

γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT) 発現抑制による
サイクリン依存性キナーゼ阻害因子の発現上昇を介した
がん細胞増殖抑制機構の解明

2019 年度

京都薬科大学大学院 課程博士学位論文

【薬学】臨床腫瘍学分野

谷口 恵香

本論文は、以下の論文の内容を総括したものである。

- 1) Keiko Taniguchi, Hiromi Ii, Susumu Kageyama, Hiroko Takagi, Tokuhiro Chano, Akihiro Kawauchi, Susumu Nakata. Depletion of gamma-glutamylcyclotransferase inhibits cancer cell growth by activating the AMPK-FOXO3a-p21 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, 517, 238-243. [第3章]
- 2) Keiko Taniguchi, Kengo Matsumura, Hiromi Ii, Susumu Kageyama, Eishi Ashihara, Tokuhiro Chano, Akihiro Kawauchi, Tatsuhiro Yoshiki, Susumu Nakata. Depletion of gamma-glutamylcyclotransferase in cancer cells induces autophagy followed by cellular senescence. *Am. J. Cancer. Res.* **2018**, 8, 650-661. [第2章]
- 3) Keiko Taniguchi, Kengo Matsumura, Susumu Kageyama, Hiromi Ii, Eishi Ashihara, Tokuhiro Chano, Akihiro Kawauchi, Tatsuhiro Yoshiki, Susumu Nakata. Prohibitin-2 is a novel regulator of p21^{WAF1/CIP1} induced by depletion of γ -glutamylcyclotransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, 496, 218-224. [第1章]

課程博士学位論文 内容の要旨

専攻・課程 : 薬学専攻・博士課程
氏名 (英字名) : 谷口恵香 (Keiko Taniguchi)
学位論文題目 : γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT) 発現抑制によるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子の発現上昇を介したがん細胞増殖抑制機構の解明

序章

γ -グルタミルシクロトランスフェラーゼ (GGCT) は膀胱がん組織のプロテオーム解析によって見出されたがん組織に高発現するタンパク質である。GGCT は膀胱がんをはじめとして、乳がん、肺がん、子宮頸がん、大腸がん等の様々ながん種において高発現がみられ、乳がんや卵巣がん等においては腫瘍組織における高い GGCT タンパク質発現レベルは予後不良因子であることが報告されている。一方、siRNA を用いた GGCT のノックダウンおよび特異的阻害剤による酵素活性の阻害は、*in vitro* および担がんマウスを用いた *in vivo* の実験系において腫瘍増殖抑制効果を発揮することが報告されている。さらに、乳がん細胞株を用いた以前の研究で、GGCT ノックダウンによって引き起こされるがん細胞増殖抑制の誘導は、サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 (CDKI) の発現上昇に依存することが示された。しかしながら、GGCT ノックダウンによる CDKI の発現上昇機構の詳細は未だ不明のままであった。

本研究では、GGCT の新規相互作用タンパク質として *prohibitin 2* (PHB2) を見出し、乳がん細胞株 MCF7 において GGCT は PHB2 を介して p21^{WAF1/CIP1} (p21) の発現を調節していることを明らかにした。また、MCF7 細胞および前立腺がん細胞株 PC3 において GGCT をノックダウンした場合に誘導される CDKI の発現上昇および細胞増殖抑制効果は、オートファジーの誘導を伴うことを示した。さらに、GGCT ノックダウンは PC3 細胞および膠芽腫細胞株 A172 において腫瘍抑制転写因子 FOXO3a の発現上昇および AMPK を介したリン酸化による活性化を引き起こし、p21 の発現上昇をその上流で制御することを示した。

第1章 GGCT と結合する新規相互作用タンパク質 PHB2 の機能解析

本章ではまず、酵母ツーハイブリッド法を用いた網羅的解析により、GGCT と相互作用する新規のタンパク質分子として PHB2 を見出した。続いて MCF7 細胞において共免疫沈降法を行い、内因性 GGCT と PHB2 タンパク質間の相互作用を示した。PHB2 は細胞内局在に依存してそれぞれ異なる機能を発揮するタンパク質であり、核に局在する PHB2 は転写抑制因子として働くことが報告されている。そこで、PHB2 の細胞内局在をウェスタンブロッティング法で解析したところ、GGCT ノックダウンにより核内局在 PHB2 が減少することを明らかにした。さらに、PHB2 をノックダウンおよび強制発現させた MCF7 細胞を用い p21 発現解析および細胞周期解析を行ったところ、GGCT ノックダウン時の p21 の発現上昇が PHB2 によって制御されていることを証明した。また、抗 PHB2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、PHB2 が p21 のプロモーター領域に結合することを明らかにした。さらに、PHB2 と p21 の単独または同時ノックダウンを行い、PHB2 が p21 発現抑制を介しがん細胞の増殖を促進する因子であることを明らかにした。

第2章 GGCT ノックダウンによるオートファジーの誘導を介して CDKI の発現が上昇する機構

GGCT のノックダウンは非アポトーシス性細胞死を引き起こすことが以前の研究により示されている。また、GGCT はアミノ酸の代謝に関わる酵素であるため、そのノックダウンは細胞に代謝性ストレスを引き起こすのではないかと考えられた。そこで、GGCT のノックダウンがオートファジー関連細胞死を引き起こすという仮説を立てた。本章では、オートファジーマーカー LC3-II の検出、オートファゴソーム形成能の評価を行い、MCF7 細胞および PC3 細胞における GGCT のノックダウンが、オートファジーを誘導することを明らかにした。また、血清欠乏培養条件下でマウス繊維芽細胞株 NIH3T3 にオートファジーが誘導される系を用い、安定的 GGCT 強制発現がオートファジーを抑制し、細胞増殖を促進することを明らかにした。さらに、オートファジー進行に必須の因子 autophagy related 5 を GGCT と同時にノックダウンすることによってオートファジーを阻害すると、細胞周期停止および細胞老化といった GGCT ノックダウン細胞で観察される表現型が抑制されたことから、オートファジー自体が制御性の役割を果たしていることを示した。最後に、このオートファジーの誘導に AMPK シグナル伝達経路および mTOR シグナル伝達経路の変動が伴っていることを明らかにした。

第3章 GGCT ノックダウンによる AMPK-FOXO3a-p21 経路の活性化を介したがん細胞増殖抑制機構

前章において、MCF7 細胞および PC3 細胞のいずれにおいても GGCT ノックダウンによる p21 の発現上昇が観察されたが、MCF7 細胞ではオートファジーの阻害によって p21 発現上昇が抑制されたにもかかわらず、PC3 細胞では抑制されなかった。さらに PC3 細胞においても PHB2 の単独ノックダウンを行ったが、p21 は誘導されなかったため、GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇には未知の機構が存在すると考えられた。本章では、PC3 細胞と A172 細胞において、GGCT ノックダウンが FOXO3a の発現誘導を引き起こすことを示した。また、FOXO3a の発現誘導は GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇とそれに続く細胞増殖抑制、細胞死誘導を制御することを示した。さらに、FOXO3a をリン酸化する AMPK が、FOXO3a-p21 経路の活性化をその上流で制御することを明らかにした。

総括

本研究では、GGCT ノックダウンによって引き起こされる CDKI 発現上昇のメカニズムとして、次の三つの機構を提示した。1. GGCT との新規相互作用タンパク質であり、p21 発現抑制機能を持つ PHB2 を介した調節。2. AMPK-ULK1 経路または mTOR 経路の変動を伴うオートファジーの誘導を介した調節。3. 腫瘍抑制転写因子 FOXO3a の発現誘導および AMPK を介した活性化による p21 発現上昇。これらの結果は、GGCT ノックダウンによる CDKI 発現上昇およびがん細胞増殖抑制の細胞種依存的なメカニズムの一端を明らかにし、今後の GGCT を標的とした治療薬の開発に寄与するものと考えられる。

目次

序論.....	1
第 1 章 GGCT と結合する新規相互作用タンパク質 PHB2 の機能解析	
1-1. 緒言.....	5
1-2. 実験方法.....	7
1-2-1. 酵母ツーハイブリッド法.....	7
1-2-2. 細胞と培養条件.....	7
1-2-3. 抗体.....	7
1-2-4. 共免疫沈降法.....	7
1-2-5. siRNA 導入トランスフェクション条件.....	8
1-2-6. ウェスタンブロッティング法.....	8
1-2-7. 細胞質/核タンパク質分画.....	9
1-2-8. PHB2 強制発現 MCF7 細胞の樹立.....	9
1-2-9. 細胞周期解析.....	10
1-2-10. クロマチン免疫沈降法.....	10
1-2-11. SA-β-Gal 染色法.....	11
1-2-12. 生細胞数・死細胞率の評価.....	11
1-2-13. 統計学的処理.....	11
1-3. 実験成績.....	12
1-3-1. GGCT タンパク質およびPHB2 タンパク質の相互作用解析.....	12
1-3-2. PHB2によるGGCT ノックダウンで誘導される p21 発現上昇の阻害効果の検討.....	14
1-3-3. PHB2 の p21 プロモーター領域への結合能の解析.....	16
1-3-4. PHB2 のノックダウンによる細胞周期停止に対する p21 の影響の解析.....	17
1-3-5. PHB2 のノックダウンによる細胞老化に対する p21 の影響の解析.....	18
1-3-6. PHB2 のノックダウンによる細胞増殖抑制および細胞死に対する p21 の影響の解析.....	19
1-4. 考察.....	20
第 2 章 GGCT ノックダウンによるオートファジーの誘導を介して CDKI の発現が上昇する機構	
2-1. 緒言.....	22
2-2. 実験方法.....	24
2-2-1. 細胞と培養条件.....	24
2-2-2. 抗体.....	24
2-2-3. siRNA 導入トランスフェクション条件.....	24
2-2-4. ウェスタンブロッティング法.....	24
2-2-5. オートファゴソーム形成能評価.....	25
2-2-6. 細胞周期解析.....	25
2-2-7. 細胞増殖能および生細胞数・死細胞率の評価.....	26

2-2-8. SA-β-Gal 染色.....	26
2-2-9. 統計学的処理.....	26
2-3. 実験成績.....	27
2-3-1. GGCT 発現低下によるオートファジーの誘導.....	27
2-3-2. GGCT 強制発現による血清欠乏誘導性オートファジー阻害効果の解析.....	29
2-3-3. GGCT ノックダウンによる CDKI 発現上昇および細胞周期停止に対してオートファジーが与える影響の解析.....	31
2-3-4. GGCT ノックダウンによる細胞増殖抑制および細胞死の誘導に対してオートファジーが与える影響の解析.....	33
2-3-5. GGCT ノックダウンによる細胞老化の誘導に対してオートファジーが与える影響の解析.....	35
2-3-6. GGCT ノックダウンによる AMPK-ULK1 経路の活性化および mTORC2-Akt 経路の不活性化.....	37
2-3-7. GGCT 発現抑制によるオートファジーの誘導に対する AMPK の関与.....	37
2-4. 考察.....	40

第 3 章 GGCT ノックダウンによる AMPK-FOXO3a-p21 経路の活性化を介したがん細胞増殖抑制機構

3-1. 緒言.....	44
3-2. 実験方法.....	45
3-2-1. 細胞培養.....	45
3-2-2. 抗体.....	45
3-2-3. siRNA 導入トランスフェクション条件.....	45
3-2-4. 細胞質/核タンパク質分画.....	45
3-2-5. ウェスタンブロッティング法.....	45
3-2-6. 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) 法.....	46
3-2-7. 生細胞数・死細胞率の評価.....	47
3-2-8. 統計的解析.....	47
3-3. 実験成績.....	48
3-3-1. PC3 細胞および A172 細胞における GGCT ノックダウンによる FOXO3a の発現誘導.....	48
3-3-2. GGCT ノックダウンによる p21 の発現上昇の FOXO3a 依存性の解析.....	50
3-3-3. FOXO3a 依存的な GGCT ノックダウンによるがん細胞増殖抑制および細胞死誘導.....	52
3-3-4. GGCT ノックダウンによる AMPK-FOXO3a 経路の活性化を介した p21 発現上昇.....	53
3-3-5. GGCT ノックダウンによる増殖抑制および細胞死における AMPK 依存性の解析.....	55
3-4. 考察.....	57
総括.....	60
謝辞.....	61
引用文献.....	62

【略語表】

AMPK	AMP-activated protein kinase
ARF1	ADP-ribosylation factor 1
ATG	autophagy related
BCA	bicinchoninic acid
BIG3	brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3
C7orf24	human chromosome 7 open reading frame 24
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKI	cyclin-dependent kinase inhibitor
ChIP	chromatin immunoprecipitation
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DP	dipeptidase
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
ER α	estrogen receptor
FACS	fluorescence-activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FOXO3a	forkhead box O 3a
GA	N-glutaryl-L-alanine
γ -Glu-Cys-Gly	glutathione
GAPDH	glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase
GCL	glutamate cysteine ligase
GGCT	γ -glutamylcyclotransferase
GGT	γ -glutamyltranspeptidase
GS	glutathione synthase
HRP	horseradish peroxidase
LC3	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
mTOR	mammalian/mechanistic target of rapamycin
mTORC	mTOR complex
NP-40	nonidet P-40
OE	overexpression
OPLAH	5-oxoprolinase
p16	p16 ^{INK4A}
p21	p21 ^{WAF1/CIP1}
p70S6K	70 kDa ribosomal protein S6 kinase
PBS	phosphate-buffered saline
PHB	Prohibitin
PI	propidium iodide

PIPES	piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)
qRT-PCR	quantitative real-time polymerase chain reaction
Raptor	regulatory associated protein of mTOR
Rb	Retinoblastoma
REA	repressor of estrogen receptor activity
Rictor	rapamycin insensitive companion of mTOR
RIPA buffer	radioimmunoprecipitation assay buffer
SA- β -Gal	senescence-associated β -galactosidase
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	small interfering RNA
TBS	tris-buffered saline
TE buffer	tris-EDTA buffer
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethane
ULK1	unc-51 like autophagy activating kinase 1
V5	V5 epitope tag

Chromosome 7 open reading frame 24 (C7orf24) は、膀胱がん組織に高発現するタンパク質分子として Kageyama らによって発見された (1,2)。膀胱がん組織抽出タンパク質の二次元電気泳動によって見出された、正常組織と比較してがん組織に高発現しているいくつかのタンパク質のうち、筆者らは分子量 22 kDa、等電点 5.1 のタンパク質に注目し、このタンパク質はデータベース上の C7orf24 のアミノ酸配列と一致した。このタンパク質分子は後に Oakley らによって γ -glutamylcyclotransferase (GGCT) という酵素であることが報告された (3)。GGCT は γ -グルタミルサイクル中で、 γ -グルタミルアミノ酸が 5-オキソプロリンと遊離アミノ酸へ変換される反応を触媒する酵素として機能することが報告されている (3)。 γ -グルタミルサイクルはグルタチオンの合成および代謝に関与する回路であり、GGCT はがん細胞の代謝に関与しているのではないかと考えられたが、当初は GGCT が具体的にがんという疾患へどのように関与しているかを報告した文献は存在しなかった。

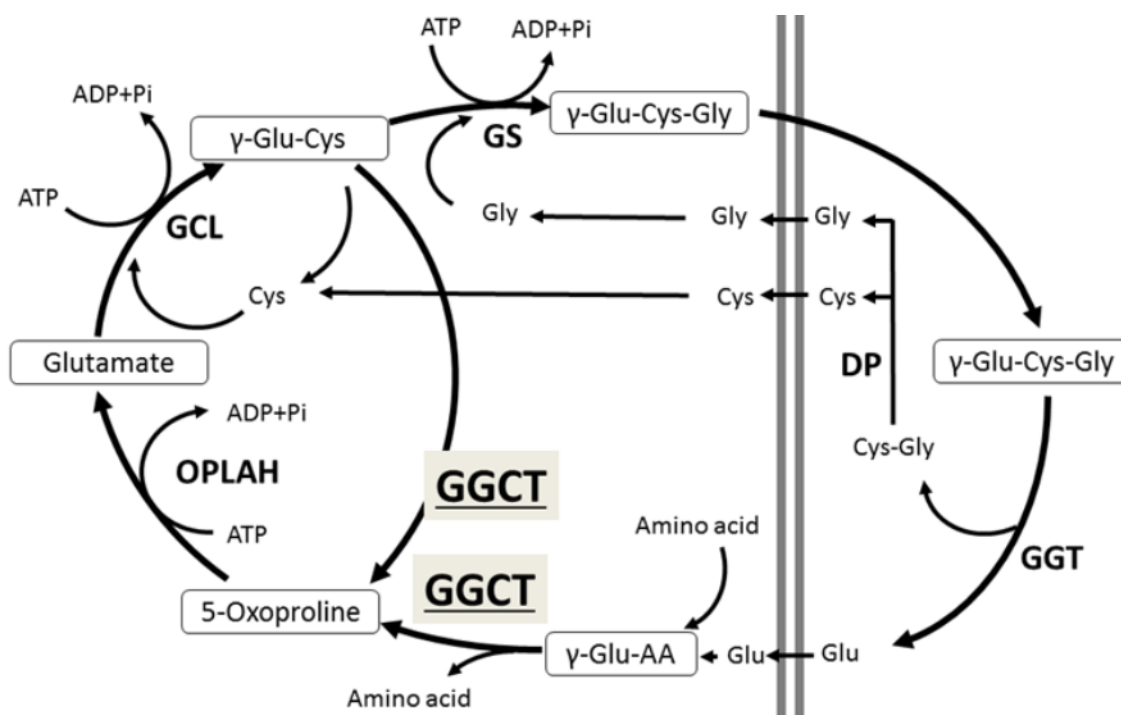


Figure 1. γ -Glutamyl cycle.

GGCT, γ -glutamylcyclotransferase; GGT, γ -glutamyltranspeptidase; GCL, glutamate cysteine ligase; GS, glutathione synthase; OPLAH, 5-oxoprolinase; γ -Glu-Cys-Gly, glutathione; DP, dipeptidase. This Figure was cited from Fig. 1 in Kageyama et al. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, E2054.

GGCT は正常組織と比較して、様々ながん組織において高発現していることが示されている。具体的には、膀胱がん (2)、乳がん、子宮頸がん、肺がん、大腸がん (4)、食道扁平上皮がん (5)、卵巣がん (6)、胃がん (7)、骨肉腫 (8) および膠芽腫 (9) など、その報告は多岐にわたる。また、GGCT のがん組織における高発現は、乳がん (4) および卵巣がん (6) 患者の予後不良と相関することが報告されている。さらに、RNA 干渉法を用いた GGCT の発現抑制は、*in vitro* において様々ながん細胞株の増

殖を抑制する一方で、GGCTの高発現が見られない正常細胞の増殖は抑制しないことが報告されている(10, 11)。担がんマウスモデルを用いた *in vivo* の実験系においても、GGCT siRNA の肺がんの担がんマウスへの局所投与(12)、あるいは乳がんの担がんマウスへの全身的投与を行うと(13)、腫瘍の成長が顕著に抑制される。また、最近の研究で、GGCT のノックアウトはマウスの正常な胚発生および成長に影響を及ぼさず、KRas 誘導性の発がんマウスモデルの発がんを有意に抑制することが報告された(14)。さらに GGCT の発現は KRas によって誘導を受けることが示された。KRas は、がん遺伝子の中でも最も広範囲のがん種において、その機能の恒常的な活性化がみられるものの一つであるため、GGCT の多様ながん種における高発現とその組織特異性を、この知見がよく説明しうると考えられる。また重要なことにこの報告では、大腸がん、乳がん、膠芽腫等を含む複数のがん症例において、GGCT 遺伝子座の増幅が検出されることが示された(14)。したがって、がん組織に特異的に高発現する GGCT は、がんの増殖および発がんを促進する因子であり、がん治療の有望な分子標的であると考えられ、GGCT 遺伝子座の増幅や KRas の恒常的活性化はこの治療戦略の重要なバイオマーカーとなりうる可能性が期待できる。

我々の研究グループおよび共同研究者によって GGCT の基質を模して創製され、GGCT 阻害活性を有する低分子化合物として見出された N-glutaryl-L-alanine (GA) は、GGCT の直接の基質となる蛍光プローブ LISA-101 を用いた測定によって、GGCT の酵素活性を顕著に抑制することがわかった(15, 16)。しかし、GA はその高い水溶性により細胞膜を透過することができないと考えられた。そこで水溶性を低減させて細胞膜を透過させるべく、末端のカルボキシ基をメチル基およびアセトキシメチル基に置換することにより新たに創製された Pro-GA は、細胞内在性の GGCT 活性を有意に阻害し、乳がん細胞株 MCF7、白血病細胞株 HL-60、前立腺がん細胞株 PC3 の増殖を *in vitro* で顕著に抑制した一方で、正常乳腺上皮細胞、末梢血単核細胞、正常前立腺上皮細胞の増殖は抑制しなかった(17)。さらに、PC3 細胞を用いた担がんマウスモデルに対し Pro-GA の腹腔内投与を行うと、顕著な体重減少を伴うことなく腫瘍の成長は抑制された(17)。以上の知見より、GGCT を標的とした治療薬の開発は、既存の治療戦略とは異なる機構によりがん細胞特異性を発揮するメリットが期待でき、そのメカニズムの解明は今後さらに重要性を増すと考えられる。しかし、RNA 干渉法による GGCT の発現抑制、および低分子化合物による阻害が、具体的にどのような機構でがん細胞の増殖を抑制するのか、その詳細は不明であった。

2016年に我々の研究グループは、siRNAを用いたGGCTのノックダウンが乳がん細胞にp21^{WAF1/CIP1}(p21)、p16^{INK4A}(p16)といったサイクリン依存性キナーゼ阻害因子(CDKI)の発現上昇および細胞老化を引き起こし、GGCT発現抑制によって引き起こされる増殖抑制および細胞死誘導は、CDKIの発現上昇に依存することを報告した(18)。これまでに報告されている代表的なp21の発現上昇機構および細胞周期調節機構を以下に述べる。DNAの損傷に応答してATMやChk2などの複数のキナーゼが活性化されると、リン酸化を受けたp53がMdm2から解離し、ユビキチン化による分解を受けることなく蓄積し、転写因子としての役割を果たす。p21はこのp53転写因子の直接的な下流標的遺伝子であり、主にcdk2-サイクリン複合体に結合し、そのキナーゼ活性を阻害することでRbタンパク質のリン酸化を阻害し、E2F依存性の転写を抑制する。E2Fは転写因子として細胞周期進行に関与する多くの遺伝子の発現を調節しているため、p21の発現上昇は結果的に細胞周期の停止を誘導する。一方でp16はcdk4/6-サイクリン複合体と結合し、その機能を阻害することでRbタンパクのリン酸化を阻害し、

細胞周期の進行を調節している (19)。

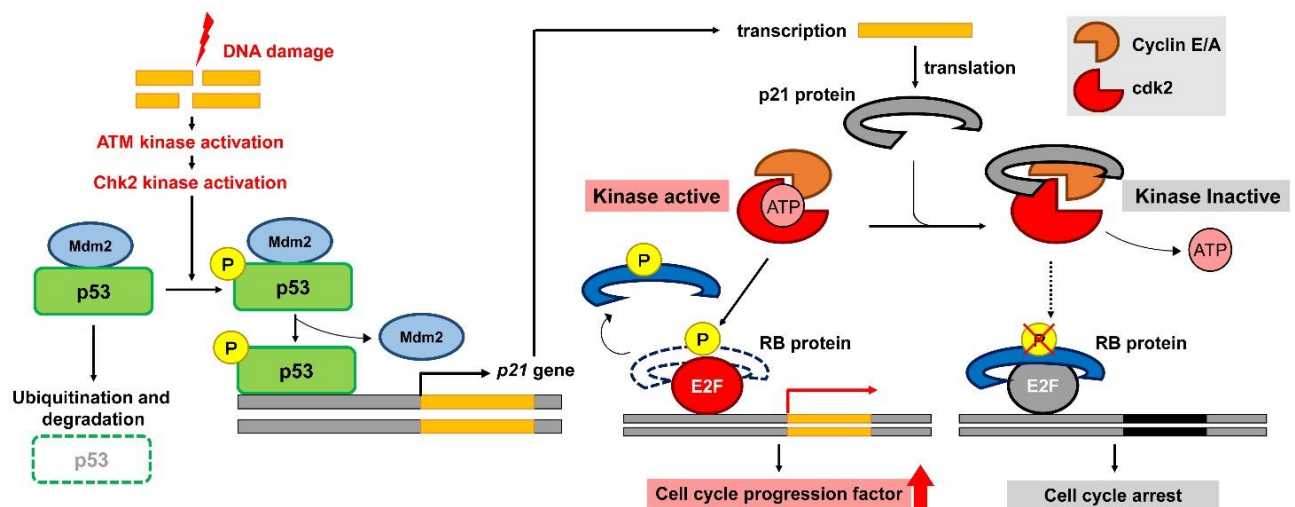


Figure 2. p21 regulates the cell cycle through its transcriptional activation by p53 in response to DNA damage.

p21 は細胞周期を停止させることによってゲノムの安定性を維持し、がんを抑制する因子であると考えられている (20,21)。実際に、非小細胞肺癌、前立腺がんおよび乳がんなどの様々ながん種においてプロモーター領域の過剰メチル化によって p21 の発現抑制が引き起こされており (22)、p21 の高発現は扁桃がん、胃がん、子宮頸部腺がん、膵臓がん、喉頭がんおよび口腔がん患者の良好な予後と関連することも報告されている (21,22)。従来、p21 遺伝子の変異は極めてまれであると考えられてきたが (20)、近年、がんゲノムシーケンスを用いた研究により、浸潤性膀胱がん患者の 14% で p21 遺伝子の変異が観察されることが報告された (23)。一方で、p21 の発現を直接的に制御している p53 は、ヒトがんの半数以上においてその変異が認められることが示されており (24)、また、非常に広範ながんにおいて過剰な発現が観察される c-Myc が (25)、p21 の転写を抑制する因子であることも示されている (26)。実際に、p53 の変異および c-Myc の過剰発現は、大腸がん、非小細胞肺癌、乳がん、胃がん、および卵巣がんにおいて p21 の低発現を引き起こすこと、この p21 低発現は前述のがん患者の予後不良と関連することが報告されている (21)。

p21 そのものの変異の頻度と比較して、p21 の上流因子である p53 の変異および c-Myc の過剰発現の方が明らかに高頻度で観察されていること、そして p21 の発現量ががん患者の予後と関連しているという上記の知見より、p21 の機能の低下で引き起こされる細胞周期の異常は、p21 の遺伝子変異の有無よりもその発現量の低下に依存しているという可能性が高い。p21 の発現低下によって細胞周期の異常が引き起こされ、その増殖が促進されているようながん細胞においては、p21 の発現を外因的に誘導することによってがん細胞の増殖を抑制するという治療戦略が成立すると考えられる。実際に、このような遺伝子の「量的な異常」に着目し、がんを抑制する因子の発現誘導効果を持つ薬剤として開発された抗がん剤として、本邦で開発された trametinib が挙げられる。CDKI の一つである p15^{INK4B} の発現上昇を指標とした化合物のスクリーニングによって見出された MEK1/2 インヒビターである trametinib (27) は、BRAF 阻害剤 dabrafenib との併用療法において、BRAF 変異陽性の進行性悪性黒色腫および進行性・転移性の非小細胞肺癌に対して本邦で承認され臨床応用されている。また、p53 お

よび c-Myc はアンドラッグアブル (undruggable; 創薬が困難) な標的であると考えられており (28)、p53 の変異または c-Myc の過剰発現が観察されているがんにおいて、これらの下流因子 p21 の発現を是正するという治療戦略は、代替の創薬標的となる可能性を秘めている。さらに、我々の研究グループによる以前の研究で、GGCT ノックダウンで引き起こされる p21 の発現上昇は p53 非依存的な機構で調節されることが示唆されており、GGCT が p53 の代替となる創薬標的である可能性を補強している (18)。以上の知見より、がん細胞内の p21 発現を上昇させるという治療戦略、および p21 の発現調節機能を有する GGCT は有望ながんの創薬標的であると考えられるが、GGCT ノックダウンによる p21 および p16 といった CDKI の発現上昇が具体的にどのような機構で引き起こされているのか、その詳細なメカニズムは不明のままであった。

そこで本稿では、GGCT 発現抑制で CDKI の発現上昇が誘導されるメカニズムについて、本研究で解明した以下の3つの機構を、対応する章においてその詳細を述べる。

1. GGCT との新規相互作用タンパク質であり、p21 発現抑制機能を持つ PHB2 を介した調節。
2. AMPK-ULK1 経路の活性化または mTOR 経路の抑制を伴うオートファジーの誘導を介した調節。
3. 腫瘍抑制転写因子 FOXO3a の発現誘導および AMPK を介した活性化による p21 発現上昇。

第 1 章

GGCT と結合する新規相互作用タンパク質 PHB2 の機能解析

1-1. 緒言

GGCT は膀胱がんを高発現するタンパク質としてプロテオーム解析によって同定された (1, 2)。膀胱がんのみならず他の様々ながん種においても正常組織と比較して高発現することが示されている (10, 11)。GGCT の発現抑制が *in vitro* および *in vivo* において抗腫瘍効果を示すことが報告されており、したがって GGCT は有望ながん治療標的であると考えられる。以前の研究で我々は、siRNA を用いた GGCT の発現抑制は乳がん細胞株をはじめとした様々ながん細胞株に CDKI の発現上昇および細胞老化を伴う非アポトーシス性細胞死を誘導することを報告したが (18)、GGCT の発現低下によってどのような機構でこれらの細胞表現型が引き起こされるのか、その詳細は明らかにされていなかった。

多くのタンパク質分子は他のタンパク質分子と相互作用することにより機能するため、がん組織に高発現する GGCT タンパク質の機能解析を行う中で、GGCT と結合するタンパク質分子を探索するインタラクトーム解析を行うことは重要な意義があると考え、このインタラクトーム解析の手法として酵母ツーハイブリッド法を用いることにより、GGCT と相互作用する新規のタンパク質分子として *prohibitin 2* (PHB2) を見出した。PHB は高度に保存されたファミリータンパク質であり、PHB1 および PHB2 からなる (29)。PHB は核、ミトコンドリアおよび細胞質といった様々な細胞画分に発現し、その細胞内局在によって果たす機能の異なるタンパク質である (30, 31)。核 PHB1 および PHB2 はそれぞれ独立して転写抑制因子として働く一方で、ミトコンドリアの PHB1 および PHB2 はヘテロダイマーを形成することによりミトコンドリア安定性に寄与することが示されている (31)。PHB2 は核においては repressor of estrogen receptor activity (REA) 機能を持ち (32)、子宮頸がん細胞株 HeLa においては、ミトコンドリアに局在していた PHB2 はエストロゲン刺激によって核へ移行し、estrogen receptor α (ER α) 依存性の転写を抑制することが報告されている (33)。重要なことに、PHB2 は大腸がん、食道がん、膀胱がんをはじめとする複数のがん種において高発現していることが示されている (34)。大腸がん患者の血清中には、非がん患者の血清中と比較して PHB2 タンパク質が高発現すること、また、肝細胞がん組織においては、隣接する非腫瘍肝組織と比較して PHB2 タンパク質が高い発現を示すことが報告されている (34, 35)。

本章では、酵母ツーハイブリッド法により GGCT と相互作用することが見出された PHB2 タンパク質について、MCF7 細胞由来の抽出タンパク質を用いた共免疫沈降法を行うことによって、内因性の GGCT および PHB2 が相互作用をしていることを確認した。次に、MCF7 細胞における GGCT 発現抑制時の PHB2 の細胞内局在の変化をウェスタンブロットティング法にて解析した。さらに、GGCT ノックダウンによって引き起こされる p21 の発現上昇に PHB2 が重要な役割を果たしているという仮説を立て、PHB2 のノックダウンおよび PHB2 強制発現 MCF7 細胞を用いた p21 発現解析および細胞周期解析を行った。また、PHB2 は転写抑制因子として働くことが示されているため、PHB2 タンパク質が p21 のプロモーター領域に結合してその転写を抑制しているという可能性を検証するために、抗 PHB2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法を行った。最後に、PHB2 の p21 に対する発現調節機能に着目し、PHB2 ががん細胞の増殖を促進する因子であるという可能性を検証するために、PHB2 と p21 を単独

または同時にノックダウンした MCF7 細胞を用いて、細胞周期解析、Senescence associated- β -Galactosidase (SA- β -Gal) 染色法による細胞老化の評価、トリパンブルー染色法による細胞増殖および細胞死の解析を行った。

1-2. 実験方法

1-2-1. 酵母ツーハイブリッド法

ProNet technology (Myriad Genetics, Salt Lake City, UT) のプロトコールに従って酵母ツーハイブリッド法による GGCT 相互作用タンパク質の探索を行った。ヒト GGCT アミノ酸配列全長 189 のうち、1-189, 1-96, 97-189 をコードする cDNA を pGBT.superB Gal4 DNA-binding domain (BD) 発現ベクターにサブクローニングすることによってベイトとして用い、ヒト乳がんおよび前立腺がん cDNA ライブラリーを pGAD.PN2 Gal4 activation domain (AD) 発現ベクターにサブクローニングすることによってプレイとして用いた。ネガティブコントロールとして選択された 6 つの遺伝子に由来する AD 融合プレイは特異性を確認するために使用された。陽性を示した二つのクローンの配列は BLAST (NCBI, Bethesda, MD) を用いて同定した。

1-2-2. 細胞と培養条件

ヒト乳がん細胞株 MCF7 は RIKEN BRC (Tsukuba, Japan) より購入した。DMEM (Wako Pure Chemical Industries, Kyoto, Japan) に 10% ウシ胎児血清 (FBS, HyClone, GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, England) および 1% penicillin/streptomycin (Wako, それぞれ 100 units/mL, 100 µg/mL) を加えた培地を用いて、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

1-2-3. 抗体

一次抗体には、マウス由来 IgG 抗体として、PHB2 (1:500, sc-133094, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)、GGCT (1:1000, 6-1E, Cosmo Bio, Tokyo, Japan)、GAPDH (1:1000, 016-25523, Wako)、p21 (556430, BD Biosciences, franklin lakes, NJ)、V5 epitope tag (V5, 1:2000, R960-25, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)、ウサギ由来 IgG 抗体として、Lamin A/C (1:1000, #2032, Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を用いた。二次抗体として、Horse anti-mouse IgG-horseradish peroxidase (HRP) を Vector Laboratories (1:2000, PI-2000, Burlingame, CA)、HRP-linked goat anti-rabbit IgG を CST (1:2000, #7074) からそれぞれ購入し用いた。

1-2-4. 共免疫沈降法

10 µg の抗 GGCT 抗体またはマウスアイソタイプコントロール抗体 (#5415, CST) を 1.5 mg の Dynabeads Protein G (Thermo Fisher Scientific) と室温で 10 分間、回転させながら反応させた。2 枚の 10 cm dish に 80% コンフルエントで培養した MCF7 細胞をトリプシン処理で剥離させ、回収し、プロテアーゼ阻害剤を添加した 1 mL の RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate-Na, 0.1% SDS) で懸濁し、氷上で 30 分間インキュベートすることにより溶解した。溶解液を 4°C、20,000 xg で 15 分間、遠心分離し、上清に含まれるタンパク質抽出液を回収し、Input として 50 µL を別に保存した。得られたタンパク質抽出液をそれぞれの抗体-ビーズ複合体に添加し、4°C で一晩、回転させながらインキュベートした。得られた抗原-抗体-ビーズ複合体を PBS で 3 回洗浄したのち、50 µL の 5x sample buffer (125 mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.04% bromophenol blue) を加えて 95°C、5 分間溶出した。得られたサンプルを後述のウェスタンブロ

ッティング法で解析した。

1-2-5. siRNA 導入トランスフェクション条件

5.0 x 10⁴ 個/well の MCF7 細胞を 6 well plate に播種し、およそ 24 時間後、30 pmol/well の Non-target control siRNA、GGCT siRNA と 5 μL の Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen, Waltham, MA) 試薬を含むトランスフェクション用無血清培地 Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) 中で混合し、15 分間、室温にて静置させ、penicillin/streptomycin を含まない培地に交換した培養細胞に添加し、終濃度 10 nM の siRNA の存在下でトランスフェクションを行った。PHB2 および p21 の同時ノックダウンを行う場合は、Non-target control siRNA を終濃度 20 nM でコントロールとして用いた。使用した siRNA は RNAi Co. LTD (Tokyo, Japan)、または Gene Design Inc. (Osaka, Japan) より購入した。配列を以下の表に示す。

Target gene	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')
Non target	GUACCGCACGUCAUUCGUAUC	UACGAAUGACGUGCGGUACGU
GGCT	UGACUAUACAGGAAAGGUCTT	GACCUUCCUGUAUAGUCATT
PHB2	AAGAACCCTGGCTACATCAA	TTTGATGTAGCCAGGGTTCTT
p21	CUGUACUGUUCUGUGUCUU	AAGACACAGAACAGUACAG

1-2-6. ウェスタンブロットティング法

培養細胞を PBS で洗浄したのち、37°C 約 1 分間のトリプシン処理にて細胞を剥離させ遠心処理にて細胞を回収した。回収した細胞を RIPA Buffer (50 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、1% NP-40、0.5% deoxycholate-Na、0.1% SDS) にプロテアーゼ阻害剤 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を加えたもので溶解し、氷冷させながら超音波処理にて破碎した。溶解液を 4°C、20,000 xg で 15 分間、遠心分離し、上清に含まれる可溶性のタンパク質抽出液を回収した。タンパク質抽出液は BCA タンパク質測定法 (Bio-RAD, Hercules, CA) を用いてタンパク質濃度を決定し、それぞれ 1 サンプルあたりタンパク質量として 20 μg に 5x sample buffer を加え、95°C、5 分間熱変性を行い、15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離した。共免疫沈降法によって得られた各サンプルは 20 μL ずつ、上記の 5x sample buffer で同様に処理した Input を 10 μL ずつアプライした。15%ゲルはセミドライ式 (170 mA/gel 定電流、75 分) にて PVDF メンブレン (Millipore, Burlington, MA) に転写した後、p21 を検出する際は PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal (TOYOBO, Osaka, Japan) で、p21 以外を検出する際は 3% スキムミルクおよび 0.05% Tween-20 を含有するリン酸緩衝溶液 (PBST) で室温下、1 時間ブロッキングした後、上記の希釈率で調製した一次抗体を、4°C で一晩、緩やかに振とうさせながら反応させた。PBST にて緩やかに振とうさせながら 5 分間、2 回洗浄したのち、二次抗体を室温で 1 時間、反応させた。抗体希釈液には p21 を検出する際は Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution (TOYOBO) を、p21 以外を検出する際は 3% のウシ血清アルブミン (BSA, Nacalai Tesque) を含有する PBST を使用した。タンパク質の発現シグナルは、メンブレンを PBST で 5 分間、3 回洗浄したのちに PBS で 2 回洗

浄し、通常は Clarity Western ECL Substrate (Bio-RAD) を用い、発現量が少なく検出が困難な場合は Chemi-Lumi One Super (Nacalai Tesque) を用いて発色させ、ChemiDoc XRS Plus (Bio-RAD) の CCD カメラで検出した。

1-2-7. 細胞質/核タンパク質分画

上記の条件で siRNA をトランスフェクションした 4 日目に、トリプシン処理によって剥離させ、回収したおよそ 1×10^6 個の細胞を LysoPure Nuclear and Cytoplasmic Extractor Kit (Wako) を用い、以下のような添付文書のプロトコールに従い、細胞質と核のタンパク質を分画した。PBS で洗浄した後の細胞ペレットに 50 μ L の Nuclear Fractionation Buffer を加え、最大速度で 10 秒間ボルテックスミキサーで混合した。氷上で 10 分間静置した後、最大速度で 10 秒間ボルテックスミキサーで混合し、500 \times g、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を氷冷した 1.5 mL チューブへ移し、20,000 \times g、4°C で 10 分間遠心分離することにより、細胞質画分を得た。500 μ L の Nuclear Fractionation Buffer を前述のステップで得られたペレットに加えることにより洗浄し、500 \times g、4°C で 10 分間遠心分離した。25 μ L の SDS Lysis Buffer をペレットに加え、最大速度で 10 秒間ボルテックスミキサーで混合し、超音波処理によってペレットを破碎した。20,000 \times g、4°C で 10 分間遠心分離することにより、核タンパク質画分を得た。

1-2-8. PHB2 強制発現 MCF7 細胞の樹立

pENTR221-PHB2 ベクターは Dnaform (clone no. 100011434, Yokohama, Japan) から購入した。Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて以下のように pENTR221-PHB2 ベクターを pEF-DEST51 ベクターに組み換えた。それぞれ 150 ng の pENTR221-PHB2 ベクターおよび pEF-DEST51 ベクター、TE buffer (pH 8.0) でトータル 8 μ L になるように混合した後、2 μ L の LR Clonase II Enzyme Mix を加えて混合した。この混合物を 25°C で 1 時間インキュベートし、1 μ L の Proteinase K 溶液を加えて混合した後、37°C で 10 分間インキュベートした。ここで得られたベクターを E. coli DH5 α コンピテントセル (Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan) を用いて、添付文書のプロトコールに従うことにより以下のようにトランスフォーメーションを行った。得られたベクターを 100 μ L のコンピテントセルに加え、氷中に 30 分間静置した後、42°C で 45 秒間インキュベートした。その後氷中で 2 分間静置し、あらかじめ 37°C に保温した SOC Medium 900 μ L を加え、200 rpm、37°C で 1 時間振とうした。あらかじめ 37°C に保温した、100 μ g/mL のアンピシリン (Wako) を含有した寒天培地に播種し、37°C で一晩インキュベートした。得られたコロニーを 100 μ g/mL アンピシリン含有 LB 培地 2 mL で 200 rpm、37°C でおよそ 8 時間振とうし、その全量を 200 mL のアンピシリン含有 LB 培地に移して 200 rpm、37°C で一晩振とうした。6,000 \times g、4°C で 15 分間遠心分離を行うことにより得られた大腸菌ペレットから、EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用い、以下のようにプラスミド DNA の精製を行った。ペレットを 10 mL の Buffer P1 で再懸濁し、10 mL の Buffer P2 を添加した後、転倒混和し、5 分間室温でインキュベートした。冷却した 10 mL の Buffer P3 を添加した後、転倒混和し、QIAfilter Cartridge の中にライセートを注ぎ、室温で 10 分間インキュベートした。プランジャーを QIAfilter Maxi Cartridge に入れ、ろ過したライセートに 2.5 mL の Buffer ER を添加し、10 回転倒混和した後、30 分間氷上でインキュベートした。あらかじめ Buffer QBT で平衡化した QIAGEN-tip 500 に、得られたライセートを加え、自然落下にてろ過した。Buffer QC で二回洗浄し、15 mL の Buffer QN で

プラスミド DNA を溶出した。この溶出液に 0.7 倍容量のイソプロパノール (Wako) を室温で添加し、15,000 xg、4°C で 30 分間遠心分離した。上清を除き、DNA ペレットを 70%エタノール (Wako) で洗浄し、15,000xg、4°C で 10 分間遠心分離した。上清を除き、ペレットを空気乾燥した後、50 μ L の TE buffer で溶解することにより目的のプラスミド DNA (V5-tagged PHB2 ベクター) を得た。次に、 2.0×10^6 個の MCF7 細胞に 2 μ g の V5-tagged PHB2 ベクターを、Amaya Cell Line Nucleofector Kit V and a Nucleofector™ 2b Device (Lonza, Visp, Switzerland) の P-020 プログラムを用いた電圧ポレーション法によって遺伝子導入した。得られた MCF7 細胞は、10 μ g/mL の blasticidin (Wako) を含んだ DMEM で 3 週間以上培養することによりセクションを行い、V5-tagged PHB2 の安定強制発現細胞株を樹立した。

1-2-9. 細胞周期解析

上記の siRNA 導入トランスフェクション条件にて MCF7 細胞に siRNA を導入した。トランスフェクション後 4 日目に、浮遊した細胞およびトリプシン処理した接着細胞を遠心処理にて回収した。回収した細胞を、70%エタノールを含む PBS にて -20°C で一晩作用させエタノール固定を行った。次に、20,000 xg で 5 分間遠心し、エタノールを除去した後、200 μ g/mL RNase A (Roche Diagnostic, Indianapolis, IN) を含む PBS で懸濁し 37°C で 30 分間静置することにより、RNA の分解を行った。その後、20 μ g/mL propidium iodide (PI) を含む PBS で懸濁し遮光、室温にて 30 分間静置させ、含有する DNA を染色した。ナイロンメッシュを用いて凝集塊を除去したのち、FACS Calibur (BD Bioscience) を用いて DNA 含有量を解析した。それぞれのサンプルは 10,000 個以上の細胞を用いて解析した。

1-2-10. クロマチン免疫沈降法

上記の siRNA 導入トランスフェクション条件にて MCF7 細胞に siRNA を導入した。トランスフェクション後 4 日目に、トリプシン処理によって剥離させ、回収したおよそ 5×10^6 個の MCF7 細胞を 1% ホルムアルデヒドで 10 分間、室温で処理することによりクロスリンクさせた。終濃度 150 mM のグリシンで処理することにより反応を停止させ、冷 PBS で 3 回洗浄した。Cell lysis buffer (0.5% NP-40、85 mM KCl、5 mM PIPES pH 8.0、protease inhibitor) で懸濁して氷上で 10 分間インキュベートすることによって細胞を溶解し、2,000 xg で遠心した。得られたペレットを nucleus lysis buffer (1% SDS、10 mM EDTA、50 mM Tris pH 8.0、protease inhibitor) で再懸濁し、氷上で 10 分間インキュベートした。得られた溶解液を Bioruptor UCD-250 (Cosmo Bio) を用いて 30 秒間、6 回冷却しながら H-amplitude で超音波処理することによって DNA を切断し、15,000 xg で 5 分間、遠心することによって上清に切断されたクロマチン断片を得た。終濃度 5 μ g/mL で抗 PHB2 抗体およびマウスアイソタイプコントロール抗体を添加し、4°C で一晩、回転させながらインキュベートした。得られた抗原-抗体複合体を 1.5 mg の Dynabeads Protein G に添加し、4°C で 2 時間、回転させながらインキュベートした。得られた抗原-抗体-ビーズ複合体を wash buffer 1 (0.1% SDS、1% Triton X-100、2 mM EDTA、150 mM NaCl、20 mM Tris pH8.1)、wash buffer 2 (1 と NaCl が 500 mM であること以外は同一)、LiCl buffer (250 mM LiCl、1% NP-40、1% sodium deoxycholate、1 mM EDTA、10 mM Tris、pH 8.1) および TE buffer でそれぞれ洗浄し、続いて elution buffer (1% SDS、10 mM EDTA and 50 mM Tris、pH8.0) を加えて 65°C で一晩、緩やか振とうすることによって抗原-抗体複合体を溶出した。得られた溶液を 40 μ g/mL の RNase A で 30 分間、

37°C でインキュベートし、その後、proteinase K を添加して2時間、55°C でインキュベートした。DNA はフェノールクロロホルム抽出法により精製した。DNA 濃度は Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) によって添付文書のプロトコールに従い定量した。得られた DNA は quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 法で解析した。Eurofins Genomics (Tokyo, Japan)より購入し、用いたプライマーの配列を以下の表に示す。

Target		Sequence (5'→3')
p21 ^{WAF1/CIP1} specific primer	Forward	CAGCGCACCAACGCAGGCG
	Reverse	CAGCTCCGGCTCCACAAGGA
Control primer	Forward	CTTTATTTATGTCATCTCCATAAACCATCT
	Reverse	GAATACTCCCCACATAGCCCG

1-2-11. SA-β-Gal 染色法

上記の siRNA 導入トランスフェクション条件にて MCF7 細胞に siRNA を導入した。トランスフェクション後4日目において細胞老化染色キット (OZ Bioscience, Marseille, France) を用いて、以下のよう SA-β-Gal 染色を行った。細胞を PBS で一度洗浄後、1 mL の Fixing buffer を加えて室温で15分間インキュベートすることにより細胞を固定した。Fixing buffer を取り除き、PBS で2回洗浄したのち、1 x SD X-Gal を含んだ staining buffer 1 mL 加え、37 °C で一晩反応させた。staining buffer を取り除いて PBS で2回洗浄した後、SA-β-Gal に青色に染色された細胞を老化細胞として計数し、視野内の全細胞中の SA-β-Gal 陽性細胞の割合を算出した。それぞれの実験において400以上の細胞数を計数し、少なくとも12か所の視野で評価した。

1-2-12. 生細胞数・死細胞率の評価

MCF7 細胞の生細胞数はトリパンブルー染色法によって評価した。5.0 x 10⁴ 個/well で6 well plate に播種し、24時間後に上記の siRNA 導入トランスフェクション条件にて細胞に siRNA を導入した。トランスフェクション後6日目にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調製し、同量の0.4%トリパンブルー (Wako) を添加し、10 μL の細胞懸濁液を用い、細胞数を血球計算盤により計数した。トリパンブルーを排出し透明であった細胞を生細胞として、トリパンブルーによって染色された細胞を死細胞としてカウントし、血球計算盤において4か所の計測平均値を算出した。死細胞数を生細胞と死細胞の合計数で除した値を死細胞率とし、パーセンテージを算出した。

1-2-13. 統計学的処理

全てのデータはそれぞれ独立した3回以上の実験を行うことにより解析した。データは平均値 ± 標準偏差 (S.D.) にて表示した。p 値は Excel software を用いて Student's t-test 両側検定を行うことにより算出し、得られた p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

1-3. 実験成績

1-3-1. GGCT タンパク質および PHB2 タンパク質の相互作用解析

GGCT と相互作用するタンパク質分子を同定すべく、酵母ツーハイブリッド法による網羅的な相互作用解析を行った。その結果、ヒト PHB タンパク質分子のフラグメント (113-299 番目アミノ酸) と、ベイトとして用いたヒト GGCT タンパク質分子のアミノ酸配列の全長、1-96 および 97-189 のうち、97-189 アミノ酸配列との結合が検出された (Fig. 3A)。次に、実際にヒトがん細胞内で GGCT と PHB2 が結合していることを確かめるため、MCF7 細胞由来の可溶性タンパク質抽出液について、抗 GGCT モノクローナル抗体を用いて共免疫沈降を行い、ウェスタンブロッティング法を用いて解析した。その結果、PHB2 のバンドは抗 GGCT 抗体を用いて免疫沈降した画分に観察され、アイソタイプコントロール抗体を用いて免疫沈降した画分には観察されなかった (Fig. 3B)。したがって MCF7 細胞において、内在性の GGCT タンパク質と PHB2 タンパク質の間に相互作用が存在していると考えられた。次に、GGCT が PHB2 の細胞内局在に影響を与える因子であるという仮説を立て、GGCT siRNA または control siRNA を導入した MCF7 細胞由来の、細胞質画分および核画分に分画したタンパク質抽出物について、ウェスタンブロッティング法を用いて PHB2 の細胞内局在を解析した (Fig. 3C)。GGCT のバンドは細胞質画分にも観察され、GGCT siRNA によるノックダウン効率を確認できた。コントロール細胞と比較して、GGCT ノックダウン MCF7 細胞において核内の PHB2 発現量が減少しており、一方で、細胞質の PHB2 は増加していた。以上の結果から、内在性の GGCT タンパク質と PHB2 タンパク質は細胞質で相互作用しており、GGCT タンパク質は PHB2 の細胞質から核への移行を促進する因子であることが示された。

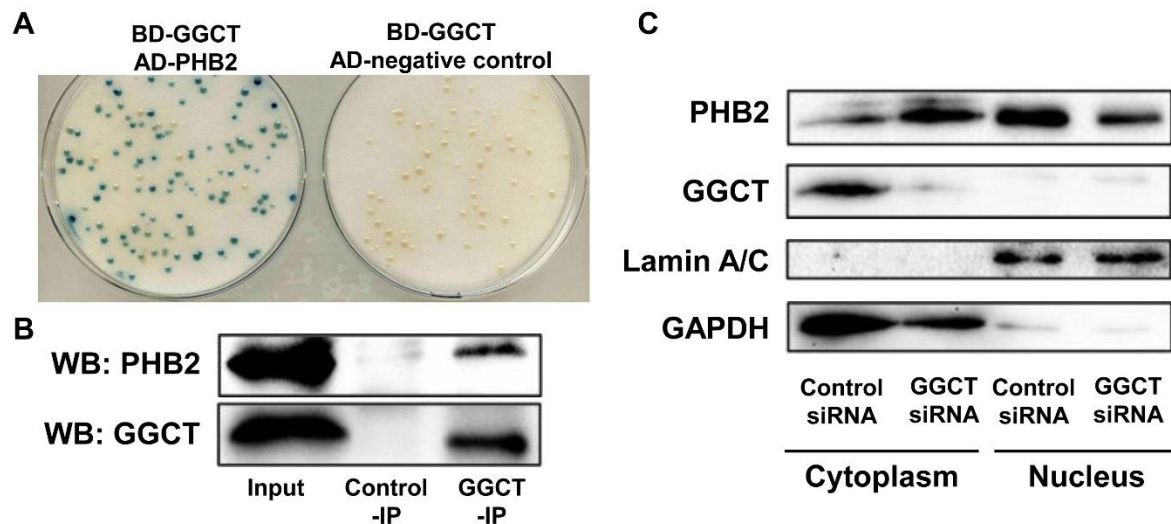


Figure 3. Interaction between PHB2 and GGCT proteins in MCF7 human breast cancer cells.

A, Representative images showing β -gal staining after yeast two-hybrid analysis. The blue signals generated by LacZ reporter activity indicate the interaction between GGCT (amino acids 97–189) and PHB2 (amino acids 113–299) fragments (left), but not with the negative control (right). **B**, Endogenous GGCT proteins were immunoprecipitated from MCF7 cell extracts using anti-GGCT or isotype control antibodies. PHB2 or GGCT proteins were detected by Western blot analysis of precipitated proteins and the lysate input. **C**, Expression of PHB2 and GGCT in the cytoplasm or nucleus was analyzed by Western blotting. Fractionated proteins from MCF7 cells were extracted at 4 days post-transfection of siRNA targeting GGCT or a non-target control siRNA. Lamin A/C and GAPDH are shown as fractionation and loading controls, respectively. These immunoblotting experiments were performed at least three times and the representative results are shown. These figures were cited from Fig. 1 in Taniguchi K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, 496, 218-224.

1-3-2. PHB2によるGGCTノックダウンで誘導されるp21発現上昇の阻害効果の検討

以前の研究で、GGCTノックダウンはがん細胞にp21の発現を上昇させ、p21発現上昇に依存してG0/G1期における細胞周期の停止を引き起こすことを報告した(18)。前述の通り、過去の文献では、PHB2は核においてはREA機能を持ち(32)、子宮頸がん細胞株HeLaにおいては、ミトコンドリアに局在していたPHB2はエストロゲン刺激によって核へ移行し、ER α 依存性の転写を抑制することが報告されている(33)。すなわち、PHB2は転写調節能を有するタンパク質であると考えられた。そこで、PHB2がGGCTノックダウンによるp21発現上昇および細胞周期停止に重要な役割を果たしているという仮説を立て、MCF7細胞においてPHB2のノックダウンおよび強制発現を行い、ウェスタンブロットティング法によるp21の発現解析およびフローサイトメトリー法による細胞周期解析を行った。その結果、PHB2のGGCTとの同時ノックダウンは、p21の顕著な発現上昇を引き起こした。また、PHB2の単独ノックダウンはp21発現上昇を引き起こした(Fig. 4A)。一方、PHB2の強制発現は、GGCTノックダウンによるp21発現上昇を減弱した(Fig. 4B)。PHB2の単独強制発現によっても、p21タンパク質発現レベルにベース量からの減少がみられた。したがって、PHB2はp21の発現抑制因子としての機能を有すると考えられた。さらに、PHB2の強制発現がGGCTノックダウンによって引き起こされたG0/G1期における細胞周期の停止を有意に回復することを明らかにした(Fig. 4C and D)。以上の結果より、GGCTノックダウンによるp21発現上昇およびG0/G1期における細胞周期停止に対し、PHB2は制御的な役割を果たしていると考えられる。

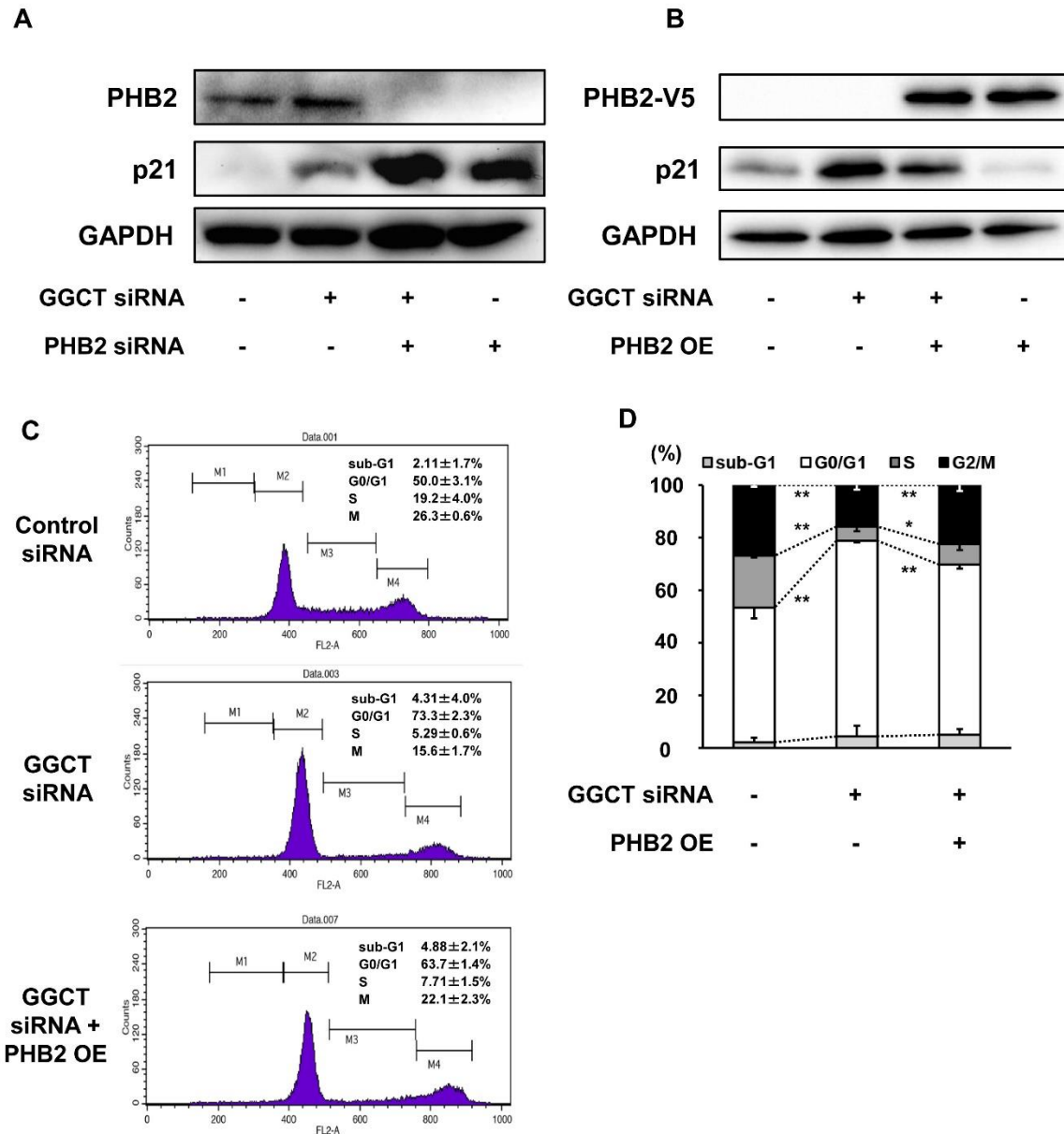


Figure 4. PHB2 inhibits upregulation of p21 in MCF7 cells.

A, Expression of p21 protein in MCF7 cells was analyzed by Western blotting at 4 days post-transfection with siRNAs targeting GGCT and/or PHB2. **B**, PHB2-overexpressing (PHB2 OE+) or empty vector-transfected (PHB2 OE-) MCF7 cells were prepared, and expression of p21 protein was analyzed by Western blotting at 4 days post-transfection with the indicated siRNAs. These immunoblotting experiments were performed at least three times and the representative results are shown. **C and D**, Cell cycle analysis of PHB2 OE+ or OE- MCF7 cells at 4 days post-transfection with the indicated siRNAs was performed by flow cytometry. Representative histograms **C** and the percentage of cells at each phase of cell cycle **D** are shown. (* p<0.05, ** p<0.01.) These figures were cited from Fig. 2 in Taniguchi K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, 496, 218-224.

1-3-3. PHB2 の p21 プロモーター領域への結合能の解析

過去の報告によると、核に局在する PHB2 は転写を抑制する因子であることが示されている (31)。そこで次に我々は、PHB2 が p21 のプロモーター領域に結合するという仮説を立てた。これを実証すべく、抗 PHB2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降を行った (Fig. 5A)。抗 PHB2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降によって得られた DNA 断片に対し、p21 のプロモーター領域に特異的なプライマーを用いて qPCR を行うと、アイソタイプコントロール抗体を用いたときと比較して、p21 のプロモーター領域が有意に検出されることがわかった (Fig. 5B)。さらに、この PHB2 の p21 プロモーター領域に対する結合は、GGCT ノックダウンによって顕著に抑制された (Fig. 5C)。以上の結果より、MCF7 細胞において PHB2 タンパク質は p21 のプロモーター領域に結合し、その結合は GGCT ノックダウンによって抑制されることを明らかにした。

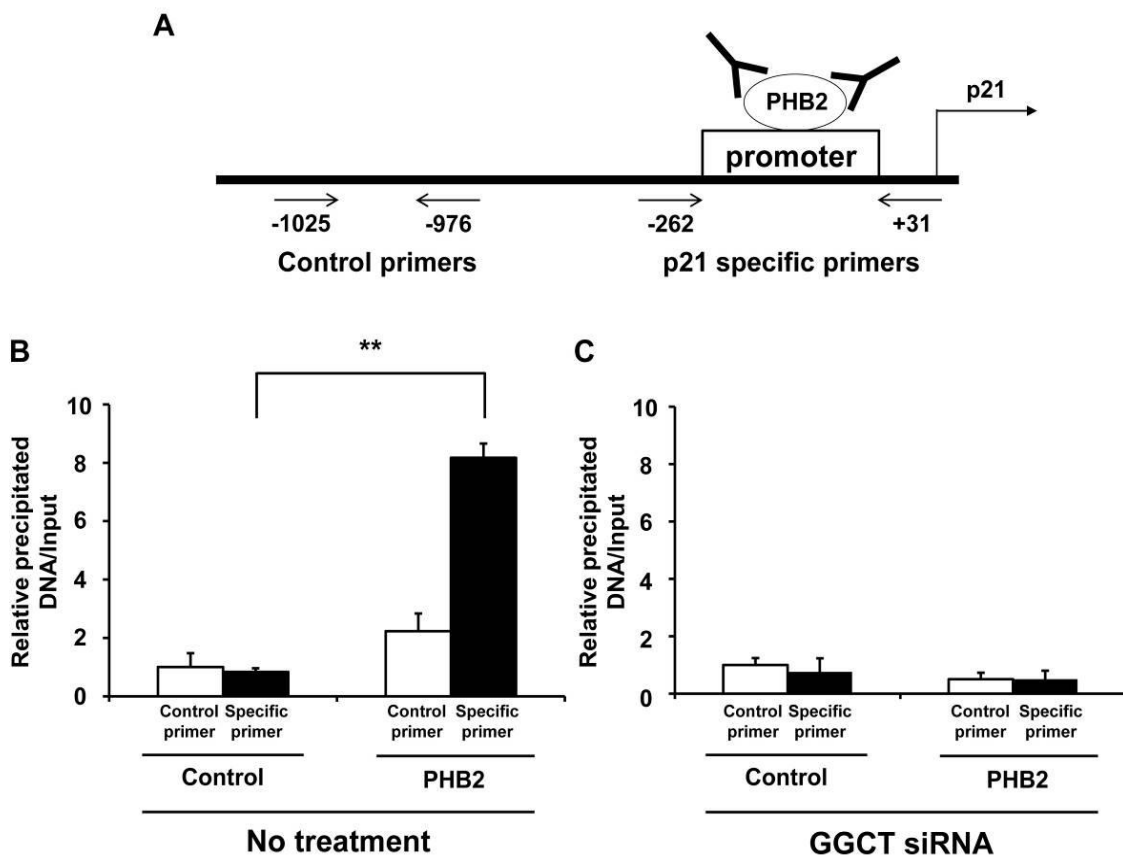


Figure 5. PHB2 binds to the p21 promoter in MCF7 cells but not in GGCT-depleted cells.

A, Schematic diagram showing the qPCR primers used for ChIP analysis of the human p21 promoter region. **B and C**, The chromatin fragments bound to PHB2 proteins in non-treated **B** or GGCT-depleted **C** MCF7 cells were immunoprecipitated with an anti-PHB2 antibody (PHB2) or an isotype control IgG (control). Relative amounts of DNA, as quantified by qPCR. (** p < 0.01.) These figures were cited from Fig. 3 in Taniguchi K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, 496, 218-224.

1-3-4. PHB2 のノックダウンによる細胞周期停止に対する p21 の影響の解析

本章においてこれまでに示した実験結果から、PHB2 には p21 の発現を抑制する機能があると考えられた。この p21 は細胞周期の進行を抑制する重要な因子である。そこで次に、PHB2 にはがん細胞の増殖を促進する機能があるという可能性を考えた。これを検証するために、PHB2 の単独ノックダウンによる細胞周期への影響と、それに対する p21 の関与をフローサイトメトリー法を用いて解析した。その結果、まず、PHB2 の単独ノックダウンは p21 発現を顕著に誘導し (Fig. 6A)、さらに G0/G1 期における細胞周期停止を引き起こした (Fig. 6B and C)。そこで、p21 を同時にノックダウンすることによりその発現上昇を阻害すると、この細胞周期停止は回復した。したがって、PHB2 のノックダウンで誘導される細胞周期の停止は、p21 の発現上昇に依存することが明らかになった。

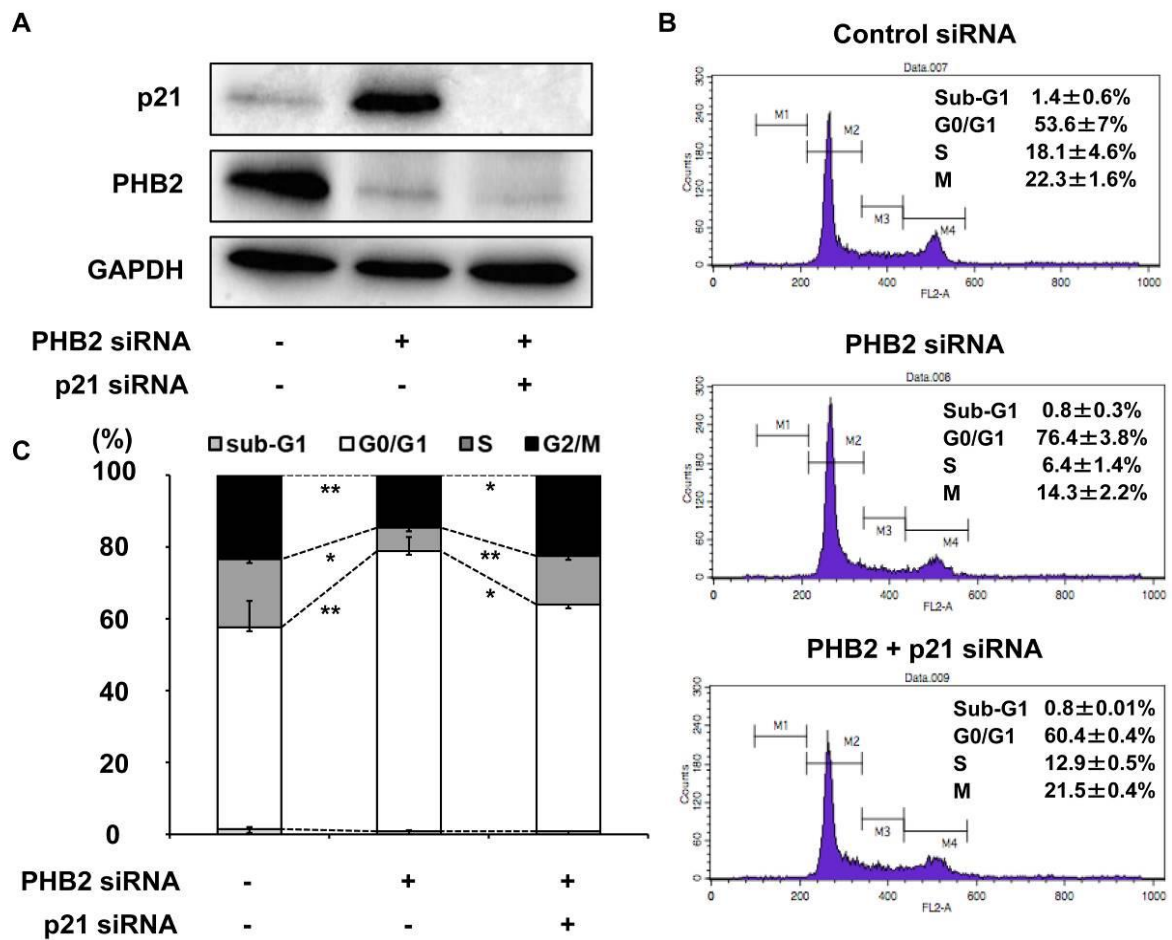


Figure 6. Knockdown of PHB2 alone induces G0/G1 arrest in MCF7 cells via upregulation of p21.

A, Expression of p21 or PHB2 in MCF7 cells was analyzed by Western blotting at 4 days post-transfection with siRNAs targeting PHB2 and/or p21. These immunoblotting experiments were performed at least three times and the representative results are shown. **B and C**, Cell cycle analysis of MCF7 cells at 4 days post-transfection with the indicated siRNAs was performed by flow cytometry. Representative histograms **B** and the percentage of cells at each phase of cell cycle **C** are shown. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.) These figures were cited from Fig. 4 and Supplementary fig. 1 in Taniguchi K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, 496, 218-224.

1-3-5. PHB2 のノックダウンによる細胞老化に対する p21 の影響の解析

以前の研究で我々の研究グループは、GGCT ノックダウンががん細胞に細胞老化を引き起こし、p21 の発現上昇はこの細胞老化の誘導に重要な役割を果たすことを示した (18)。そこで、PHB2 単独ノックダウンによって細胞老化が引き起こされるかどうかを SA- β -gal 染色法を用いて解析した。その結果、PHB2 のノックダウンによって SA- β -gal 陽性老化細胞の出現が観察され、その割合が有意に増加することがわかった。そこで同時に p21 をノックダウンすると、この老化細胞の増加は抑制された (Fig. 7A and B)。したがって、PHB2 のノックダウンによって誘導された細胞老化は、p21 の発現上昇に依存することが明らかになった。

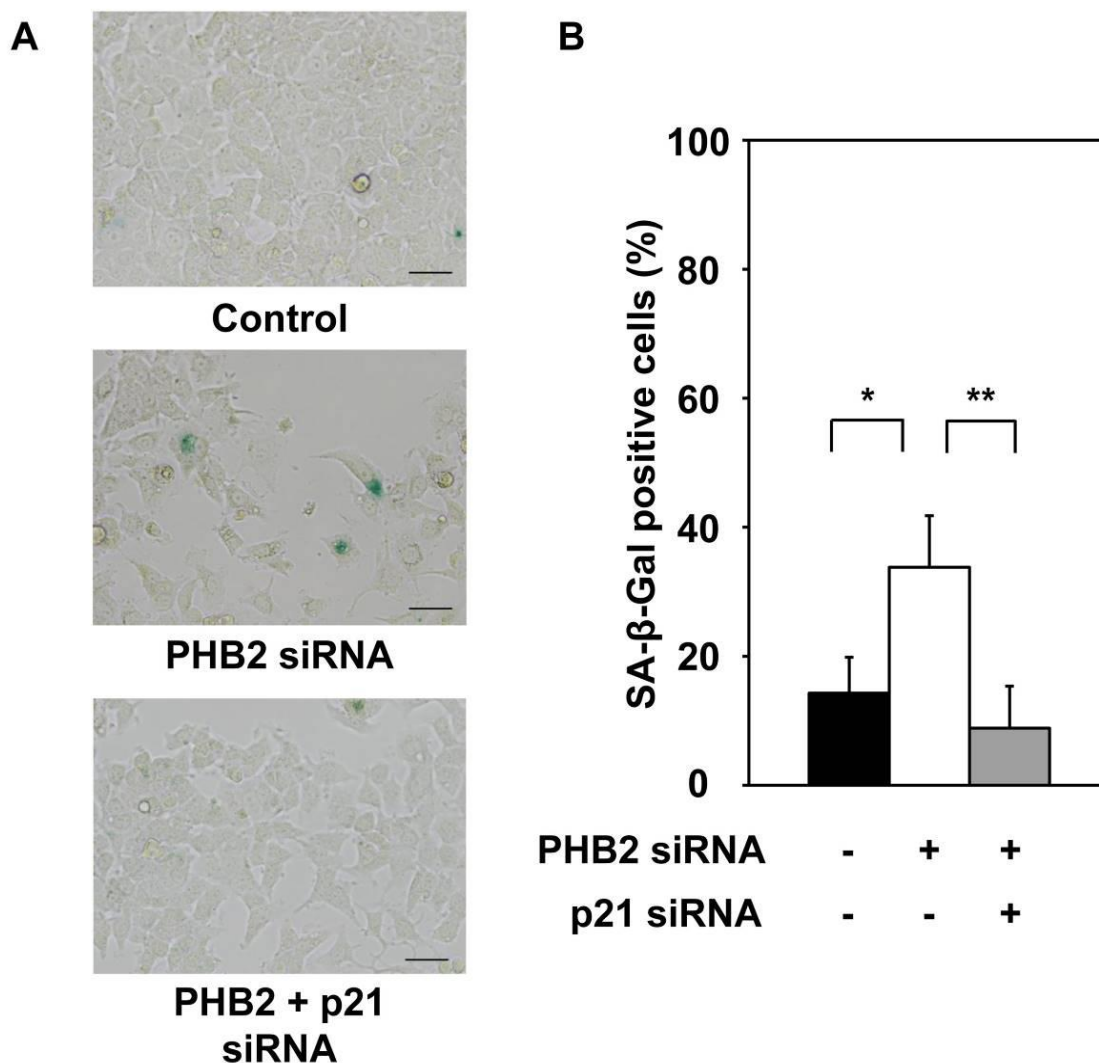


Figure 7. Knockdown of PHB2 induces cellular senescence in MCF7 cells via upregulation of p21.

A, Representative images of SA- β -Gal staining of MCF7 cells 4 days post-transfection with the indicated siRNAs. Scale bar, 50 μ m. **B**, The number of SA- β -Gal-positive cells was counted and the positive cell: total cell ratios are shown. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.) These figures were cited from Fig. 4 and Supplementary fig. 2 in Taniguchi K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, 496, 218-224.

1-3-6. PHB2 のノックダウンによる細胞増殖抑制および細胞死に対する p21 の影響の解析

過去の報告において、MCF7 細胞における GGCT ノックダウンによる細胞増殖抑制および細胞死は、p21 発現上昇に依存して誘導されることが示されている (18)。前述の通り、GGCT ノックダウンによって、核内 PHB2 の発現量が減少し、かつ p21 の発現量が増加することが示された。そこでこの生物学的意義を明らかにすべく、PHB2 単独ノックダウンが細胞増殖に与える影響、および p21 の関与についてトリパンブルー染色法を用いて解析した。すると、PHB2 のノックダウンによって生細胞数の減少および死細胞の割合の増加が引き起こされることがわかった。さらに、その生細胞数の減少および死細胞の割合の増加は、p21 の同時ノックダウンによって有意に回復した (Fig. 8A and B)。したがって、PHB2 のノックダウンによって誘導された生細胞数の減少および死細胞の割合の増加は、p21 の発現上昇に依存することが明らかになった。

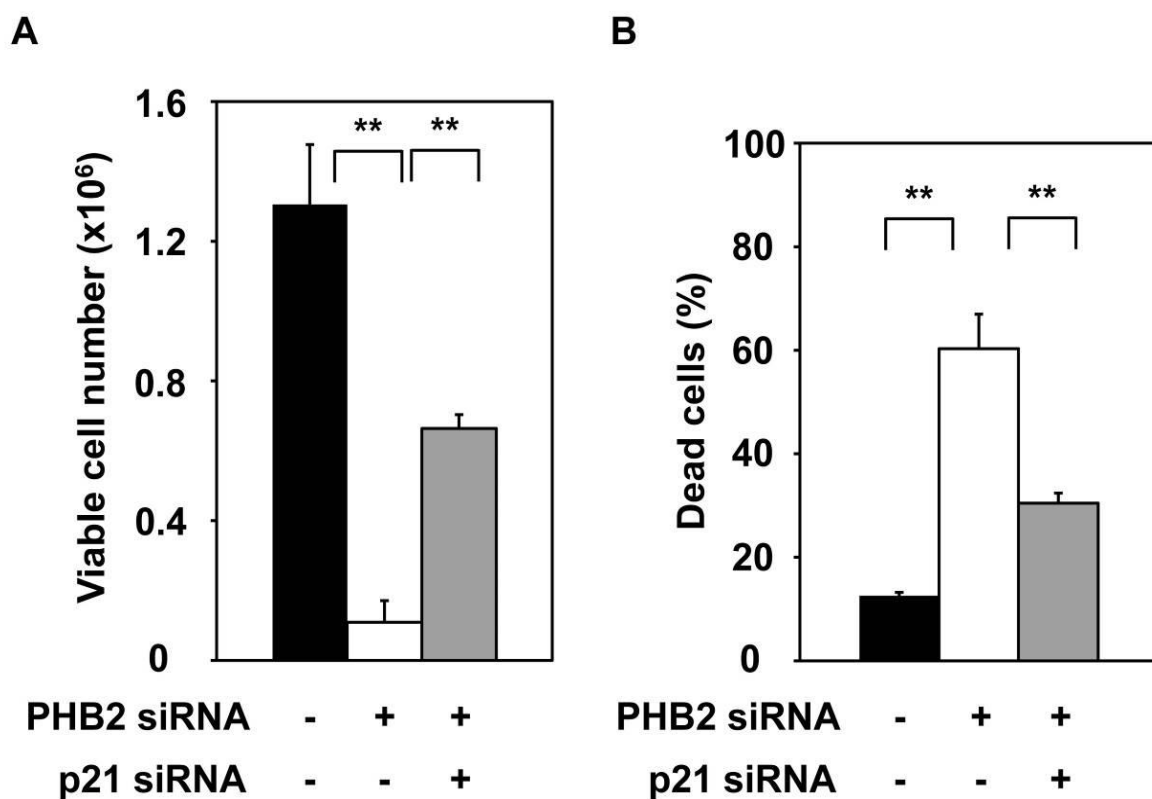


Figure 8. Knockdown of PHB2 induces growth inhibition and cell death in MCF7 cells via upregulation of p21.

A, MCF7 cells were transfected with the indicated siRNAs. The number of Trypan blue-negative viable cells at 6 days post-transfection is shown. **B**, Proportion of Trypan blue-positive (dead) cells at 6 days post-transfection with the indicated siRNAs. (** p<0.01.) These figures were cited from Fig. 4 and Supplementary fig. 3 in Taniguchi K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, 496, 218-224.

1-4. 考察

本章では、GGCT との新規の相互作用タンパク質分子である PHB2 を、酵母ツーハイブリッド法を用いた網羅的相互作用解析で同定した。さらに、ヒト乳がん細胞由来のタンパク質抽出物に対する抗 GGCT 抗体を用いた免疫沈降法により、内在性の PHB2 と GGCT が相互作用していることを確認した。核内に発現する PHB2 は転写を抑制する因子として機能することが示されており (31)、例えばエストロゲン刺激に応答してミトコンドリアの PHB2 が核に移行し、エストロゲン依存性の転写が抑制されることが報告されている (33)。また別の研究では、brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 3 (BIG3) は PHB2 を捕捉し、PHB2 の核への移行を抑制することが報告されている (36)。さらに、Kuramori らは、ヒト骨髄性白血病細胞において、天然化合物 capsaicin は PHB2 に直接結合し、PHB2 の核移行を促進することを示した (37)。これらの知見は、PHB2 の核内局在が調節されることは、PHB2 が転写抑制機能を発揮する上で重要な役割を果たすことを示唆している。本章においては、GGCT ノックダウンは核内の PHB2 発現を減少させ、細胞質における PHB2 発現を増加させることを示した。このことは、GGCT は PHB2 の核移行を促進する新規因子であることを示唆している。しかしながら、PHB2 の核移行を GGCT がどのようなメカニズムで促進するかについては不明であり、今後の重要な研究課題である。過去の報告において、GGCT に類似したタンパク質である Botch タンパク質が、Notch タンパク質の γ -グルタミルグリシン側鎖からグリシンを遊離させるという翻訳後修飾を行うことにより、その核移行を調節しているということが報告されている (38)。さらに GGCT は Glu98 に活性中心を持つことが示されており (20)、これは本章で示された PHB2 と相互作用する 97-189 アミノ酸配列中に含まれるため、GGCT の酵素活性が PHB2 に何らかの翻訳後修飾を施し、その核移行を調節している可能性が考えられる。

以前の研究で、GGCT 発現抑制が p21 の発現を増加させ、この p21 発現上昇に依存して細胞老化および細胞増殖抑制が引き起こされることを報告してきたが (18)、その詳細なメカニズムは不明であった。PHB2 と GGCT が相互作用していること、GGCT ノックダウンによって PHB2 の核内および細胞質における発現量が変化したことを鑑みて、PHB2 が GGCT ノックダウンによる p21 の発現上昇に重要な役割を果たすという仮説を立てた。そして実際に、核内 PHB2 は p21 のプロモーター領域に結合しており、その結合は GGCT ノックダウンによって顕著に抑制されることを明らかにした。この結果は、GGCT の発現を抑制すると、PHB2 の細胞質から核への移行が阻害されることによって、p21 のプロモーター領域に結合する PHB2 タンパク質の量が減少し、それによって p21 の転写抑制が解除されたという可能性を示している。この知見と矛盾することなく、PHB2 の強制発現が GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇を顕著に抑制することも示した。これらの結果より、GGCT 発現抑制で誘導される p21 発現上昇は、PHB2 の p21 転写抑制因子としての機能が阻害されることによって引き起こされることを示唆している。また、MCF7 細胞において PHB2 を単独でノックダウンすると、細胞老化の誘導、G0/G1 期における細胞周期停止、増殖抑制および細胞死の誘導等の、GGCT ノックダウンでがん細胞に引き起こされる細胞応答と同じ表現型が誘導され、さらにこれらの表現型は p21 依存的事であることを示した。これらの結果は、GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇とそれに続く細胞周期停止および細胞老化が、PHB2 の p21 転写抑制機能の阻害によって調節されているのではないかという考察を補強する。

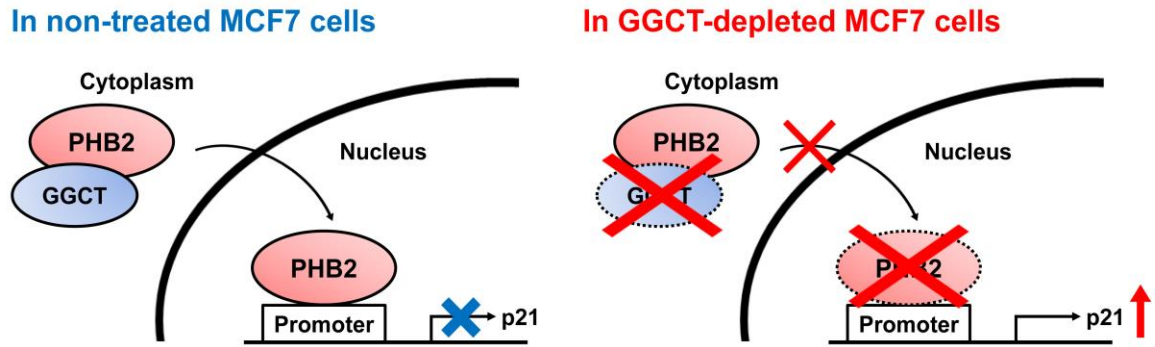


Figure 9. Depletion of GGCT upregulates p21 expression by inhibiting PHB2 binding to p21 promoter.

Graphical summary of the mechanisms of p21 upregulation by GGCT depletion, including inhibition of the translocation of PHB2 protein from cytoplasm into nucleus.

p21 は p53 の主要な標的遺伝子であり、がん細胞の増殖抑制に中心的な役割を果たすため (39, 40)、p21 を調節する機能を持つ PHB2 はがん治療における有望な標的であると考えられた。Polier らは、PHB1 および PHB2 は rocaglamides という天然抗がん化合物の直接的な標的であり、ヒト急性 T 細胞性白血病細胞株 Jurkat に G0/G1 期における細胞周期停止を引き起こすが、PHB1 および 2 のノックダウンはその細胞周期停止効果を模倣したと報告した (41)。Cheng らは、ヒト肝細胞がん細胞株 HepG2 に PHB2 siRNA を導入すると、S 期の細胞が減少し、G0/G1 期の細胞が増加したと報告した (35)。MCF7 細胞において、PHB2 単独ノックダウンが G0/G1 期における細胞周期停止を引き起こしたという本章における結果を併せて考えると、PHB2 は、p21 の発現が抑制されて異常な増殖を示すようになったがん細胞に対する有望な標的分子である可能性が考えられる。しかし一方で、BIG3 による PHB2 の核移行阻害を抑制すると、ER α の下流標的遺伝子の転写が抑制され、*in vitro* 及び *in vivo* において乳がんの増殖が抑制されることが報告されている (42, 43)。つまりエストロゲン依存性の増殖を示すがん細胞においては、PHB2 は抗がん効果を持つタンパク質であることも示唆されている。エストロゲン依存性または非依存性がん細胞の両方における PHB2 の機能を明らかにするためには、今後更なる研究が必要である。

本章において、GGCT と相互作用するタンパク質分子として PHB2 を新たに見出し、PHB2 が p21 のプロモーター領域に結合することによってその発現を抑制する新規因子であることを明らかにした。GGCT のノックダウンは PHB2 の核内発現を抑制し、それによって p21 のプロモーター領域に結合する PHB2 の量を減少させ、結果的に p21 の発現上昇を引き起こしていると考えられる。PHB2 の強制発現は GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇を顕著に抑制したことから、GGCT ノックダウンを介した p21 発現上昇には、PHB2 の阻害を必要とすることが示唆される。また、MCF7 細胞における PHB2 の単独ノックダウンが p21 発現上昇を介して細胞周期停止、細胞老化、増殖抑制および細胞死を誘導したことから、本研究における p21 発現抑制因子としての PHB2 の機能解明は、がん細胞の無秩序な増殖の根底にあるメカニズムへの新たな洞察を示し、新規治療標的としての可能性を示唆している。

第2章

GGCT ノックダウンによるオートファジーの誘導を介して CDKI の発現が上昇する機構

2-1. 緒言

今日、プログラム細胞死には多数の様式が存在することが報告されており、細胞死様式の分類とその呼称については議論の別れるところではあるが、古典的には、大別すると次のような分類がなされる。タイプ1プログラム細胞死は典型的には caspase-3/7 に依存的なアポトーシス細胞死、タイプ2プログラム細胞死は典型的にはオートファジー関連タンパク質 5/6 (autophagy related 5/6、ATG5/6) 依存的なオートファジー関連細胞死、タイプ3プログラム細胞死はネクロトーシス型プログラム細胞死 (ネクロトーシス)、および mitotic catastrophe 等を含むその他の様式である (44)。過去の報告において我々の研究グループは、GGCT の発現抑制によって引き起こされるがん細胞死はアポトーシス性ではないことを示してきた (18)。さらに、GGCT は γ -グルタミルサイクル中でグルタチオンの恒常性維持とアミノ酸の代謝に関わる酵素であるため、そのノックダウンは細胞に代謝性ストレスを引き起こすのではないかと考えられた。そこで、GGCT の発現抑制がオートファジー関連細胞死を引き起こすのではないかという仮説を立てた。

オートファジー (自食作用) は栄養素の欠乏等に応答して誘導される、細胞の代謝恒常性を維持するために備わった機能である。オートファジーは基本的には細胞保護的な現象であるが、細胞代謝の不均衡によって過剰にオートファジーが惹起されると細胞死が引き起こされることがあり、これがいわゆるオートファジー関連細胞死である (45)。ATG5 はオートファジーの進行に不可欠な因子であり、ATG12 が E1 様酵素 ATG7 によって活性化されると、E2 様酵素 ATG10 によって ATG5 と共有結合し、この複合体は ATG16L1 とさらに複合体を形成する。このタンパク質複合体は E3 様酵素として働き、さらに下流の microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3) のホスファチジルエタノールアミンとの結合を促進することにより、オートファゴソーム形成を促進する (46)。ATG5 がオートファジーの誘導に重要な役割を果たす因子であることは、オートファジー誘導能を欠く ATG5 欠損の新生仔マウスを飢餓条件下で生育すると、同条件下で生育した野生型マウスよりもはるかに短い期間しか生存できなかったという Kuma らの研究によって示されている (47)。

オートファジーを誘導するシグナル伝達経路には様々なものがあるが、代表的なものとして AMPK-ULK1 シグナル伝達経路、mTOR シグナル伝達経路等が挙げられる。ULK1 はオートファジーの開始に必須の因子であり、AMPK α が Thr172 におけるリン酸化によって活性化されると、p-AMPK α は ULK1 を直接リン酸化することによってオートファジーを開始する (48)。ULK1 はいくつかのアミノ酸残基においてリン酸化を受けることが報告されており、それぞれ異なるシグナル伝達によってリン酸化され、異なる機能を発揮する (49)。例えば、グルコース欠乏によって活性化された AMPK は、ULK1 を Ser777 および Ser317 において直接リン酸化することにより、オートファジーを開始する (50)。栄養素が豊富に存在する条件下においては、ULK1 は mTOR complex 1 (mTORC1) によって Ser757 をリン酸化され、AMPK による ULK1 の活性化が阻害される (50)。さらに、アミノ酸欠乏によって活性化された AMPK は、ULK1 を Ser555 でリン酸化することによりオートファジーを誘導する (51)。一方で、Thr172 をリン酸化され活性化された AMPK は、mTORC1 の構成分子の一つである Raptor をリン酸化

することにより、mTORC1 のシグナル伝達経路を阻害することが報告されている (52)。もう一つの mTOR 複合体、mTORC2 は、Akt を Ser473 でリン酸化することが報告されている (53)。Ser473 でリン酸化された Akt は酵母においては ATG6 としても知られる Beclin1 をリン酸化し、リン酸化された Beclin1 が 14-3-3 および中間径フィラメントと複合体を形成することにより、オートファジーが阻害されることが報告されている (54)。

本章では、MCF7 細胞および PC3 細胞において siRNA を用いて GGCT の発現を抑制し、オートファジーマーカーである LC3-II のウェスタンブロッティング法による検出、オートファゴソームを特異的に染色するカチオン性両親媒性トレーサー色素を用いた染色法によりオートファゴソーム形成の評価を行った。また、GGCT を強制発現させたマウス線維芽細胞株 NIH3T3 を血清欠乏条件で培養し、ウェスタンブロッティング法による LC3-II の検出を行うことにより、GGCT のオートファジーに対する影響を解析した。生細胞中の NADH 量に比例して WST-8 から生成されるホルマザンを定量することにより細胞増殖を評価し、フローサイトメトリー法による細胞周期解析を行うことにより、GGCT がオートファジーの誘導、細胞増殖および細胞周期に与える影響について解析した。さらに、オートファジーの進行に重要な役割を果たす ATG5 を GGCT と同時にノックダウンすることによってオートファジーを阻害することにより、細胞周期停止、細胞増殖抑制、細胞死の誘導および細胞老化といった GGCT 発現低下細胞で観察される表現型の誘導におけるオートファジーの機能を解析した。最後に、オートファジーの誘導に重要な役割を果たす AMPK シグナル伝達経路および mTOR シグナル伝達経路の変動について、それぞれのリン酸化体をウェスタンブロッティング法で検出することにより解析した。

2-2. 実験方法

2-2-1. 細胞と培養条件

ヒト乳がん細胞株 MCF7、ヒト前立腺がん細胞株 PC3、ヒト前立腺がん細胞株 DU-145、ヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 は RIKEN BRC より購入した。マウス線維芽細胞株 NIH3T3 は American Type Culture Collection (Rockville, MD) より購入した。GGCT 強制発現 NIH3T3 細胞の樹立は、pCX4bsr レトロウイルスベクターを用い、空ベクターまたは GGCT 発現ベクターをトランスフェクションすることにより行った (2)。DMEM に 10%FBS および 1% penicillin/streptomycin (それぞれ 100 units/mL、100 μ g/mL) を加えた培地を用いて、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

2-2-2. 抗体

第一章で使用した抗体に加え、一次抗体にはマウス由来 IgG 抗体として、LC3 (1:1000、M186-3、MBL、Nagoya, Japan)、 β -actin (1:1000、017-24551、Wako)、 β -tubulin (1:200、T4026、Sigma-Aldrich、St. Louis, MO)、ウサギ由来 IgG 抗体として、p16 (1:1000、ab51243、Abcam、Cambridge, MA)、phospho-AMPK α (Thr172、1:1000、CST)、phospho-ULK1 Ser555 および Ser757 (1:1000、#5869 および #6888、CST)、phospho-70 kDa ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) (Thr389、1:1000、#9205、CST)、phospho-Rictor、Thr1135、1:1000、#3806、CST)、phospho-Akt (Ser473、1:1000、#4060、CST)、およびこれらリン酸化タンパク質の非リン酸化体 (1:1000、#5832、#8054、#9476、#4691、CST) を用いた。

2-2-3. siRNA 導入トランスフェクション条件

5.0 x 10⁴ 個/well の MCF7 細胞、PC3 細胞、DU-145 細胞、MDA-MB-231 細胞を 6 well plate に播種し、およそ 24 時間後、30 pmol/well の Non-target control siRNA、GGCT siRNA および ATG5 siRNA と 5 μ L の Lipofectamine RNAi MAX 試薬を含むトランスフェクション用無血清培地 Opti-MEM 中で混合し、15 分間、室温にて静置させ、penicillin/streptomycin を含まない培地に交換した培養細胞に添加し、終濃度 10 nM の siRNA の存在下でトランスフェクションを行った。GGCT および ATG5、または AMPK α 1 の同時ノックダウンを行う場合は、Non-target control siRNA を終濃度 20 nM でコントロールとして用いた。第一章で使用したものに加え、新たに使用した siRNA について配列を以下の表に示す。

Target gene	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')
ATG5	CGAAUCCAACUUGCUUUA	TAAAGCAAGTTGGAATTCG
AMPK α 1	UGCCUACCAUCUCAUAAUA	TATTATGAGATGGTAGGCA

2-2-4. ウェスタンブロットティング法

上記の条件で培養した細胞を PBS で洗浄し、37°C 約 1 分間のトリプシン処理にて細胞を剥離させ遠心処理にて細胞を回収した。細胞を RIPA Buffer にプロテアーゼ阻害剤および PhosSTOP EASYpack (Roche Diagnostics) を加えたもので溶解し、氷冷させながら超音波処理にて細胞を破碎した。溶解液を

4°C、20,000 xg で 15 分間、遠心分離し、上清に含まれる可溶性のタンパク質抽出液を回収した。細胞抽出液は BCA タンパク質測定法を用いてタンパク質濃度を決定し、それぞれ 1 サンプルあたりタンパク質量として 20 µg に 5x sample buffer を加え、95°C、5 分間熱変性を行い、検出するタンパク質の分子量に応じた 7%、10%、15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離した。7%ゲルはウェット式 (50 V/gel 定電圧、60 分)、10%および 15%ゲルはセミドライ式 (170 mA/gel 定電流、90 分) にて PVDF メンブレンに転写した後、p21 を検出する際は PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal で、p21 および抗リン酸化タンパク質抗体以外を検出する際は 3% スキムミルクを含有する PBST で室温下、1 時間ブロッキングした後、上記の希釈率で調製した一次抗体を、4°C 一晩、緩やかに振とうさせながら反応させた。PBST にて緩やかに振とうさせながら 5 分間、2 回洗浄したのち、二次抗体を室温で 1 時間、反応させた。抗体希釈液には p21 を検出する際は Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution を、p21 および抗リン酸化タンパク質抗体以外を検出する際は 3% BSA in PBST を使用した。リン酸化タンパク質を検出する一次抗体を用いた際には、ブロッキングには Blocking one-P (Nacalai Tesque)、抗体希釈液には 0.05% Tween-20 を含むトリス塩酸緩衝液 (TBST) を用いた。タンパク質の発現シグナルは、抗リン酸化タンパク質以外を検出する際はメンブレンを PBST で 5 分間、3 回洗浄したのちに PBS で 2 回洗浄し、抗リン酸化タンパク質を検出する際は TBST で 5 分間、3 回洗浄したのちに TBS で 2 回洗浄し、通常は Clarity Western ECL Substrate を用い、発現量が少なく検出が困難な場合は Chemi-Lumi One Super を用いて発色させ、ChemiDoc XRS Plus の CCD カメラで検出した。

2-2-5. オートファゴソーム形成能評価

上記の siRNA 導入トランスフェクション条件にて MCF7 細胞および PC3 細胞に siRNA を導入した。トランスフェクション後 4 日目の細胞に、18 時間、10 µM のリソソーム阻害剤クロロキンを処理した後、カチオン性両親媒性トレーサー色素であり、受動的な拡散によって細胞内に迅速に移行し、リソソームに蓄積することなくオートファゴソームを特異的に染色する CYTO-ID Autophagy Detection Kit (Enzo Life Science, Farmingdale, NY) を用いて細胞内のオートファゴソームを CYTO-ID Green detection reagent、核を Hoechst 33342 で染色した。CYTO-ID Autophagy Detection Kit のポジティブコントロールとして、MCF7 細胞にオートファジー促進剤ラパマイシン 500 nM を 18 時間処理してオートファゴソーム染色を行った。蛍光染色の細胞画像は Eclipse Ti confocal microscope (Nikon, Tokyo, Japan) を用いて撮影した。

2-2-6. 細胞周期解析

上記の siRNA 導入トランスフェクション条件にて MCF7 細胞に siRNA を導入した。トランスフェクション後 4 日目に、浮遊した細胞およびトリプシン処理した接着細胞を遠心処理にて回収した。GGCT 強制発現 NIH3T3 細胞は、6 cm dish に播種したおよそ 24 時間後に培養液を 10% FBS または 2% FBS を含有した DMEM と交換し、48 時間後に浮遊した細胞およびトリプシン処理した接着細胞を遠心処理にて回収した。回収した細胞を、70% エタノールを含む PBS にて MCF7 細胞は -20°C で一晩、NIH3T3 細胞は室温で 30 分間作用させ、エタノール固定を行った。次に、20,000 xg で 5 分間遠心し、エタノールを除去した後、200 µg/mL RNase A を含む PBS で懸濁し 37°C で 30 分間静置することにより、RNA の分解を行った。その後、20 µg/mL PI を含む PBS で懸濁し遮光、室温にて 30 分間静置さ

せ、含有する DNA を染色した。ナイロンメッシュを用いて凝集塊を除去したのち、FACS Calibur または BD LSRFortessa X-20 (BD Bioscience) を用いて DNA 含有量を解析した。それぞれのサンプルは 10,000 個以上の細胞を用いて解析した。

2-2-7. 細胞増殖能および生細胞数・死細胞率の評価

GGCT 強制発現 NIH3T3 細胞は、96 well plate に播種したおよそ 24 時間後に培養液を 10% FBS または 2% FBS を含有した DMEM と交換して 3 日間培養し、NIH3T3 細胞の生存率は cell count reagent SF kit (Nacalai Tesque) を用いて 450 nm における吸光度を測定することにより評価した。相対 OD 値は day 0 における吸光度を 1 として算出した。MCF7 細胞および PC3 細胞の生細胞数はトリパンブルー染色法によって評価した。5.0 x 10⁴ 個/well で 6 well plate に播種し、24 時間後に上記の siRNA 導入トランスフェクション条件にて細胞に siRNA 導入した。トランスフェクション後 4 日目もしくは 7 日目にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調製し、同量の 0.4% トリパンブルーを添加し、10 μ L の細胞懸濁液を血球計算盤を用いて計数した。トリパンブルーを排出し透明であった細胞を生細胞として、トリパンブルーによって染色された細胞を死細胞として計数し、血球計算盤において 4 カ所の計測平均値を算出した。死細胞数を生細胞と死細胞の合計数で除した値を死細胞率とし、パーセンテージを算出した。

2-2-8. SA- β -Gal 染色

上記の siRNA 導入トランスフェクション条件にて MCF7 細胞および PC3 細胞に siRNA を導入した。トランスフェクション後 4 日目において細胞老化染色キットを用いて、添付文書のプロトコールに従って SA- β -Gal を染色し、37°C 一晩反応させた。SA- β -Gal に青く染まったものを老化細胞として計数し、視野内の全細胞中の SA- β -Gal 陽性細胞の割合を算出した。それぞれの実験において 400 以上の細胞数を計数し、少なくとも 12 か所の視野で評価した。

2-2-9. 統計学的処理

全てのデータはそれぞれ独立した 3 回以上の実験を行うことにより解析した。データは平均値 \pm 標準偏差 (S.D.) にて表示した。p 値は Excel software を用いて *Student's t-test* 両側検定を行うことにより算出し、得られた p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

2-3. 実験成績

2-3-1. GGCT 発現低下によるオートファジーの誘導

オートファジーが誘導されると、LC3-I がリン脂質分子の一つであるホスファチジルエタノールアミンと共有結合し、LC3-II に変換される (55)。siRNA を用いた GGCT のノックダウンががん細胞にオートファジーを誘導するのかどうかを検証するため、non-target siRNA または GGCT siRNA を導入した MCF7 細胞および PC3 細胞における、LC3-II のタンパク質レベルをウェスタンブロッティング法で解析した。MCF7 細胞および PC3 細胞において、GGCT のノックダウンは LC3-II のタンパク質レベルを増加させた (Fig. 10A)。また、この増加した LC3-II のタンパク質レベルは、ATG5 の同時ノックダウンによって減少した (Fig. 10A)。この結果は、LC3-I から LC3-II への変換が ATG5 を介したオートファジー活性化によって引き起こされているということを示唆している。さらに、GGCT をノックダウンした MCF7 細胞および PC3 細胞において、カチオン性両親媒性トレーサー色素であり、受動的な拡散によって細胞内に迅速に移行し、リソソームに蓄積することなくオートファゴソームを染色する CYTO-ID Autophagy Detection Kit を用いたオートファゴソーム形成能評価を行ったところ、GGCT ノックダウン細胞でオートファゴソームの形成が確認され、このオートファゴソーム形成能は ATG5 の同時ノックダウンで阻害された (Fig. 10B)。並行して、CYTO-ID Green detection reagent がオートファジーを特異に検出することを確認するため、オートファジー促進剤として確立されているラパマイシンを処理することにより、MCF7 細胞にオートファゴソーム形成が引き起こされることを確認した (Fig. 10C)。

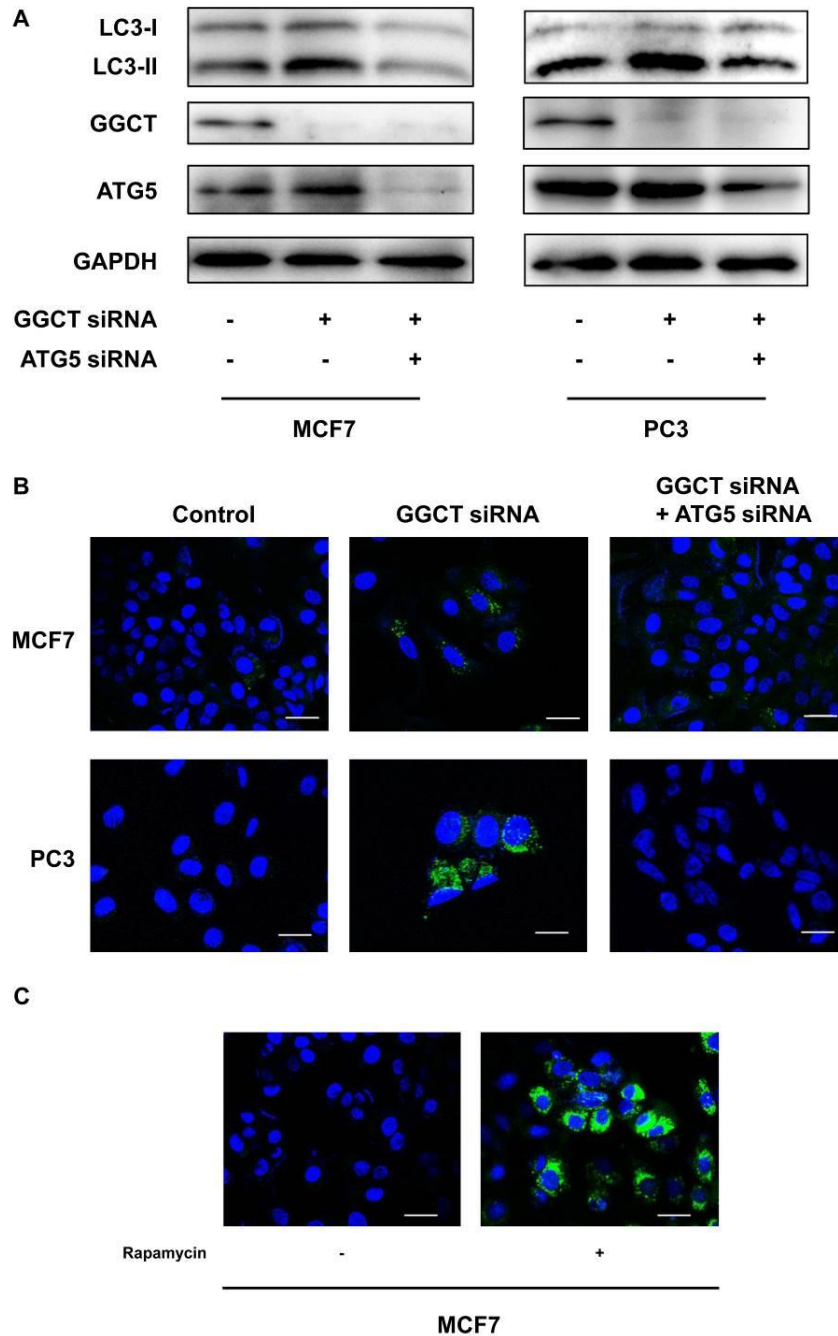


Figure 10. GGCT depletion induces autophagy.

A, Western blot analysis of LC3, GGCT, ATG5 and GAPDH in MCF7 and PC3 cells at 4 days post-transfection with siRNA targeting GGCT and ATG5, or with a non-target control siRNA. GAPDH is shown as a loading control. These immunoblotting experiments were performed at least three times and the representative results are shown. **B**, Representative images of autophagosomes in MCF7 and PC3 cells stained by CYTO-ID Autophagy Detection Kit. Cells were stained 4 days after transfection with the indicated siRNAs. Scale bar, 20 μ m. **C**, A positive control for detection of autophagosomes. Representative images of MCF7 cells treated with an autophagy inducer Rapamycin (500 nM for 18 hours) are shown. Scale bar, 20 μ m. These figures were cited from Fig. 1 and Supplementary fig. 1 in Taniguchi K et al. *Am J Cancer Res.* **2018**, 8, 650-661.

2-3-2. GGCT 強制発現による血清欠乏誘導性オートファジー阻害効果の解析

次に、GGCT の強制発現がオートファジーの誘導に影響を及ぼすかどうかについて調べるため、レトロウイルスベクターを用いてコントロールおよび GGCT 発現ベクターをマウス線維芽細胞株 NIH3T3 に導入し、GGCT の安定強制発現細胞株を得た。本章で用いたがん細胞株 MCF7 および PC3 はいずれも正常細胞と比較して高い GGCT 発現を示し (17)、がん細胞株に GGCT を強制発現させても GGCT による細胞増殖促進効果が観察されなかったため、がん細胞における GGCT の機能は飽和していると考えられた。そのため、安定的な維持が容易で遺伝子導入効率が高く、GGCT 発現が検出されない正常マウス線維芽細胞株である NIH3T3 に対して GGCT の強制発現を行い、その機能を解析した。正常マウス線維芽細胞株にヒトがん遺伝子やヒトがん抑制遺伝子を導入してその分子機能を解析する手法は多数の先行研究があり、概ね妥当な実験系と考えた。まず、ウェスタンブロッティング法によって GGCT の強制発現を確認した (Fig. 11A)。血清欠乏条件での培養はオートファジーを誘導する確立された手法であるため (55)、上記の細胞を血清欠乏条件で培養することによってオートファジーを誘導し、LC3-II のタンパク質レベルを検出することによってオートファジーへの GGCT 強制発現による影響について評価した。血清欠乏条件での培養はオートファジーの誘導を示す LC3-II のタンパク質レベルの増加をもたらす、この増加は GGCT の強制発現によって減弱されることがわかった (Fig. 11B)。さらに、WST-8 アッセイによって細胞増殖を、フローサイトメトリー法によって細胞周期を解析したところ、GGCT の強制発現は血清欠乏条件で培養した際の NIH3T3 の抑制された増殖を有意に回復し (Fig. 11C)、細胞周期の進行を促進した (Fig. 11D and E)。これらの結果は、GGCT ノックダウンによってオートファジーが誘導されたこと、およびがん細胞の増殖抑制が引き起こされることと一致しており、GGCT はオートファジーを抑制し、細胞増殖を促進する機能を持つことが示唆された。

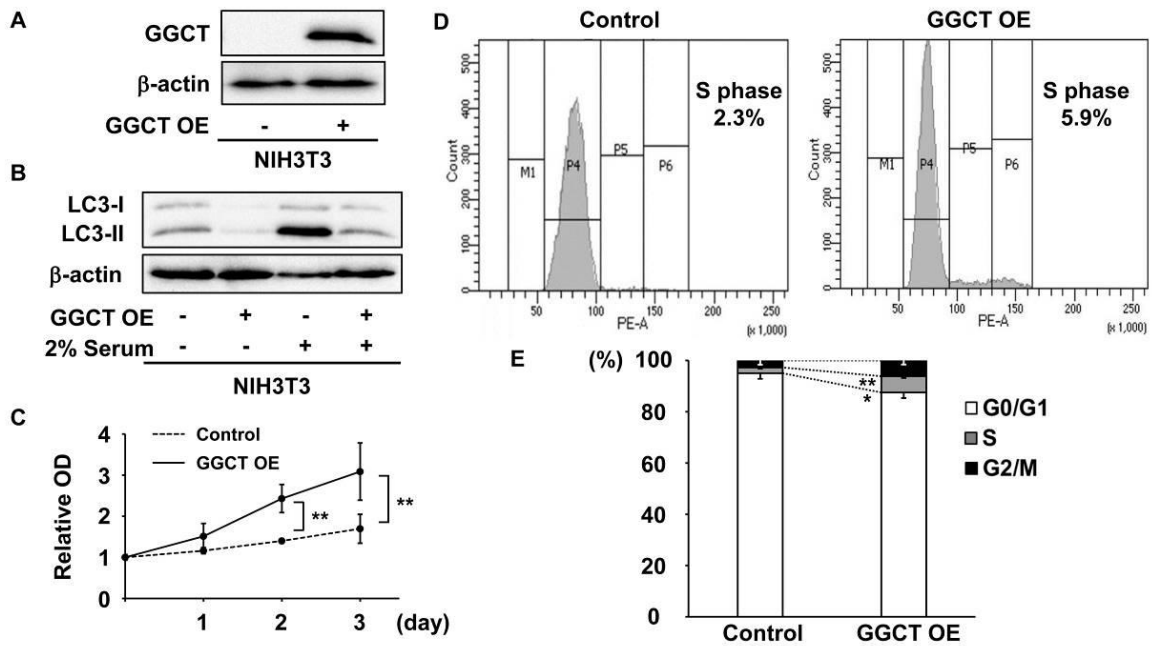


Figure 11. Overexpression of GGCT suppresses autophagy and promotes proliferation.

A, Western blot analysis of GGCT-overexpressing cells. **B**, Western blot analyses of LC3 in control and GGCT-overexpressing NIH3T3 cells cultured in (-) 10% or (+) 2% serum-containing medium. These immunoblotting experiments were performed at least three times and the representative results are shown. **C**, Growth curves of control and GGCT-overexpressing (OE) NIH3T3 cells cultured in 2% serum-containing medium. **D and E**, Cell cycle analysis of control and GGCT-overexpressing NIH3T3 cells in DMEM supplemented with 2% FBS. Representative histograms **D** and quantified distribution **E** are shown. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.) These figures were cited from Fig. 2 in Taniguchi K et al. *Am J Cancer Res.* **2018**, 8, 650-661.

2-3-3. GGCT ノックダウンによる CDKI 発現上昇および細胞周期停止に対してオートファジーが与える影響の解析

以前の研究で、様々ながん細胞株において p21 および p16 の単独または両方の発現上昇が GGCT の発現抑制で引き起こされることを報告した (18)。特に MCF7 細胞と PC3 細胞においては、p21 および p16 の両方の発現が上昇していた。そこで、GGCT のノックダウンによる CDKI 発現上昇に対するオートファジーの影響を調べるため、ATG5 を GGCT と同時にノックダウンすることによりオートファジーを阻害し、ウェスタンブロッティング法を用いて CDKI の発現量を解析した。まず、GGCT ノックダウンによって MCF7 細胞および PC3 細胞いずれにおいても、p21 および p16 の両方の発現上昇を確認した。次に、ATG5 を GGCT と同時にノックダウンすることによりオートファジーを阻害すると、MCF7 細胞では p21 および p16 の発現上昇が減弱され、PC3 細胞では p16 の発現上昇のみが抑制されることを見出した (Fig. 12A)。これらの結果から、がん細胞における GGCT ノックダウンによる CDKI の発現上昇は、ATG5 依存性のオートファジーの誘導に影響を受けることが明らかになった。また、以前の研究で、MCF7 細胞における GGCT の発現抑制は、p21 依存的に G0/G1 期の細胞周期停止を引き起こすことを報告した (18)。フローサイトメトリーを用いた細胞周期解析により、MCF7 細胞において ATG5 を GGCT と同時にノックダウンすると、GGCT 発現低下による G0/G1 期における細胞周期停止は有意に回復することがわかった (Fig. 12B and C)。以上の結果より、GGCT 発現抑制に応答して誘導されるオートファジーは、それに続く p21 発現上昇を介して GGCT 発現低下による細胞周期停止に対して重要な役割を果たしていることが示唆された。

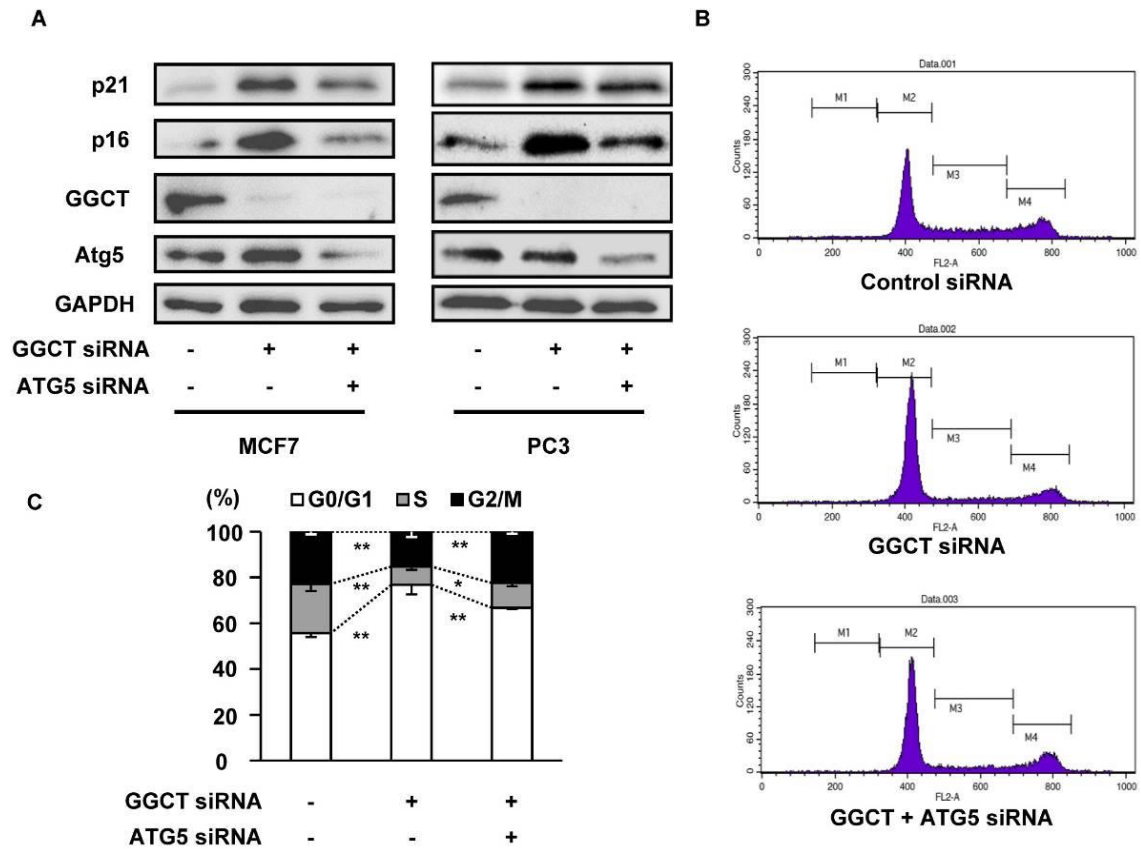


Figure 12. Inhibition of autophagy attenuates upregulation of CDKI and cell cycle arrest caused by GGCT knockdown.

A, Western blot analysis of p21, p16, GGCT, ATG5, and GAPDH expression in MCF7 and PC3 cells at 4 days post-transfection with siRNA targeting GGCT or with a non-target control siRNA. GAPDH is shown as a loading control. These immunoblotting experiments were performed at least three times and the representative results are shown. **B and C**, Cell cycle phases in MCF7 cells were analyzed by flow cytometry at 4 days post-transfection with the indicated siRNAs. Representative histograms **B** and quantified distribution are shown **C**. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.) These figures were cited from Fig. 3 in Taniguchi K et al. *Am J Cancer Res.* **2018**, 8, 650-661.

2-3-4. GGCT ノックダウンによる細胞増殖抑制および細胞死の誘導に対してオートファジーが与える影響の解析

前節の結果より、GGCT の発現を抑制した細胞で誘導されているオートファジーは、CDKI の発現上昇および細胞周期停止に制御的な役割を果たしていると考えられたため、次に我々は、オートファジーが GGCT ノックダウンによって誘導される細胞増殖抑制および細胞死を制御しているという仮説を立てた。そこで、ATG5 を GGCT と同時にノックダウンすることによってオートファジーを阻害し、トリパンブルー染色法を用いて生細胞数および死細胞数を計測した。その結果、GGCT ノックダウンで抑制された MCF7 細胞および PC3 細胞の増殖が、オートファジーの阻害によって部分的にはあるが、有意に回復することがわかった (Fig. 13A)。また、ATG5 の単独ノックダウンによるオートファジーの阻害は PC3 細胞の生細胞数を有意に減少させたため (Fig. 13B)、GGCT 発現抑制で誘導されたオートファジーががん細胞の増殖を抑制する一方で、未処理がん細胞における基底状態の ATG5 依存性オートファジーは、部分的にはあるが細胞増殖に対して促進性に寄与している可能性が示唆された。また、GGCT 発現抑制で増加したトリパンブルー陽性死細胞数の割合が、ATG5 の同時ノックダウンによるオートファジーの阻害で有意に減少することがわかった (Fig. 13C)。以上の結果より、GGCT 発現抑制による細胞増殖抑制および細胞死誘導は、少なくとも部分的には、オートファジーの誘導に依存するということが明らかにした。

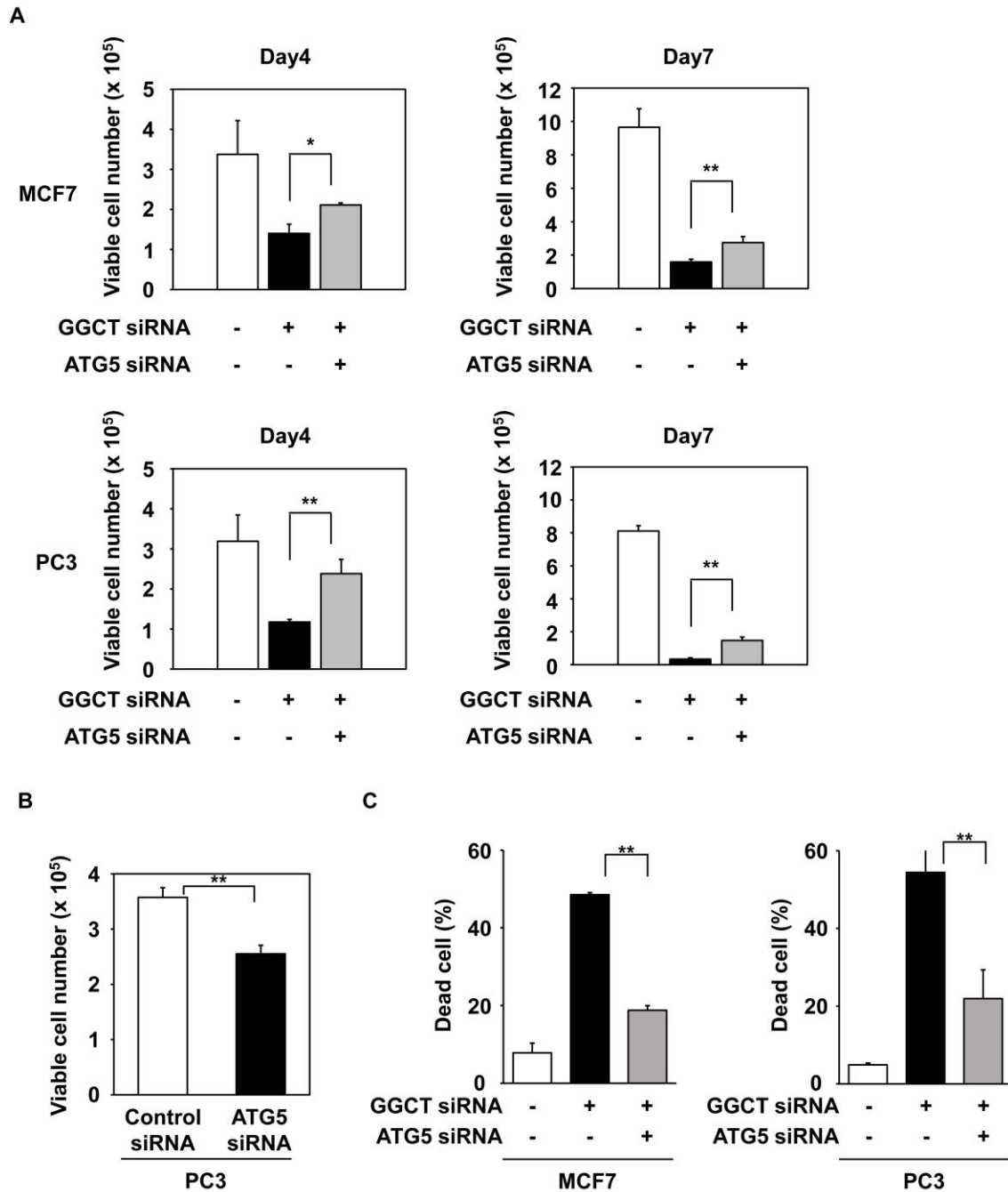


Figure 13. Growth inhibition and cell death of cancer cells induced by GGCT depletion is regulated by autophagy.

A, MCF7 and PC3 cells were transfected with the indicated siRNAs. The relative number of trypan blue-negative viable cells at 4 and 7 days post-transfection is shown. **B**, PC3 cells were transfected with siRNA targeting ATG5, or with non-target control siRNA. The number of Trypan blue-negative viable cells at 4 days post-transfection is shown. **C**, Proportion of Trypan blue-positive (dead) cells at 7 days post-transfection with the indicated siRNAs. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.) Fig. 4A was cited from Fig. 4 in Taniguchi K et al. *Am J Cancer Res.* **2018**, 8, 650-661.

2-3-5. GGCT ノックダウンによる細胞老化の誘導に対してオートファジーが与える影響の解析

近年、いくつかの研究によって、オートファジーが細胞老化を制御する機能を有することが報告されている (58, 59, 60, 61, 62)。例えば、活性型 HRas を発現させたヒト線維芽細胞モデルでは細胞老化およびオートファジーが誘導されるが、ATG5 または ATG7 をノックダウンすることによりオートファジーを阻害すると、SA- β -Gal 活性が有意に抑制され、細胞老化が阻害されることが報告されている (58)。したがって、オートファジーは細胞老化をその上流で制御する因子の一つであると考えられる。以前の研究で、GGCT の発現低下は乳がん細胞および前立腺がん細胞をはじめとする様々ながん細胞株に細胞老化を誘導することを報告した (18)。そこで、オートファジー誘導が GGCT 発現低下細胞で誘導される細胞老化を促進性に制御しているという仮説を立てた。これを検証するために、MCF7 細胞および PC3 細胞において、ATG5 を GGCT と同時にノックダウンすることによりオートファジーを阻害し、老化細胞を特異的に染色することのできる SA- β -Gal 染色法を用いて細胞像を観察することにより、細胞老化を評価した。その結果、GGCT siRNA を導入した MCF7 細胞および PC3 細胞は、control siRNA を導入した細胞と比較して、扁平に拡大した細胞老化に特徴的な細胞形態の変化を呈し (Fig. 14A)、SA- β -Gal 染色陽性の細胞率が増加した (Fig. 14B)。そこで ATG5 を GGCT と同時にノックダウンすることによってオートファジーを阻害すると、老化細胞に特徴的な扁平かつ拡大した形態は明確には観察されず、SA- β -Gal 陽性細胞率は GGCT のみをノックダウンした細胞と比較して有意に減少した (Figure 14A and B)。これらの結果より、MCF7 細胞および PC3 細胞において GGCT ノックダウンによって引き起こされる細胞老化は、オートファジーの誘導に依存するということが明らかになった。

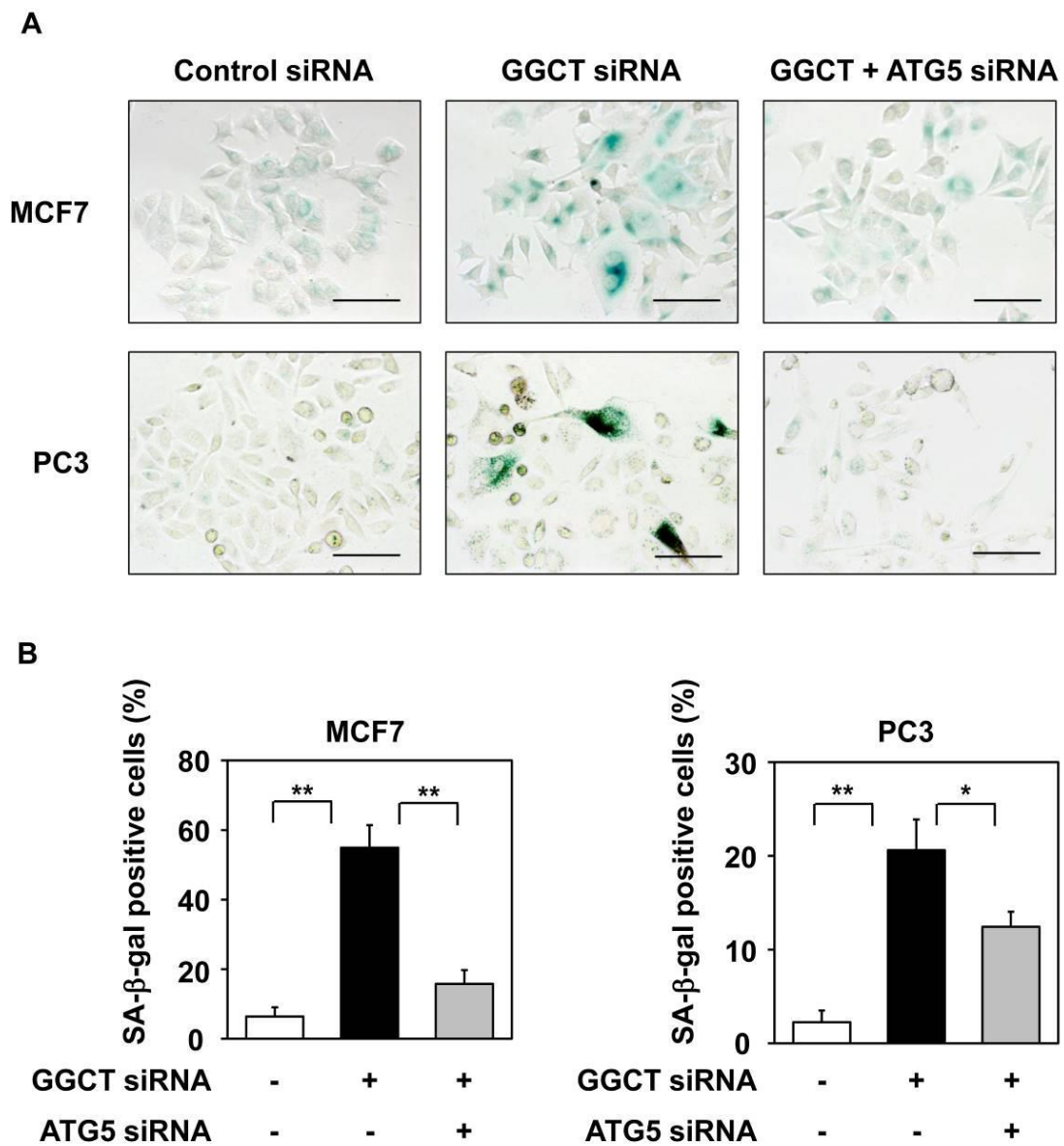


Figure 14. Cellular senescence induced by GGCT depletion is regulated by autophagy.

A, Representative images of SA-β-Gal staining of MCF7 and PC3 cells 4 days post-transfection with the indicated siRNAs. Scale bar, 100 μm. **B**, The number of SA-β-Gal-positive cells was counted and the positive cell: total cell ratios are shown. (* p<0.05, ** p<0.01.) These figures were cited from Fig. 5 in Taniguchi K et al. *Am J Cancer Res.* 2018, 8, 650-661.

2-3-6. GGCT ノックダウンによる AMPK-ULK1 経路の活性化および mTORC2-Akt 経路の不活性化

次に、GGCT 発現抑制がオートファジーを調節するシグナル伝達経路をどのように変化させるかについて、シグナル伝達因子のリン酸化レベルをウェスタンブロッティング法で解析することにより詳細に解析を行った。AMPK はオートファジーの進行に必須な分子である ULK1 を活性化することが知られている (48, 50-52, 56)。GGCT をノックダウンした PC3 細胞において、p-AMPK α Thr172 および p-ULK1 Ser555 がコントロール細胞と比較して増加していることがわかった (Fig. 15A)。同じ前立腺がん細胞株である DU-145 細胞においても、LC3-II の発現レベルの増加に伴って、AMPK-ULK1 シグナル伝達経路の活性化が引き起こされていることも確認した (Fig. 15C)。しかし、前立腺がん細胞株において GGCT 発現抑制で引き起こされた AMPK-ULK1 シグナル伝達経路のリン酸化体の増加は、MCF7 細胞では観察されなかった。そこで、mTORC1 によってリン酸化されることが報告されている p-ULK1 Ser757 の変動を調べたところ、GGCT ノックダウン PC3 細胞および DU-145 細胞では p-ULK1 Ser757 の減少が観察されなかったのに対し、MCF7 細胞においては GGCT ノックダウンは p-ULK1 Ser757 を減少させることがわかった (Fig. 15A)。同じ乳がん細胞株である MDA-MB-231 細胞においても、LC3-II の発現レベルの増加に伴って、p-ULK1 Ser757 の減少が引き起こされていることも確認した (Fig. 15C)。一方で、MCF7 細胞において p-AMPK α Thr172 の増加が観察されなかったという結果とは異なり、MDA-MB-231 細胞においては GGCT ノックダウンで p-AMPK α Thr172 の増加が観察された。また、mTORC1 の主要な下流因子の一つである p70S6K (57) のリン酸化レベルが、PC3 細胞および MCF7 細胞において減少していることがわかった (Fig. 15A)。したがって、GGCT ノックダウンは mTORC1 シグナル伝達経路を抑制していることが示唆された。さらに、mTORC2-Akt シグナル伝達経路の構成分子のリン酸化レベルについても解析した。p-Rictor Thr1135 の増加は mTORC2 の機能、特に Akt Ser473 リン酸化能の不活性化を意味し (53)、これは GGCT 発現抑制によって増加した (Fig. 15B)。p-Akt Ser473 の減少は、p-Beclin1 の減少を介したオートファジー阻害の解除をもたらすことが報告されているが (54)、PC3 細胞、MCF7 細胞の両方において GGCT ノックダウンによって p-Rictor Thr1135 の増加に伴い Akt の Ser473 におけるリン酸化レベルが減少することを見出した。

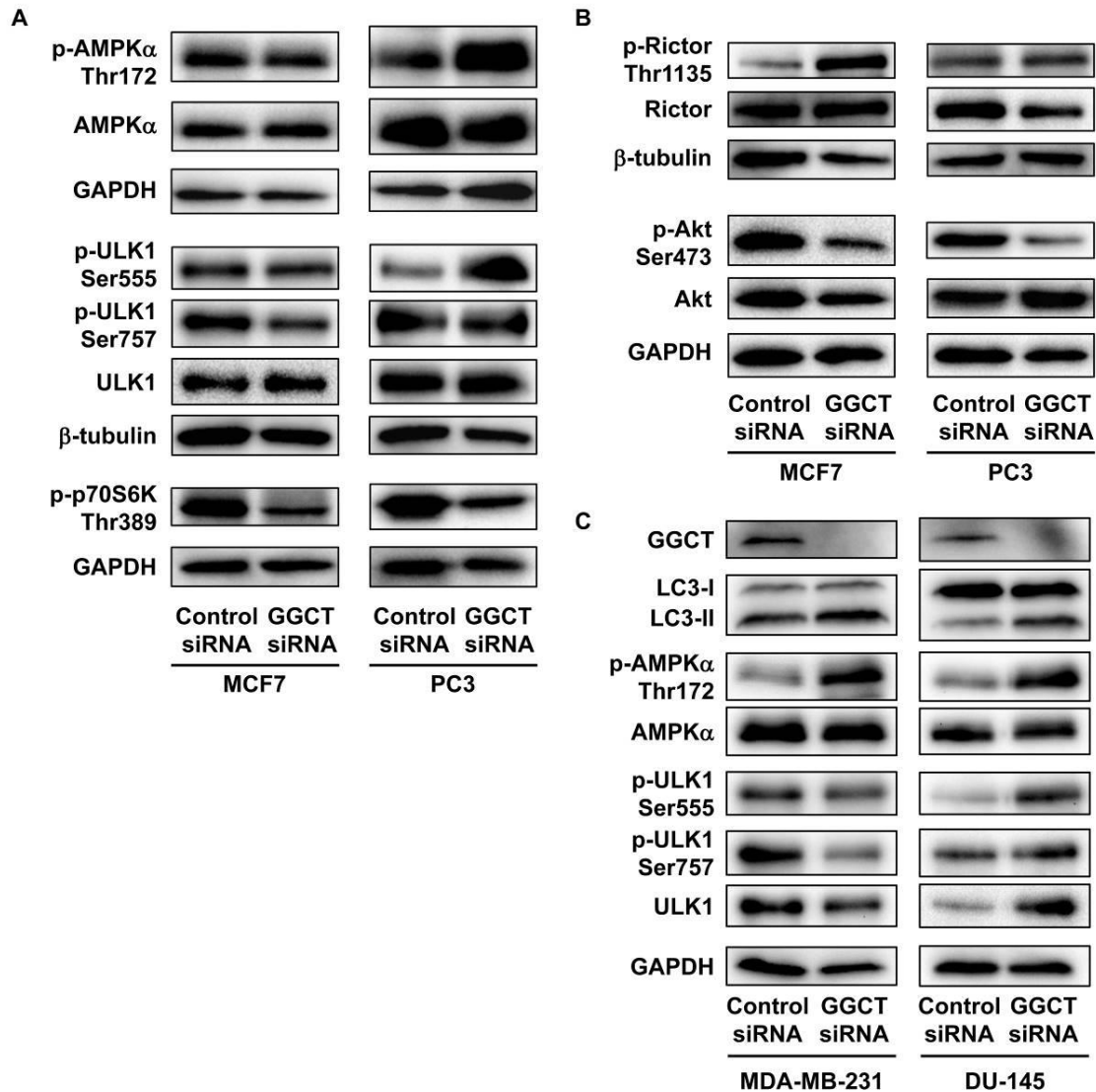


Figure 15. Depletion of GGCT activates AMPK-ULK1 pathway and/or leads to inactivation of the mTORC2-Akt in cancer cells.

A, Western blot analyses of mediators of the AMPK-ULK1 signaling pathway (p-AMPK α Thr172, AMPK α , p-ULK1 Ser555 and ULK1) and downstream components of the mTORC1 pathway (p-ULK1 Ser757 and p-p70S6K Thr389) in MCF7 and PC3 cells 4 days post-transfection with siRNA targeting GGCT or with a non-target control siRNA. GAPDH and β -tubulin are shown as loading controls. **B**, Western blot analyses of p-Rictor Thr1135, Rictor, p-Akt Ser473, Akt, GAPDH and β -tubulin in MCF7 and PC3 cells 4 days post-transfection with the indicated siRNAs are shown. **C**, Western blot analyses of GGCT, LC3, mediators of the AMPK-ULK1 signaling pathway (p-AMPK α Thr172, AMPK α , p-ULK1 Ser555, and ULK1) and downstream component of the mTORC1 pathway p-ULK1 Ser757 in DU-145 prostate cancer and MDA-MB-231 breast cancer cells 6 days post-transfection with siRNA targeting GGCT or with a non-target control siRNA. GAPDH are shown as loading controls. These immunoblotting experiments were performed at least three times and the representative results are shown. These figures were cited from Fig. 6 and Supplementary fig. 2 in Taniguchi K et al. *Am J Cancer Res.* **2018**, 8, 650-661.

2-3-7. GGCT 発現抑制によるオートファジーの誘導に対する AMPK の関与

PC3 細胞において、AMPK α Thr172 のリン酸化体およびその下流因子 p-ULK1 Ser555 が GGCT の発現を抑制することにより増加したため、AMPK がこの GGCT 発現抑制によるオートファジーの誘導に重要な役割を果たしているという仮説を立てた。これを実証すべく、AMPK α 1 の GGCT との同時ノックダウンを行い、ウェスタンブロッティング法を用いて p-ULK1 Ser555、LC3-II の発現解析を行った。その結果、MCF7 および PC3 いずれの細胞においても、AMPK 下流因子である p-ULK1 Ser555、およびオートファジーマーカー LC3-II のバンドの増加が抑制された (Fig. 16)。したがって、GGCT 発現抑制によるオートファジーの誘導は、AMPK 調節性のシグナル伝達経路の活性化を介するということが明らかになった。

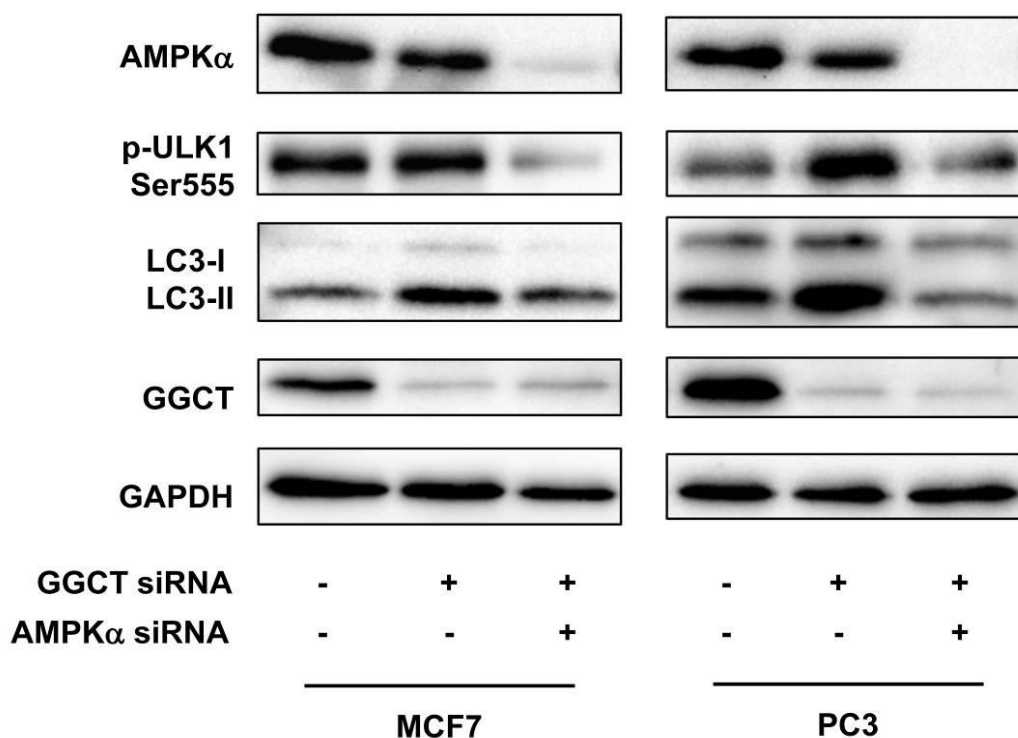


Figure 16. AMPK is a key regulator of autophagy induced by GGCT knockdown.

Western blot analyses of AMPK α , p-ULK1 ser555, LC3, GGCT and GAPDH in MCF7 and PC3 cells 4 days post-transfection with siRNA targeting GGCT and AMPK α 1, or with a non-target control siRNA. GAPDH is shown as loading controls. These immunoblotting experiments were performed at least three times and the representative results are shown.

2.4. 考察

本章では、siRNA を用いた GGCT の発現抑制によって、MCF7 細胞および PC3 細胞にオートファジーが誘導されることを明らかにした。さらに、ATG5 の GGCT との同時ノックダウンによるオートファジーの阻害が GGCT 発現抑制による CDKI の発現上昇を減弱したことから、オートファジーの誘導が CDKI の発現を調節する機能を有することを明らかにした。ATG5 の GGCT との同時ノックダウンによるオートファジーの阻害は、MCF7 細胞においては p21 および p16 の両方の発現上昇を減弱したが、PC3 細胞においては p16 の発現上昇は減弱されたものの、p21 の発現は変化しなかった。ところが、この ATG5 の同時ノックダウンは MCF7 細胞および PC3 細胞の両方において GGCT 発現低下で引き起こされた細胞老化および細胞増殖抑制を回復した。これらの結果より、PC3 細胞において、GGCT ノックダウン時にオートファジーの誘導に依存して引き起こされる細胞表現型 (増殖抑制、細胞老化等) には、p21 よりも p16 の発現上昇が重要な役割を果たしていることが示唆される。さらに、PC3 細胞において GGCT 発現抑制で誘導される p21 発現上昇には、オートファジー非依存的な未知の機構が関与していると考えられる。

ATG5 のノックダウンによるオートファジーの阻害が GGCT 発現抑制で誘導される細胞老化を減弱したという本章の結果を考えると、オートファジーは GGCT 発現抑制で引き起こされた細胞老化に対する制御機構であることが推察できる。実際に、複数の研究によってオートファジーと細胞老化の関連性、特に細胞老化の誘導に対するオートファジーの制御的な役割が示唆されている。例えば、ヒト線維芽細胞モデルを用いた研究によると、がん遺伝子誘導性の酸化ストレスは細胞老化を引き起こすが、この細胞老化はオートファジーの阻害によって抑制される (58, 59)。したがってオートファジーは細胞老化を上流で調節する因子であると考えられる。ドキシソルピシン、カンプトテシンといった抗がん剤は MCF7 細胞およびヒト大腸がん細胞株 HCT116 にオートファジーと細胞老化の両方を引き起こしたが、オートファジーの阻害はこれらの細胞に引き起こされた細胞老化を抑制、あるいは遅延させた (60)。さらに、天然化合物 pseudolaric acid B は、Akt-mTOR 経路を阻害することにより、乳がん細胞株 MCF7 にオートファジー依存性細胞老化を引き起こす (61)。近年、Li らによって、BRAFV600E 変異を有するメラノーマ細胞に対し、BRAF インヒビターである encorafenib を処理することにより、mTOR-p70S6K 経路の阻害およびオートファジー依存性細胞老化が引き起こされることが報告された (62)。これらの知見は、がん細胞に対する治療的介入に応答して誘導されたオートファジーが、細胞老化に対して制御的な役割を果たすことを強調している。本章で提示した結果は、GGCT 発現抑制で引き起こされた細胞老化が、オートファジーの誘導を介した CDKI 発現上昇によって制御されている可能性を示唆している。

GGCT は γ -グルタミルサイクル中で γ -グルタミルアミノ酸から 5-オキソプロリンおよび遊離アミノ酸を生成する反応を触媒する酵素であり、アミノ酸の代謝に重要な役割を果たしている (3)。アミノ酸の欠乏は AMPK-ULK1 シグナル伝達経路を活性化することによりオートファジーを誘導する一方で、アミノ酸の充足は mTORC1 を活性化して ULK1 を阻害することが報告されている (51, 56)。したがって、GGCT ノックダウンによってオートファジーが誘導されるメカニズムは、GGCT の発現抑制によって惹起されたアミノ酸代謝恒常性の異常によって説明できる可能性がある。本章で実施した NIH3T3 細胞に対する GGCT 強制発現実験によって、GGCT がオートファジーを抑制する機能を持つ

ことが示された。実際に、血清欠乏条件で培養すると、NIH3T3 細胞においてオートファジーが誘導され、増殖は抑制されたが、GGCT を強制発現するとオートファジーは阻害され、抑制された増殖は回復した。これらの結果より GGCT 機能の増強は、血清欠乏によって引き起こされた代謝性ストレスのうち、何らかのアミノ酸の欠乏を供給することによってオートファジー誘導の必要性が減弱し、血清欠乏によって抑制された増殖を回復させた可能性が考えられる。しかしながら、実際にどの種類のアミノ酸が欠乏することによってがん細胞に GGCT ノックダウンによる様々な細胞表現型が引き起こされているのかは明らかにされていない。近年、GGCT ノックアウトマウス胎児線維芽細胞 MEF において、細胞内還元型グルタチオン濃度および L-システイン濃度の減少、細胞内活性酸素種の増加が観察され、GGCT ノックアウトで引き起こされた MEF の増殖抑制が N-アセチルシステインの処理により回復することが示された (14)。この報告により、正常細胞における GGCT の一般的な代謝的機能については、細胞内システイン濃度の維持に重要な役割を果たしている可能性が考えられるが、正常細胞を用いたこの知見について、がん遺伝子等に依存して引き起こされる代謝酵素のリプログラミングや代謝経路の変化が頻繁に観察されるがん細胞において、同様の変化が引き起こされているかどうかは明らかにされていない。がん細胞を用いたメタボローム解析等による網羅的代謝物質解析が今後の課題である。

オートファジーは通常、低栄養状態に適応したり、不要な細胞内小器官等を除去したりするための細胞保護機能である (63)。実際に、ATG5 の単独ノックダウンによるオートファジーの阻害はコントロールと比較して有意に生細胞数を減少させたことから、未処理がん細胞において、基底状態で ATG5 依存的に引き起こされているオートファジーは、部分的にはあるが、がん細胞の増殖に対して促進性に働いていることが示唆された。一方で、GGCT 発現抑制で誘導されたがん細胞増殖抑制および細胞死は、ATG5 のノックダウンによるオートファジーの阻害によって回復した。このことは、GGCT 発現抑制で人為的に誘導されたオートファジーは、がん細胞の増殖を抑制する機能を有することを示唆している。過剰なオートファジーの誘導は非アポトーシス性細胞死のメカニズムの一つであり、代謝性ストレスによって引き起こされる持続的なオートファジーは、タンパク質および細胞小器官の代謝回転がそれらの合成能を超えたとき、細胞死を誘導すると考えられている (64)。さらに、がん細胞にいくつかの抗がん活性を有する化合物を処理することにより、オートファジー関連細胞死が引き起こされることが示されている (65-69)。

本章で、PC3 細胞および DU-145 細胞でオートファジーが誘導された際に、p-AMPK α Thr172 および p-ULK1 Ser555 が顕著に増加していることを見出し、AMPK-ULK1 シグナル伝達経路の活性化を伴っていることを示した。PC3 細胞において、AMPK α 1 を GGCT と同時にノックダウンすると、AMPK 下流因子 p-ULK1 Ser555 およびオートファジーマーカーである LC3-II のタンパク質発現が抑制された。したがって、GGCT ノックダウン PC3 細胞で誘導されるオートファジーは、AMPK-ULK1 シグナル伝達経路の活性化を介するということが示された。一方で MCF7 細胞では GGCT ノックダウンによっても p-AMPK α Thr172 および p-ULK1 Ser555 の発現量にはほとんど変化が見られなかった。MDA-MB-231 細胞では、p-AMPK α Thr172 の増加が見られたものの、p-ULK1 Ser555 の増加は観察されなかった。MCF7 細胞において、AMPK α 1 の GGCT との同時にノックダウンはオートファジーを抑制したが、実際にオートファジーの実行分子として働く ULK1 の Ser555 におけるリン酸化体の増加が観察されなかった乳がん細胞株におけるオートファジーの誘導には、AMPK の発現は必要であるものの、

その活性化には依存しないと考えられる。また、MCF7 細胞と MDA-MB-231 細胞はいずれも乳がん細胞株であるが、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体および HER2 といった受容体の発現パターン等が異なる腫瘍組織より樹立された細胞株であるため、GGCT ノックダウン MCF7 細胞で p-AMPK α Thr172 の増加が見られず、MDA-MB-231 細胞で p-AMPK α Thr172 の増加が観察されたという結果の差異は、このような細胞株の性質の違いに依存するという可能性が考えられる。両方の乳がん細胞株で一致した結果が得られたのは、ULK1 の不活性化を示す p-ULK1 Ser757 (50) が減少していたことである。それと一致して、GGCT ノックダウンは MCF7、PC3 いずれの細胞においても mTORC1 の主要な下流因子の一つである p-p70S6K Thr389 (57) を減少させることがわかった。したがって、mTORC1 シグナル伝達経路は GGCT ノックダウン細胞において抑制されており、特に乳がん細胞株においては、ULK1 の不活性化を介して結果的にオートファジーが誘導されたのではないかと考えられる。さらに、p-Rictor Thr1135 は mTORC2-Akt シグナル伝達経路を阻害すること (53)、mTORC2-Akt シグナル伝達経路は Beclin1、14-3-3 および中間径フィラメントのタンパク質複合体形成を促進することによりオートファジーを阻害することが報告されている (54)。実際に、MCF7 細胞において GGCT ノックダウンは p-Rictor Thr1135 を増加させ、p-Akt Ser473 を減少させており、mTORC2-Akt シグナル伝達経路の不活性化によってオートファジーが結果的に促進されていることが示唆される。以上の結果より、前立腺がん細胞株において AMPK-ULK1 シグナル伝達経路の活性化を介してオートファジーが調節されていることが示された。PC3 細胞において、GGCT ノックダウンによって mTORC1 の下流因子 p-p70S6K Thr389 の減少が観察されたが、p-ULK1 Ser757 の減少は観察されなかったこと、および p-Akt Ser473 の減少は観察されたものの、p-Rictor Thr1135 に顕著な変化が見られなかったことを考えると、PC3 細胞におけるオートファジーの誘導には mTORC1-pULK1 Ser757 シグナル伝達経路および mTORC2-Akt シグナル伝達経路の抑制には依存しないと考えられる。一方で乳がん細胞株におけるオートファジーの誘導は、AMPK の発現に依存はするものの、AMPK-ULK1 シグナル伝達経路の活性化には依存しないと考えられ、代わりに mTORC1-ULK1 Ser757 シグナル伝達経路および mTORC2-Akt シグナル伝達経路の抑制が関与している可能性が示された。これらの結果は、GGCT ノックダウンが代謝性ストレスを引き起こし、細胞種依存的にさまざまなシグナル伝達経路を調節することによりオートファジーを誘導している可能性を示している。

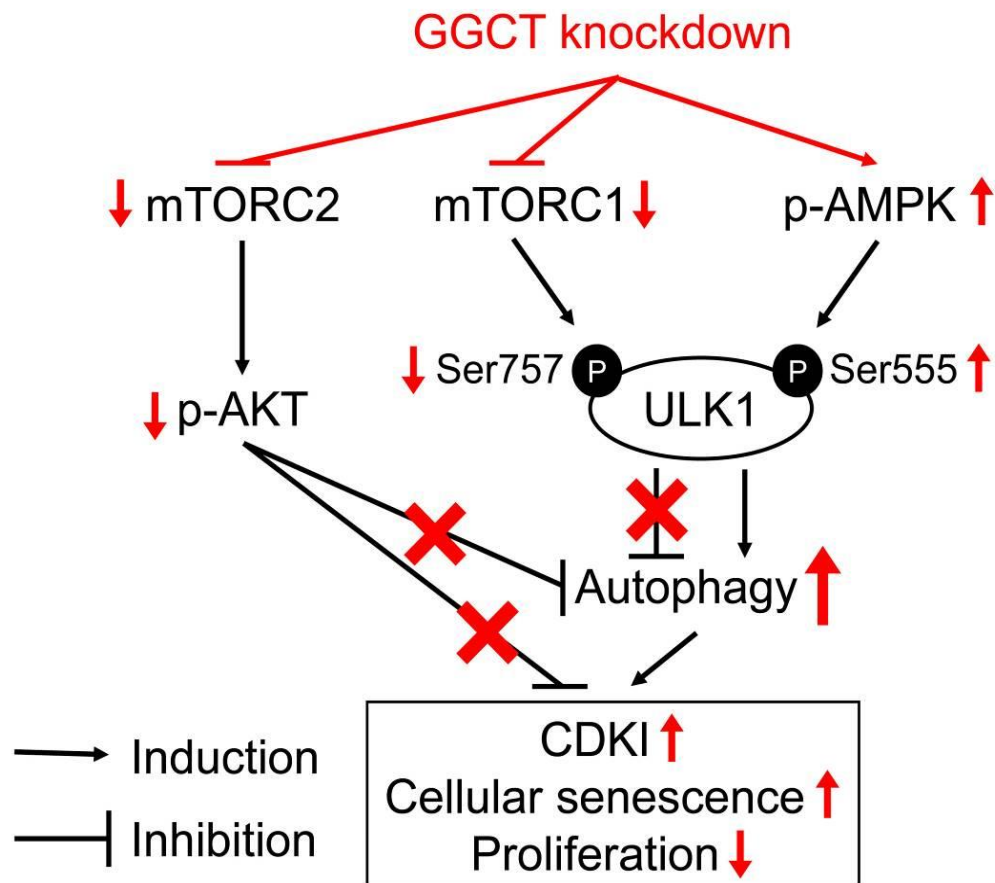


Figure 17. Graphical summary of the signaling cascades involved in the autophagy induction upon GGCT depletion.

This figure was cited from Fig. 7 in *Am J Cancer Res.* **2018**, 8, 650-661.

第二章では、GGCT 発現抑制によってがん細胞にオートファジーが誘導されることを示した。NIH3T3 細胞における GGCT の強制発現がオートファジーの誘導を阻害したことから、GGCT はオートファジーを抑制する因子であると考えられる。さらに、GGCT ノックダウンによる CDKI の発現上昇とそれに続く増殖抑制、細胞死の誘導および細胞老化といった細胞応答が、部分的にはあるが、オートファジーの誘導によって促進されていることを示した。同時に、GGCT ノックダウンは細胞種依存的に、オートファジー誘導性のシグナル伝達経路である AMPK-ULK1 経路を活性化し、オートファジー抑制性のシグナル伝達経路である mTORC2-Akt 経路を不活性化することを明らかにした。

第 3 章

GGCT ノックダウンによる AMPK-FOXO3a-p21 経路の活性化を介したがん細胞増殖抑制機

3-1. 緒言

様々ながん細胞株において、GGCT ノックダウンによって p21 および p16 といった CDKI がいずれも誘導されるのか、あるいは一方だけなのかについては、極めて細胞種依存的であることを過去に報告した (18)。第二章において、MCF7 細胞および PC3 細胞のいずれにおいても GGCT ノックダウンによる p21 の発現上昇が観察されたが、MCF7 細胞ではオートファジーの阻害によって p21 発現上昇が抑制されたにもかかわらず、PC3 細胞では抑制されなかった。さらに PC3 細胞において PHB2 の単独ノックダウンを行ったところ、p21 の発現上昇は観察されなかった。したがって、GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇およびそれに続く増殖抑制には、PHB2 にもオートファジーにも依存しない、未知の機構が存在すると考えられた。

FOXO3a は Forkhead box O ファミリーに属する転写因子であり、細胞の代謝、ストレス応答、アポトーシス、細胞周期停止に関連する遺伝子の発現を制御することにより、腫瘍抑制を引き起こす (70, 71, 72, 73)。過去の文献によれば、FOXO3a の阻害はその標的遺伝子の一つである CDKI の p27^{KIP1}、およびプロアポトーシスタンパク質 BIM の発現を抑制し、前立腺がんの進展を促進する (74)。p21 もまた、FOXO3a の標的遺伝子の一つである (75, 76)。この知見と一致して、ある後ろ向き臨床研究によって、FOXO3a の低発現が鼻咽頭がん患者の予後不良と相関することが報告された (77)。

これまでの報告で、FOXO3a の Ser413 を含む複数のアミノ酸残基は AMPK によってリン酸化され、このリン酸化によって FOXO3a の転写活性が増強されることが報告されている (78)。AMPK は細胞のエネルギー状態にตอบสนองして代謝制御を行うセンサー分子であり、オートファジーの誘導にも中心的な役割を果たす (79)。第二章にて、GGCT をノックダウンすると AMPK-ULK1 シグナル伝達経路をはじめとしたオートファジー促進性のシグナル伝達経路が促進されていることは既に述べた。しかし、GGCT ノックダウンによって活性化された AMPK が、具体的にどのような役割を果たしているのかについては明らかにされていなかった。

本章では、PC3 細胞と膠芽腫細胞株 A172 において GGCT のノックダウンを行い、ウェスタンブロットティング法および qRT-PCR 法を用いて FOXO3a の発現解析を行い、GGCT の発現抑制がタンパク質および mRNA レベルでの FOXO3a の発現誘導を引き起こすことを示した。また、FOXO3a の GGCT との同時ノックダウンを行い、トリパンブルー染色法で細胞数を計測することにより、FOXO3a の発現誘導が、GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇とそれに続く細胞増殖抑制、細胞死誘導を制御することを示した。さらに、AMPK を GGCT と同時にノックダウンし、ウェスタンブロットティング法を用いて FOXO3a Ser413 のリン酸化レベルおよび p21 の発現量解析を行うことにより、FOXO3a をリン酸化する AMPK が、FOXO3a-p21 経路の活性化をその上流で制御することを明らかにした。

3-2. 実験方法

3-2-1. 細胞と培養条件

ヒト前立腺細胞株 PC3 およびヒト膠芽腫細胞株 A172 は RIKEN BRC より購入した。DMEM に 10%FBS および 1% penicillin/streptomycin を加えた培地を用いて、37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

3-2-2. 抗体

一次抗体には、前章までに用いた抗体以外に、ウサギ由来 IgG 抗体として phospho-FOXO3a (1:1000、Ser413、#8174、CST) およびその非リン酸化体 (1:1000、#2497、CST) を用いた。

3-2-3. siRNA 導入トランスフェクション条件

5.0 x 10⁴ 個/well の PC3 細胞、A172 細胞を 6 well plate に播種し、およそ 24 時間後、30 pmol/well の Non-target control siRNA、GGCT siRNA、FOXO3a siRNA、AMPK α 1 siRNA と 5 μ L の Lipofectamine RNAi MAX 試薬を含むトランスフェクション用無血清培地 Opti-MEM 中で混合し、15 分間、室温にて静置させ、penicillin/streptomycin を含まない培地に交換した培養細胞に添加し、終濃度 10 nM の siRNA の存在下でトランスフェクションを行った。前章までに使用したものに加え、新たに使用した siRNA について配列を以下の表に示す。GGCT および FOXO3a、または AMPK α 1 の同時ノックダウンを行う場合は、Non-target control siRNA を終濃度 20 nM でコントロールとして用いた。

Target gene	Sense (5'→3')	Anti-sense (5'→3')
FOXO3a	CCAUGUCACACUAUGGUAA	TTACCATAGTGTGACATGG

3-2-4. 細胞質/核タンパク質分画

上記の条件で PC3 細胞および A172 細胞に siRNA をトランスフェクションした 4 日目に、トリプシン処理によって剥離させ、回収したおよそ 1 x 10⁶ 個の細胞を LysoPure Nuclear and Cytoplasmic Extractor Kit を用い、第一章で行ったのと同様に細胞質と核のタンパク質を分画した。

3-2-5. ウェスタンブロッティング法

上記の条件で培養した細胞を PBS で洗浄し、37°C 約 1 分間のトリプシン処理にて細胞を剥離させた後に遠心分離にて細胞を回収した。回収した細胞を RIPA Buffer にプロテアーゼ阻害剤および PhosSTOP EASYpack を加えたもので溶解し、氷冷しながら超音波処理にて破碎した。溶解液を 4°C、20,000 xg で 15 分間、遠心分離して上清を回収した。細胞抽出液のタンパク質濃度を BCA 法にて決定し、1 サンプルあたりタンパク質量として 50 μ g に 5x sample buffer を加え、95°C、5 分間インキュベートし、検出するタンパク質の分子量に応じた 10%、15% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE で分離した。10%ゲルはウェット式 (50V/gel 定電圧、60 分)、15%ゲルはセミドライ式 (170

mA/gel 定電流、75分)にてPVDFメンブレンに転写した後、p21を検出する際はPVDF Blocking Reagent for Can Get Signalで、GGCTおよびGAPDHを検出する際は3%スキムミルクおよび0.05% Tween-20を含有するTBSTで、FOXO3aおよびAMPK α を検出する際には5%のBSAを含むTBSTで室温下、1時間ブロッキングした後、上記の希釈率で調製した一次抗体を、4°C 一晚、緩やかに振とうさせながら反応させた。TBSTにて緩やかに振とうさせながら5分間、2回洗浄したのち、二次抗体を室温で1時間反応させた。抗体希釈液にはp21を検出する際はCan Get Signal Immunoreaction Enhancer Solutionを、GGCTおよびGAPDHを検出する際はSignal Enhancer HIKARI (Nacalai Tesque)を、FOXO3aおよびAMPKを検出する際は5%BSA含有TBSTを使用した。リン酸化タンパク質を検出する一次抗体を用いた際には、ブロッキングにはBlocking one-P、抗体希釈液にはCan Get Signal Immunoreaction Enhancer Solutionを用いた。タンパク質の発現シグナルは、TBSTで5分間、3回洗浄したのちにTBSで2回洗浄し、通常はClarity Western ECL Substrateを用い、発現量が少なく検出が困難な際はChemi-Lumi One Superを用いて発色させ、ChemiDoc XRS PlusのCCDカメラで検出した。

3-2-6. 定量的リアルタイムPCR (qRT-PCR) 法.

上で述べた条件でsiRNAを導入した細胞を1 wellあたり500 μ LのTRIzol (Thermo Fisher Scientific)に溶解し、RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて以下のように全RNA抽出物を精製した。溶解物に100 μ Lのクロロホルム (Wako)を加え、激しく混和した。12,000 xg、4°Cで15分間遠心分離し、回収した上清と同量の100% エタノール (Wako)を加えて激しく混和した。得られた混合物の全量をRNeasy スピニングカラムに移し、12,000 xg、室温で15秒間遠心分離した。下層を廃棄し、Buffer RW1を700 μ L添加した。12,000 xg、室温で15秒間遠心分離し、下層を廃棄し、Buffer RPEを500 μ L添加した。これを一度繰り返し、12,000 xg、室温で2分間遠心分離し、下層カラムを新たなカラムと交換し、最大速度、室温で1分間遠心分離した。下層カラムを新たな1.5 mL チューブと交換し、上層カラムにRNase freeの滅菌蒸留水20 μ Lを添加し、12,000 xg、室温で1分間遠心分離することにより下層に細胞全RNA溶液を得た。得られた全RNA 500 ngから、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO)を用いて以下のように逆転写反応を行い、cDNAを合成した。500 ngのRNAを滅菌蒸留水で6 μ Lとし、65°Cで5分間加熱した。gDNA Removerを加えた4x DN Master Mix 2 μ Lを添加し、37°Cで5分間加熱した。5x RT Master Mix II 2 μ Lを添加し、37°Cで15分、50°Cで5分、98°Cで5分間インキュベートした。得られたcDNAをTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)およびLight Cycler 96 System (Roche Diagnostics)を用いて以下のような条件でqRT-PCRを行った。cycle 1: 95°Cで60秒、cycle 2 (x 40): 95°Cで15秒、60°Cで60秒。遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子 *ARF1* のmRNA発現量を内部標準として $2^{-\Delta\Delta Cq}$ 法を用いて算出した。Eurofins Genomicsより購入し用いた各Primerの配列は以下に示す。

Target		Sequence (5'→3')
FOXO3a	Forward	GAACGTGGGGAACCTTCACTGGTGCTA
	Reverse	GGTCTGCTTTGCCCACTTCCCCTT
p21	Forward	CGATGGAACCTTCGACTTTGTCA
	Reverse	GCACAAGGGTACAAGACAGTG
ARF1	Forward	GACCACGATCCTCTACAAGC
	Reverse	TCCCACACAGTGAAGCTGATG

3-2-7. 生細胞数・死細胞率の評価

PC3 細胞および A172 細胞の生細胞数および死細胞率はトリパンブルー染色法によって評価した。5.0 x 10⁴ 個/well で 6 well plate に播種し、24 時間後に上記の siRNA 導入トランスフェクション条件にて細胞に siRNA 導入した。トランスフェクション後 7 日目にトリプシン処理にて細胞懸濁液を調製、同量の 0.4% トリパンブルーを添加し、10 μL の細胞懸濁液を計数した。トリパンブルーを排出し透明であった細胞を生細胞、トリパンブルーによって染色された細胞を死細胞として計数し、血球計算盤において 4 カ所の計測平均値を算出した。死細胞数を生細胞と死細胞の合計数で除した値を死細胞率とし、パーセンテージを算出した。

3-2-8. 統計的解析

それぞれ独立した 3 回以上の実験を行うことによって得られたデータは、平均値 ± 標準偏差 (S.D.) で表した。p 値は Excel software を用いて *Student's t-test* 両側検定を行うことにより算出し、得られた p 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判定した。

3-3. 実験成績

3-3-1. PC3 細胞および A172 細胞における GGCT ノックダウンによる FOXO3a の発現誘導

まず、PC3 細胞および A172 細胞において、GGCT siRNA 導入によって p21 発現上昇が引き起こされることをウェスタンブロッティング法で確認した (Fig. 18A)。同条件下で、これらの細胞から総タンパク質および総 RNA を抽出し、ウェスタンブロッティング法および qRT-PCR 法でその発現を解析したところ、FOXO3a もまた顕著にタンパク質レベル (Fig. 18A) および mRNA レベル (Fig. 18B) で誘導されることが明らかとなった。次に、FOXO3a の機能はその細胞内局在によって制御されていることが報告されているため (80)、GGCT siRNA を導入した PC3 細胞および A172 細胞由来の、細胞質と核に分画したタンパク質を用いてウェスタンブロッティング法を行い、それぞれの細胞内局在のタンパク質発現量について解析した。その結果、GGCT ノックダウンによって細胞質 FOXO3a、核内 FOXO3a とともに発現量が増加していた (Fig. 18C)。したがって、PC3 細胞および A172 細胞において、GGCT のノックダウンは p21 発現上昇に伴って FOXO3a の発現を誘導し、GGCT はその核内局在を促進する因子である可能性が示唆された。

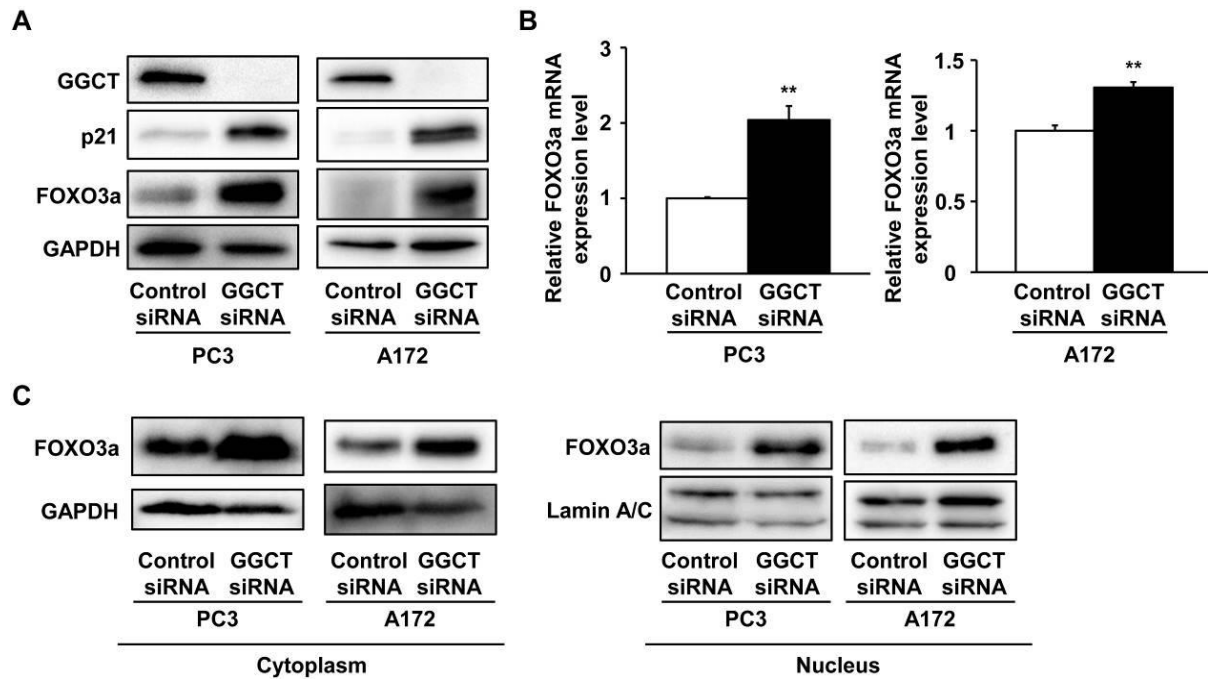


Figure 18. GGCT depletion upregulates expression of FOXO3a in PC3 and A172 cancer cells.

A, Western blot analysis of GGCT, p21, FOXO3a, and GAPDH in PC3 and A172 cells at 4 days post-transfection with non-target control siRNA or siRNA targeting GGCT. GAPDH is shown as a loading control. **B**, Expression levels of FOXO3a mRNA analyzed by qRT-PCR in PC3 and A172 cells at 4 days post-transfection with the indicated siRNAs. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.) **C**, Expression of FOXO3a in the cytoplasm or nucleus, as determined by Western blotting. Fractionated proteins from PC3 and A172 cells were extracted at 4 days post-transfection with the indicated siRNAs. GAPDH and Lamin A/C are shown as loading controls of cytoplasm and nucleus, respectively. These immunoblotting experiments were performed at least three times and the representative results are shown. These figures were cited from Fig. 1 in Taniguchi K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, 517, 238-243.

3-3-2. GGCT ノックダウンによる p21 の発現上昇の FOXO3a 依存性の解析

FOXO3a は転写因子であること、GGCT ノックダウンによって p21 の発現上昇に伴い FOXO3a の発現が誘導されたことを考慮すると、FOXO3a の発現誘導が GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇を制御しているのではないかと考えられた。これを検証するために、GGCT と FOXO3a の同時ノックダウンを行い、p21 のタンパク質および mRNA の発現量をウェスタンブロッティング法および qRT-PCR 法を用いて解析した。その結果、GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇は、FOXO3a の同時ノックダウンによってタンパク質レベルおよび mRNA レベルで顕著に阻害されることがわかった (Fig. 19A and B)。したがって、PC3 細胞および A172 細胞において GGCT 発現抑制で誘導される p21 の発現上昇は、FOXO3a 依存的に制御されていることが明らかになった。

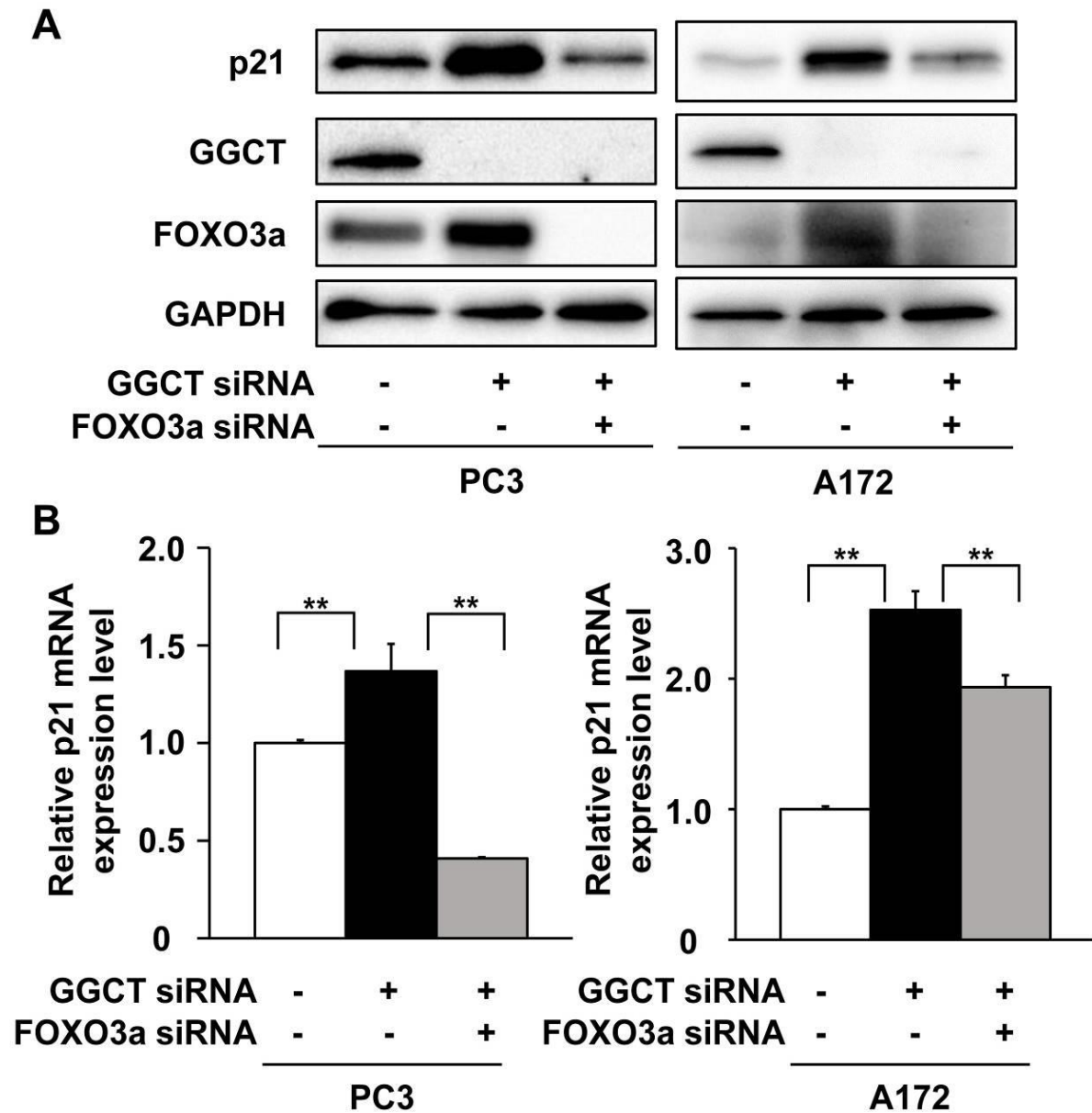


Figure 19. GGCT depletion induces upregulation of p21 via FOXO3a.

A, Western blot analysis of p21, GGCT, FOXO3a and GAPDH expression in PC3 and A172 cells at 4 days post-transfection with siRNA targeting GGCT and FOXO3a, or with non-target control siRNA. These immunoblotting experiments were performed at least three times and the representative results are shown. **B**, Expression of p21 mRNA, as determined by qRT-PCR, in PC3 and A172 cells at 4 days post-transfection with siRNA targeting GGCT and FOXO3a, or with a non-target control siRNA. (** $p < 0.01$.) These figures were cited from Fig. 2 in Taniguchi K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, 517, 238-243.

3-3-3. FOXO3a 依存的な GGCT ノックダウンによるがん細胞増殖抑制および細胞死誘導

次に、PC3 細胞および A172 細胞において、GGCT ノックダウンによるがん細胞増殖抑制および細胞死の誘導に FOXO3a が関与しているかどうかについて、FOXO3a を GGCT と同時にノックダウンし、トリパンブルー染色法にて細胞数を計測することにより解析した。その結果、PC3 細胞および A172 細胞における FOXO3a の同時ノックダウンは、部分的にはあるが、有意にその生細胞数 (Fig. 20A) およびトリパンブルー陽性死細胞数の増加を回復した (Fig. 20B)。したがって PC3 細胞および A172 細胞において、GGCT 発現抑制にตอบสนองして p21 の発現を誘導している FOXO3a は、GGCT ノックダウンによる細胞増殖抑制および細胞死を制御していることが明らかになった。

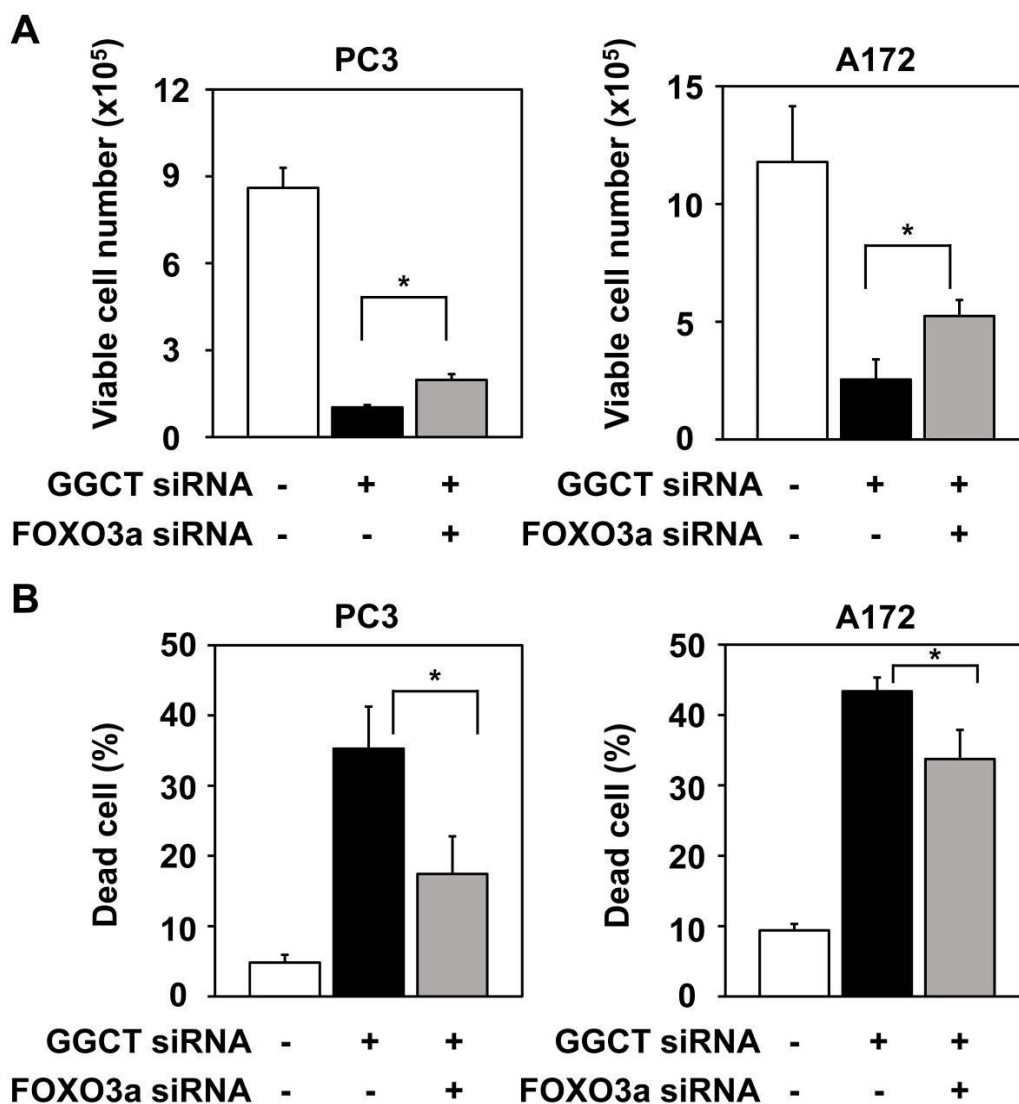


Figure 20. Growth inhibition of cancer cells induced by GGCT depletion is regulated by FOXO3a.

A, PC3 and A172 cells were transfected with the indicated siRNAs. The number of Trypan blue-negative viable cells at 7 days post-transfection is shown. **B**, Proportion of Trypan blue-positive (dead) cells at 7 days post-transfection with the indicated siRNAs. (*p<0.05.) These figures were cited from Fig. 3 in Taniguchi K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, 517, 238-243.

3-3-4. GGCT ノックダウンによる AMPK-FOXO3a 経路の活性化を介した p21 発現上昇

AMPK は FOXO3a の複数のアミノ酸残基をリン酸化することが報告されており、そのうちのひとつが Ser413 であり、Ser413 をリン酸化された FOXO3a の転写活性は増強されることが示されている (78)。そこで、これまでに示してきた GGCT 発現低下による FOXO3a を介した p21 調節機能に、活性化 AMPK が重要な役割を果たしているのではないかと考えた。これを検証するために、PC3 細胞および A172 細胞において AMPK α 1 の GGCT との同時ノックダウンを行い、ウェスタンブロッティング法を用いて p-FOXO3a Ser413 および p21 のタンパク質発現レベルを解析した。第二章で示したのと同様に、GGCT ノックダウンによって p-AMPK α Thr172 もまた増加したが、これは AMPK α 1 の同時ノックダウンによって減少した。そして、GGCT ノックダウンによって増加した FOXO3a Ser413 のリン酸化レベルは、AMPK α 1 の同時ノックダウンによって顕著に減少した。また、AMPK α 1 の GGCT との同時ノックダウンは、p21 の発現上昇を顕著に減少させた。しかし、GGCT 発現抑制で誘導された FOXO3a のタンパク質発現レベルは、AMPK の同時ノックダウンによって抑制されなかった (Fig. 21)。これらの結果より、GGCT 発現抑制は p-AMPK α Thr172 の増加による活性化を介して FOXO3a の Ser413 におけるリン酸化体の増加を引き起こし、この AMPK-FOXO3a 経路は GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

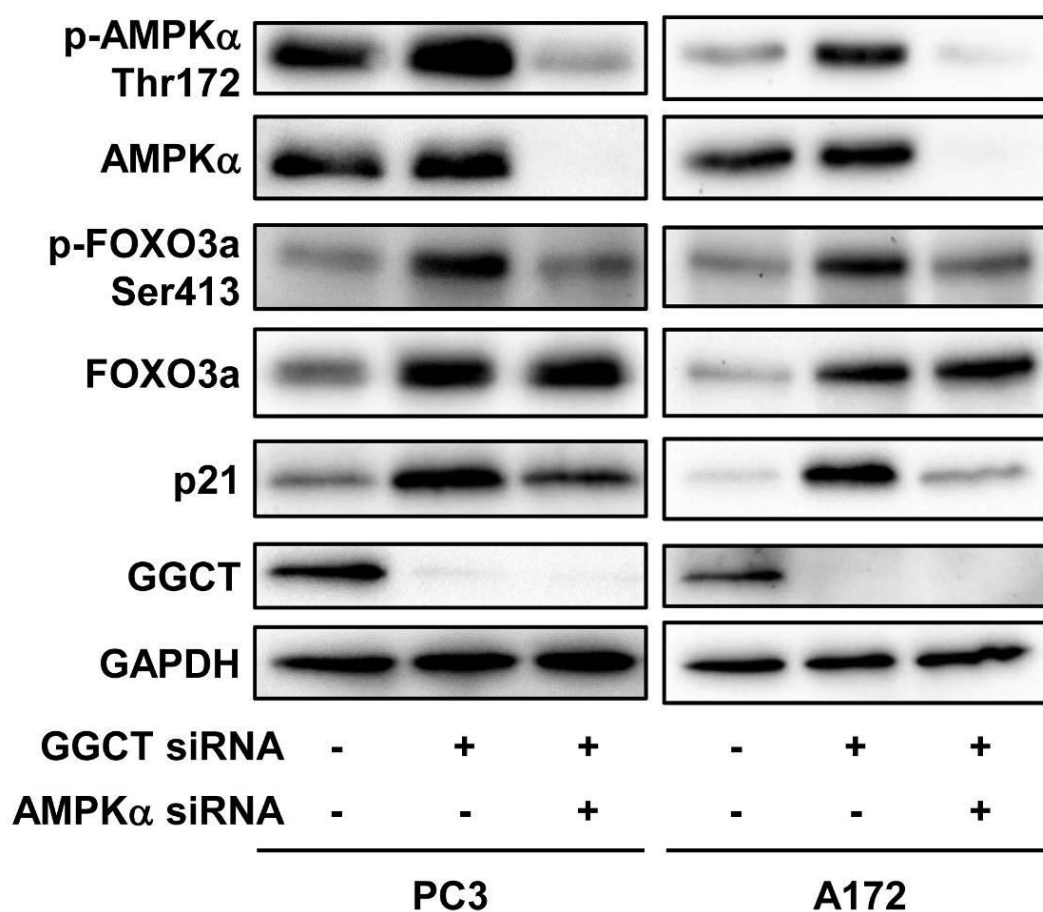


Figure 21. AMPK regulates phosphorylation of FOXO3a at Ser413 upon GGCT depletion.

Western blot analysis of GGCT, p-AMPKα Thr172, p-FOXO3a Ser413, the respective non-phosphorylated forms, p21 and GAPDH levels in PC3 and A172 cells at 4 days post-transfection with siRNA targeting GGCT and AMPKα1, or with non-target control siRNA. GAPDH is shown as a loading control. These immunoblotting experiments were performed at least three times and the representative results are shown. This figure was cited from Fig. 4A in Taniguchi K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, 517, 238-243.

3-3-5. GGCT ノックダウンによる増殖抑制および細胞死における AMPK 依存性の解析

次に、FOXO3a の発現誘導が GGCT ノックダウンによる増殖抑制および細胞死の誘導を制御したという結果を考慮して、PC3 細胞および A172 細胞において AMPK-FOXO3a-p21 経路が GGCT ノックダウンによる細胞増殖抑制および細胞死の誘導に必要であるという仮説を立てた。これを検証するために、AMPK α 1 を GGCT と同時にノックダウンした細胞について、トリパンブルー染色法により生細胞数および死細胞数を計測した。その結果、GGCT の発現抑制で引き起こされた細胞増殖抑制および死細胞率の増加は、AMPK α 1 の同時ノックダウンによって有意に回復することがわかった (Fig. 22A and C)。また、AMPK の細胞増殖に対する影響を調べるため、AMPK の単独ノックダウンを行ったところ、AMPK α 1 の発現抑制は PC3 細胞の増殖を有意に抑制することが分かった (Fig. 22B)。以上の結果より、未処理がん細胞では細胞の生存および増殖に寄与している AMPK は、GGCT 発現抑制でそのリン酸化が誘導されて活性化されると、FOXO3a のリン酸化を介した p21 の発現上昇を引き起こし、がん細胞の増殖を抑制しているという可能性が示唆された。これらの知見を総合的に考慮すると、GGCT ノックダウンの PC3 細胞および A172 細胞における抗増殖効果は AMPK-FOXO3a-p21 経路によって抑制的に制御されると考えられた。

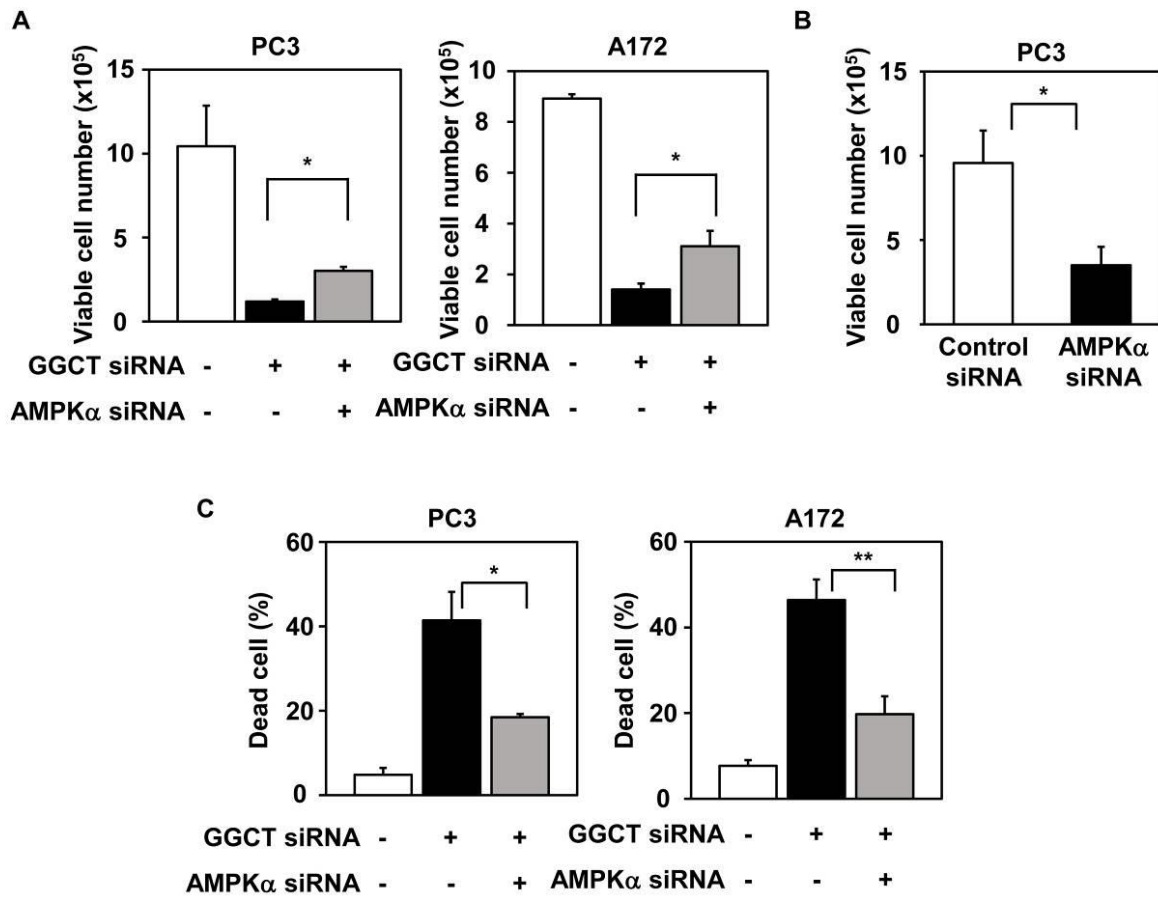


Figure 22. AMPK regulates growth inhibition and cell death upon GGCT depletion.

A, PC3 and A172 cells were transfected with siRNA targeting GGCT and AMPK α 1, or with non-target control siRNA. The number of Trypan blue-negative viable cells at 7 days post-transfection is shown. **B**, PC3 cells were transfected with siRNA targeting AMPK α 1, or with non-target control siRNA. The number of Trypan blue-negative viable cells at 7 days post-transfection is shown. **C**, The proportion of Trypan blue-positive (dead) cells at 7 days post-transfection with the indicated siRNAs. (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.) Fig. 22A and C were cited from Fig. 4B and C in Taniguchi K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, 517, 238-243.

3-4. 考察

本章では、GGCT ノックダウンによる PC3 細胞および A172 細胞における増殖抑制および細胞死誘導が、AMPK-FOXO3a-p21 経路の活性化によって引き起こされることを示した。FOXO3a または AMPK α 1 を同時にノックダウンした際に、GGCT ノックダウンで引き起こされた p21 発現上昇、増殖抑制、細胞死誘導等の細胞応答は、顕著に抑制されることが明らかとなった。さらに、FOXO3a の Ser413 におけるリン酸化は GGCT 発現抑制で誘導され、AMPK α 1 の同時ノックダウンによって抑制された。また、p21 は FOXO3a の転写標的であり、AMPK は FOXO3a をリン酸化することによりその転写活性を増強するため (75, 76, 78)、本章における結果は、GGCT 発現抑制で引き起こされるがん細胞増殖抑制および細胞死誘導効果が AMPK-FOXO3a 経路の活性化に依存するということを明らかにした。

GGCT は γ -グルタミルサイクル中でアミノ酸代謝に関与する酵素であり、 γ -グルタミルアミノ酸から 5-オキソプロリンと遊離アミノ酸が生成される反応を触媒する酵素である (3)。第二章において、PC3 細胞において GGCT の発現抑制は AMPK-ULK1 シグナル伝達経路を活性化することを示した。AMPK は細胞の代謝性ストレスに応答するセンサー分子であり、グルコースやアミノ酸といった栄養素の欠乏によって活性化される (50, 51)。MCF7 細胞においては、GGCT のノックダウンによる増殖抑制は p21 発現上昇に依存しており (18)、この p21 発現上昇にはオートファジー誘導が重要な役割を果たしていることは第二章で示した。GGCT の発現を抑制した PC3 細胞においても、この p21 発現上昇およびオートファジーの誘導が観察されたのにも関わらず、ATG5 の GGCT との同時ノックダウンによるオートファジーの阻害は、p21 の発現上昇を抑制されなかった。また、PC3 細胞において PHB2 の単独ノックダウンを行ったところ、p21 の発現上昇は観察されなかった。これらの結果は、GGCT ノックダウン PC3 細胞における p21 の発現上昇が、オートファジーおよび PHB2 非依存的なメカニズムによって制御されることを示唆している。本章では、GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇、増殖抑制および細胞死誘導を引き起こす機構として、AMPK-FOXO3a 経路を見出した。

FOXO3a の Ser413 を含むいくつかのアミノ酸残基は、AMPK によって直接リン酸化され、FOXO3a は標的遺伝子の転写活性化を引き起こすことが報告されている (78)。AMPK によるリン酸化を受けない変異体 FOXO3a を遺伝子導入した細胞においては、FOXO3a 依存性の転写が完全にではないが有意に抑制されることが報告されているため (78)、Ser413 を含むアミノ酸残基における FOXO3a のリン酸化は、FOXO3a 依存性の転写に重要な役割を果たす。AMPK α と FOXO3a のリン酸化レベルは GGCT の発現を低下させた PC3 細胞および A172 細胞において増加したが、AMPK α 1 の GGCT との同時ノックダウンによって抑制された。これらの結果は、GGCT のノックダウンは AMPK 依存的な機構で FOXO3a Ser413 のリン酸化レベルを増加させるということを示している。興味深いことに、FOXO3a Ser413 のリン酸化レベルが AMPK α 1 の同時ノックダウンによって阻害された一方で、GGCT 発現抑制時の FOXO3a の発現誘導は AMPK α 1 の同時ノックダウンによって抑制されなかった。したがって、GGCT 発現抑制で誘導される FOXO3a の活性化は、次の二つの機構で説明される。1. AMPK 依存的なリン酸化、2. AMPK 非依存的な mRNA レベルでの発現誘導および核内における発現上昇。FOXO3a タンパク質による標的遺伝子の活性化は、FOXO3a の核内発現量に依存することが報告されている。過去の報告の具体例を挙げると、FOXO3a はいくつかのアミノ酸残基において Akt によるリン酸化を受けると細胞質から核へ移行する (70)。PC3 細胞において Akt を阻害すると、核内における FOXO3a タ

ンパク質発現レベルを増加、細胞質における発現レベルを減少させ、それによって下流遺伝子の発現上昇を引き起こし、反対に、同じく前立腺がん細胞株である DU-145 細胞において Akt を安定強制発現させると、核内 FOXO3a タンパク質発現レベルが減少することが報告されている (81)。したがって、AMPK の活性化によるリン酸化体の増加、および核内 FOXO3a 発現量の増加のいずれも、FOXO3a 依存性の転写活性化において重要な役割を果たしていると考えられる。本章において、mRNA 発現および全タンパク質発現と共に核内 FOXO3a タンパク質発現が増加していたことは、FOXO3a が転写レベルで誘導されており、それと同時に、AMPK による Ser413 を含むアミノ酸残基においてリン酸化を受けることによって、FOXO3a の転写因子としての機能が促進されている可能性を示唆している。

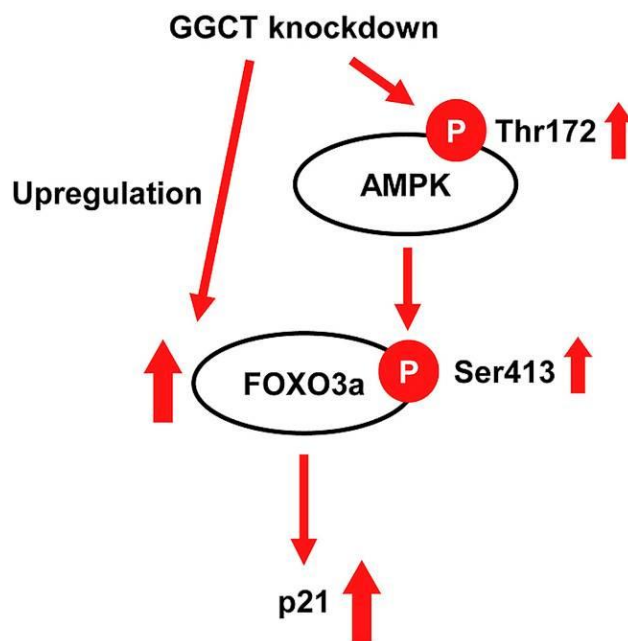


Fig. 23. Depletion of GGCT upregulates p21 expression by activating the AMPK–FOXO3a axis.

Graphical summary of the mechanisms of p21 upregulation by GGCT depletion, including the activation of AMPK–FOXO3a pathway. This figure was cited from Graphical abstract in Taniguchi K et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2019**, 517, 238-243.

核内において FOXO3a タンパク質が低い発現を示し、その結果 FOXO3a の DNA に対する結合能が減少していることは、前立腺がんの悪性度と相関することが報告されている (81)。Shou らは、正常上咽頭組織と比較して上咽頭がん組織においては FOXO3a が低い発現を示していると報告した (77)。本章において、FOXO3a の発現が GGCT ノックダウンで上昇していたことを考慮すると、GGCT が高発現しているがん組織においては、FOXO3a や p21 といったがん抑制因子の発現が阻害されていることによって、異常な細胞周期および腫瘍の進行が誘導されているという可能性が考えられる。さらに、FOXO3a は代謝性ストレスへの抵抗性およびエネルギー代謝に重要な役割を果たすことが報告されており、その mRNA 発現レベルは様々な環境刺激に反応して発現誘導される (73)。FOXO3 遺伝子は、がん抑制遺伝子 p53、およびその相同体である p73 の直接の標的であり、p53 は DNA 傷害に反応して FOXO3 遺伝子の二番目のイントロンに結合してその転写を促進する (82, 83)。Brucker らは、FOXO3a は低酸素条件で培養することによってその発現が誘導され、さらに低酸素、血清欠乏条件での培養は

膠芽腫細胞株において FOXO3a の細胞質から核への移行が促進されることを報告した (84)。これらの知見を考慮すると、様々ながん組織で高発現している GGCT は、FOXO3a の発現を抑制することによって何らかの代謝性ストレスを回避しているのではないかと考えられる。そこで GGCT を阻害すると、GGCT の機能に依存して回避されていた代謝性ストレスが細胞内に蓄積し、そのストレスによって FOXO3a の発現が誘導され、p21 発現上昇およびがん細胞増殖抑制が引き起こされているという可能性が示唆される。

本章では、PC3 細胞および A172 細胞において、FOXO3a の発現が誘導され、かつ AMPK 依存的にリン酸化されることが、GGCT の発現抑制で引き起こされる p21 発現上昇、がん細胞増殖抑制および細胞死の重要な調節因子であることを明らかにした。これらの結果は、GGCT 発現抑制は AMPK–FOXO3a–p21 経路を活性化することによってがん細胞の増殖を抑制することを示唆している。

総括

様々ながん組織に高発現するタンパク質であり、その発現抑制が顕著な抗腫瘍効果を示す GGCT は、有望ながんの新規治療標的分子であると考えられてきた。以前の研究で、乳がん細胞において siRNA を用いて GGCT の発現を抑制すると、CDKI の発現上昇を介した増殖抑制が引き起こされることを示したが、GGCT 発現抑制による CDKI の発現上昇機構の詳細は明らかにされていなかった。本研究では、複数種のがん細胞株を用いて、これまで不明であった GGCT 発現抑制による CDKI の発現上昇の細胞種依存的なメカニズムを解明した。

第 1 章ではではまず、酵母ツーハイブリッド法を用いた網羅的解析を行い、GGCT と相互作用する新規のタンパク質分子として PHB2 を見出した。MCF7 細胞由来タンパク質に対する抗 GGCT 抗体を用いた共免疫沈降法により、内因性 GGCT と PHB2 タンパク質が相互作用することを明らかにした。核に局在する PHB2 は転写抑制因子として働くことが報告されているため、PHB2 の細胞内局在を解析したところ、GGCT 発現抑制により核内局在 PHB2 が減少することがわかった。さらに、PHB2 をノックダウンおよび強制発現させた MCF7 細胞を用いて p21 発現解析および細胞周期解析を行い、GGCT ノックダウン時の p21 の発現上昇が PHB2 によって制御されていることを示した。また、抗 PHB2 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、PHB2 が p21 のプロモーター領域に結合することを明らかにした。さらに、PHB2 と p21 の単独または同時ノックダウンを行い、PHB2 が p21 発現抑制を介してがん細胞の増殖を促進する因子であることを明らかにした。

第 2 章では、GGCT の発現抑制が MCF7 細胞および PC3 細胞にオートファジーを誘導することを明らかにした。また、血清欠乏培養条件下でマウス繊維芽細胞株 NIH3T3 にオートファジーが誘導される実験系を用い、GGCT の強制発現がオートファジーを抑制し、細胞増殖を促進することを明らかにした。さらに、オートファジー進行に必須の因子 ATG5 を GGCT と同時にノックダウンすることによってオートファジーを阻害すると、細胞周期停止および細胞老化といった GGCT ノックダウン細胞で観察される表現型が抑制されたことから、オートファジーがこれらの表現型を促進性に制御していることを示した。最後に、このオートファジーの誘導に AMPK-ULK1 シグナル伝達経路の活性化および mTOR シグナル伝達経路の抑制が伴っており、GGCT 発現抑制によるオートファジーの誘導は AMPK-ULK1 シグナル伝達経路に依存することを明らかにした。

第 3 章では、PC3 細胞と A172 細胞において、GGCT ノックダウンが FOXO3a の発現誘導を引き起こすことを示した。また、FOXO3a の発現誘導は GGCT ノックダウンによる p21 発現上昇とそれに続く細胞増殖抑制、細胞死誘導を制御することを示した。さらに、FOXO3a をリン酸化する AMPK が、FOXO3a-p21 経路の活性化をその上流で制御することを明らかにした。

本研究では、GGCT 発現抑制によって引き起こされる CDKI 発現上昇のメカニズムとして、次の三つの機構を提示した。1. GGCT との新規相互作用タンパク質 PHB2 の、p21 発現抑制機能の阻害。2. AMPK-ULK1 シグナル伝達経路の活性化または mTOR シグナル伝達経路の抑制を伴うオートファジーの誘導を介した調節。3. 腫瘍抑制転写因子 FOXO3a の発現誘導、および AMPK によるリン酸化を介した FOXO3a の機能活性化による p21 発現上昇。これらの結果は、GGCT ノックダウンによって CDKI の発現が上昇し、がん細胞の増殖が抑制される細胞種依存的なメカニズムの一端を明らかにし、今後の GGCT を標的とした治療薬の開発に寄与するものと考えられる。

謝辞

研究を遂行し本稿をまとめるに当たり、御懇篤なる御指導を賜りました京都薬科大学 臨床腫瘍学分野 中田 晋 准教授に厚く御礼申し上げます。実験技術や論文作成をはじめとした、基礎研究において必要とされるあらゆるスキルを基礎から細部にわたって御指導、御鞭撻を頂戴いたしましたこと、感謝の念に堪えません。

また、本論文の査読ならびに御指導、御高閲を賜りました本学 臨床薬理学分野 中田 徹男 教授ならびに薬理学分野 田中 智之 教授に篤く御礼申し上げます。

さらに、博士課程進学以前より現在に至るまで、懇切丁寧なる研究の御指導を頂戴し、円滑な研究室運営を賜りました臨床腫瘍学分野 飯居 宏美 助教に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、実験手技の御指導を賜りました松村 健吾 博士、ならびに実験に協力して頂きました臨床腫瘍学分野 高木 寛子 学士、安藤 翔太 学士、茂山 千愛美 学士をはじめとする大学院生の皆様に感謝の意を表すると共に、益々のご活躍をお祈り申し上げます。

また、幅広い勉強の機会を賜りました、本学制度とがんプロフェッショナル養成基盤推進プラン制度に心より御礼申し上げます。

本学 臨床腫瘍学分野 前教授の故 吉貴 達寛 先生には、博士課程進学以前より様々な研究の御助言を頂戴し、長きにわたり温かく見守って下さいましたこと、深く敬意と感謝の意を表します。

そして、実験に協力して頂きました安藤 孝太氏、遠藤 百華氏、松田 凌平氏をはじめとした臨床腫瘍学分野の学部学生の皆様に深く御礼申し上げます。

最後に、大学院生活を送るに当たり、様々な面で支えて頂いたすべての皆様に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Kageyama S, Isono T, Iwaki H, Wakabayashi Y, Okada Y, Kontani K, Yoshimura K, Terai A, Arai Y, Yoshiki T. Identification by proteomic analysis of calreticulin as a marker for bladder cancer and evaluation of the diagnostic accuracy of its detection in urine. *Clin. Chem.* **2004**, 50, 857-66.
- 2) Kageyama S, Iwaki H, Inoue H, Isono T, Yuasa T, Nogawa M, Maekawa T, Ueda M, Kajita Y, Ogawa O, Toguchida J, Yoshiki T. A novel tumor-related protein, C7orf24, identified by proteome differential display of bladder urothelial carcinoma. *Proteomics Clin.* **2007**, 1, 192-9.
- 3) Oakley AJ, Yamada T, Liu D, Coggan M, Clark AG, Board PG. The identification and structural characterization of C7orf24 as γ -glutamyl cyclotransferase. An essential enzyme in the γ -glutamyl cycle. *J. Biol. Chem.* **2008**, 283, 22031-42.
- 4) Gromov P, Gromova I, Friis E, Timmermans-Wielenga V, Rank F, Simon R, Sauter G, Moreira JM. Moreira Proteomic profiling of mammary carcinomas identifies C7orf24, a γ -glutamyl cyclotransferase, as a potential cancer biomarker. *J. Proteome. Res.* **2010**, 9, 3941-53.
- 5) Takemura K, Kawachi H, Eishi Y, Kitagaki K, Negi M, Kobayashi M, Uchida K, Inoue J, Inazawa J, Kawano T, Board PG. γ -Glutamylcyclotransferase as a novel immunohistochemical biomarker for the malignancy of esophageal squamous tumors. *Hum. Pathol.* **2014**, 45, 331-41.
- 6) Li Y, Wu T, Wang Y, Yang L, Hu C, Chen L, Wu S. γ -Glutamyl cyclotransferase contributes to tumor progression in high grade serous ovarian cancer by regulating epithelial-mesenchymal transition via activating PI3K/AKT/mTOR pathway. *Gynecol. Oncol.* **2018**, 149, 163-72.
- 7) Jiang Z, Zhang C, Gan L, Jia Y, Xiong Y, Chen Y, Wang Z, Wang L, Luo H, Li J, Zhu R, Ji X, Yu Q, Wang L. iTRAQ-Based Quantitative Proteomics Approach Identifies Novel Diagnostic Biomarkers That Were Essential for Glutamine Metabolism and Redox Homeostasis for Gastric Cancer. *Proteomics Clin. Appl.* **2018**, e1800038.
- 8) Uejima D, Nishijo K, Kajita Y, Ishibe T, Aoyama T, Kageyama S, Iwaki H, Nakamura T, Iida H, Yoshiki T, Toguchida J. Involvement of cancer biomarker C7orf24 in the growth of human osteosarcoma. *Anticancer Res.* **2011**, 31, 1297-305.
- 9) Shen SH, Yu N, Liu XY, Tan GW, Wang ZX. Gamma-glutamylcyclotransferase promotes the growth of human glioma cells by activating Notch-Akt signaling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, 471, 616-20.

- 10) Kageyama S, Hanada E, Ii H, Tomita K, Yoshiki T, Kawauchi A. Gamma-Glutamylcyclotransferase. A Novel Target Molecule for Cancer Diagnosis and Treatment. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 345219.
- 11) Kageyama S, Ii H, Taniguchi K, Kubota S, Yoshida T, Isono T, Chano T, Yoshiya T, Ito K, Yoshiki T, Kawauchi A, Nakata S. Mechanisms of Tumor Growth Inhibition by Depletion of γ -Glutamylcyclotransferase (GGCT): A Novel Molecular Target for Anticancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, 19, E2054.
- 12) Hama S, Arata M, Nakamura I, Kasetani T, Itakura S, Tsuchiya H, Yoshiki T, Kogure K. Prevention of tumor growth by needle-free jet injection of anti-C7orf24 siRNA. *Cancer Gene. Ther.* **2012**, 19, 553-7.
- 13) Ran R, Liu Y, Gao H, Kuang Q, Zhang Q, Tang J, Fu H, Zhang Z, He Q. PEGylated hyaluronic acid-modified liposomal delivery system with anti- γ -glutamylcyclotransferase siRNA for drug-resistant MCF-7 breast cancer therapy. *J. Pharm. Sci.* **2014**, 104, 476-84.
- 14) He Z, Wang S, Shao Y, Zhang J, Wu X, Chen Y, Hu J, Zhang F, Liu XS. Ras Downstream Effector GGCT Alleviates Oncogenic Stress. *iScience.* **2019**, 19, 256-66.
- 15) Ii H, Yoshiki T, Hoshiya N, Uenishi J. Synthesis and GGCT Inhibitory Activity of N-Glutaryl-L-alanine Analogues. *Chem. Pharm. Bull.* **2016**, 64, 785-92.
- 16) Yoshiya T, Ii H, Tsuda S, Mochizuki M, Kageyama S, Yoshiki T. Design of fluorogenic probes and fluorescent-tagged inhibitors for γ -glutamyl cyclotransferase. *J. Pept. Sci.* **2017**, 23, 618-23.
- 17) Ii H, Yoshiya T, Nakata S, Taniguchi K, Hidaka K, Tsuda S, Mochizuki M, Nishiuchi Y, Tsuda Y, Ito K, Kageyama S, Yoshiki T. A Novel Prodrug of a γ -Glutamylcyclotransferase Inhibitor Suppresses Cancer Cell Proliferation in vitro and Inhibits Tumor Growth in a Xenograft Mouse Model of Prostate Cancer. *ChemMedChem.* **2018**, 13, 155-63.
- 18) Matsumura K, Nakata S, Taniguchi K, Ii H, Ashihara E, Kageyama S, Kawauchi A, Yoshiki T. Depletion of γ -glutamylcyclotransferase inhibits breast cancer cell growth via cellular senescence induction mediated by CDK inhibitor upregulation. *BMC Cancer.* **2016**, 1, 748.
- 19) Albert B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Robert K, Walter P. "Molecular biology of the cell (6th edition)." *Garland Science.* **2014**.
- 20) Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor p21 (Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts. *Cancer Lett.* **2002**, 179, 1-14.

- 21) Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat. Rev. Cancer.* **2009**, 9, 400-14.
- 22) Kreis NN, Louwen F, Yuan J. The Multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in Cell Differentiation, Migration and Cancer Therapy. *Cancers (Basel).* **2019**, 11, E1220.
- 23) Liu Y, Kwiatkowski DJ. Combined CDKN1A/TP53 mutation in bladder cancer is a therapeutic target. *Mol. Cancer Ther.* **2015**, 14, 174-82.
- 24) Perri F, Pisconti S, Della Vittoria Scarpati G. P53 mutations and cancer: a tight linkage. *Ann Transl Med.* **2016**, 4, 522.
- 25) Vita M, Henriksson M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. *Semin Cancer Biol.* **2006**, 16, 318-30.
- 26) Mitchell KO, El-Deiry WS. Overexpression of c-Myc inhibits p21WAF1/CIP1 expression and induces S-phase entry in 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-sensitive human cancer cells. *Cell Growth Differ.* **1999**, 10, 223-30.
- 27) Yamaguchi T, Kakefuda R, Tajima N, Sowa Y, Sakai T. Antitumor activities of JTP-74057 (GSK1120212), a novel MEK1/2 inhibitor, on colorectal cancer cell lines in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* **2011**, 39, 23-31.
- 28) Dang CV, Reddy EP, Shokat KM, Soucek L. Drugging the 'undruggable' cancer targets. *Nat. Rev. Cancer.* **2017**, 17, 502-8.
- 29) Mishra S, Murphy LC, Murphy LJ. The Prohibitins: emerging roles in diverse functions. *J. Cell. Mol. Med.* **2006**, 10, 353-63.
- 30) Thuaud F, Ribeiro N, Nebigil CG, Désaubry L. Prohibitin ligands in cell death and survival: mode of action and therapeutic potential. *Chem. Biol.* **2013**, 20, 316-31.
- 31) Bavelloni A, Piazzini M, Raffini M, Faenza I, Blalock WL. Prohibitin 2: At a communications crossroads. *IUBMB Life.* **2015**, 67, 239-54.
- 32) Montano MM, Ekena K, Delage-Mourroux R, Chang W, Martini P, Katzenellenbogen BS. An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1999**, 96, 6947-52.
- 33) Kasashima K, Ohta E, Kagawa Y, Endo H. Mitochondrial functions and estrogen receptor-dependent nuclear

- translocation of pleiotropic human prohibitin 2. *J. Biol. Chem.* **2006**, 281, 36401-10.
- 34) Mengwasser J, Piau A, Schlag P, Sleeman JP. Differential immunization identifies PHB1/PHB2 as blood-borne tumor antigens. *Oncogene.* **2004**, 23, 7430-5.
 - 35) Cheng J, Gao F, Chen X, Wu J, Xing C, Lv Z, Xu W, Xie Q, Wu L, Ye S, Xie H, Zheng S, Zhou L. Prohibitin-2 promotes hepatocellular carcinoma malignancy progression in hypoxia based on a label-free quantitative proteomics strategy. *Mol. Carcinog.* **2014**, 53, 820-32.
 - 36) Kim JW, Akiyama M, Park JH, Lin ML, Shimo A, Ueki T, Daigo Y, Tsunoda T, Nishidate T, Nakamura Y, Katagiri T. Activation of an estrogen/estrogen receptor signaling by BIG3 through its inhibitory effect on nuclear transport of PHB2/REA in breast cancer. *Cancer Sci.* **2009**, 100, 1468-78.
 - 37) Kuramori C, Azuma M, Kume K, Kaneko Y, Inoue A, Yamaguchi Y, Kabe Y, Hosoya T, Kizaki M, Suematsu M, Handa H. Capsaicin binds to prohibitin 2 and displaces it from the mitochondria to the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2009**, 379, 519-25.
 - 38) Chi Z, Byrne ST, Dolinko A, Harraz MM, Kim MS, Umanah G, Zhong J, Chen R, Zhang J, Xu J, Chen L, Pandey A, Dawson TM, Dawson VL. Botch is a γ -glutamyl cyclotransferase that deglycinates and antagonizes Notch. *Cell Rep.* **2014**, 7, 681-8
 - 39) El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* **1993**, 75, 817-25.
 - 40) Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* **1993**, 75, 805-16.
 - 41) Polier G, Neumann J, Thuaud F, Ribeiro N, Gelhaus C, Schmidt H, Giaisi M, Köhler R, Müller WW, Proksch P, Leippe M, Janssen O, Désaubry L, Krammer PH, Li-Weber M. The natural anticancer compounds rocaglamides inhibit the Raf-MEK-ERK pathway by targeting prohibitin 1 and 2. *Chem. Biol.* **2012**, 19, 1093-104.
 - 42) Yoshimaru T, Komatsu M, Matsuo T, Chen YA, Murakami Y, Mizuguchi K, Mizohata E, Inoue T, Akiyama M, Yamaguchi R, Imoto S, Miyano S, Miyoshi Y, Sasa M, Nakamura Y, Katagiri T. Targeting BIG3-PHB2 interaction to overcome tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Nat. Commun.* **2013**, 4, 2443.
 - 43) Yoshimaru T, Aihara K, Komatsu M, Matsushita Y, Okazaki Y, Toyokuni S, Honda J, Sasa M, Miyoshi Y, Otaka A, Katagiri T. Stapled BIG3 helical peptide ERAP potentiates anti-tumour activity for breast cancer

- therapeutics. *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1821.
- 44) Douglas R Green. "Means to an end, Apoptosis and other cell death mechanisms." *Cold Spring Harbor Laboratory Press*, **2011**.
 - 45) Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **2007**, 7, 961-7.
 - 46) Keller CW, Lünemann JD. Autophagy and Autophagy-Related Proteins in CNS Autoimmunity. *Front. Immunol.* **2017**, 8, 165.
 - 47) Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* **2004**, 432, 1032-6.
 - 48) Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy. *Science.* **2011**, 331, 456-61.
 - 49) Roach PJ. AMPK -> ULK1 -> autophagy. *Mol. Cell. Biol.* **2011**, 31, 3082-4.
 - 50) Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan KL. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell. Biol.* **2011**, 13, 132-41.
 - 51) Ghislat G, Patron M, Rizzuto R, Knecht E. Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase-β (CaMKK-β). *J. Biol. Chem.* **2012**, 287, 38625-36.
 - 52) Lee JW, Park S, Takahashi Y, Wang HG. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS One.* **2010**, 5, e15394.
 - 53) Julien LA, Carriere A, Moreau J, Roux PP. mTORC1-activated S6K1 phosphorylates Rictor on threonine 1135 and regulates mTORC2 signaling. *Mol. Cell. Biol.* **2010**, 30, 908-21.
 - 54) Wang RC, Wei Y, An Z, Zou Z, Xiao G, Bhagat G, White M, Reichelt J, Levine B. Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation. *Science.* **2012**, 338, 956-9.
 - 55) Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing.

EMBO J. **2000**, 19, 5720-8.

- 56) Fan XY, Tian C, Wang H, Xu Y, Ren K, Zhang BY, Gao C, Shi Q, Meng G, Zhang LB, Zhao YJ, Shao QX, Dong XP. Activation of the AMPK-ULK1 pathway plays an important role in autophagy during prion infection. *Sci. Rep.* **2015**, 5, 14728.
- 57) Magnuson B, Ekim B, Fingar DC. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem. J.* **2012**, 441, 1-21.
- 58) Young AR, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JF, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, Narita M. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes. Dev.* **2009**, 23, 798-803.
- 59) Luo Y, Zou P, Zou J, Wang J, Zhou D, Liu L. Autophagy regulates ROS-induced cellular senescence via p21 in a p38 MAPK α dependent manner. *Exp. Gerontol.* **2011**, 46, 860-7.
- 60) Goehle RW, Di X, Sharma K, Henderson SC, Valerie K, Rodier F, Davalos AR, Gewirtz DA. The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2012**, 343, 763-78.
- 61) Qi M, Zhou H, Fan S, Li Z, Yao G, Tashiro S, Onodera S, Xia M, Ikejima T. mTOR inactivation by ROS-JNK-p53 pathway plays an essential role in psedolaric acid B induced autophagy-dependent senescence in murine fibrosarcoma L929 cells. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, 715, 76-88.
- 62) Li Z, Jiang K, Zhu X, Lin G, Song F, Zhao Y, Piao Y, Liu J, Cheng W, Bi X, Gong P, Song Z, Meng S. Encorafenib (LGX818), a potent BRAF inhibitor, induces senescence accompanied by autophagy in BRAFV600E melanoma cells. *Cancer Lett.* **2016**, 370, 332-44.
- 63) Mizushima N, Levine B, Cuervo A, Klionsky DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* **2008**, 451, 1069-75.
- 64) Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. *Mol. Cancer Ther.* **2011**, 10, 1533-41.
- 65) Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **2004**, 101, 18030-5.
- 66) Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y, Kondo S. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene.* **2005**,

24, 980-91.

- 67) Turcotte S, Chan DA, Sutphin PD, Hay MP, Denny WA, Giaccia AJ. A molecule targeting VHL-deficient renal cell carcinoma that induces autophagy. *Cancer Cell*. **2008**, 14, 90-102.
- 68) Nozaki R, Kono T, Bochimoto, Watanabe T, Oketani K, Sakamaki Y, Okubo N, Nakagawa K, Takeda H. Zanthoxylum fruit extract from Japanese pepper promotes autophagic cell death in cancer cells. *Oncotarget*. **2016**, 7, 70437-46.
- 69) Hsieh YY, Lo HL, Yang PM. EZH2 inhibitors transcriptionally upregulate cytotoxic autophagy and cytoprotective unfolded protein response in human colorectal cancer cells. *Am. J. Cancer. Res.* **2016**, 6, 1661-80.
- 70) Calnan DR, Brunet A. The FoxO code. *Oncogene*. **2008**, 27, 2276-88.
- 71) Chiacchiera F, Matrone A, Ferrari E, Ingravallo G, Lo Sasso G, Murzilli S, Petruzzelli M, Salvatore L, Moschetta A, Simone C. p38alpha blockade inhibits colorectal cancer growth in vivo by inducing a switch from HIF1alpha- to FoxO-dependent transcription. *Cell Death Differ.* **2009**, 16, 1203-14.
- 72) Wang J, Liu S, Yin Y, Li M, Wang B, Yang L, Jiang Y. FOXO3-mediated up-regulation of Bim contributes to rhin-induced cancer cell apoptosis. *Apoptosis*. **2015**, 20, 399-409.
- 73) Yadav RK, Chauhan AS, Zhuang L, Gan B. FoxO transcription factors in cancer metabolism. *Semin. Cancer Biol.* **2018**, 50, 65-76.
- 74) Shukla S, Bhaskaran N, MacLennan GT, Gupta S. Deregulation of FoxO3a accelerates prostate cancer progression in TRAMP mice. *Prostate*. **2013**, 73, 1507-17.
- 75) Seoane J, Le HV, Shen L, Anderson SA, Massagué J. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. *Cell*. **2004**, 117, 211-23.
- 76) Hauck L, Harms C, Grothe D, An J, Gertz K, Kronenberg G, Dietz R, Endres M, von Harsdorf R. Critical role for FoxO3a-dependent regulation of p21CIP1/WAF1 in response to statin signaling in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **2006**, 100, 50-60.
- 77) Shou Z, Lin L, Liang J, Li JL, Chen HY. Expression and prognosis of FOXO3a and HIF-1 α in nasopharyngeal carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **2012**, 138, 585-93.

- 78) Greer EL, Oskoui PR, Banko MR, Maniar JM, Gygi MP, Gygi SP, Brunet A. The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 30107-19.
- 79) Chiacchiera F, Simone C. The AMPK-FoxO3A axis as a target for cancer treatment. *Cell Cycle.* **2010**, 9, 1091-6.
- 80) Burgering BM, Kops GJ. Cell cycle and death control: long live Forkheads. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, 27, 352-60.
- 81) Shukla S, Shukla M, Maclennan GT, Fu P, Gupta S. Deregulation of FOXO3A during prostate cancer progression. *Int. J. Oncol.* **2009**, 34, 1613-20.
- 82) Kurinna S, Stratton SA, Tsai WW, Akdemir KC, Gu W, Singh P, Goode T, Darlington GJ, Barton MC. Direct activation of forkhead box O3 by tumor suppressors p53 and p73 is disrupted during liver regeneration in mice. *Hepatology.* **2010**, 52, 1023-32.
- 83) Renault VM, Thekkat PU, Hoang KL, White JL, Brady CA, Kenzelmann Broz D, Venturelli OS, Johnson TM, Oskoui PR, Xuan Z, Santo EE, Zhang MQ, Vogel H, Attardi LD, Brunet A. The pro-longevity gene FoxO3 is a direct target of the p53 tumor suppressor. *Oncogene.* **2011**, 30, 3207-21.
- 84) Brucker DP, Maurer GD, Harter PN, Rieger J, Steinbach JP. FOXO3a orchestrates glioma cell responses to starvation conditions and promotes hypoxia-induced cell death. *Int. J. Oncol.* **2016**, 49, 2399-410.