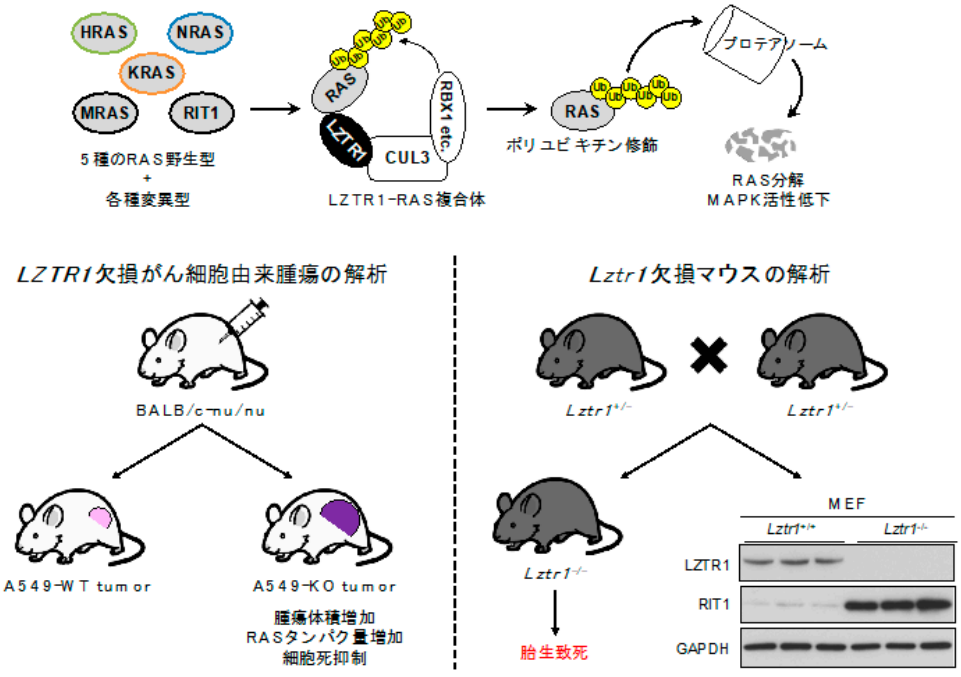
| 127　RASプロテオスタシス機構の破綻による生体影響の解明 | 阿部　太紀 |
|---|---|

**【目的】**がん原遺伝子産物 RAS の遺伝子変異はがんの約 30%で同定され、RAS は腫瘍増殖における重要なドライバー因子であり組織分化、免疫など多種多様な恒常性維持に寄与している。RAS の活性化レベルは、GTP が結合した活性化型と GDP が結合した不活性化型を交互に繰り返す GTP／GDP-サイクルにより制御されるとの考えが一般的である。最近我々は、CUL3 型ユビキチン E3 リガーゼの基質アダプターとして機能する LZTR1（leucine zipper like transcription regulator 1）はユビキチン・プロテアソーム経路を介して RAS の分解を促し MAPK シグナル活性化を抑制するという新規活性化制御機構を報告した。他方、*LZTR1* 遺伝子変異は RAS／MAPK シグナル経路に生殖細胞系列の遺伝子変異が挿入されることで先天性心疾患、骨格異常、精神発達遅滞、易発がん性など多彩な症状を呈する遺伝性先天奇形 Noonan 症候群を引き起こす。しかしながら、LZTR1 機能障害による RAS の恒常性維持機構（プロテオスタシス）の破綻が腫瘍増殖や個体発生に与える影響は未だその詳細は明らかとなっていない。以上を踏まえ本研究では、1. *LZTR1* 欠損による RAS 依存性腫瘍増殖との関係性、2. RAS プロテオスタシスの破綻が個体発生に与える影響、2 点の解明を目的に研究を実施した。

**【方法】**BALB/c-nu/nu マウスに非小細胞肺がん株 A549 細胞由来 *LZTR1* 欠損細胞と親株を皮下移植し腫瘍増殖能を評価し、*LZTR1* 欠損細胞の性質をプロテオミクス解析により解析した。*Lztr1* 欠損マウスを作製し、心臓肥大や骨格異常などの RASopathies 罹患者特有の表現系と RAS の異常蓄積の有無を解析した。

**【結果】**xenograft model の解析により、*LZTR1* 欠損細胞では親株に比べて腫瘍増殖能が高く、pan-RAS や RIT1 の発現量が増加しており、TUNEL 陽性の細胞数が減少していた。プロテオーム解析の結果、*LZTR1* 欠損細胞では RAS ファミリー分子の発現が増加しており、細胞接着分子や上皮間葉転換関連分子の発現変動が抽出された。実際に *in vitro* での検討により *LZTR1* 欠損時には上皮間葉転換が促進されることが明らかになった。他方 *Lztr1* 欠損マウスでの解析では、*Lztr1* $^{+/-}$マウスは出生可能であるものの *Lztr1* $^{-/-}$マウスは胎生致死性を示し、マウス胎児由来線維芽細胞を用いた検討では *Lztr1* 欠損時に KRAS などの異常蓄積が認められた。KRAS の異常活性化はマウスの胎生致死を引き起こすことが知られており、LZTR1 機能障害による RAS プロテオスタシスの破綻は発生段階での異常を引き起こすことが示唆された。

本研究の概要と結果



# 127. RAS プロテオスタシス機構の破綻による生体影響の解明

阿部　太紀

東北大学 大学院医学系研究科 遺伝医療学分野

Key words：RAS，プロテオスタシス，ユビキチン・プロテアソーム，上皮間葉転換

## 緒　言

がん原遺伝子産物 RAS は、がんの約 30%で同定される腫瘍増殖における重要なドライバー因子であると共に下流の MAPK シグナル伝達経路を制御することで組織分化、免疫など多種多様な恒常性維持に寄与している。RAS の活性化レベルは、GTP が結合した活性化型と GDP が結合した不活性化型を交互に繰り返す GTP／GDP-サイクルにより制御されるとの考えが主流であり、RAS タンパク質発現制御機構は殆ど明らかになっていなかった。最近我々は、RAS の恒常的な発現制御の一端を解き明かした［1］。具体的には、CUL3 型ユビキチン E3 リガーゼの基質アダプターとして機能する LZTR1（leucine zipper like transcription regulator 1）はユビキチン・プロテアソーム経路を介して RAS の分解を促し MAPK シグナル活性化を抑制することを明らかにした（図 1）。LZTR1 は G12V がん型変異体をはじめとする多種多様な変異体に対しても分解促進作用を有しており、RAS 自身の発現量を制御する点で GTP／GDP サイクル制御とは大きく異なる新規 RAS 活性制御機構である。しかしながら、RAS の恒常性維持機構（プロテオスタシス）の破綻が腫瘍増殖や個体発生に与える影響（疾患との関連性）は未だ明らかとなっていない。

他方、LZTR1 は RAS／MAPK シグナル経路に生殖細胞系列の遺伝子変異が挿入されることで発症する遺伝性先天奇形の 1 つである Noonan 症候群の原因分子である［2，3］。Noonan 症候群は先天性心疾患、骨格異常、精神発達遅滞、易発がん性など全身に多彩な症状を呈する難病であり、LZTR1 機能障害による RAS プロテオスタシスの破綻が疾患発症原因である可能性が考えられる。*LZTR1* 遺伝子変異は機能喪失型の変異である可能性が指摘されているが、詳細は未だ明らかとなっていない。

以上の背景を踏まえ、1. *LZTR1* 欠損による腫瘍増殖との関係性、2. RAS プロテオスタシスの破綻が個体発生に与える影響、の解明を目的に研究を実施した。本研究により、*LZTR1* 欠損は上皮間葉転換（EMT）の促進などを介して腫瘍増殖を増強すること、*Lztr1* ノックアウトマウスは胎生致死性を示すことが明らかとなった。

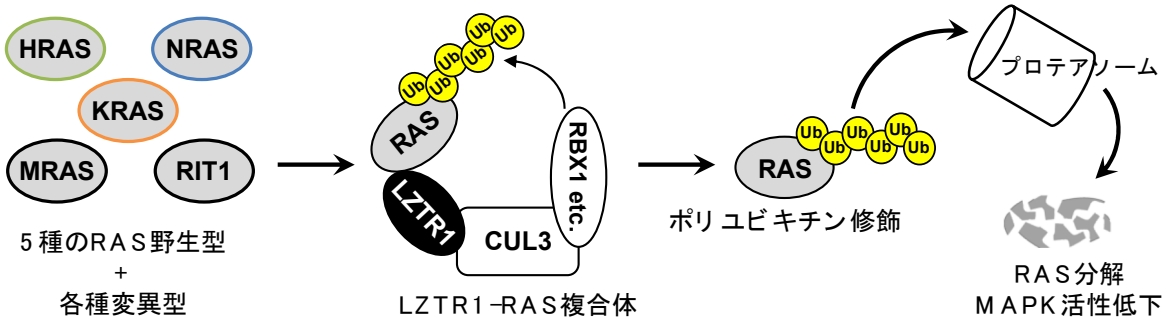



図 1. LZTR1 による RAS ファミリー分解機構の概略

## 方　法

### 1. *LZTR1* 欠損細胞の樹立と細胞増殖能、細胞浸潤活性の評価

CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集により、ヒト非小細胞肺がん細胞株 A549 細胞を親株として LZTR1 ノックアウト細胞（A549-KO）を作製した。親株（A549-WT）と A549-KO 細胞を用いて、RAS タンパク質発現量をウェスタンブロットにより、細胞増殖能を Cell Counting Kit-F により、細胞浸潤活性を Corning BioCoat マトリゲルインベージョンチャンバーにより評価した。

### 2. *LZTR1* 欠損細胞を使用した xenograft tumor モデルの作製と解析

BALB/c-nu/nu マウスの皮下に A549-WT または A549-KO 細胞を皮下移植し、経時的に腫瘍体積を評価すると共に摘出した腫瘍組織に関してウェスタンブロットや組織染色によりその性質を解析した。

### 3. *LZTR1* 欠損細胞を使用したプロテオーム解析

*LZTR1* 欠損によるがん細胞のタンパク質発現変動を網羅的に捉えるために DIA プロテオーム解析を実施し、Metascape や DAVID などのプラットフォームによりエンリッチメント解析を行った。

### 4. TGF-β1 処置による上皮間葉転換の誘導と評価

A549-WT または A549-KO 細胞に human TGF-β1 を 72 時間処置し、ウェスタンブロットと RT-qPCR により上皮間葉転換関連分子の発現レベルを評価した。

### 5. RAS プロテオスタシスの破綻が個体発生に与える影響の解析

CRISPR/Cas9 システムを利用したゲノム編集により *Lztr1* 遺伝子を欠失させた *Lztr1* $^{+/-}$マウスを樹立した。*Lztr1* $^{+/-}$雌雄マウスを掛け合わせることで *Lztr1* $^{-/-}$マウスの生存可否を評価すると共に、胎児線維芽細胞を使用したウェスタンブロット解析を実施した。

## 結　果

### 1. *LZTR1* 欠損は RAS の異常蓄積とがん細胞の腫瘍増殖能を増強した

*LZTR1* 欠損細胞の特徴をウェスタンブロットにて評価したところ、古典型 RAS である KRAS や非古典型 RAS である RIT1 の発現量が顕著に増加していた。また、がん細胞である A549 細胞が元々から有している細胞増殖能や細胞浸潤活性は *LZTR1* 欠損細胞ではさらに増強されており、*LZTR1* 欠損はがん細胞の悪性度を高める可能性が示された（図 2a～c）。そこで、*LZTR1* 欠損による腫瘍増殖能への影響を xenograft tumor モデルにより評価したところ、*LZTR1* 欠損由来腫瘍では A549-WT 由来腫瘍に比べて顕著な腫瘍体積の増加が認められた。また、TUNEL 染色によりアポトーシス細胞の有無を解析すると、A549-KO 由来腫瘍では TUNEL 陽性細胞の割合が極端に少ないことが示された。これらの結果より、*LZTR1* 欠損はがんの悪性度を著しく増強することが明らかとなった。

### 2. 肺がん細胞での *LZTR1* 欠損は上皮間葉転換（EMT）の誘導を促進した

*LZTR1* 欠損による腫瘍増殖能の増強などが引き起こされる原因を明らかにするために、A549-WT と A549-KO 細胞に関してプロテオミクス解析により両者の差異を解析した。その結果、A549-KO 細胞では RAS ファミリーの中でも KRAS や RIT1 の発現量が顕著に増加しており、エンリッチメント解析結果より細胞接着や上皮細胞分化に関連した分子群が発現変動していることが明らかとなった。これら分子群は上皮間葉転換（EMT）に関与する分子が多く存在する。そこで、A549-KO 細胞に TGF-β1 を処置して EMT を誘導し遺伝子発現変動を評価した。興味深いことに、*LZTR1* 欠損細胞では SLUG、SNAIL などの EMT 関連転写因子群の発現が有意に増加していた。これらの結果より、*LZTR1* 欠損は腫瘍増殖や転移時に重要な EMT 誘導を促進することが示された。

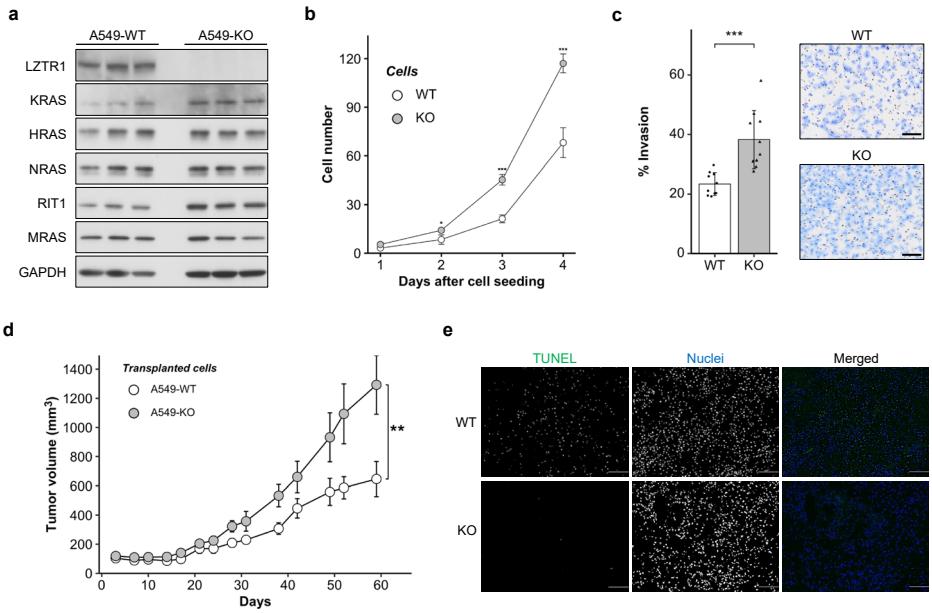



図 2. *LZTR1* 欠損による腫瘍・細胞増殖能と細胞浸潤活性の評価

a) ウェスタンブロットによる RAS ファミリーの発現量解析。

b) A549-WT と A549-KO 細胞の細胞増殖能の比較検討（Student's t-test：* P＜0.05、*** P＜0.001）。

c) A549-WT と A549-KO 細胞の細胞浸潤活性の比較検討（Student's t-test：*** P＜0.001、scale bar：50 μm）。

d) xenograft tumor の腫瘍体積変化（tumor volume＝length×width²／2；Student's t-test：** P＜0.01、scale bar：100 μm）。

e) TUNEL 染色によるアポトーシス陽性細胞数の評価。

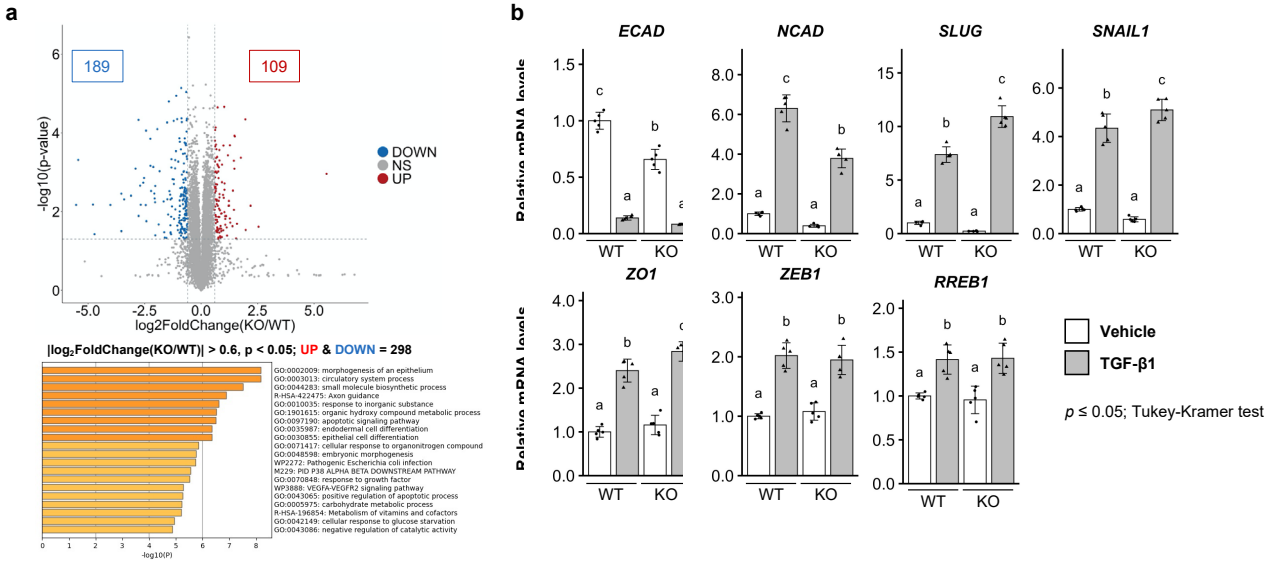



図 3. *LZTR1* 欠損によるが EMT 誘導への影響解析

a) A549-WT、A549-KO 細胞のプロテオミクス解析結果。

b) A549-WT、A549-KO 細胞への TGF-β1 処置後の遺伝子発現変動の解析結果（RT-qPCR、P≦0.05：Tukey-Kramer test）。

### 3. *LZTR1* 欠損による生態影響の解析

初めに、ゲノム編集により *Lztr1* 遺伝子をヘテロ欠失状態にした *Lztr1* $^{+/-}$マウスを作製した。*Lztr1* $^{+/-}$マウスは出生可能であり、少なくとも半年間以上は生存可能であった。続いて、雌雄 *Lztr1* $^{+/-}$マウスを掛け合わせることで *Lztr1* $^{-/-}$マウスの作製を試みた。10 ペアの雌雄 *Lztr1* $^{+/-}$マウスを使用した繁殖の結果、*Lztr1* $^{-/-}$マウスを得ることはできず *Lztr1* $^{-/-}$マウスは胎生致死である可能性が示された。そこで、*Lztr1* $^{-/-}$マウスの特徴を詳細に調べるために胎生 13.5 日のマウス胚よりマウス胎児線維芽細胞（MEF）を採取し、RAS 発現量などをウェスタンブロットにより解析した。その結果、pan-RAS（K、H、NRAS）と RIT1 の発現が *Lztr1* $^{-/-}$-MEF で著しく増加しており、下流の MEK1/2 や ERK1/2 の活性が確認された。

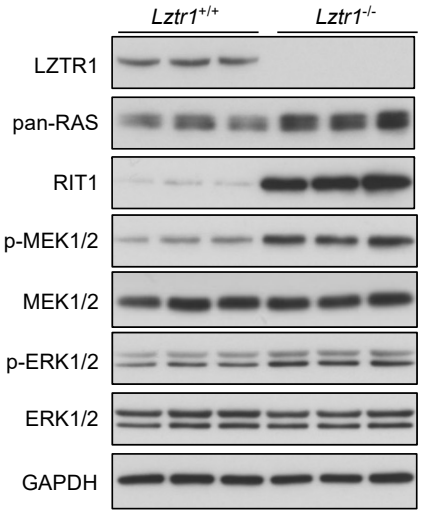



図 4. MEF における RAS／MAPK シグナル伝達経路関連分子の発現変動
E13.5 由来 MEF のウェスタンブロット解析の結果（*Lztr1* $^{+/-}$-MEF、*Lztr1* $^{+/-}$-MEF それぞれ n＝3 で実施）。

## 考　察

上記 1、2 の結果より、*LZTR1* 欠損は腫瘍増殖を増強することが初めて証明され、その一因として RAS の発現量増加と EMT 誘導の促進が考えられた。これまでに、RAS の活性化は RAS-RREB1 経路を介して EMT の誘導に関与することが報告されているが、いずれも RAS のがん型変異体での報告であり、RAS 発現量が変動することで EMT 誘導が増強されるとの報告は本研究が初めてとなる[4]。*LZTR1* 遺伝子変異は前述の通り Noonan 症候群を引き起こすが、その他に難治性悪性腫瘍の代表格である Glioblastoma の原因でもあり［5]、本研究成果は *LZTR1* 遺伝子変異に起因した Glioblastoma の発祥機序解明や新たな治療法開発に役立つことが期待される。現在、RAS 発現量増加と RREB1 活性化の詳細について解析を継続中であり、今回の結果に関しては英文での論文投稿を準備中である。

また、上記 3 では *LZTR1* 欠損によりマウスの正常な発生が障害されること、RAS／MAPK シグナル伝達活性の異常が起こることが *in vivo* で証明された。この結果は Noonan 症候群の発症機序や新規原因遺伝子の同定において非常に重要な知見であり、RAS プロテオスタシスに関与する分子・遺伝子群は未だ原因遺伝子の同定に至っていない罹患者の発症原因である可能性が考えられる。今後は、原因遺伝子未同定の罹患者の DNA 検体を取得し、今回の知見を踏まえた遺伝子解析の実施を検討中である。

## 共同研究者・謝辞

本研究は、東北大学大学院医学系研究科遺伝医療学分野の所属大学院生、研究補助員、新堀哲也准教授、ならびに青木洋子教授らの共同研究者との研究成果である。また、本研究に対してご支援を賜りました上原記念生命科学財団に心より御礼申し上げます。

## 文　献

1） Abe T, Umeki I, Kanno S-I, Inoue S-I, Niihori T, Aoki Y. LZTR1 facilitates polyubiquitination and degradation of RAS-GTPases. Cell death and differentiation. 2020;27(3):1023-35. Epub 2019 Jul 23. PMID: 31337872. DOI: 10.1038/s41418-019-0395-5.

2） Yamamoto GL, Aguena M, Gos M, Hung C, Pilch J, Fahiminiya S, et al. Rare variants in SOS2 and LZTR1 are associated with Noonan syndrome. J Med Genet. 2015;52(6):413-21. Epub 2015 Mar 20. PMID: 25795793. DOI: 10.1136/jmedgenet-2015-103018.

3） Umeki I, Niihori T, Abe T, Kanno SI, Okamoto N, Mizuno S, et al. Delineation of LZTR1 mutation-positive patients with Noonan syndrome and identification of LZTR1 binding to RAF1-PPP1CB complexes. Hum Genet. 2019;138(1):21-35. Epub 2018 Oct 27.. PMID: 30368668. DOI: 10.1007/s00439-018-1951-7.

4） Su J, Morgani SM, David CJ, Wang Q, Er EE, Huang YH, et al. TGF-beta orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1. Nature. 2020;577(7791):566-71. Epub 2020 Jan 8. PubMed PMID: 31915377. DOI: 10.1038/s41586-019-1897-5.

5） Frattini V, Trifonov V, Chan JM, Castano A, Lia M, Abate F, et al. The integrated landscape of driver genomic alterations in glioblastoma. Nature genetics. 2013;45(10):1141. Epub 2013 Aug 5. PMID: 23917401. DOI: 10.1038/ng.2734.