

## 有糸分裂期の機能性ヌクレオポリン：大腸がんの病態解明と治療への応用

橋爪 智恵子<sup>1</sup>，源 利成<sup>2</sup>，Richard W. Wong<sup>3</sup>

### 1. はじめに

真核細胞の核膜孔を形成する核膜孔複合体（nuclear pore complex：NPC）は核膜を貫通する巨大なタンパク質チャネルである。ヒトのNPCは110MDaという大きな構造体であり、30種類以上のヌクレオポリンと呼ばれるタンパク質から構成されている。NPCは細胞分裂の間期（G1-S-G2期）では、核-細胞質間分子輸送を制御している<sup>1,2)</sup>（図1A）。一方、NPCは有糸分裂期（M期）の核膜崩壊の際に、いくつかのサブ複合体に乖離することが知られているが、その役割は長い間不明であった。しかし近年、それらサブ複合体中のヌクレオポリンがM期の染色体分離に関与することが次々と明らかにされてきた<sup>3)</sup>。

これまでに著者らは、ヌクレオポリンの一つであるNup358/Ran binding protein 2（RanBP2）がM期において紡錘体のキネトコア領域に局在し染色体分離を制御すること、培養細胞のNup358/RanBP2をノックダウンするとM期での細胞死が増加することを見いだしている<sup>4)</sup>。我々が報告したこの知見を受けてVecchioneらのグループが、Nup358/RanBP2をノックダウンすると特定の遺伝子型を示す大腸がん細胞特異的にM期での細胞死が増加する、すなわちこの種の大腸がん細胞の生存にはNup358/RanBP2が必

須であるという興味深い研究を最近の*Cell*誌に報告した<sup>5)</sup>。

本稿ではまず、ヌクレオポリンNup358/RanBP2の細胞分裂M期での役割を解説する。ついで、上述したNup358/RanBP2と大腸がんに関するVecchioneらの研究<sup>5)</sup>を紹介する。そして、M期に紡錘体形成を阻害することで細胞死作用を持つ微小管重合阻害剤に対する大腸がん細胞の感受性とNup358/RanBP2発現との関係、および大腸がん治療の臨床試験への応用について概説する。

### 2. ヌクレオポリンNup358/RanBP2の細胞分裂M期における役割

NPCを構成するヌクレオポリンの多くは、それぞれの分子量によって“NupX”（XはkDa）と呼ばれている。NPC内での局在をもとに、ヌクレオポリンは六つの構成要素[pore membrane proteins（POMs）、Y型コア、アダプター、チャネル、核バスケット]に分類され、これらは生化学的に安定な複合体を形成している（図1A）。また、これらの構成要素の分類とは関係なく、多くのヌクレオポリンに存在するフェニルアラニン-グリシン（FG）リピート配列はNPCの中央に配置されて疎水性バリアを形成し、物質輸送を制御する。近年、NPCの機能として、従来の細胞分裂間期での分子輸送制御<sup>1,2)</sup>に加え、M期での役割が注目されている。M期初期の核膜崩壊とともに複数のヌクレオポリン複合体が乖離し、そのいくつかのヌクレオポリンがキネトコア、紡錘体、中心体に局在を変える<sup>1)</sup>（図1A、詳しくは著者らの総説<sup>6)</sup>を参照されたい）。このような過程でヌクレオポリンは有糸分裂過程に形成される微細構造体（キネトコア、紡錘体、中心体等）の集合、機能的構造形成と分離を制御し、正確な染色体分離に必要である。したがって、ヌクレオポリンはゲノムを保全するために必須の分子である。

Nup358/RanBP2はNPCの細胞質線維構造を構成し、細胞質リングに結合している（図1A）。ヒトでは3224アミノ酸残基からなる358kDaの大きなタンパク質であり、特徴的なN末端ロイシンリッチドメイン、四つのRan結合ドメイン、八つのタンデムZincフィンガー、small ubiquitin-like modifier（SUMO）E3リガーゼドメイン、FGリピート、C末端cyclophilinホモロジドメインを持つ（図1B）。Nup358/RanBP2にはkaryopherin/importinと呼ばれる核移行

<sup>1</sup>金沢医科大学医学部血液免疫内科学（〒920-0293 石川県河北郡内灘町大学1-1）

<sup>2</sup>金沢大学がん進展制御研究所腫瘍制御研究分野（〒920-0934 金沢市宝町13-1）

<sup>3</sup>金沢大学新学術創成研究機構セルバイオノミクスユニット（〒920-1192 金沢市角間町）

#### Mitotic nucleoporin orchestrates colorectal carcinogenesis

Chieko Hashizume<sup>1</sup>, Toshinari Minamoto<sup>2</sup> and Richard W. Wong<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Division of Hematology/Immunology, Department of Medicine, Kanazawa Medical University, 1-1 Daigaku, Uchinada, Ishikawa 920-0293, Japan, <sup>2</sup>Divisions of Translational and Clinical Oncology and Surgical Oncology, Cancer Research Institute and Cancer Center, Kanazawa University and Hospital, 13-1 Takara-machi, Kanazawa 920-0934, Japan, <sup>3</sup>Cell-bionomics Research Unit, Innovative Integrated Bio-Research Core, Institute for Frontier Science Initiative: Bio-AFM Frontier Research Center & Lab of Molecular Cellular Biology, School of Natural System: Kanazawa University, Kakuma-machi, Kanazawa 920-1192, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880748

投稿受付日：2016年5月27日

© 2016 公益社団法人日本生化学会

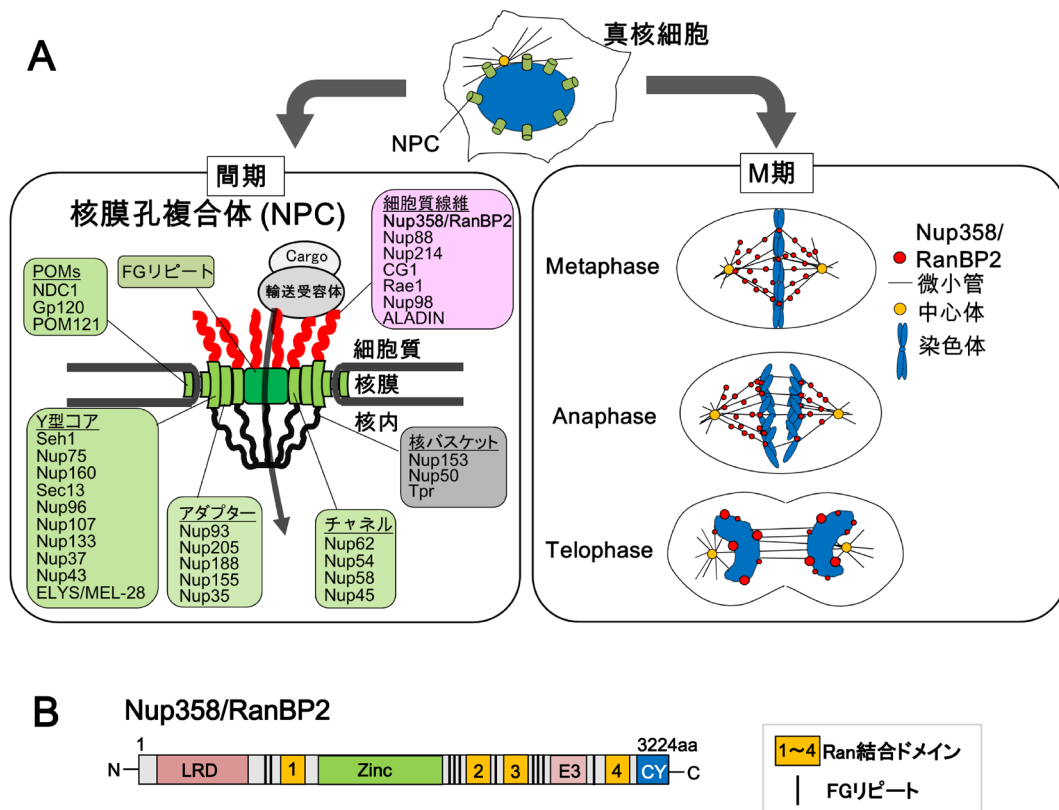


図1 スクレオポリンNup358/RanBP2の役割と構造

(A)細胞分裂間期における核膜孔複合体 (NPC) の構造(左). 約30種のスクレオポリンは六つの構成要素 [pore membrane proteins (POMs), Y型コア, アダプター, チャンネル, 核バスケット] に分類される. NPCの中央に位置するスクレオポリンのフェニルアラニン-グリシン (FG) リピード配列は, 疎水性バリアを形成することで物質輸送を制御する. Nup358/RanBP2(赤)は, 間期ではNPCの細胞質線維構造を形作り, 細胞質-核間の物質輸送を制御する(左)一方, M期では紡錘体-キネトコア領域に局在し, 染色体分離に寄与する(右). (B)Nup358/RanBP2のドメイン構造. N末端からロイシンリッチドメイン (LRD), 四つのRan結合ドメイン, 八つのタンデムZincフィンガー (Zinc), SUMO E3リガーゼドメイン (E3), FGリピード, C末端 cyclophilin ホモロジードメイン (CY) を持つ.

受容体と Ran guanosine triphosphate hydrolase (GTPase) が結合し, 核-細胞質間輸送を制御するが, それ以外にもさまざまなドメイン構造を介して多様な機能を持つ. M期には, Nup358/RanBP2はRan GTPase activating protein 1 (RanGAP1) とともにキネトコアや紡錘体に局在する<sup>4,7,8</sup>. 著者らは, 細胞内のNup358/RanBP2を欠失させるとG2/M期停止と染色体分離の不全が起こり, M期の崩壊 (mitotic catastrophe) と細胞死・アポトーシスを引き起こすことを明らかにした<sup>4</sup>. これはすなわち, Nup358/RanBP2がM期において正確な染色体分離に機能することを示し, 一方でNup358/RanBP2がM期で本来の役割を果たせない場合, 細胞の形質転換やがん化を来すことを示唆している.

### 3. Nup358/RanBP2とBRAF様大腸がん細胞の関係

スクレオポリンと疾患との関連では興味深いことに, Nup358/RanBP2はがんに対して相反する作用が報告されて

きた. 一方では, Nup358/RanBP2ノックアウトマウスは発がんしやすいことから, Nup358/RanBP2は染色体分離異常を防ぐことでがん抑制因子として機能していると考えられている<sup>9</sup>. 他方では, Nup358/RanBP2は染色体転座により血液系腫瘍を形成することから, 潜在的にがん化を引き起こす役割を持つとも考えられている<sup>10</sup>. 最近報告されたVecchioneらの研究結果は, Nup358/RanBP2の発現亢進を特徴とする大腸がん細胞はM期崩壊による細胞死から回避される<sup>5</sup> というもので, Nup358/RanBP2のがん促進作用を示唆している.

本邦において, 大腸がんは女性のがん死の1位, 男性では3位に相当する死亡数の多いがん種である. 大腸がんは, 遺伝性がんとして家族性大腸腺腫症や遺伝性非ポリポーシス大腸がん (Lynch症候群) がよく知られているが, 大多数を占める孤発がんの発生は喫煙, 食生活の欧米化, 運動不足などの生活習慣に起因すると考えられている. 大腸がんの発がん過程は多段階的であり, 正常上皮細

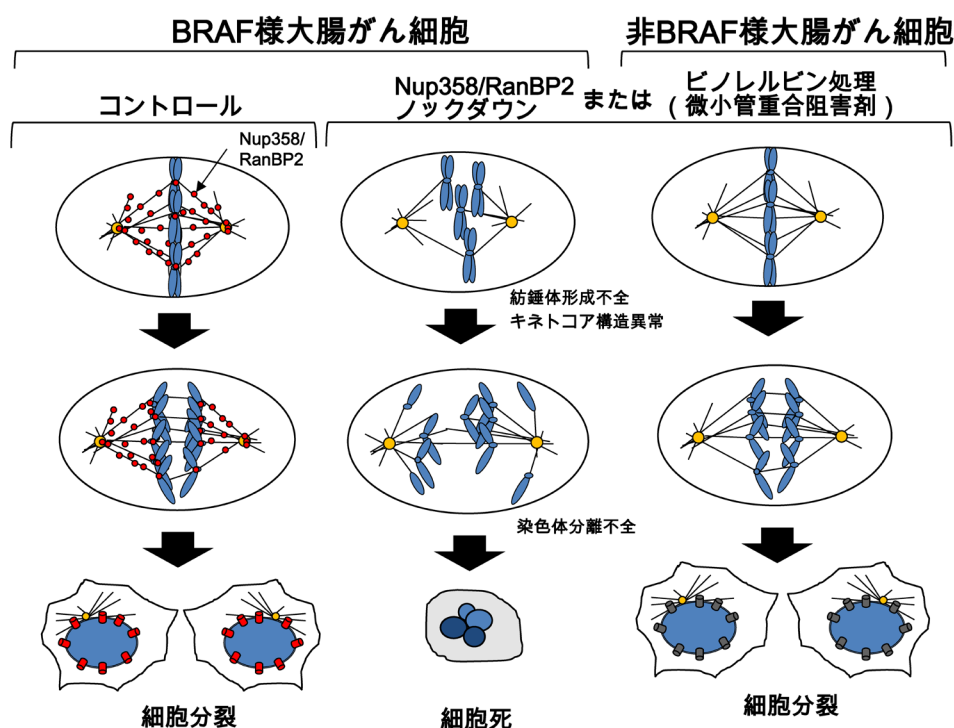


図2 BRAF様大腸がん細胞に対するNup358/RanBP2ノックダウンおよびビノレルビン処理の効果  
BRAF様大腸がん細胞にNup358/RanBP2ノックダウン, またはビノレルビン処理すると, 非BRAF様大腸がん細胞と比較して染色体分離不全が増加し, その結果細胞死が有意に増加する。

胞が腺腫になり, 時間を経て腺がんに進展して大腸組織に浸潤し, リンパ流や血流を介してリンパ節や他の組織, 臓器に転移していくことが知られている<sup>11, 12)</sup>。そして, この発がん過程においてさまざまな遺伝子変異が蓄積していくことが示されている。大腸がんのおよそ40%はK-ras変異により, また約10%はB-raf遺伝子コドン600 (V600E) 変異によりがん化シグナルを活性化し, これらの変異は相互排他的に生じている<sup>11)</sup>。一方, K-ras変異の有無にかかわらず, B-raf野生型大腸がんの一部はB-raf変異型と同様の遺伝子発現特性を呈する。そして, 両者を合わせた“BRAF様 (BRAF-like)”大腸がんは全体のおよそ20%に相当し, 悪性度が高く予後が悪いとされている<sup>12)</sup>。

VecchioneらはこのBRAF様大腸がんに注目し, B-raf (V600E) 変異腫瘍の治療に有用な標的遺伝子を明らかにするため, short hairpin (sh) RNAライブラリーを用いた loss-of-function アプローチによって, BRAF様大腸がん細胞の生存に必須となる遺伝子を探索した。BRAF様大腸がん細胞で選択的に高発現であった363遺伝子に対して1586種類のshRNAウイルスベクターを準備し, B-raf (V600E) 変異大腸がん細胞株とB-raf野生型大腸がん細胞株に導入して, 腫瘍細胞生存に対する効果を比較した。その結果, Nup358/RanBP2遺伝子に特異的なshRNAベクターを導入されたBRAF様大腸がん細胞は致命的であった (図2)。これまでの報告<sup>4, 7, 8)</sup>と一致して, 彼らはNup358/RanBP2

ノックダウンがキネトコア構造, M期進行と染色体分離の異常を引き起こすことを見いだした。また, Nup358/RanBP2ノックダウンは, BRAF様大腸がん細胞にM期での細胞死を誘導するM期延長やM期での細胞周期停止を引き起こすことを見いだした。これらの知見は, これまでに著者らが子宮頸がんHeLa細胞で示した結果と合致する<sup>4)</sup>。Vecchioneらはまた, BRAF様大腸がん細胞はもともとキネトコアでの微小管伸長が不全であり, Nup358/RanBP2ノックダウンによってさらにこの不全を助長してM期の細胞死を誘導することを見いだした。これらの結果から, BRAF様大腸がん細胞はNup358/RanBP2の高発現により, M期におけるキネトコアからの微小管伸長の不全を防いでいると考えられる。

#### 4. BRAF様大腸がん細胞に対する微小管重合阻害剤ビノレルビンの効果

BRAF様大腸がん細胞におけるM期での微小管形成の選択的不全は, このような腫瘍が微小管重合阻害剤に潜在的に高感受性であることを示唆している。そこでVecchioneらは, がんの薬剤感受性ゲノミクスプロジェクトのデータベースを調べたところ, 彼らの仮説と一致してBRAF様大腸がん細胞は非BRAF様腫瘍細胞よりもM期特異的に作用する抗がん剤に高感受性であることがわかった<sup>13)</sup>。つ



ぎに彼らはこの仮説を独自に検証するために、微小管重合阻害剤のなかでもビンカルカロイド化合物のビノレルビンとビンブラスチンを、またタキサン類のパクリタキセルとドセタキセルの腫瘍細胞に対する生存阻害効果を測定した。その結果、これらの薬剤のうちビノレルビンのみが非BRAF様に比べてBRAF様大腸がん細胞に対して有意に高い生存阻害効果を示し、そのIC<sub>50</sub> (50%阻害濃度)は両細胞間で30倍以上の差があることがわかった。なお、ビノレルビンはこれまで乳がんおよび非小細胞肺癌の治療に用いられてきた抗がん剤である。

つぎにVecchioneらはビノレルビンの生体内での効果を試すため、ヒト大腸がん細胞の異種移植モデルマウスを用いて解析した。その結果、BRAF様大腸がん細胞の移植腫瘍に対して選択的にビノレルビンが抗腫瘍効果を示すことがわかった。さらに、大腸がんの遠隔転移は肝臓に多い<sup>11)</sup>ことに着目し、大腸がんの肝転移腫瘍に対するビノレルビンの効果を試すため、ヒト大腸がん細胞をマウス肝に移植し、生体内顕微鏡を用いてビノレルビンによる治療経過を観察した。その結果、BRAF様大腸がん細胞では染色体分離不全と、染色体が断片化されたアポトーシス細胞が多数観察された。この結果は、肝転移したBRAF様大腸がんはビノレルビンに感受性であることを示唆している。

Vecchioneらは上記の実験の効果をもとに、実際の臨床検体を用いてBRAF様大腸がんに対する微小管重合阻害剤の有効性を確かめるため、これまでの臨床試験でビンブラスチンとカルシウムチャネルブロッカーのベプリジルを併用処方された大腸がん患者15名のうち<sup>14)</sup>、20年間再発していない1名の患者の切除腫瘍について遺伝子解析を行った。その結果、この症例の大腸がんはK-ras遺伝子変異とBRAF様遺伝子発現パターンが見いだされたことから、微小管重合阻害剤のような微小管ダイナミクスを標的とする抗がん剤はBRAF様腫瘍に特異的な治療薬になりうることを示唆された。

## 5. おわりに

Vecchioneらによる今回の研究は、大腸がんのなかでも悪性度の高いBRAF様大腸がんが有糸分裂M期での細胞死を回避するためにNup358/RanBP2を高発現させていることを発見した。そして、微小管重合阻害剤のビノレルビンが、このヌクレオポリンによるM期での染色体分離不全を回避するメカニズムを標的として腫瘍細胞死を誘導することを明らかにした。とくに、BRAF様と非BRAF様大腸がんという遺伝子変異や発現様式が異なる大腸がん細胞に対する微小管重合阻害剤の効果を比較し、ビノレルビンがBRAF様大腸がんに選択的な治療効果を示したことは注目に値する。この非臨床研究の結果は、すでに各国で抗がん

剤として認可されているが、大腸がん治療薬として承認されていないビノレルビンなどの有糸分裂M期に作用する微小管重合阻害剤が、BRAF様大腸がんのような特定の遺伝子変異・発現パターンを示す大腸がん患者に対して特異的に効果がある可能性を示したことに大きな価値がある。

今後も、有糸分裂に特異的に作用するヌクレオポリンの機能および、それらがさまざまな病態進行にいかに関与するのか明らかにされていくことで、NPCが関与する疾患の生物学的病態と治療標的が明らかにされていくと期待される。

## 文 献

- 1) Wong, R.W. (2015) *Chem. Biol.*, **22**, 1285–1287.
- 2) 小迫英尊 (2015) 生化学, **87**, 49–55.
- 3) Nakano, H., Wang, W., Hashizume, C., Funasaka, T., Sato, H., & Wong, R.W. (2011) *Cell Cycle*, **10**, 425–433.
- 4) Hashizume, C., Kobayashi, A., & Wong, R.W. (2013) *Cell Death Dis.*, **4**, e854.
- 5) Vecchione, L., Gambino, V., Raaijmakers, J., Schlicker, A., Fumagalli, A., Russo, M., Villanueva, A., Beerling, E., Bartolini, A., Mollevi, D.G., El-Murr, N., Chiron, M., Calvet, L., Nicolazzi, C., Combeau, C., Henry, C., Simon, I.M., Tian, S., in 't Veld, S., D'ario, G., Mainardi, S., Beijersbergen, R.L., Liefink, C., Linn, S., Rumpf-Kienzl, C., Delorenzi, M., Wessels, L., Salazar, R., Di Nicolantonio, F., Bardelli, A., van Rhee, J., Medema, R.H., Tejpar, S., & Bernards, R. (2016) *Cell*, **165**, 317–330.
- 6) 橋爪智恵子, Wong, R. (2011) 生化学, **83**, 957–965.
- 7) Joseph, J., Liu, S.T., Jablonski, S.A., Yen, T.J., & Dasso, M. (2004) *Curr. Biol.*, **14**, 611–617.
- 8) Salina, D., Enarson, P., Rattner, J.B., & Burke, B. (2003) *J. Cell Biol.*, **162**, 991–1001.
- 9) Dawlaty, M.M., Malureanu, L., Jegathan, K.B., Kao, E., Sustmann, C., Tahk, S., Shuai, K., Grosschedl, R., & van Deursen, J.M. (2008) *Cell*, **133**, 103–115.
- 10) Nofrini, V., Di Giacomo, D., & Mecucci, C. (2016) *Eur. J. Hum. Genet.*, **24**, 1388–1395.
- 11) Carethers, J.M. & Jung, B.H. (2015) *Gastroenterology*, **149**, 1177–1190.e3.
- 12) Popovici, V., Budinska, E., Tejpar, S., Weinrich, S., Estrella, H., Hodgson, G., Van Cutsem, E., Xie, T., Bosman, F.T., Roth, A.D., & Delorenzi, M. (2012) *J. Clin. Oncol.*, **30**, 1288–1295.
- 13) Garnett, M.J., Edelman, E.J., Heidorn, S.J., Greenman, C.D., Dastur, A., Lau, K.W., Greninger, P., Thompson, I.R., Luo, X., Soares, J., Liu, Q., Iorio, F., Surdez, D., Chen, L., Milano, R.J., Bignell, G.R., Tam, A.T., Davies, H., Stevenson, J.A., Barthorpe, S., Lutz, S.R., Kogera, F., Lawrence, K., McLaren-Douglas, A., Mitropoulos, X., Mironenko, T., Thi, H., Richardson, L., Zhou, W., Jewitt, F., Zhang, T., O'Brien, P., Boisvert, J.L., Price, S., Hur, W., Yang, W., Deng, X., Butler, A., Choi, H.G., Chang, J.W., Baselga, J., Stamenkovic, I., Engelman, J.A., Sharma, S.V., Delattre, O., Saez-Rodriguez, J., Gray, N.S., Settleman, J., Futreal, P.A., Haber, D.A., Stratton, M.R., Ramaswamy, S., McDermott, U., & Benes, C.H. (2012) *Nature*, **483**, 570–575.
- 14) Linn, S.C., Giaccone, G., & Pinedo, H.M. (1994) *Lancet*, **343**, 1648–1649.