

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏 名 中村 彬彦
学 位 博 士 (歯学)
学 位 記 番 号 新大院博 (歯) 第513号
学位授与の日付 令和4年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博 士 論 文 名 HEATR1, a novel interactor of Pontin/Reptin, stabilizes Pontin/Reptin and promotes cell proliferation of oral squamous cell carcinoma
(Pontin/Reptin の新規結合因子である HEATR1 は、Pontin/Reptin の安定化と口腔扁平上皮癌細胞の増殖促進に寄与する)

論文審査委員 主査 小林 正治 教授
副査 泉 健次 教授
副査 田沼 順一 教授

博士論文の要旨

【緒言】

口腔扁平上皮癌 (Oral Squamous Cell Carcinoma; OSCC) は頭頸部領域において最も頻度の高い悪性腫瘍であり、頸部リンパ節へ転移をきたす確率が高い。OSCC はその治療方法および診断技術の進歩にもかかわらず、進行癌の生存率は依然として低いままであり、OSCC の新たな治療標的の探索と進展メカニズムの解明が求められる。

Pontin と Reptin は、互いに相同性を有する AAA+ (ATPases Associated with various cellular Activities) ファミリータンパク質である。これらはヘテロオリゴマー複合体である Pontin/Reptin を形成し、分子シャペロンとしてタンパク質の安定性やタンパク質複合体の会合に関与している。Pontin および Reptin は腫瘍細胞においてその過剰発現が報告されているほか、MYC、E2F1、 β -catenin、p53、DNA 損傷応答、リボソーム生合成の制御を通じて、様々な癌の進行に関与していることが報告されている。われわれは先行研究で Pontin と Reptin が OSCC の増悪に関与していることを報告した。しかしながら、OSCC 進展における Pontin/Reptin の役割と分子メカニズムは未だ解明されておらず、その基礎的なメカニズムを理解するためにはさらなる研究が必要である。

【材料と方法】

3 種のヒト OSCC 由来細胞株 (HSC-3、HSC-4、SAS) とヒト OSCC 組織を用いて、ウェスタンブロット、共免疫沈降、免疫細胞染色、質量分析、RNA 干渉、細胞増殖試験、RT-PCR、タンパク質安定性試験、免疫組織染色を行い、Pontin/Reptin の新規結合因子の探索と、これらタンパク質の機能を解析した。ヒト OSCC 組織を用いた実験は新潟大学医歯学総合病院医療倫理委員会の承認を得て行った (承認番号: 2019-0080)。

【結果】

われわれは、Pontin/Reptin の新規結合因子として、リボソーム合成関連タンパク質である HEAT repeat-containing protein 1 (HEATR1) を同定した。Pontin/Reptin は標的タンパク質の安定化に

寄与することが示されていることから、Pontin/Reptin が HEATR1 のタンパク質安定化に必要かどうかを解析したところ、予想に反して、Pontin と Reptin は HEATR1 の安定化に必要ではなく、HEATR1 が Pontin と Reptin タンパク質を安定化することが分かった。機能的には、HEATR1 は Pontin/Reptin と共に、mTOR と pre-rRNA 合成を活性化することで OSCC 細胞の増殖を正に制御した。また、ヒト OSCC 組織の腫瘍領域では、HEATR1 の発現が顕著に上昇していることがわかった。

【考察】

本研究では、mTOR、HEATR1 という 2 つの HEAT repeat ファミリータンパク質が Pontin/Reptin の相互作用因子として同定され、HEAT repeat が Pontin/Reptin の認識モチーフとなり得ることが示唆された。近年、Pontin/Reptin は mTOR の N 末端 HEAT repeat 領域と直接相互作用することが示されており、Pontin/Reptin と HEATR1 の相互作用も HEAT repeat が介在している可能性が示唆される。さらに、Pontin/Reptin は mTOR と相互作用し、エネルギーが豊富な条件下で mTOR 複合体を活性化し、rRNA の転写やリボソーム生合成を促進することが示されている。

したがって、HEATR1 が OSCC における Pontin/Reptin の安定化因子として、mTOR とリボソーム生合成の制御に関与している可能性が示唆された。HEATR1 と癌の進展との関連については、矛盾するいくつかの報告がある。これは、がんの組織型や癌種によって HEATR1 の発現量や機能的役割が異なることに起因しているのかもしれない。今後、HEATR1 タンパク質の相互作用ネットワークをさらに解明し、mTOR 経路を含む OSCC 進展機構における HEATR1 の機能的役割を包括的に明らかにすることが必要である。

審査結果の要旨

Pontin と Reptin は、細胞内において Pontin/Reptin 複合体を形成し、クロマチンリモデリング複合体やテロメラーゼなどを標的とする四次構造形成シャペロンとして機能することで様々ながんの進展へ関与すると考えられている。しかしながら、一般的に生体内において恒常的に発現し、細胞の増殖と生存に関わる多くの基本的な細胞経路を制御する Pontin と Reptin を、直接的ながん治療の標的とすることは困難と考えられてきた。そこで、本研究では間接的な治療標的となる Pontin/Reptin 複合体の新規結合因子の探索と機能解明を目的に行われた。

本研究では、Pontin/Reptin 複合体の新規結合因子として HEATR1 に着目し、3 種の口腔扁平上皮癌（OSCC）由来細胞株 HSC-3、HSC-4、SAS を用いて、Pontin、Reptin、HEATR1 の発現量と OSCC 細胞増殖活性との関係について検討した。また、これまでヒト舌扁平上皮癌由来細胞において HEATR1 が、Pontin/Reptin 複合体を安定化させるメカニズムを検証することが困難であり、不明であったが、本研究では *in vitro* において Pontin、Reptin、HEATR1 が核小体で複合体形成することを明らかにし、HEATR1 の新たな機能として、Pontin/Reptin 複合体を安定化させ mTOR シグナル経路を介して細胞増殖を促進することを明らかにした。

一般に低酸素状態であるがん組織において、Pontin/Reptin 複合体による ATP 依存的な mTOR の活性化は困難である。しかしながら、ワーブルグ効果や小胞体ストレス応答(UPR)によって部分的ではあるが high-energy condition にあるために、Pontin、Reptin、HEATR1 が高発現している OSCC 細胞では mTOR シグナル経路が活性化され、細胞増殖が亢進していると考えられる。

また、mTOR と HEATR1 は何れも HEAT repeat モチーフを有する HEAT repeat ファミリータ

ンパク質で、HEAT repeat は他のタンパク質成分を組み立てるための柔軟な足場として機能するため、HEAT repeat が Pontin/Reptin 複合体の認識モチーフとなり得ることが示唆され、これは HEATR1 の新機能の発見ともいえる。Pontin/Reptin 複合体の直接阻害はその多機能性と発現の恒常性より、重篤な副反応を惹起する可能性を否定できないが、本研究も結果から Pontin/Reptin 複合体と HEATR1 との結合阻害をターゲットとした創薬の可能性が見出され、将来的な新規 OSCC 治療薬の開発へ貢献するものと考えられる。加えて、HSC-4 には、多くの種類の腫瘍形成を促進することが知られている GOF 変異 p53R248Q が発現しており、本実験から得られた基礎解析データは OSCC 以外のがん研究への応用が期待される。

本研究は OSCC 組織における HEATR1 の発現を報告した初めて研究であり、Pontin/Reptin 複合体と HEATR1 の結合阻害をターゲットとした創薬の可能性が見出され、本研究で得られた基礎解析データは、将来的な新規 OSCC 治療薬の開発へ貢献するものと考えられる。また、OSCC 組織において HEATR1 の発現様式は Ki-67 の発現様式と類似していることから、HEATR1 は扁平上皮癌の細胞増殖能マーカーとして臨床に生かせると考えられる。

審査員 3 名の口頭試問の結果（別紙：最終審査結果の要旨参照）、本論文が博士の学位論文として十分な価値を持ち、さらに申請者が大学院医歯学総合研究科博士課程修了者としての学力ならびに見識を有し、博士（歯学）の学位を有するものと判定した。