

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：23701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08277

研究課題名(和文) レドックス制御機構としてのメチル化ダイナミクスーがん細胞転移の分子機序の解明ー

研究課題名(英文) Methylation dynamics in redox regulation - Elucidation of the molecular mechanisms of tumor metastasis

研究代表者

神谷 哲朗 (Kamiya, Tetsuro)

岐阜薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：60453057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、がん細胞増悪・転移の分子基盤の解明に向けて、細胞外微小環境におけるレドックス制御機構としてのメチル化の関与の解明を目指した。本研究のターゲット分子である抗酸化酵素SOD3発現制御機構としてのヒストンメチル化の関与を検証したところ、SOD3発現レベルと転写抑制マーカであるH4R3me2のメチル化レベルとの間に相関性が認められた。また、本メチル化に関与するタンパクとして、ヒストンメチル化酵素PRMT1および転写因子FOXO1が重要な役割を担うと考えられた。以上より、ヒストンメチル化ならびにFOXO1が協調的に機能し、がん微小環境でのレドックス状態を制御すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん増悪機構としての活性酸素の関与が指摘されているが、がん細胞転移あるいはがん細胞を取り巻く環境下における抗酸化酵素の発現制御機構は十分に解明されていない。本研究では、がん細胞およびその周りに存在するマクロファージにおける抗酸化酵素SOD3発現制御機構としてのヒストンメチル化の重要性ならびにその制御機構の一端を明らかにした。

以上より、本研究成果は活性酸素の産生増加あるいはその消去の低下による酸化ストレスの亢進を起点としたがん増悪・転移の分子機序の詳細解明に向けて、有益な情報を提供できたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of histone methylation in extracellular redox regulation to elucidate the molecular mechanisms of tumor metastasis. We previously reported that DNA methylation within the promoter region of superoxide dismutase 3 (SOD3) play the critical role in its gene expression. Our present results clearly indicated that histone H4R3 dimethylation is related to the expression of SOD3 in tumor cells and tumor-associated macrophages. Moreover, it was considered that transcription factor, FOXO1, and histone methyltransferase, PRMT1, play a key role in the regulation of SOD3.

Overall, our results suggested that FOXO1 and PRMT1 function as a key molecule for the regulation of SOD3 in tumor-related cells. Our findings could support to better understand the molecular mechanisms involved in tumor metastasis.

研究分野：病態生化学

キーワード：SOD3 がん 活性酸素 ヒストンメチル化 FOXO1 PRMT1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性新生物(がん)は、我が国における死亡原因の第一位であり、がんに至る原因の究明ならびにその予防・治療薬の開発が積極的に進められている。これまでに、がん増悪あるいは転移の促進因子としての活性酸素種の関与が指摘されており、その制御はがんの治療方策として期待されている。また、がん細胞とがん細胞を取り巻くマクロファージや血管内皮細胞などの異種細胞間での情報伝達のがん増悪のキーファクターとなる可能性が明らかになりつつあり、細胞間、細胞外での情報伝達機構の重要性が注目されている。

本研究のターゲット遺伝子である **superoxide dismutase 3 (SOD3)** は活性中心に銅イオンを配位する抗酸化酵素であり、細胞外へ分泌されることにより分泌細胞およびその近傍に存在する細胞のレドックス恒常性の維持に寄与することが知られている。がん組織においては、**SOD3** 発現の低下が認められており、**SOD3** 発現低下に起因する酸化ストレスの亢進ががん増悪に関与することが明らかになりつつある。一方で、**SOD3** はその発現レベルに応じて、細胞の増殖あるいは増殖抑制という二相性の細胞応答を誘導することが報告され、がん治療方策として **SOD3** 発現を適切に制御する重要性が提唱されている。

我々はこれまでに、生体に広範に存在する銅イオンの恒常性破綻に起因するシグナルががん増悪の序となる可能性に着目し、種々病態下における **SOD3** 発現制御機構を明らかにしてきた。特に、がん細胞およびがん関連マクロファージにおいては、塩基配列によらない遺伝子発現制御機構(エピジェネティクス)を介して **SOD3** 発現が変動することを世界に先駆けて報告している。**DNA** メチル化やヒストン化学修飾異常を起点とした遺伝子発現異常とがん発症・増悪との関連性が多数報告されている中、細胞外レドックス制御機構としてのエピジェネティクスの関与を明らかにすることは、がん増悪の分子機構の解明につながるものと考えられているが、その詳細な分子機構は十分に解明されていない。そこで、がん細胞およびがん関連マクロファージにおけるエピジェネティックな **SOD3** 発現制御機構の解明ならびにがん組織におけるレドックス恒常性破綻の分子機構の解明を目指した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生体に広範に存在する銅イオン動態の破綻を起点としたレドックス制御機構ならびにがん増悪機構へエピジェネティクス異常の関与を検証することである。

そこで、細胞外レドックス制御のキーファクターとなる **SOD3** をターゲットタンパクとして、そのエピジェネティクス制御機構としての①メチル化ダイナミクスの意義、②その関連タンパクの同定と機能を解析した。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

ヒト乳がん細胞株(MCF7細胞、MDA-MB-231細胞)は、4 mM L-グルタミン、100 unit/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、10%ウシ胎児血清(FCS)を含むDMEM培地を用いて、また、ヒト単球系細胞株(THP-1細胞、U937細胞)は、4 mM L-グルタミン、100 unit/mL ペニシリン、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、10%非働化FCSを含むRPMI1640培地を用いて、37°C、5% CO₂条件下で培養した。THP-1細胞のマクロファージ用細胞への分化は、100 nM ホルボールエステル(TPA)処理したのちに、IL4/IL13で処理することによりM2マクロファージへ、LPS/IFN- γ で処理することによりM1マクロファージへと分化させた。

(2) mRNA 発現量の測定

各種試薬で処理した細胞から、トリゾール試薬を用いて総RNAを抽出し、次いでcDNAの合成を行った。調製したcDNAを用いて、**SOD3**を含む各種遺伝子のmRNA発現量をreal time RT-PCR法にて測定した。

(3) タンパク質発現量の測定

各種試薬で処理した細胞から、総タンパク質、核タンパク質あるいはコアヒストンの抽出を行い、ウエスタンブロット法にて、**SOD3**を含む各種タンパク質発現量ならびにメチル化ヒストン発現を解析した。

(4) 転写因子FOXO1の過剰発現細胞株の作製

THP-1細胞より調製したcDNAを鋳型として、FOXO1タンパク質特異的プライマーを用いて遺伝子を増幅した。その後、本遺伝子をpcDNA3.1プラスミドに組み込むことで、FOXO1過剰発現プラスミドを作製した。細胞を播種した後、リポフェクタミン3000を用いて本プラスミドをトランスフェクションすることで、FOXO1が一過性に過剰発現された細胞株を作製した。

(5) FOXO1 ノックダウン細胞株の作製

細胞を播種した後、siRNA MAX を用いて FOXO1 の siRNA をトランスフェクションすることで、FOXO1 が一過性にノックダウンされた細胞株を作製した。

(6) クロマチン免疫沈降法 (ChIP 法)

各種試薬で処理した細胞を、1%パラホルムアルデヒドにて固定化した後、細胞溶解液を調製した。その後、細胞溶解液を超音波処理することで 100 から 800 bp の DNA 断片を調製した。調製した DNA 断片を FOXO1 抗体などの一次抗体あるいは非特異的 IgG 抗体と一晩インキュベートした。その後、磁気ビーズを添加し、さらに 2 時間インキュベートした。インキュベート後、フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿することで免疫沈降物を得た。得られた沈降物を用いて PCR 反応を行い、*SOD3* 遺伝子プロモーター領域における FOXO1 の結合度ならびにヒストンメチル化レベルを評価・解析した。

(7) 細胞遊走試験

Transwell の upper chamber に MDA-MB-231 細胞を播種した。その後、lower chamber に血清含有培地を upper chamber に血清不含の培地を添加することで細胞遊走を惹起した。24 時間後、lower chamber へ移行した MDA-MB-231 細胞を顕微鏡下で観察することで細胞遊走性を評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト乳がん細胞株における SOD3 発現と DNA メチル化との関連性

SOD3 発現制御機構としての DNA メチル化の関与を、ヒト乳がん細胞株 (MCF7 細胞および MDA-MB-231) を用いて検討した。MCF7 細胞では SOD3 発現がほとんど認められなかったのに対して、MDA-MB-231 細胞においては高い SOD3 発現が認められた。また、DNA メチル化阻害剤の添加は MCF7 細胞における SOD3 発現を増大させたことから、MCF7 細胞における SOD3 はエピジェネティクスによる制御を受けていると考えられた。さらに、本メカニズムの普遍性を検討するために、ヒト前立腺がん細胞株 (PC3 細胞および LNCaP 細胞) を用いて検討したところ、期待通りに DNA メチル化レベルと SOD3 発現レベルとの間に相関性が認められた。以上より、がん細胞における SOD3 発現は DNA メチル化により大きく影響されると考えられた。

我々は以前、ヒト肺がん細胞株 (A549 細胞) およびヒト単球系細胞株 (THP-1 細胞) における SOD3 発現制御機構としての DNA 脱メチル化酵素 (ten-eleven-translocation 1: TET1) の関与を見出している。TET1 の活性には酸素および鉄イオンが必要であることから、低酸素環境下および鉄イオン存在下における SOD3 発現を解析した。しかし、低酸素環境下および鉄イオン存在下においても有意な SOD3 発現レベルの変動は認められなかった。がん細胞はその種類毎に適応する酸素分圧が異なる可能性が示唆されたため、今後はさらに実験系を確立していく必要とともに、酸素分圧以外の他の因子 (栄養状態、MAPK などのシグナル分子の関与) を検討する必要があると考えられた。

(2) SOD3 発現制御機構としてのヒストンメチル化の関与

THP-1 細胞における SOD3 発現制御機構としての DNA メチル化はすでに報告しているため、本細胞においては主にヒストンメチル化の関与、特に、がん増悪との関連性が多数報告されている転写抑制マーカー H3K27me3 および転写促進マーカー H4R3me2 に着目して検証した。THP-1 細胞を TPA で処理したところ、H3K27me3 レベルの低下ならびに H4R3me2 レベルの増大が認められた。次に、*SOD3* 遺伝子プロモーター領域におけるヒストンメチル化レベルを ChIP 法にて解析した。その結果、*SOD3* 遺伝子プロモーター領域においても K3K27me3 レベルの低下ならびに K4R3me2 レベルの増大が認められた。

近年、マクロファージへの分化過程において、H3K27me3 脱メチル化酵素 (JMJD3) が重要な役割を担うことが報告された。そこで、TPA 誘導性 SOD3 発現増大に及ぼす JMJD3 の関与を、その阻害剤 (GSK-J4) を用いて解析した。GSK-J4 で THP-1 細胞を前処理したところ、H3K27me3 レベルの低下の抑制とともに SOD3 発現亢進の抑制が認められた (図 1)。また、*SOD3* 遺伝子プロモーター領域への JMJD3 結合の増大も認められた。さらに、M2 マクロファージにおける銅イオン関連タンパクの発現増大も GSK-J4 存在下において抑制された。以上より、マクロファージへの分化に伴い変化する SOD3 を含む銅イオン関連タンパクは、JMJD3 を介した H3K27me3 レベルの変動により制御されていると考えられた。

次に、H4R3me2 と SOD3 発現との関連性を詳細に検証した。H4R3me2 の責任タンパクの一つとして PRMT1 が報告されている。そこで、PRMT1 と H4R3me2 の関連性を検証したところ、TPA 処理により PRMT1 の核内への移行が促進することを見出した。今後、PRMT1 の過剰

発現細胞株あるいはノックダウン細胞株を樹立することで PRMT1 と SOD3 発現との関連性を詳細に検証していく必要はあるものの、PRMT1 を介した H4R3me2 レベルの亢進が SOD3 発現の増大に関与していると推察された。

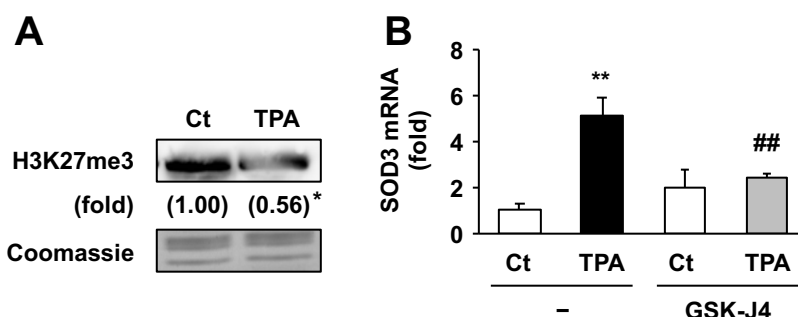


図 1 SOD3 発現に及ぼす JMJD3 の関与
A: H3K27me3 レベル、B: SOD3mRNA 発現変動
GSK-J4: JMJD3 阻害剤、* p<0.05 vs. Ct.

(3) 転写因子 FOXO1 による SOD3 発現制御

従来、転写因子 FOXO1 はがん抑制因子として考えられていたが、近年の報告ではその機能は発現する細胞種あるいはその生存環境において変化すると考えられている。*SOD3* 遺伝子のプロモーター領域に FOXO1 結合配列が存在すること、SOD3 はその発現レベルに応じて細胞増殖・抑制という二相性の細胞応答性を示すことから、SOD3 発現と FOXO1 との関連性を検証した。THP-1 細胞を TPA で処理したところ一過性に FOXO1 の核移行が認められ、また、*SOD3* 遺伝子プロモーター領域への結合の増大が認められた (図 2)。また、先の PRMT1 は FOXO1 のメチル化を誘導することで FOXO1 の核内滞留性を向上させることが報告されている。本研究において、一過性に FOXO1 のメチル化レベルの増大傾向が認められたため PRMT1 は FOXO1 と協調的に機能し、SOD3 発現の増大に関与している可能性が示唆された。

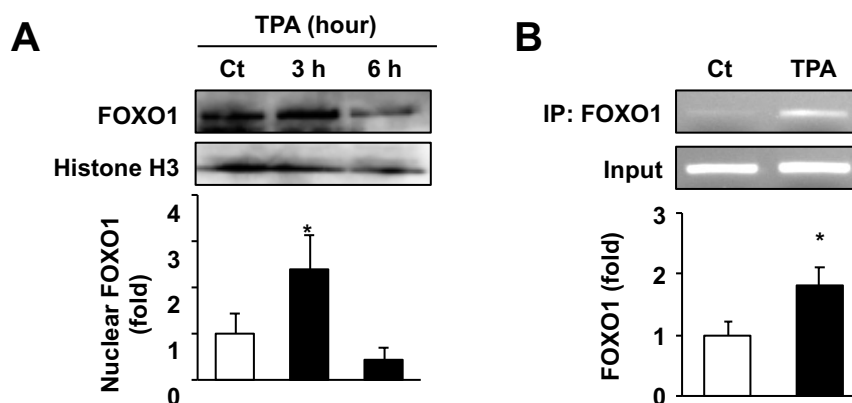


図 2 SOD3 発現に及ぼす FOXO1 の影響
A: FOXO1 の核移行、B: *SOD3* 遺伝子プロモーター領域への FOXO1 の結合
* p<0.05 vs. Ct.

次に、FOXO1 過剰発現プラスミドを作成し、SOD3 発現と FOXO1 との関連性を検証した。FOXO1 を過剰発現させることにより、TPA 誘導性の SOD3 発現増大はさらに増強した。一方、FOXO1 のノックダウン細胞においては、TPA 発現性 SOD3 発現増大は顕著に抑制された。また、本傾向は MDA-MB-231 細胞においても認められた。以上より、FOXO1 は SOD3 発現を正に制御する転写因子の一つであると考えられた。

(4) SOD3 によるがん細胞遊走能獲得の可能性

我々は、本研究において高転移性ヒト乳がん細胞株である MDA-MB-231 細胞では高い SOD3 が認められることを見出した。そこで、SOD3 が細胞増殖および抑制という二相性の細胞応答性を示すことに着目し、MDA-MB-231 細胞における SOD3 がその高い細胞遊走性に関与している可能性を検証した。MDA-MB-231 細胞では高い細胞遊走性が認められたが、FOXO1 のノックダウン細胞ではその遊走性は著しく減弱した。また、SOD3 のノックダウン細胞においても遊走性の減少傾向が認められた。FOXO1 のノックダウンは他のがん細胞遊走・転移促進因子の遺伝

子発現レベルにも影響したと考えられたが、SOD3 のノックダウンのみで細胞遊走性が変化するデータは非常に興味深い。今後、さらにその詳細を検討していく予定である。

エピジェネティクス異常を起点とした遺伝子の発現異常とがん増悪との関連性が指摘されて以来、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構が明らかになりつつある。また、エピジェネティクスを治療のターゲットとした医薬品の開発が積極的に進められている。我々は、生体に広範に存在する銅イオン動態の破綻に起因するシグナル伝達の異常ががん組織、特に細胞外環境におけるレドックス恒常性破綻につながることを見出しており、本研究において明らかとしたレドックス制御機構としてのエピジェネティクス異常の分子機構の詳細は、がん増悪の分子機構の解明ひいては治療薬につながると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Ichihara Mari, Kamiya Tetsuro, Hara Hirokazu, Adachi Tetsuo | 4. 巻 52 |
| 2. 論文標題 The MEF2A and MEF2D function as scaffold proteins that interact with HDAC1 or p300 in SOD3 expression in THP-1 cells | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Free Radical Research | 6. 最初と最後の頁 799 ~ 807 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/10715762.2018.1475730 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Kamiya Tetsuro, Takeuchi Kosuke, Fukudome Saki, Hara Hirokazu, Adachi Tetsuo | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Copper chaperone antioxidant-1, Atox-1, is involved in the induction of SOD3 in THP-1 cells | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 BioMetals | 6. 最初と最後の頁 61 ~ 68 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10534-017-0067-1 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 神谷哲朗、市原茉莉、山口雄史、原 宏和、足立哲夫 |
| 2. 発表標題 転写因子FOXO1およびヒストンメチル化タンパクPRMT1によるSOD3発現抑制 |
| 3. 学会等名 第71回日本酸化ストレス学会，第18回日本NO学会合同学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tetsuro Kamiya, Mari Ichihara, Yuji Yamaguchi, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi |
| 2. 発表標題 Involvement of histone acetylation and methylation in SOD3 regulation in human monocytic THP-1 cells |
| 3. 学会等名 19th Biennial Meeting of the SFRR1. (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 神谷哲朗、竹内康佑、福留早貴、原 宏和、足立哲夫 |
| 2. 発表標題 銅輸送タンパクAtox-1を介した細胞外レドックス制御機構 |
| 3. 学会等名 第29回日本微量元素学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Tetsuro Kamiya, Ryuhei Takemoto, Hirokazu Hara, Tetsuo Adachi: |
| 2. 発表標題 Histone demethylase JMJD3 regulates a copper-containing lysyl oxidase expression in THP-1 cell-derived M2-macrophages |
| 3. 学会等名 SfRBM 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山口雄史、神谷哲朗、原 宏和、足立哲夫 |
| 2. 発表標題 抗酸化酵素SOD3発現制御への転写因子FoxO1の直接的関与 |
| 3. 学会等名 日本酸化ストレス学会東海支部第7回学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 市原茉莉、青山由佳、神谷哲朗、原 宏和、足立哲夫 |
| 2. 発表標題 ヒストンリモデリングによるSOD3発現制御機構の解析 |
| 3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会2017 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 神谷哲朗、竹内康佑、福留早貴、原 宏和、足立哲夫 |
| 2. 発表標題 銅イオントランスポーターAtox-1によるSOD3発現制御機構 |
| 3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2017 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 神谷哲朗、仲原理紗、市原茉莉、森 菜美紀、青山由佳、原 宏和、足立哲夫 |
| 2. 発表標題 細胞外抗酸化酵素SOD3発現制御機構としてのDNA/ヒストンメチル化修飾 |
| 3. 学会等名 第14回日本病理学会カンファレンス |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 神谷哲朗、仲原理紗、森菜美紀、原 宏和、足立哲夫 |
| 2. 発表標題 細胞外レドックス制御機構におけるDNAメチル化の関与 |
| 3. 学会等名 第63回日本薬学会東海支部大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 市原茉莉、神谷哲朗、原 宏和、足立哲夫 |
| 2. 発表標題 SOD3発現制御機構としてのヒストンアセチル化とその分子機構の解明 |
| 3. 学会等名 第63回日本薬学会東海支部大会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岐阜薬科大学 医療薬剤学大講座 臨床薬剤学研究室
<http://sv1.gifu-pu.ac.jp/lab/rinyaku/>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 原 宏和 (Hara Hirokazu) (30305495) | 岐阜薬科大学・薬学部・准教授 (23701) | |
| 研究分担者 | 足立 哲夫 (Adachi Tetsuo) (40137063) | 岐阜薬科大学・薬学部・教授 (23701) | |