

# 論文内容要旨

## **Promotion of cancer cell proliferation by cleaved and secreted luminal domains of ER stress transducer BBF2H7**

(小胞体ストレストランスデューサーBBF2H7の分泌断片による癌細胞増殖促進機構)

PLOS ONE, 2015, in press.

主指導教員：今泉 和則教授

(基礎生命科学部門 分子細胞情報学)

副指導教員：松原 昭郎教授

(総合健康科学部門 腎泌尿器科学)

副指導教員：内匠 透教授

(連携講座 独立行政法人 理化学研究所)

岩本 秀雄

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

低酸素状態，低グルコース状態，酸化ストレスなどの様々な異常環境によって，小胞体のタンパク質折り畳み機能が攪乱した状態を小胞体ストレスといい，直ちに細胞は防御機構として小胞体ストレス応答を活性化させる。当研究室は小胞体膜貫通型 **bZIP** 転写因子 **BBF2H7** が小胞体ストレストランスデューサーとして機能することを解明してきた。**BBF2H7** は小胞体ストレスに応答して膜内切断を受け，N末端断片が核内へ移行して転写因子として作用する。一方，切断されたC末端断片は細胞外に分泌され，ヘッジホッグシグナルに作用して発生段階のマウス軟骨細胞を増殖させることが知られている。*Bbf2h7* 遺伝子は，線維粘液性肉腫において染色体の転座により *Bbf2h7* のC末側と *FUS* のN末側とが融合したキメラ遺伝子として同定された。また，線維粘液性肉腫においてヘッジホッグシグナルの活性化も報告されている。近年，ヘッジホッグシグナルの異常活性化が線維粘液性肉腫を含む複数の癌における細胞増殖に関与することがわかってきた。そこで，**BBF2H7** がヘッジホッグシグナルを活性化して癌細胞の増殖を促進している可能性があると考え，その解析を行った。

腫瘍組織での **BBF2H7** の発現を調べるため，マイクロアレイデータベースである **Oncomine** を用いて解析した。膠芽腫，乳癌，子宮頸癌，前立腺癌，結腸癌において，正常組織と比較して *Bbf2h7* の発現が上昇していた。さらに，それらの癌由来細胞株である **U251MG** 細胞，**MCF7** 細胞，**HeLa** 細胞，**LNCap** 細胞，**LS174T** 細胞における **BBF2H7** の発現を調べた。細胞抽出液のウエスタンブロッティングにより，**BBF2H7** は **LS174T** 細胞以外の全ての癌細胞株に発現し，しかも一部切断されたN末端およびC末端が検出されたことから **BBF2H7** が癌細胞内で活性化していることもわかった。癌細胞株の培養上清を抗 **BBF2H7** C末抗体を用いて免疫沈降を行うと細胞外に分泌されたC末端が検出された。以上より，**LS174T** 細胞以外の全ての癌細胞で **BBF2H7** は小胞体ストレスに応答して切断され，C末端が細胞外に分泌されることが明らかになった。

ヒト **BBF2H7** C末端に細胞増殖促進作用があるかを調べるため，野生型と比較して細胞増殖が低下している **BBF2H7** 欠損マウス胎児線維芽細胞にヒト **BBF2H7** 発現ベクターを導入し，細胞の増殖速度を調べた。**BBF2H7** の全長およびC末端を発現させると細胞増殖は回復したが，N末端を発現させても回復しなかった。したがって，ヒト **BBF2H7** C末端にはマウスの場合と同様に細胞増殖促進作用があることがわかった。

**BBF2H7** C末端はヘッジホッグとその受容体である **Ptch1** の結合を促進させるコファクターである。**BBF2H7** C末端が働く癌細胞はヘッジホッグに応答する性質を元来もっていることが予測される。そこでまず，各癌細胞株のヘッジホッグ応答性について検証するた

め、ヘッジホッグを培養液に処理後、細胞の増殖速度を調べた。ヘッジホッグ処理により LS174T 細胞以外の調べた全ての癌細胞 (U251MG 細胞, MCF7 細胞, HeLa 細胞, LNCap 細胞) の増殖が促進された。RT-PCR の解析からヘッジホッグシグナルの活性化指標である *Gli1* および *Fox11* の発現レベルも同時に上昇していた。つまり、これら癌細胞株は、ヘッジホッグリガンド依存的にシグナルを活性化して増殖することが示された。

次に BBF2H7 がヒト癌細胞の増殖にも関与しているかを調べた。マウス BBF2H7 C 末端は、マウス軟骨細胞でヘッジホッグおよび *Ptch1* と結合し、ヘッジホッグシグナルを活性化して細胞増殖を促進させることが知られている。BBF2H7 C 末端を過剰発現させた HEK293T 細胞の培養上清を U251MG 細胞の培養液中に添加した。その結果、*Gli1* および *Fox11* の発現レベルが有意に上昇し、かつ細胞増殖が促進した。この効果は、培養上清から BBF2H7 C 末端を抗 BBF2H7 C 末端抗体で吸収した場合、あるいはヘッジホッグシグナルを遮断させるシクロパミン (Smoothened 阻害剤) 処理した場合にキャンセルされた。また、BBF2H7 をノックダウンした U251MG 細胞は、ヘッジホッグシグナルの減弱を伴って細胞増殖が抑制された。以上より、分泌された BBF2H7 C 末端が癌細胞のヘッジホッグシグナルを活性化させ、細胞の増殖に促進的に作用することが明らかになった。

近年、ヘッジホッグシグナルが各種の癌の増殖、浸潤、転移に重要な役割を果たすことが明らかにされており、創薬標的経路としても注目されている。既にヘッジホッグシグナル構成分子の Smoothened 阻害薬が臨床応用されており、進行性基底細胞癌に対し制癌効果を発揮している。しかし、Smoothened 阻害薬抵抗性の癌種も数多くあり、さらなる薬物開発が望まれている。BBF2H7 C 末端は、ヘッジホッグと *Ptch1* の結合を促進するコファクターとして働きヘッジホッグシグナルを活性化させる。したがって、Smoothened 阻害薬とは異なったメカニズムで癌細胞の増殖を抑える創薬のターゲットになり得ると考えられる。分泌された BBF2H7 C 末端の機能を抑え、ヘッジホッグシグナルを阻害する抗 BBF2H7 C 末端モノクローナル抗体を作製し、抗体医薬としての可能性を見極める必要がある。