

令和元年5月24日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16556

研究課題名(和文) hTERT発現制御における新規の治療標的の解明と臨床応用

研究課題名(英文) Identification of novel regulators of telomerase reverse transcriptase expression in hepatocellular carcinoma.

研究代表者

網崎 正孝 (AMISAKI, Masataka)

鳥取大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：40790374

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は網羅的解析によりプロモータを介したhTERT発現制御に関わる遺伝子、C15orf55とC7orf43を同定した。C15orf55はhTERTプロモータ上にSP1の結合を増加させ、hTERT発現を増加させた。一方、C7orf43はYAP1関連遺伝子の結合領域を介してプロモータを制御していた。臨床検体でC15orf55とC7orf43の発現はhTERT発現と相関していた。データベースのHCC患者の解析では、C15orf55とC7orf43のどちらかを高発現した患者は予後不良だった。C15orf55とC7orf43を治療標的とするところでこれらの経路を介した新たな治療法の確立が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌に対する治療の主流は、異常に活性化した経路を標的として治療する分子標的薬だが、有効な治療薬が少ない現状である。本研究では、癌細胞の不死化に必須の遺伝子であるテロメラーゼ逆転写酵素を活性化する因子に着目し、新たな因子2つを見出した。1つはC15orf55という遺伝子で、SP1という転写因子を活性化(プロモーター領域に導く)ことでテロメラーゼ逆転写酵素の発現を上昇させていた。もう1つはC7orf43という遺伝子で、YAP1という転写因子を活性化(核内に導く)ことで遺伝子発現を活性化していた。いずれの遺伝子も肝細胞癌の患者で大量に発現しており、有望な治療標的と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The promoter mutation in the telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene is the most common genetic alteration in hepatocellular carcinoma (HCC), suggesting that hTERT upregulation is a critical event in hepatocarcinogenesis. Thus, regulators for hTERT expression would be a promising target for HCC prevention and treatment. Here, we conducted a functional screening of hTERT regulators to find novel therapeutic targets. A genome-wide short-hairpin RNA library was used for the screening. The activity of the TERT promoter was measured by a luciferase assay. C15orf55 and C7orf43 were identified to regulate TERT expression, possibly via the SP1 axis and Hippo pathway, respectively. The expression of both genes was higher in tumor and its adjacent non-tumor tissues of HCC patients than in normal liver tissues with benign disease. Survival data from the TCGA database showed that high expression of these genes was related to poor long-term outcomes of HCC patients.

研究分野：肝臓癌

キーワード：テロメラーゼ逆転写酵素 TERT C15orf55 C7orf43

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体末端にはテロメアと呼ばれる特徴的な塩基配列の反復があり、テロメリックタンパクと複合体を形成することで立体構造となり染色体末端同士の組み代わりや癒合を防いでいる。テロメアは細胞分裂に伴う遺伝子の複製時に短縮するが、テロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT) によりテロメアの遺伝子配列を増幅することで染色体末端が短縮することを防いでいる。特に細胞分裂が盛んな癌細胞からなる悪性腫瘍はその90%以上の癌腫においてhTERTが高発現していることが知られており、無秩序な細胞増殖に関与していると推測される。すなわち、hTERTは幅広い癌腫において治療の際の標的となりうると考えられている。

本研究は世界で3番目に多い癌腫である肝細胞癌 (HCC) に焦点を当てた。なぜなら、HCCに対して有効な抗癌剤が少なく治療効果も限られ、さらに肝切除術や腫瘍焼灼術といった根治治療後も高い確率で再発することから予後の悪い癌腫として知られていて、新たな治療標的の解明が必要とされているからである。HCCの発癌過程においてhTERTは活性化する。すなわち、hTERTは正常肝細胞ではほとんど発現していないが、HCC及びその前癌病変 (異型結節) あるいは再生結節において高発現していることが知られていて、治療標的のみではなく根治治療後の予防的治療となり得る。さらにHCC患者のエキソームを解析した最新の知見ではHCCのすべての遺伝子変異のうち、hTERTプロモーター領域の遺伝子変異が最も高頻度であることが報告されている。従って、hTERTは、HCCの発生及び進展に関与していると考えられる。

2. 研究の目的

以上のようにhTERT及びその発現制御機構は有望なHCC治療標的の一つとなるが、未だ確立した治療薬はない。本研究ではプロモーターを介したhTERT発現制御メカニズムを解析し、新たな治療標的となりうる遺伝子の同定を目的とした。

3. 研究の方法

まず、スクリーニング系でhTERT発現が抑制されその結果細胞増殖が抑制、すなわちスクリーニングで目的の遺伝子のみが検出されないことが想定されるため、CAGプロモーター制御下にhTERTが安定発現する肝癌細胞株HepG2を作成した。さらにこのHepG2にhTERTプロモーター (hTERT遺伝子の上流5kbp) 制御下にEGFPを発現するベクターを安定導入した。に対しTERTプロモーター制御下にEGFPを発現するプラスミドを安定導入した。この細胞に約2万種類のshRNAレンチウイルスライブラリーを感染させた。shRNAレンチウイルスは1つの細胞に対して1つのライブラリーが導入されるようウイルス濃度を調整した。感染細胞についてピューロマイシン耐性株を選別することでshRNAが導入された細胞を抽出した。その後EGFP発現が低下した細胞、すなわちhTERTプロモーター活性が低下した細胞をセルソーターにより分取した。これらの細胞のゲノムを抽出し、shRNAに特異的なバーコード配列を読み取り、組み込まれたshRNAよりhTERT発現に関与する遺伝子を同定した (これらの遺伝子に対するshRNAはhTERTプロモーター活性を抑制したことから、shRNAの標的遺伝子はhTERTプロモーター活性化に寄与する遺伝子と推測された)。これらの遺伝子の過剰発現によりhTERT mRNA発現、タンパク発現及びテロメラーゼ活性が上昇する遺伝子を抽出した (この作業によりスクリーニングで擬陽性となった遺伝子が除かれ、真にhTERTプロモーター活性化に寄与するものが抽出された。そのため以後、抽出された遺伝子を単に制御遺伝子と記載)。さらにhTERTプロモーターを段階的に短縮しそれらの制御下にルシフェラーゼを発現するベクターを作製し、このベクターと制御遺伝子とを一過性共発現させルシフェラーゼ活性を測定する一連の実験 (プロモーターアッセイ) で遺伝子の応答領域を同定し、TERTプロモーターを活性化するメカニズムを解析した。このプロモーターアッセイは各遺伝子の応答領域を同定できるまで細分化して行った。また、各制御遺伝子に関連していると推測される経路についてウエスタンブロットや蛍光免疫染色、クロマチン免疫沈降定量的PCR法で解析を行った。次いで臨床検体を用いてHCCでの遺伝子発現を定量的RT-PCRにより測定し、制御遺伝子とhTERT発現との関連を検討した。また、TCGAデータベースを用い、制御遺伝子とHCC患者の予後との関連を検討した。

4. 研究成果

(1)hTERT発現制御遺伝子の新規同定
肝細胞癌細胞株HepG2において、上述のレンチウイルスshRNAライブラリーを用いたスクリーニングにより、hTERTプロモーター活性を促進すると考えられる遺伝子6つを同定した (表1)。これらの遺伝子のうちCLEC4CはHepG2での発現が検出感度以下であったため以後の検討から除外した。この5つの遺伝子に対するshRNAをHepG2に導入したところ、C15orf55とC7orf43に対するshRNAによりhTERT mRNA発現が低下した (図1)。C15orf55とC7orf43を一過性過剰発現させるとhTERT発現が上昇した (図2)。また、C15orf55あるいはC7orf43を安定的に過剰発現するHepG2を作

表1. スクリーニングにより同定された遺伝子

サンプル番号	HUGO Gene Symbol	バーコード配列
1	C7orf43	TGCAGTCACACATGACGT
2	F2	ACGTGTACAGTGTCAAC
3	CLEC4C	ACGTACACCATGACCAGT
4	LZTR1	TGCACAGTGTGGTTGGT
5	SLC22A16	CAGTCAACTGGTACACTG
6	C15orf55	CACAGTGTGCACACACA

製し（それぞれ OE-C15orf55 および OE-C7orf43 と呼称）Telomerase Repeated Amplification Protocol (TRAP)-qPCR 法を用いてテロメラーゼ逆転写酵素活性を定量的に測定したところ、いずれの過剰発現株においてもテロメラーゼ活性が上昇していた（図 3）。以上より、C15orf55 と C7orf43 は hTERT 発現を上昇させる新たな制御遺伝子として同定された。

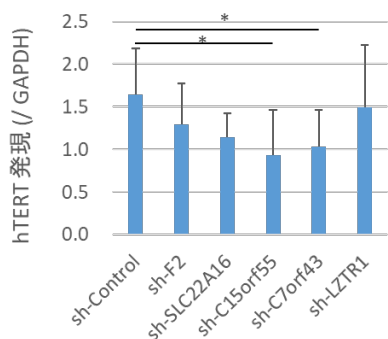


図 1 遺伝子ノックダウンによる hTERT 発現の変化

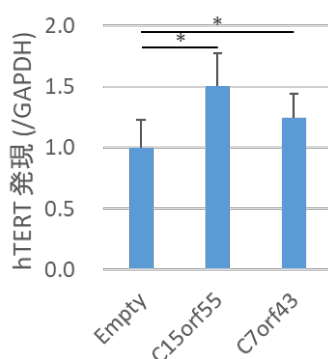


図 2 遺伝子一過性過剰発現による hTERT 発現の変化

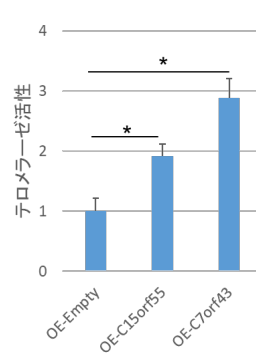


図 3 遺伝子安定発現株のテロメラーゼ活性

(2)新規制御遺伝子の hTERT プロモーター応答領域の検討

新たに同定された hTERT 制御遺伝子の、hTERT プロモーター上での機能を調べるために、hTERT プロモーターの応答領域を同定しそこから、関連する転写因子の同定を試みた。hTERT のプロモーター領域を段階的に短縮したプロモーターアッセイで、

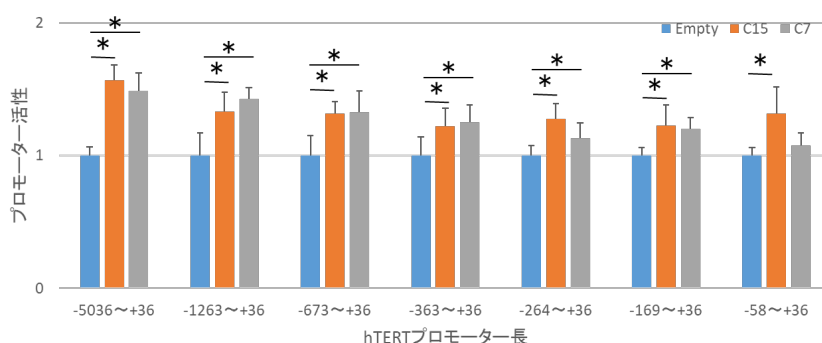


図 4 プロモーターを段階的に短縮した hTERT プロモーターアッセイ

C15orf55 は hTERT プロモーターの -58 ~ +36bp に、C7orf43 は同じく -169 ~ -59bp に応答していることが明らかになった。これらの同定部位をさらに短縮してプロモーターアッセイを行ったところ C15orf55 は、SP1 結合領域として知られる GC モチーフが応答領域であり（図 5）、C15orf55 の一過性過剰発現により TERT プロモーターに結合する SP1 量が増加した（図 6）。C7orf43 は GABPA および EGR1 の結合領域が応答領域であり、GABPA と EGR1 との両方に関与する Hippo シグナル経路のエフェクター-YAP1 を介して TERT プロモーターを制御していると考えられた。C7orf43 の安定発現株は YAP1

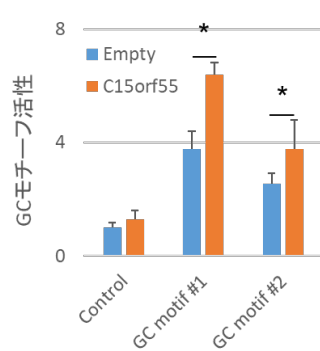


図 5 C15orf55 一過性発現による GC モチーフの活性

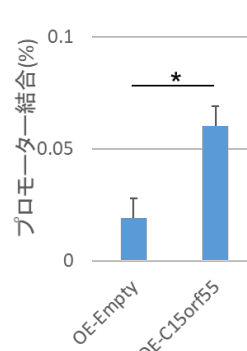


図 6 hTERT プロモーター上の SP1 結合 (ChIP-PCR)

経路が活性化しており（図 7）、YAP1 の核内移行が亢進していた。以上より、C15orf55 は SP1 を介して、C7orf43 は YAP1 を介して hTERT 発現を促進することが明らかとなった（図 8）。

(3)新規制御遺伝子の臨床的意義の検討
HCC 患者の肝癌組織において C15orf55 及び C7orf43 と TERT の

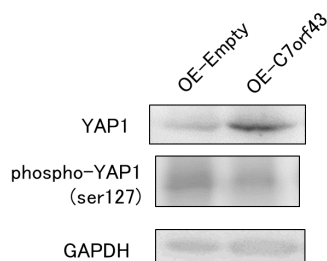


図 7 C7orf43 安定発現株における YAP1 経路の活性化

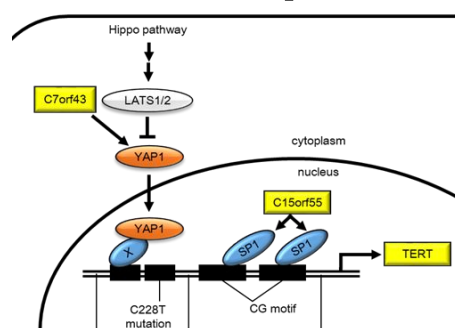


図 8 本実験で明らかとなった経路 (模式図)

遺伝子発現は相関していた(図9)。さらに、C15orf55及びC7orf43は、良性肝疾患患者から採取した正常組織に比較し、HCC患者の癌部において高発現していた(図10)。TCGAデータベースを用いた377名のHCC患者の解析では、C15orf55とC7orf43の両方あるいはどちらかを高発現した患者は全生存期間が短く、再発率も高くなる傾向であった(図11)。

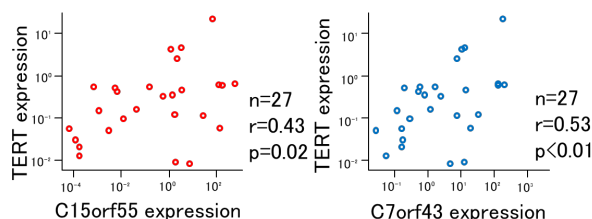


図9 C15orf55、C7orf43とhTERT発現の関係

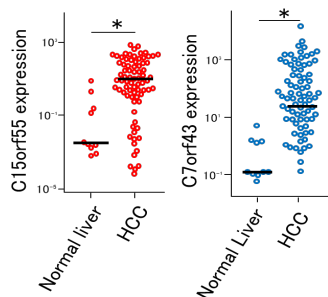


図10 臨床検体におけるC15orf55、C7orf43発現

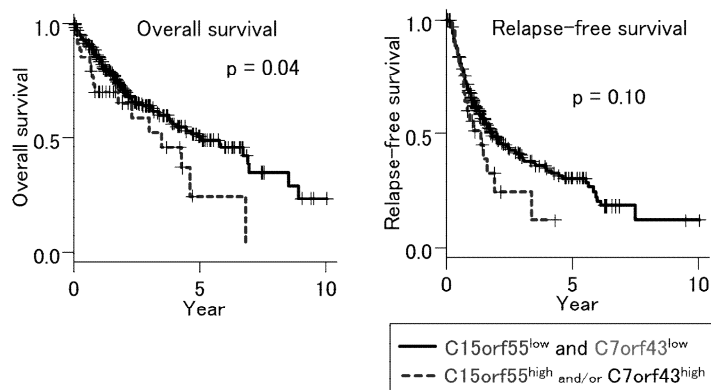


図11 遺伝子発現とHCC患者予後(TCGAデータベース)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

(1) **Amisaki M, Tsuchiya H, Sakabe T, Fujiwara Y, Shiota G. Identification of genes involved in the regulation of TERT in hepatocellular carcinoma. Cancer Sci. (査読あり) 2019;110:550-560. doi: 10.1111/cas.13884.**

(2) **Asai R, Tsuchiya H, Amisaki M, Makimoto K, Takenaga A, Sakabe T, Hoi S, Koyama S, Shiota G. CD44 standard isoform is involved in maintenance of cancer stem cells of a hepatocellular carcinoma cell line. Cancer Med. (査読あり) 2019;8:773-782. doi: 10.1002/cam4.1968.**

[学会発表](計 2件)

(1) Masataka Amisaki, Hiroyuki Tsuchiya, Yoshiyuki Fujiwara, Goshi Shiota. Identification of novel regulators of telomerase reverse transcriptase expression in hepatocellular carcinoma. The 77th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association. 2018

(2) 網崎正孝、土谷博之、本城総一郎、汐田剛史. 肝細胞癌における新規ヒトテロメラーゼ逆転写酵素発現制御因子の同定. 第54回日本肝臓学会総会. 2017年

[産業財産権]

出願状況(計 1件)

名称: 肝癌のテロメラーゼ逆転写酵素の遺伝子発現レベルを制御する薬剤のスクリーニング方法および診断キット

発明者: 汐田剛史、網崎正孝、坂部友彦、土谷博之

権利者: 同上

種類: 特願

番号: 2018-074291

出願年: 2018年4月7日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。