contributes to survival and proliferation in breast cancer stem cell through up-regulation of CD44 expression
(in preparation)
3. Chiharu Miyajima, Yuka Itoh, Yasumichi Inoue and Hidetoshi Hayashi
Positive regulation of interleukin-2 expression by a pseudokinase, Tribbles 1 in activated T cells
Biol. Pharm. Bull., **38**(8), 2015, 1126-1133