

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860965

研究課題名(和文) HSP90 シャペロン機能発現に関わる新たな細胞質内脱アセチル化酵素の活性制御機構

研究課題名(英文) Regulation of cytoplasmic HDACs relating HSP90 protein

研究代表者

石川 雄一 (Ishikawa, Yuichi)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：20633142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：熱ショック蛋白質90(HSP90)は、ERBB2、AKT、RAF、BCR-ABLおよび変異型p53等腫瘍形成性シグナル蛋白質のコンフォーメーション成熟に重要な役割を担う蛋白質である。本研究では、Nucleus accumbens-associated protein 1 (NACC1)と脱ユビキチン化酵素cylindromatosis (CYLD)の相互作用の結果HSP90の蛋白質シャペロンに影響を与える可能性について検討したが、関与は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Heat shock protein 90 (HSP90) is a unique shaperon protein which ERBB2, AKT, RAF, BCR-ABL and mutant p53 proteins are client proteins controlling their conformational change. The present study could not demonstrated the direct interaction between nucleus accumbens-associated protein 1 (NACC1) and deubiquitinase, cylindromatosis (CYLD) resulting in downregulation HSP90 functions.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍学 HSP90 CYLD ERBB2 HSF1

1. 研究開始当初の背景

HDAC6 (histone deacetylase 6)は、細胞質内で標的分子の脱アセチル化を触媒するユニークな酵素であり、2つのデアセチラーゼドメイン (DAC1, 2)と、1つのユビキチン結合ドメインを持つ。HDAC6の基質蛋白質として細胞骨格分子である  $\alpha$ -tubulin や cortactin, 細胞接着/転写制御に関わる  $\beta$ -catenin に加えて、今回の研究テーマである分子シャペロン蛋白質 HSP90 が報告されている。

HDAC6 は HSP90 を脱アセチル化することで、そのシャペロン機能を正に制御しており、HDAC6 阻害により HSP90 のアセチル化が亢進するとそのシャペロンは失われる。HSP90 のクライアント蛋白質には、複数のがん関連分子(ERBB2/ AKT/ RAF/ BCR-ABL/ mutant p53)があり、さらに抗がん薬などのタンパク変性誘導型のストレス (Proteotoxic stress) による細胞死の観点からも、HSP90とHDAC6はがん治療の標的分子としても注目されている。

我々は、これまで悪性腫瘍で高発現する BTB/POZ family 蛋白質である NACC1 が、細胞質内で HDAC6 の脱アセチル化作用を加速させることを細胞生物学的に明らかにしてきた。特に細胞骨格関連分子である、微小管の  $\alpha$ -tubulin, および アクチンの重合に重要な役割を担う cortactin の脱アセチル化を誘導し、細胞運動・浸潤能に大きな影響を与える事を発表してきた。

しかし、NACC1 は核内で HDAC-3, -4, CoREST/Sim3 などと巨大な複合体を形成し、エピジェネティックな機序により標的遺伝子の転写抑制を行うことが推測されているものの、HDAC6 mRNA/蛋白質の発現自体には影響を与えなかった。NACC1 の HDAC6 脱アセチル化機構に対する分子機序は未解明であった。

そこで本研究では、HDAC6 の DAC ドメインに直接結合し、その機能を阻害する CYLD (cylindromatosis) 遺伝子産物に着目した。CYLD は家族性の皮膚腫瘍で変異の見つかる脱ユビキチン化酵素であり HDAC6 の機能を阻害することが最近になって報告された。NACC1 は CYLD の転写抑制効果により、各種クライアント蛋白質の機能に影響を与えている可能性がある(図1)。

本研究では、この作業仮説を元に、がん細胞の生物学的特性の形成に係わる NACC1 の役割の解明を試みた。

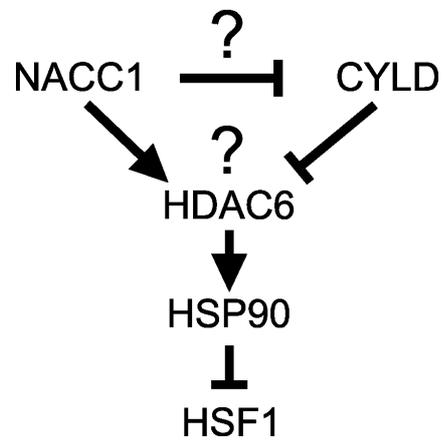


図1 : NACC1 の HDAC6 機能阻害仮説  
NACC1 は CYLD の転写を制御することあるいは直接作用により HDAC6 の機能を抑制している。

2. 研究の目的

本研究では、HDAC6 の機能発現に、NACC1 (nucleus accumbens associated 1) による CYLD (cylindromatosis) 遺伝子産物の転写制御が関与しているか検討する(図1)。

更に HSP90 クライアント蛋白質である heat shock factor 1 (HSF1) (図2) ならびに ERBB2 (図3) に着目し、腫瘍細胞の生物学的特性との関連を検討する。

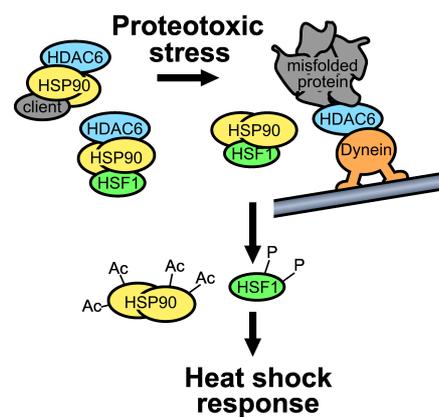


図2 : HSF1 に対する HSP90 のクライアント機能

HDAC6 の機能阻害は、HSP90 のアセチル化誘導し、HSF1 を解離させ下流のがん関連シャペロン分子の活性化を促す。

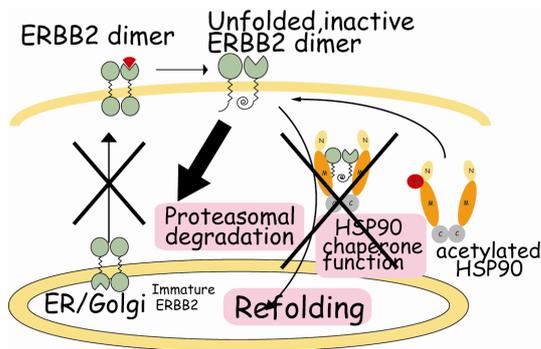


図3：ERBB2 発現に対する HSP90 のクライアント機能

NACC1/HDAC6 の抑制によってシャペロン機能を失った HSP90 では, ERBB2 の Golgi/小胞体系での再利用が行われず、プロテアソーム系で分解される。

### 3. 研究の方法

本研究は、1) 多種類の癌細胞株における NACC1 と CYLD の発現パターンと、HSF1 活性化および ERBB2 の発現・局在との関連の検討、ならびに 2) NACC1 の CYLD 転写制御に関する検討、3) NACC1 および CYLD 阻害による HDAC6/HSP90/HSF1 or ERBB2 複合体への影響の検討の 3 分野で行った。

#### (1) 細胞株と基礎検討

悪性黒色腫 (10), 乳癌 (4), 胃癌 (4), 大腸癌 (8), 膵癌 (4), 骨肉腫 (4), 膠芽腫 (6), を用い, NACC1, HDAC6, HSP90, CYLD, HSF1, HSP70, ERBB2 の mRNA/蛋白の発現パネル作成した。また, HSF1 応答配列をつないだレポータージーンアッセイも導入し評価した。HSP90 の阻害剤である geldanamycin および 26S proteasome の阻害剤である MG-132 を用いてタンパク質変性ストレスを誘導し, ストレス存在下・非存在下で HSP90 のアセチル化, HSF1 の活性化, および HSP70 の発現誘導を検出した。ポジティブコントロールとして, geldanamycin による HSP70 誘導はヒト大腸癌由来 Caco-2 細胞で確認した。

HSP90 のアセチル化に関しては免疫沈

降で HSP90 を精製し、アセチル化リジンに対する抗体で検出した。HSF1 の活性化に関してはリン酸化による SDS-PAGE 移動度のシフトと、核内への移行を免疫染色および細胞質・核分画により検出した。HSP70 の発現誘導は定量的 RT-PCR およびウェスタンブロットにより検出した。

#### (2) NACC1 阻害および過剰発現系による CYLD 発現制御に関する検討

NACC1 過剰発現株における siRNA 処理で CYLD 発現に関して解析した。また, CYLD のプロモーター領域をクローニングし, リポーターアッセイ (Promega) により転写抑制部位の決定ならびに ChIP assay でその領域への NACC1 の結合についても確認した。NACC1 tet-ON system (Clone tech) (MCF7) により CYLD の発現局在の変化が生じるか確認した。

#### (3) 分子 pathway での機能解析

ストレス存在下・非存在下で HDAC6/HSP90/HSF1 複合体との相互作用を免疫沈降により解析した。また, NACC1 および CYLD をノックダウンした場合の HDAC6/HSP90/HSF1 複合体への影響を免疫沈降法および HSP70 の RT-PCR とウェスタンブロットにより検出する。ERBB2 については, HSP90 との結合細胞内での局在確認を免疫染色し共焦点レーザー顕微鏡で確認する。

### 4. 研究成果

#### (1) NACC1 と CYLD の相互作用

研究方法の, (1) ならびに (2) においても, NACC1 の制御下では CYLD の動態には影響を与えなかった。この事は本研究の作業仮説上最も重要な部分であるが, direct な証明は得られなかった。

siRNA 処理により若干の CYLD の発現低下は認められた (図 4) が, プロモーター解析では NACC1 の直接的影響は確認できなかった。さらに, ChIP assay でもその事実は確認できなかった。

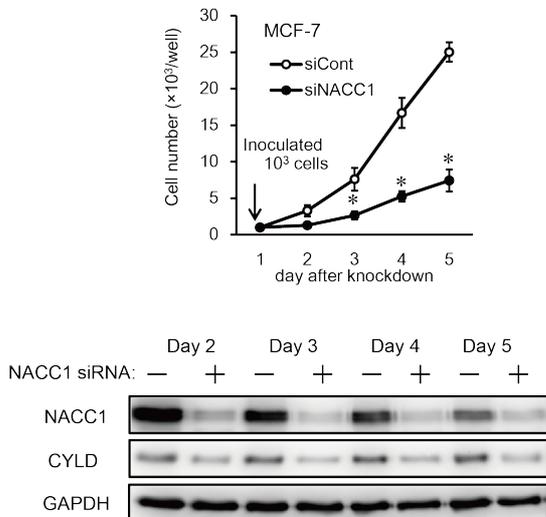


図4：siRNA 処理による CYLD の発現変化 若干の発現低下みとめられた。

免疫染色の結果でも核移行は確認されず，NACC1 から HDAC6 への作用は CYLD を迂回していることが考えられた。

### (3) 分子 pathway での解析。

NACC1 の発現抑制は乳癌細胞株において，劇的に ERRBB2 の発現を抑制した (図5)。

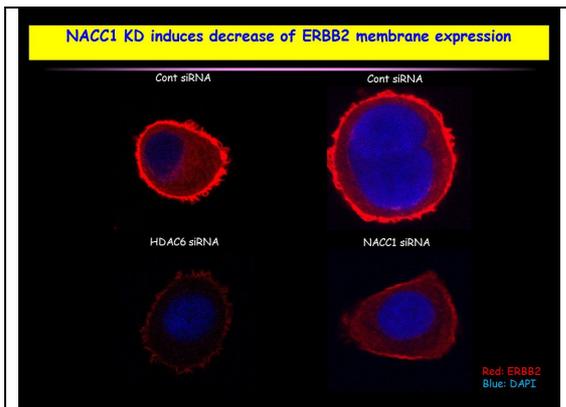


図5：NACC1 発現抑制(KDNACC1)で確認された ERBB2 の発現低下。

結果として乳癌培養細胞株で，トラスツマブの殺細胞効果を増強した (図6)。また，CYLD の発現には影響しないものの，HDAC6 の脱アセチル化効果は劇的に亢進し，NACC1 の HSP90 に与える影響は HDAC6 との interaction に関する直接効果によるものであることが明らかとなった。

NACC1 HDAC6 HSP90 ERBB2 の pathway による悪性腫瘍の悪性形質獲得の事象は新たな標的分子としての意義を持つと考えられるが，皮膚悪性腫瘍における CYLD の不活化の意義とは眷恋しないことが明らかとなった。

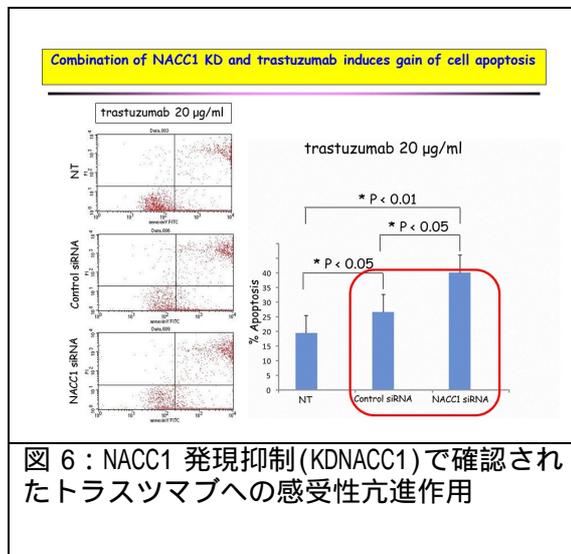


図6：NACC1 発現抑制(KDNACC1)で確認されたトラスツマブへの感受性亢進作用

### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

馬場 俊右, 大久保 絢香, 石川 雄二, 櫻井 英一, 佐藤 隆亮, 森 志朋, 高橋 和宏, 赤坂 俊英, 中村 浩昭. 成人 Still 病様症状を呈した乳癌の 1 例. 日本皮膚科学会雑誌 (0021-499X)125 巻 2 号 Page283(2015.02)

石川 雄一, 角田 加奈子, 大西 正純, 吉田 亜希, 渡部 大輔, 前田 文彦, 高橋 和宏, 赤坂 俊英. 脈絡膜悪性黒色腫の肝転移に対し、シスプラチン肝動注・肝動脈塞栓術後肝部分切除を施行した 1 例. Skin Surgery(0918-9688)22 巻 1 号 Page66(2013.01)

石川 雄一(岩手医科大学), 角田 加奈子, 大西 正純, 渡部 大輔, 吉田 亜希, 前田 文彦, 高橋 和宏, 赤坂 俊英, 福島 明宗. 隆起性皮膚線維肉腫に対する遺伝子診断の有用性. 日本皮膚科学会雑誌 (0021-499X)123 巻 2 号 Page159(2013.02)

石川 雄一(岩手医科大学 腫瘍生物学), 角田 加奈子, 柴崎 晶彦, 高橋 和宏, 赤坂 俊英, 増田 友之, 前沢 千早 . 悪性黒色腫における CYLD の発現抑制が細胞運動・増殖能獲得に与える影響 . 岩手医学雑誌 (0021-3284)64 巻 6 号 Page456-457(2013.02)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

石川 雄一 (Ishikawa, Uichi)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：20633142

##### (2) 研究分担者

なし( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

なし( )