

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19790267  
 研究課題名（和文）  
 悪性腫瘍におけるエピジェネティック・マスター因子 REST の異常とその生物学的意義  
 研究課題名（英文）  
 Biological roles of REST in non-neuronal cells and its dysregulation in tumorigenesis.  
 研究代表者  
 柴崎 晶彦 (SHIBAZAKI MASAHIKO)  
 長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・助教  
 研究者番号：20445109

## 研究成果の概要：

細胞骨格因子 $\beta$ -tubulin, 特に $\beta$ III-tubulin（以下 $\beta$ III）は神経細胞特異的である。しかし多く腫瘍では $\beta$ III の異所的発現が見られ、タキソール系抗がん剤に対し抵抗性を獲得する。本研究では $\beta$ III 遺伝子の発現制御因子 REST に注目し、異所的 $\beta$ III 発現機構、さらに薬剤耐性機構を検討した。その結果、REST が細胞周期依存的に変動し $\beta$ III を産生すること、また悪性黒色腫細胞で $\beta$ III の発現が低いものは、タキソールに高感受性であることを明らかにし、一部の悪性黒色腫に対するタキソールの有効性を示唆した。

## 交付額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 1,800,000 | 0       | 1,800,000 |
| 2008年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 450,000 | 3,750,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード： $\beta$ III-tubulin, REST, タキソール薬剤耐性機構, 細胞周期, 悪性腫瘍

## 1. 研究開始当初の背景

無秩序な自律性増殖と並び、脱分化 (dedifferentiation) は、がん細胞の生物学的特性の形成に大きく関与している。一般に腫瘍の分化度と悪性度は相関し、anaplastic あるいは undifferentiated type と呼ばれる未分化な悪性腫瘍は予後不良である。これらの腫瘍では、分化の喪失に伴い複数の aberrant な蛋白質を発現する。肺小細胞癌における NCAM (neural

cell adhesion molecule, CD56) などは、その端的な例といえる。

一方、分化した細胞は、数万のトランスクリプトームの中からジェネティック/エピジェネティックな機構を活用し、特定の遺伝子セットのみを発現させることで、細胞の恒常性を維持している。未分化ながん細胞では、この秩序だったトランスクリプトームの選択・維持機構が破綻している可能性がある。

本研究では、以下の文献的考察から、「神経系エピジェネティックマスター遺伝子 REST の不活化は複数の悪性腫瘍で生じており、aberrant な遺伝子発現を誘導することで、がん細胞の生物学的特性（薬剤耐性など）の形成に関与している」との仮説を立てるに至った。

REST 蛋白質の神経系遺伝子発現抑制機構に関する報告

- (1) REST は、ES 細胞において神経特異的遺伝子プロモーター領域(RE-1 領域)に結合し、神経系細胞への分化に伴って消失する因子としてクローニングされた(文献1)。
- (2) REST はエピジェネティック関連蛋白質の足場として働き、神経細胞において神経特異的遺伝子の発現を抑制している(文献2)。
- (3) 現在までに、RE-1 領域をプロモーターに持つ遺伝子が、100 種類以上同定されている(文献2)。
- (4) 神経組織で特異的に発現する microRNA (miR-124a)が、REST の制御を受けることが明らかとなり、神経細胞の分化誘導に関与していることが明らかとなった(文献3)。

悪性腫瘍における異常と、がんの生物学的特性との関連に関する報告

- (1) Westbrook らは、shRNA ライブラリーを用いた loss-of-function 解析から、REST は癌抑制遺伝子であり、遺伝子の欠損により *in vitro* において細胞のフォーカス形成が見られること、また大腸結腸がん細胞株 DLD1 において REST 遺伝子がフレームシフト変異していることを示した(文献4)。
- (2) 肺小細胞癌では REST の exon skipping が高頻度に生じており、C-末端を欠いた蛋白質を発現する splicing variant が発現している(文献5)。
- (3) REST について神経分化との関連を研究した論文は多いが、悪性腫瘍における異常は脳腫瘍、肺小細

胞癌、大腸結腸癌で数報みられるのみである。また悪性腫瘍で、REST 協調タンパク質である CoREST の異常を解析した報告はない。

- (4) がんの生物学的特性との関連では、REST の変異体が PI3K-Akt 経路を介して細胞増殖能に影響することが報告されているのみで(文献4)、他のがん細胞の生物学的特性は明らかになっていない。

以上の背景をもとに、腫瘍細胞における REST の役割を解析するにあたって、本研究では特に $\beta$ III-tubulin (以下 $\beta$ III)の発現制御に注目した。細胞骨格因子 $\beta$ -tubulin には幾つかのアイソタイプが存在し、 $\beta$ III は、神経細胞特異的である。しかし多くの卵巣癌や肺癌などでは $\beta$ IIIの異所的発現が見られ、タキソール系抗がん剤に対し抵抗性を獲得する(文献6)。神経幹細胞では、 $\beta$ III は REST により抑制的に制御されている。すなわち一部腫瘍細胞において REST の異常が、異所的 $\beta$ III発現に強く関与する可能性がある。この可能性を証明することで、一部腫瘍がタキソール系抗がん剤に対して、耐性を獲得する機序が明らかになり、REST が遺伝子治療の標的になりうると考え、研究を開始した。

(文献1) Schoenherr CJ. et al. *Science* 267: 1360-1363, 1995.

(文献2) Lunyak VV. et al. *Science* 298: 1741-1752, 2002.

(文献3) Conaco C. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 2422-2427, 2006.

(文献4) Westbrook TF. et al. *Cell* 121: 837-848, 2005.

(文献5) Coulson JM. et al. *Cancer Res.* 60: 1840-1844, 2000.

(文献6) Kavallaris M. et al. *J. Clin. Invest.* 100: 1282-1293, 1997.

## 2. 研究の目的

本研究は、神経特異的遺伝子群のクロマチン修飾制御に関わるエピジェネティックマスター遺伝子、REST (RE-1 silencing factor)の役割を各種悪性腫瘍で解析し、生物学的特性(特に薬剤耐性)との関連を明

らかにする。

### 3. 研究の方法

各種腫瘍細胞培養株（扁平上皮癌，悪性黒色腫，卵巣癌）を用い，以下の項目について検討した。

(1)  $\beta$ III-tubulin の発現レベルについて，ウェスタン法または PCR 法，免疫染色法により検討した。

(2) 細胞周期依存的 $\beta$ III-tubulin の発現について，Aphidicolin や Hydroxyurea 処理により細胞周期を同調し，ウェスタン法で解析した。またクロマチンレベルでの REST の解析は ChIP アッセイ法を用い解析した。

(3) タキソールに対する感受性は，上記の結果をもとに細胞死を指標とし， $\beta$ III-tubulin 発現レベルとの相関を検討した。

(4) 悪性黒色腫における $\beta$ III-tubulin の発現レベルは臨床病理検体を用い，免疫染色法で検討した。検体使用に際しては提供者の同意をもとに行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞周期依存的 $\beta$ III 発現と REST

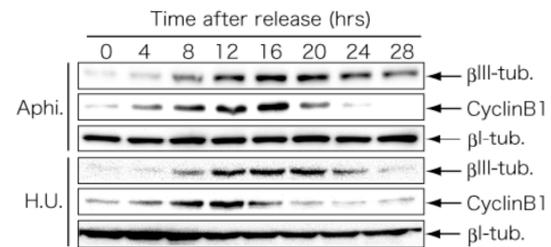
非神経系細胞では REST の強い発現が見られ，神経特異的な遺伝子群の転写は抑制されている。しかし，代表的な非神経系培養細胞株 HEK293 や HeLa において，RT-PCR 法によりその標的遺伝子である $\beta$ III の弱い発現が確認された。すなわち，非神経系細胞において，REST が生理的に制御されていることを示唆する。そこで，本項目では REST が細胞周期依存的に， $\beta$ III の発現を制御すると仮定し検討した結果，以下の結果を得た。

#### ① 「非神経系培養細胞株 HEK293 および HeLa における $\beta$ III の細胞周期依存的発現」

Aphidicolin や hydroxyurea により細胞周期を同調した HeLa において，細胞周期依存的 (S 期から M 期) な $\beta$ III の発現が見られた (図 1)。他のアイソタイプである $\beta$ I の

変化は見られない。

図 1. 細胞周期依存的 $\beta$ III の発現。

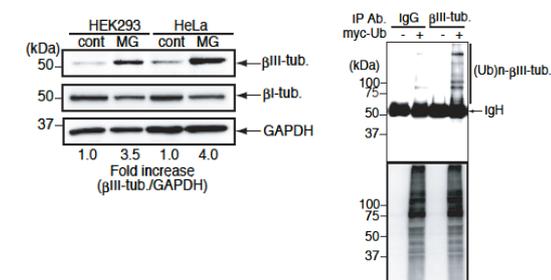


この結果は， $\beta$ III が特に細胞分裂期に関与することを意味する。

#### ② 「非神経細胞における $\beta$ III のユビキチン・プロテオソーム系による分解代謝」

HEK293, HeLa においてプロテオソーム阻害剤 MG132 により $\beta$ III が増加することから， $\beta$ III は不要時にはプロテオソーム系により分解されることが示された。またプロテオソーム系で分解されるために，ユビキチン化が必須であるが， $\beta$ III はユビキチン化されることも明らかとなった (図 2)。

図 2.  $\beta$ III のユビキチン・プロテオソーム系による分解。

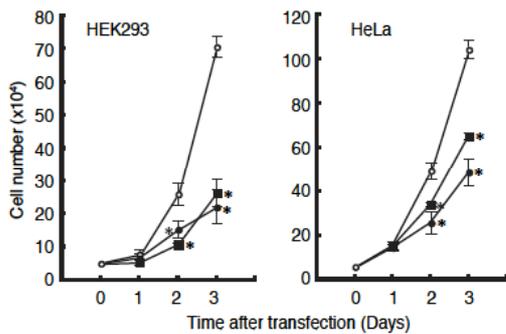


この結果は， $\beta$ III が不要時にはユビキチン・プロテオソーム系により分解されることを意味する。

#### ③ 「細胞増殖における $\beta$ III の役割」

内在性 $\beta$ III を，siRNA 法によりノックダウンした HEK293, HeLa において，明らかな増殖抑制がみられた (図 3)。

図 3. 内在性 $\beta$ III の細胞増殖に対する役割

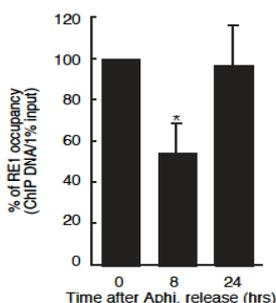


この結果は、内在性 $\beta$ III が細胞増殖に積極的に関与すること、すなわち図 1 に見られる細胞周期依存的 $\beta$ III 発現の生理的な意義を示すものである。

#### ④ 「REST の細胞周期依存的変動」

前述の通り、REST は神経幹細胞が成熟神経細胞へ分化する過程で消失し、種々の神経特異的遺伝子の発現が解除される。その標的遺伝子の一種である $\beta$ III が非神経系細胞において細胞周期依存的に発現することから (図 1), REST がクロマチンレベルで、スイッチングしている可能性を予想した。REST が結合するゲノム領域 RE-1 は、約 20 塩基の特徴的配列である。現時点で、 $\beta$ III 遺伝子上の RE-1 配列が決定されていないため、本研究では $\beta$ III 遺伝子 RE-1 配列の検索を、ゲノムデータベースにて行った。その結果、ヒト、マウス、ラットに共通の RE-1 様配列をイントロン 1 の 3.1kb 下流に見出した。クロマチン免疫沈降法により検討した結果、この配列上に REST が存在し、 $\beta$ III の発現を抑制的に制御していることを見出した (図 4)。細胞周期を同調した HeLa 細胞を用い、クロマチン免疫沈降法で検討した結果、細胞周期の特に S 期から M 期にかけて、 $\beta$ III 遺伝子上から、REST が解離することを見出した (図 4)。

図 4. 細胞周期依存的 REST スwitchング



以上、REST は非神経細胞において、細胞周期依存的 (S 期から M 期) にクロマチンから解離し、それにより産生される $\beta$ III が細胞分裂に積極的に関与すること、 $\beta$ III がユビキチン-プロテオソーム系で、分解されることを見出した。これは非神経系細胞において、REST- $\beta$ III を軸とした機構が、細胞増殖に関連することを示す新規知見である。さらに REST フレームシフト変異をもつ大腸癌細胞株 DLD-1 において、 $\beta$ III の明らかな発現上昇も確認している。

本研究により得られた知見は、非神経系細胞における $\beta$ III 発現制御機構を初めて示すものであり、REST の破綻がタキソール系抗がん剤耐性機構に関与する可能性を示すものである (投稿中)。

#### (2) 悪性黒色腫に対するタキソールの有効性について

悪性黒色腫メラノーマは皮膚科領域における難治性の悪性腫瘍であり、臨床的治療法としては、外科的切除、および多剤併用療法が行われるが、抗がん剤としてタキソール系抗がん剤を用いることは、一般に少ない。本研究では、幾つかのメラノーマ培養細胞株を用い、 $\beta$ III の発現とタキソール感受性について、以下に示す新たな知見を得た。

#### ① 「メラノーマ培養細胞株および臨床病理検体における $\beta$ III の発現」

悪性黒色腫メラノーマは外胚葉由来の神経堤細胞腫であり、本来 $\beta$ III の高発現が見られるが、幾つかのメラノーマ培養細胞株において $\beta$ III 発現量が低いものを見出した。また、メラノーマと診断された臨床病理検体においても同様に、約 30%の検体において $\beta$ III 発現量が低いものが存在した。

#### ② 「 $\beta$ III 発現量とタキソールに対する感受性」

$\beta$ III 発現量が低いメラノーマ培養細胞株にタキソールを添加し、細胞死を指標として検討した結果、 $\beta$ III 発現量が低い細胞株ではタキソール濃度依存的に高い感受性を示した。比較対象としての正常メラノサ

イト（初代培養細胞）は、 $\beta$ III 発現量は高く、タキソールに対し抵抗性であった。さらに内在性 $\beta$ III を siRNA 法によりノックダウンすることで、タキソールに対する感受性、すなわち細胞死が増大した。

### ③「メラノーマ細胞株における $\beta$ III 発現制御機構」

上述の通り、メラノサイトは神経堤細胞由来であり、本来 $\beta$ III を高発現している。しかし本研究の結果、一部のメラノーマ培養細胞株や臨床病理検体において、 $\beta$ III の低発現が確認された。本研究では、 $\beta$ III の低発現機序として、REST もしくは REST と複合体を形成するクロマチン因子、特に遺伝子の発現制御に強く関与するヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)に注目し、HDAC 阻害剤を用いた検討を行った。

その結果、脱アセチル化酵素阻害剤により $\beta$ III 低発現メラノーマ培養細胞株において、 $\beta$ III 発現上昇が見られることから、クロマチンレベルでの HDAC 抑制系が亢進している可能性が示唆された。

以上の知見は、一部のメラノーマ患者に対するタキソールの有効性を示唆する新規の基礎的知見である (Akasaka K. et al., *J. Invest. Dermatol.*, 2009) .

### (3) 卵巣癌における $\beta$ III 発現とその制御機構について

卵巣癌細胞でもクロマチンレベルでの $\beta$ III 遺伝子の発現制御を確認した (Izutsu N. et al., *Int. J. Oncol.*, 2008) .

以上、本研究において REST- $\beta$ III 系が意外にも、非神経細胞において細胞増殖に関与すること、また REST やその関連因の破綻が $\beta$ III の異所的発現に強く関連し、タキソール系薬剤の耐性機構に関与することを、基礎的観点から見出した点が成果である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Akasaka K, Maesawa C, Shibazaki M, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T.

“Loss of Class III  $\beta$ -Tubulin Induced by Histone Deacetylation Is Associated with Chemosensitivity to Paclitaxel in Malignant Melanoma Cells.”

**Journal of Investigative Dermatology** 2009, *in press*, 査読有

② Izutsu N, Maesawa C, Shibazaki M, Oikawa H, Shoji T, Sugiyama T, Masuda T.

“Epigenetic modification is involved in aberrant expression of class III  $\beta$ -tubulin, TUBB3, in ovarian cancer cells.”

**International Journal of Oncology** 32, 1227-1235, 2008, 査読有

③ Mitomo S, Maesawa C, Ogasawara S, Iwaya T, Shibazaki M, Yashima-Abo A, Kotani K, Oikawa H, Sakurai E, Izutsu N, Kato K, Komatsu H, Ikeda K, Wakabayashi G, Masuda T.

“Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines.”

**Cancer Science** 99, 280-286, 2008, 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他] 該当なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴崎 晶彦 (SHIBAZAKI MASAHIKO)

長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・助教

研究者番号：20445109

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし