

活性型がん遺伝子 BRAF による

ストレス適応応答制御機構の解明と治療への応用

Regulation Mechanisms of Stress Response by Oncogenic BRAF

平成 26 年度入学 永澤生久子 (Nagasawa, Ikuko)

指導教員 富田章弘

がんの発生はがん遺伝子の変化の集積に起因し、活性型がん遺伝子による細胞増殖シグナルの異常な活性化は現在のがん治療において重要な治療標的である。一方で、その後のがん細胞が微小環境ストレス下で増殖を維持するためには、積極的なストレス適応応答機構の活性化が重要である。従って、がん細胞のストレス適応応答を制御することは有用ながん治療法として期待されるが、その詳細な分子機序はあまり明らかにされていない。そこで本研究では、新たながん治療戦略の分子基盤として、がん遺伝子によるストレス適応応答の制御機構を明らかにすることを旨とし、治療標的として重要ながん遺伝子 BRAF と多様なストレスに応答する Integrated stress response (ISR) を結ぶ分子機序の解明を研究目的とした。

ISR は代謝ストレスやウイルス感染及びヘムの欠乏等、様々なストレスに対し活性化し、細胞のストレス適応に寄与する重要なストレス適応応答経路である。¹⁾ そ

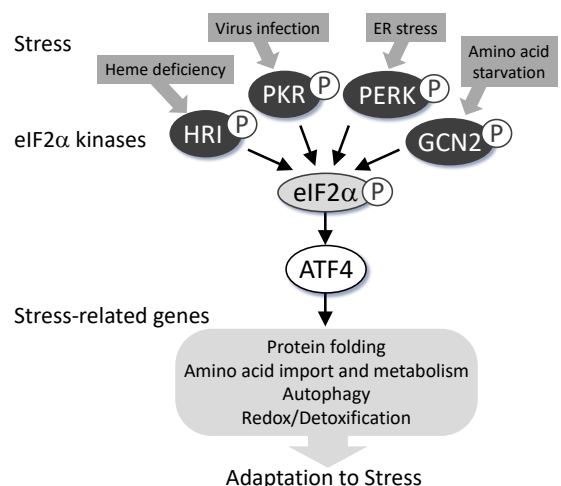


図1. Integrated Stress Response (ISR)

の基軸となるのは4種の eIF2 α キナーゼ (HRI, PKR, PERK または GCN2) の活性化, eIF2 α のリン酸化及び転写因子 ATF4 の発現誘導である (図 1). ATF4 によってアミノ酸代謝やタンパク質の折りたたみ, レドックス代謝等に関わるストレス関連遺伝子の転写が促進され, それらの働きによって細胞はストレス適応を果たす.

近年, 活性変異型 BRAF の選択的阻害剤である vemurafenib ががん細胞において ISR を活性化させることが報告された.²⁾ Vemurafenib は BRAF 変異型メラノーマ患者の治療において奏効率 60-80% の高い治療効果が報告されているが, 完全にがん細胞を死滅させることはできず, がん細胞の薬剤耐性化が課題となっている. このことから vemurafenib による ISR 活性化にも注目が集まり, その分子機序及び意義について議論されている. そこで本研究では, BRAF による ISR 制御機構の解明に向けて, はじめに vemurafenib による ISR 活性化機序の解析を行った. さらに, vemurafenib による ISR に対する選択的阻害剤の探索を行い, その有用性を評価した. 最後に, 活性変異型 BRAF の新たな機能として, ATF4 の発現を制御するメカニズムについて解析した.

1. BRAF 変異型がん細胞は GCN2 を介した ISR を活性化させることで vemurafenib の作用から細胞を防御する

Vemurafenib は活性変異型 BRAF (V600E) に高い選択性を有することから, vemurafenib による ISR 活性化と BRAF 変異との関係を検討した. BRAF 変異型メラノーマ細胞株において, vemurafenib は eIF2 α のリン酸化及び ATF4 発現を誘導したが, BRAF 野生型メラノーマ細胞株では vemurafenib によるそれらの誘導は弱かった. このことから vemurafenib は BRAF 変異型細胞

選択的に ISR 活性化を誘導することが示された。さらに，vemurafenib による ISR 活性化は，vemurafenib の主要な作用機序と考えられている MEK-ERK シグナル阻害とは独立して誘導されることを見出した。

次に，4 種の eIF2 α キナーゼをそれぞれ siRNA を用いてノックダウンした結果，vemurafenib による ISR 活性化は GCN2 のノックダウンによって阻害されることを見出した (図 2A)。また，vemurafenib 処理によって GCN2 活性化の指標となる Thr899 のリン酸化が誘導されることを確認した (図 2B)。さらに，GCN2 が細胞内のアミノ酸の枯渇を感知するストレスセンサー分子であることに一致して，vemurafenib による ISR 活性化の下流ではセリンの生合成及び代謝の応答が上昇することを見出した。なお，先行研究では小胞体ストレスを感知する PERK が vemurafenib による ISR に関与することが提唱されていたが，本研究において siRNA 及び阻害剤を用いて検討した条件では vemurafenib による PERK の活性化は認められなかった。

Vemurafenib による ISR 活性化が細胞増殖に与える影響について検討した結果，ATF4 のノックダウンによって vemurafenib の細胞増殖阻害効果が

増強されることを見出した (図 2C)。このことから，GCN2 を介した ATF4 発現の誘導は vemurafenib

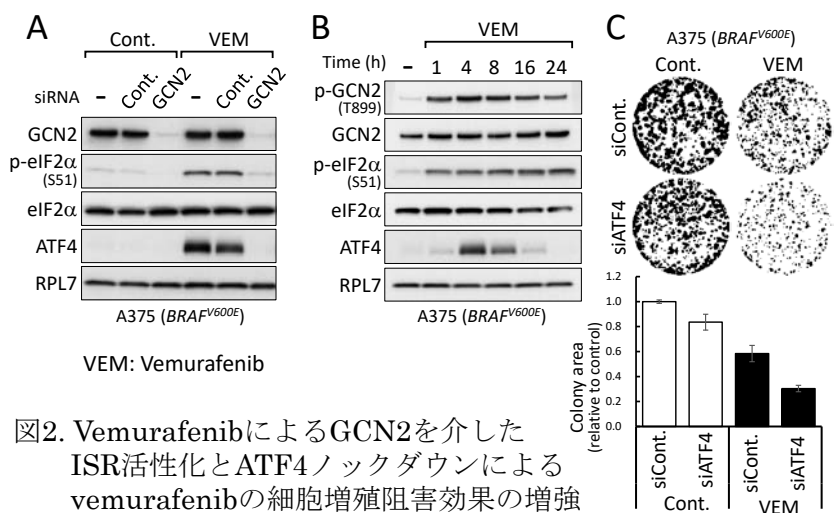


図2. VemurafenibによるGCN2を介したISR活性化とATF4ノックダウンによるvemurafenibの細胞増殖阻害効果の増強

の作用に対して細胞防御に働くことが示された。³⁾

2. Vemurafenib による ISR に対する選択的阻害剤の探索

次に vemurafenib による ISR を選択的に阻害する低分子化合物の探索を行った。具体的には、vemurafenib 処理によって誘導される ATF4 を蛍光免疫染色法により検出することで、355 種のキナーゼ阻害剤ライブラリーから vemurafenib による ATF4 発現誘導を抑制する阻害剤のスクリーニングを行った。その結果、強い ATF4 発現抑制作用を示した複数のキナーゼ阻害剤の中で、阻害剤 A が他のストレス処理による ATF4 発現には影響を与えず、vemurafenib 処理による ATF4 発現誘導のみを選択的に阻害することを見出した (図 3A)。阻害剤 A による ATF4 発現抑制作用は未だ同定されていない新たな作用機序によって発揮されるものと考えられた。遺伝子発現解析より、阻害剤 A は vemurafenib で誘導される細胞内のアミノ酸代謝の恒常性を維持するための応答を抑制することが示唆された。それに加えて、vemurafenib と阻害剤 A の共処理は、それぞれの単独処理に比べて相乗的にアポトーシスを誘導することで、強い細胞増殖阻害効果を示した (図 3B-3C)。以上より、阻害剤 A は vemurafenib による ISR 活性化及びその下流で

機能するアミノ酸代謝の応答を抑制し、vemurafenib と併用することによって相乗的な細胞死を導くことを明らかとした。

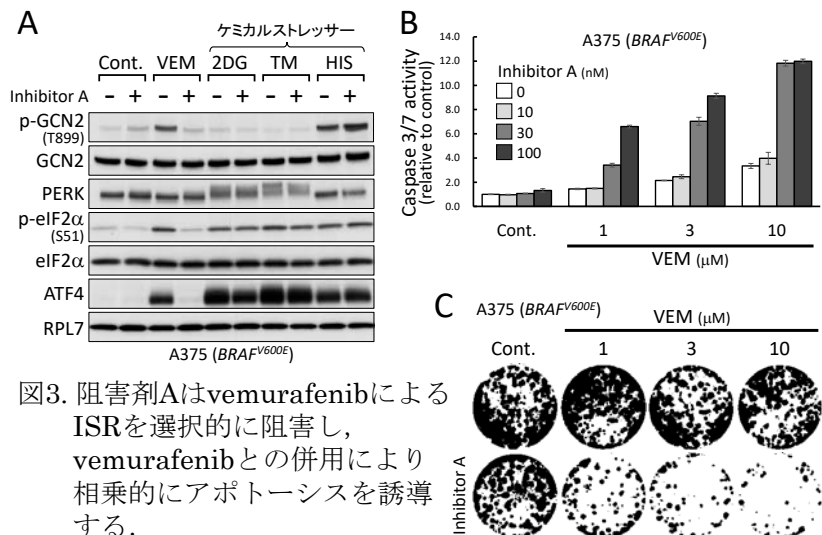


図3. 阻害剤AはvemurafenibによるISRを選択的に阻害し、vemurafenibとの併用により相乗的にアポトーシスを誘導する。

3. 活性変異型 BRAF は mTOR シグナルの活性制御を介して ATF4 発現誘導を制御する

これまでの結果より, vemurafenib の処理から 4 時間後に GCN2 を介した ATF4 の発現が誘導されるが, 24 時間後には ATF4 の発現誘導が抑えられることを見出した (図 2B). そこで次に, ノックダウンによる BRAF の機能阻害が ISR に与える影響について検討した. その結果, BRAF 変異型細胞株では, BRAF ノックダウンによって GCN2 を介した ATF4 発現が強く抑制された (図 4A). 一方で, PERK を介した ATF4 発現は部分的に抑制された. また, BRAF 野生型細胞株ではいずれのストレス条件下においても BRAF ノックダウンによる ATF4 発現への影響は認められなかった (図 4A). 次に, 我々は BRAF 変異型細胞株において, vemurafenib を 24 時間処理または BRAF をノックダウンすると mTOR シグナル及びその下流で働く翻訳開始因子の活性が低下することを見出した. これと合致して mTOR 阻害剤処理によって GCN2 を介した ATF4 発現誘導が強く抑制された (図 4B). さらにタンパク質の免疫沈降による検討より,

BRAF と mTOR 複合体 1 及び GCN2 間ではコンプレックスが形成され, BRAF-mTOR 間の相互作用は GCN2 が活性化するストレス条件下におい

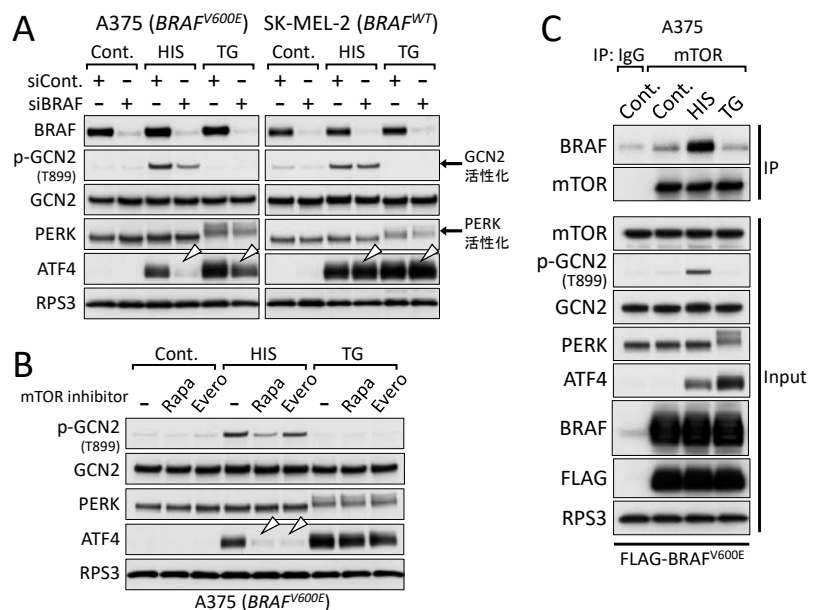


図4. 活性変異型BRAFはmTORシグナルを介して ATF4発現誘導を制御する.

て増加することを見出した(図 4C). 以上より, 活性変異型 BRAF による ISR 制御機構の一つとして, 活性変異型 BRAF は mTOR シグナルの制御を介して, GCN2 を介した ATF4 発現誘導を制御することを明らかとした.

総括

これまでに活性変異型 BRAF は増殖及び生存シグナルにおける役割について中心的に解析されてきたが, 本研究は活性変異型 BRAF が mTOR シグナルの制御を介して, ISR における ATF4 発現誘導を正に制御し, アミノ酸の不足等の代謝ストレスに対する適応応答にも重要な役割を果たすことを見出した. 興味深いことに, BRAF に対するキナーゼ阻害剤である vemurafenib は, 処理後 4 時間の時点では BRAF の増殖シグナルとストレス適応応答の二面性の機能を完全に阻害することはできず, かえって ISR 活性化を誘発すると考えられる. このような BRAF の二面性の機能は, がん治療の効果に影響を及ぼす可能性があり, 実際に我々は ISR の活性化が vemurafenib の作用に対し細胞防御に働くことを示した. その解決策の一つとして, vemurafenib と阻害剤 A の併用療法は BRAF の増殖シグナル及びストレス適応応答の両機能を抑制することによって合成致死に導く新しいがん治療法として期待できる.

参考文献

- 1) Harding H. P., Zhang Y., Zeng H., Novoa I., Lu P. D., Calton M., Sadri N., Yun C., Popko B., Paules R., Stojdl D. F., Bell J. C., Hettmann T., Leiden J. M., Ron D., *Mol. Cell*, **11**, 619-633 (2003).
- 2) Ma X. H., Piao S. F., Dey S., McAfee Q., Karakousis G., Villanueva J., Hart L. S., Levi S., Hu J., Zhang G., Lazova R., Klump V., Pawelek J. M., Xu X., Xu W., Schuchter L. M., Davies M. A., Herlyn M., Winkler J., Koumenis C., Amaravadi R. K., *J. Clin. Invest.*, **124**, 1406-1417 (2014).
- 3) Nagasawa I., Kunimasa K., Tsukahara S., Tomida A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.