

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09768

研究課題名(和文) 低酸素応答性転写抑制因子DECを標的としたがん分子標的治療法開発研究

研究課題名(英文) Development of a molecular targeting anti-cancer therapy against hypoxia inducible DEC transcription factors

研究代表者

谷本 圭司 (Tanimoto, Keiji)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：90335688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本申請研究では、新しい抗がん戦略として、低酸素誘導性転写因子DEC1およびDEC2の抗がん分子標的としての可能性を検討するとともに、その制御機構の解明に取り組んだ。DEC1やDEC2により抑制されるDNA損傷応答遺伝子プロモーターを用いたレポーターを作製した。siRNA導入により、DEC2抑制のがん細胞増殖抑制効果が高いことが、通常酸素および低酸素環境下で確認された。さらに、低線量率放射線照射により、AURKB遺伝子発現が大きく低下することを見出し、その発現抑制にDEC2が関与している可能性、抗がん剤感受性変化に大きく関与することを確認した。新しい治療プロトコルへの応用展開が期待された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請研究では、新しい抗がん戦略として、がんの特徴である低酸素環境で働く転写因子DEC1およびDEC2を分子標的とした治療が有用であるか検討するとともに、その分子機構の解明に取り組んだ。さまざまな試みの中で、DEC2を阻害するとがん細胞の増殖を効率良く抑制できることが明らかとなった。さらに、低線量率放射線照射により、DEC2によりAURKB遺伝子発現が抑制され、抗がん剤感受性が変化することを見出し、より安全で効果的な新しい治療プロトコルへの応用展開が期待された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the potential of transcription factors DEC1 and DEC2, that are induced under hypoxia and regulate DNA damage response and apoptosis, as anticancer molecular targeting targets for treatment-resistant oral cancers. We so far established the reporter-based screening system using DEC-responsive sequences identified and analyzed in DNA damage response genes repressed by DEC1 and DEC2. On the other hand, the evaluation of cell proliferation by siRNA-based DEC1 and DEC2 inhibition showed that DEC2 inhibition was more effective to inhibit cancer cell proliferation under both normoxic and hypoxic conditions. Furthermore, we found that AURKB gene expression was greatly reduced with low-dose-rate irradiation, suggesting that DEC2 may be involved in the suppression. In addition, we found that decreased expression of the AURKB gene might be involved in modification of anticancer drug sensitivity, suggesting a novel therapeutic strategy.

研究分野：外科系歯学

キーワード：低酸素 Hypoxia DEC1 DEC2

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔がんなどの固形がん治療において、より効果的な放射線療法や新しい分子標的治療薬を含む化学療法の開発は、治療後の機能温存という観点から患者の生活の質向上に大きく寄与すると期待されている。現在の抗がん治療では、効果を示す症例がある一方で、全く効果を示さない、もしくは再発・転移をきたし悲惨な結末を迎える症例も多く、治療抵抗性の分子機構の解明、それらを克服する画期的な治療法開発は急務である。

これまでに、固形がんの治療抵抗性に低酸素などの微小環境が大きな役割を果たしている事が明らかにされてきた。例えば、腫瘍内酸素分圧と局所制御率、無病生存や全生存期間などの放射線治療予後との関連性が古くから証明されている。また、放射線治療抵抗性には物理的な酸素分子不足のみならず、(Hypoxia-inducible factor) HIF 経路を介したがん細胞や腫瘍内血管内皮細胞自体の放射線障害に対する抵抗性獲得が明らかとなってきた。一方、低酸素は、以前より遺伝子不安定性誘発の要因として考えられており、幾つかの DNA 修復酵素遺伝子が低酸素下で発現抑制される機構が報告されてきた。申請者も、低酸素下での転写因子 HIF-1 やその下流の転写抑制因子 DEC による DNA 損傷応答機構のシステミックな制御を明らかにしてきた。DEC (Differentiated Embryo Chondrocytes 1 および 2, 別名 BHLHE40 および 41: Basic helix-loop-helix, Family member E40 および 41) は、低酸素などの様々なストレス応答、概日リズムや代謝調節に関与する転写因子であるが、その制御機構や分子機能には不明な点が多く残されている。申請者は、これまでの研究過程で、がん細胞の増殖、進展における転写因子 DEC の重要性を示す結果を数多く得ており、がん分子標的としての検証は非常に重要であると考えている。

### 2. 研究の目的

本研究では、低酸素環境下における DNA 損傷応答を制御している転写因子 DEC1 および DEC2 の新たな制御分子および制御法(薬)の探索を行い、がん細胞制御法へ応用展開することを目的とした。

### 3. 研究の方法

1) DEC 応答レポーターを作製する。DEC により発現低下する遺伝子群の中から、DNA 損傷応答関連遺伝子プロモータールシフェラーゼレポーターを作製する。

2) 口腔がんと同じ扁平上皮がん、低酸素応答が詳細に検討されている子宮頸がん HeLa 細胞を用いて、通常酸素環境下(21% O<sub>2</sub>)または低酸素環境下(1% O<sub>2</sub>) 24 時間培養後の網羅的遺伝子発現解析を RNA-seq にて行った。その際、非特異的 siRNA (siNS)、または、*HIF1A* 遺伝子 (siHIF1A)、*EPAS1* (siHIF2A)、*BHLHE40* (siDEC1)、*BHLHE41* (siDEC2) 特異的 siRNA を用いて、それぞれの遺伝子発現を抑制することにより、下流の標的遺伝子を明らかにするよう試みた。

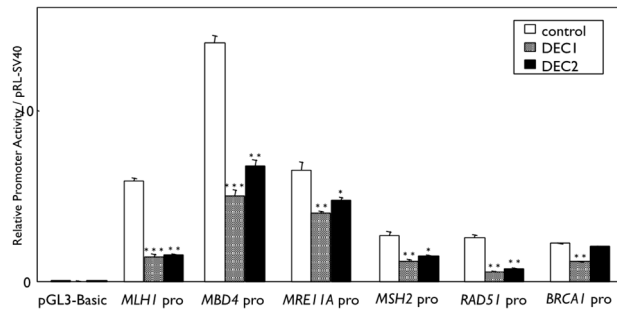
3) 上記 siRNA を導入した細胞の増殖を、細胞核をヘキスト染色後、INCellAnalyzer にて細胞核数(細胞数)測定することにより比較した。

4) ヒトゲノム siRNA ライブラリーを用いた、遺伝毒性スクリーニングを開始した。2) 同様に siRNA 導入後、細胞数を測定し、siRNA による遺伝子発現抑制が細胞増殖に与える影響を評価した。

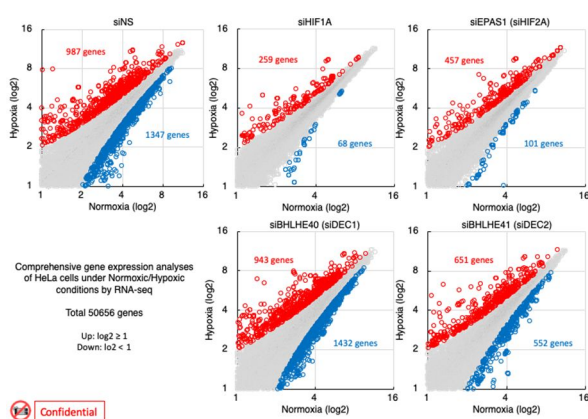
### 4. 研究成果

1) DNA 損傷応答遺伝子群のうち、DEC による遺伝子発現抑制が認められた *MLH1*、*MBD4*、*MRE11A*、*MSH2*、*RAD51*、*BRCA1* 遺伝子プロモーターを pGL3-basic ルシフェラープラスミドに

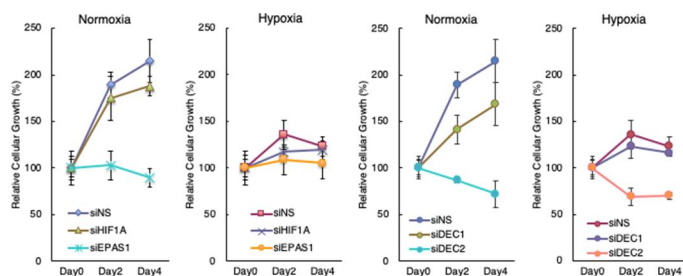
サブクローニングした。作製したレポーターを HepG2 細胞に一過性に遺伝子導入し、共遺伝子導入した DEC1 または DEC2 発現ベクターの影響を比較した。その結果、導入 24 時間後の活性比較において、ほとんどのプロモーター活性は DEC1 または DEC2 により抑制されたが、BRCA1 プロモーターのみ、DEC2 による抑制が観察されなかった（上図）。DEC の活性をモニターする上で、SN 比を考えると、MLH1 プロモーターまたは RAD51 プロモーターを利用したレポーターが適していると考えられた。



2) HeLa 細胞に siRNA を導入し、24 時間後に通常酸素環境下または低酸素環境下で培養を開始し、さらに 24 時間培養後細胞を回収し、totalRNA を調製し、RNA-seq にて遺伝子発現解析を行った。その結果、多くの発現増加、または低下遺伝子が見出された（右図）。特に、DEC1（発現増加 943、低下 1432 遺伝子）や DEC2（増加 651、低下 552 遺伝子）の標的遺伝子候補が多く見出されており、今後の応用展開が期待された。



3) 2) 同様に siRNA を HeLa 細胞に導入後、2 日目および 4 日目に細胞数を測定し、それぞれ初日との変化を比較した。その結果、特に EPAS1 (HIF2A) や DEC2 阻害ががん細胞増殖抑制に有効である可能性が示された（右図）。



4) ヒトゲノム siRNA ライブラリーを用いた、遺伝毒性スクリーニングを開始した。これまでにキナーゼ 384 遺伝子の抑制効果を観察したが、22 の増殖促進キナーゼ、160 の増殖抑制キナーゼを見出している。今後、さらなる機能単位の遺伝子群の評価を行い、上記 HIF や DEC 標的遺伝子との掛け合わせから、分子標的遺伝子を見出していく。

5) 低線量率放射線照射による遺伝子発現変動を RNA-seq により測定した結果、細胞周期や細胞分裂において重要な働きをしている AURKB の発現低下を見出した。更なる解析から AURKB の発現低下に DEC2 が関与している可能性も見出し、DEC2 下流の重要遺伝子の一つとして、治療応用へ向けた解析を進めている。

本研究では、DEC の分子標的としての意義、その下流の多様性などを明らかにした。特に DEC2 はがん分子標的として有望であると思われ、その下流遺伝子の応用も期待された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahiro Fukazawa, Keiji Tanimoto*, Looniva Shrestha, Takeshi Imura, Shinya Takahashi, Taijiro Sueda, Nobuyuki Hirohashi, Eiso Hiyama, Louis Yuge	4. 巻 14
2. 論文標題 Simulated microgravity enhances CDDP-induced apoptosis signal via p53-independent mechanisms in cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0219363
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0219363	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kazumi Shimamoto, Keiji Tanimoto*, Takahiro Fukazawa, Hideaki Nakamura, Akinori Kanai, Hidemasa Bono, Hiromasa Ono, Hidetaka Eguchi, Nobuyuki Hirohashi	4. 巻 inpress
2. 論文標題 GLIS1, a novel hypoxia-inducible transcription factor, promotes breast cancer cell motility via activation of WNT5A.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Carcinogenesis	6. 最初と最後の頁 bgaa010
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/carcin/bgaa010	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 Takuma Furukawa, Keiji Tanimoto, Takahiro Fukazawa, Takeshi Imura, Yumi Kawahara, Louis Yuge	4. 巻 4
2. 論文標題 Simulated microgravity attenuates myogenic differentiation via epigenetic regulations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Npj Microgravity	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41526-018-0045-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 谷本圭司	4. 巻 274
2. 論文標題 がんにおける低酸素応答性転写因子HIF	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 265-270
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 光野 萌, 谷本圭司, 島袋紀一, 島本和美, 廣橋伸之
2. 発表標題 低酸素がん細胞におけるビスフォスフォネート製剤の抗腫瘍分子機構.
3. 学会等名 第60回原子爆弾後障害癌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 島本和美, 谷本圭司, 深澤賢宏, 島袋紀一, 廣橋伸之
2. 発表標題 新規低酸素誘導性転写因子GLIS1の機能解析.
3. 学会等名 第44回中国放射線影響研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kiichi Shimabukuro, Keiji Tanimoto, Naoya Kakimoto, Nobuyuki Hirohashi
2. 発表標題 The effects of low-dose irradiation on the hypoxic cells.
3. 学会等名 The 4th International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiji Tanimoto, Kazumi Shimamoto, Nobuyuki Hirohashi
2. 発表標題 Significant roles of the novel hypoxia-inducible transcription factor, GLIS1, in breast cancer
3. 学会等名 The 3rd International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radio Disaster Medical Science (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 谷本圭司, 島本和美, 島袋紀一, 小田千代, 廣橋伸之
2. 発表標題 新規低酸素誘導性転写因子GLIS1のがん細胞における意義
3. 学会等名 第61回日本放射線影響学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 谷本圭司, 島本和美, 小田千代, 廣橋伸之
2. 発表標題 低酸素シグナルと放射線応答
3. 学会等名 第59回原子爆弾後障害研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Keiji Tanimoto, Hideaki Nakamura, Nobuyuki Hirohashi, Lorenz Poellinger, Eisaburo Sueoka
2. 発表標題 DEC plays a crucial role in DNA damage response via transcriptional regulation under hypoxic conditions
3. 学会等名 The 14th Japan-Korea Joint Symposium on Cancer and Ageing Research (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------