

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25年 5月 13日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22700869

研究課題名（和文）

がん微小環境制御転写因子 Bach1 の機能解明とがん幹細胞移植モデルマウスへの応用

研究課題名（英文）The investigation of function of repressor Bach1 in microenvironment of the tumor and the application to a mouse model for cancer stem cell transplantation.

研究代表者

松本 光代（MATSUMOTO MITSUYO）

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：80400448

研究成果の概要（和文）：免疫不全Bach1^{-/-}マウスの作出が移植癌細胞の高感度生着および転移モデルにつながると考え、超免疫不全Bach1^{-/-}NOGマウスの作出を進めている。本モデルをよりよく活用するため、Bach1の細胞内での役割とそのメカニズムの解明に着手した。我々は不死化Bach1^{-/-}MEF細胞と野生型不死化MEF細胞の遺伝子発現解析および蛋白質発現解析およびBach1のChIP-seq解析から、Bach1がPpar γ の転写抑制に寄与する事を明らかにした。実際に、不死化Bach1^{-/-}MEF細胞はPpar γ のリガンド依存的に脂肪細胞分化誘導培地において、容易に脂肪細胞へと分化した。

研究成果の概要（英文）：We planned the construction of a Bach1^{-/-} immune-deficient mouse as a good recipient mouse model for engraftment and metastatic of human transplantable tumor cells. Therefore, we aimed to investigate the mechanism and role of Bach1 in fibroblast cell. To identify novel target genes of Bach1 in fibroblast cell, we performed ChIP-seq, DNA microarray, qPCR and western blotting analysis. These results suggest that Bach1 acts as a repressor of Ppar γ gene transcription in immortalized MEF (iMEF). Bach1^{-/-} iMEF more easily differentiated to adipocytes when treated with insulin, IBMX, dexamethasone and Ppar γ ligand in vitro. Bach1 might play a role in adipose differentiation of fibroblast cell by modulating the actions of Ppar γ .

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22年度	1,100,000	330,000	1,430,000
23年度	900,000	270,000	1,170,000
24年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：BACH1, がん微小環

1. 研究開始当初の背景

腫瘍の増殖および進展には癌細胞のみの性質だけでなく、その近傍に位置する間質細胞を含んだ微小環境が非常に重要であるという『tumor-stromal interaction』の考え方は古くから存在し、近年、その具体的な機序が段々と明らかになってきた。本研究代表者自身、子宮体癌細胞がその近傍にある間質細胞由来エストロゲン合成酵素の影響を受けていることを明らかにしている (Matsumoto *et al.*, *Endocr Relat Cancer* 2008, Takahashi- Shiga N *et al.*, *Clin Cancer Res* 2009)。

さらに一歩進めて、腫瘍悪性化メカニズムを微小環境を含んだネットワークとして捉え、癌細胞の生育環境を整えることで、異種細胞の生着感度の高いモデルマウスを構築できるのではないかとの着想に至った。

最近トピックとなっているがん研究の領域は『cancer stem cell theory』に基づいた研究である。これは、癌にも自己複製能と多分化能を併せ持つ stem cell 様の細胞が存在し、癌の転移や抗がん剤耐性に関与しているというものである。造血幹細胞システムの研究成果を基に進められた白血病幹細胞の研究とは異なり、固形癌はその形成に長い時間を費やしており、複数の遺伝子変異を持つことが多い。さらに、癌幹細胞は少数しか存在しない。そのため、同定されたマーカーは癌種によって全く異なり、加えて、同一種の癌細胞においても複数のマーカーが必要となり判断に困窮することが多い。また、さらなるハードルとして、最終的な幹細胞様細胞の同定には、細胞の免疫不全マウスへの移入による *in vivo* での腫瘍形成が求められる。しかし、異種細胞移植のため生着感度は低い。現在、生着感度を上げるため超免疫不全マウ

スと呼ばれる SKID マウスや NOG マウスなどが汎用され始めたが、腫瘍形成能が癌幹細胞様細胞の認定の要となっている今、固形癌の癌幹細胞研究の発展のためには、異種細胞の生着感度のより高いモデルマウスの作出が急務である。従って本研究では、NOG マウスの更なる遺伝子改変により、異種細胞生着にとって最適化された微小環境を有するモデルマウス作り出すことを考えた。

当研究協力者の五十嵐のグループは近年、酸化ストレスを制御している転写抑制因子 Bach1 が、p53 と間接的ながらも結合し、細胞老化制御に寄与していることを報告した (Dohi *et al.*, *Nat Struct Mol Biol.* 2008)。細胞老化は癌の発生に深く関係しているだけでなく、老化した癌周辺細胞は IL-6, -7, -8, VEGF 等を高産生し、癌細胞を刺激することで、悪性化へと導くことが知られている。最近、我々は Bach1 が直接的にも間接的にも腫瘍細胞の遊走や浸潤を含む癌転移に関わる可能性を見出した。Bach1 ノックアウトマウスの上皮細胞において、上皮 - 間葉移行 (EMT) にとって重要な因子である Snail および Twist が、野生型のものと比べマイクロアレイ解析で約 2 倍高かった。Bach1 欠失型 MEF 細胞の分泌物はパラクライン的に、乳癌細胞の遊走および浸潤能を有意に増加させた。Bach1 ノックアウト MEF 細胞と乳癌細胞を混合してヌードマウスの fat pad に移植すると、野生型マウスの MEF 細胞と混合したものと比較して、癌細胞の増殖は変わらないものの、血管新生が促進され、さらにリンパ節転移および肺転移の誘発を増強した。以上より、Bach1 は癌細胞の活性化を抑制していることが示唆された。他方、肝癌、卵巣癌では癌周囲の細胞が老化しているとの報告がある。また、癌細胞周辺の線維芽細胞は cancer-associated fibroblast (CAF) と呼ば

れ、特に癌の悪性化促進に関係すると言われている。すなわち、BACH1 ノックダウン細胞が癌細胞に対して、CAF 様に作用する可能性が示唆される。従って、Bach1 を欠失させた超免疫不全マウスは高感度にヒト癌細胞を生着できる環境を保持したマウスとなることが期待される。また、間質細胞を含むヒト腫瘍細胞における BACH1 の作用について、異なるメカニズムが解明できれば、Bach1 欠失型超免疫不全マウスの癌研究への利用価値はより高まるであろう。

2. 研究の目的

本研究3年間における最終目標は、ヒト癌幹細胞の生着およびそれを含むヒト癌細胞転移を高感度に評価できるモデルマウスを構築することである。近年、我々はBach1欠失型 Mouse Embryonic Fibroblast (MEF)が細胞間相互作用を通して癌細胞の増殖および転移を促進する可能性を見出した。そこで、Bach1 欠失型超免疫不全マウスを作製する一方で、がんの微小環境を含んだヒト腫瘍組織を意識し、癌細胞の浸潤・転移・分化における BACH1 の影響およびそのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Bach1 欠失型超免疫不全マウスの作出

東北大学医学系研究科生物化学分野の五十嵐の協力によって、C57BL/6 系の Bach1 欠失型マウスを入手した。また、NOD/Scid 系の NOG マウスは、Scid-IL2 γ c ノックアウトマウスを NOD 系マウスと交配することで作出した T 細胞、B 細胞が機能不全という特徴を持つ超免疫不全マウスであり、実験動物中央研究所が保有する。これら異なる系統由来のマウスを人工授精において掛け合わせた。

(2) 間質細胞にあたる Bach1 の影響および

そのメカニズムの解明 Bach1 は転写抑制因子として知られているが、その標的的全貌は分かっていない。我々は Bach1 の転写制御が CAF 用の効果に影響を与えていると考え、次世代シーケンス技術 (SOLiD4) を用い、不死化 MEF 細胞における Bach1 の ChIP-seq を行った。1x10⁸ cells の不死化 MEF 細胞を、0.7%ホルムアルデヒドを用いて固定した。固定後、超音波破砕機 (Covaris) によって 100-300 塩基長になるように DNA を切断した。Bach1 および Bach1 とヘテロ量体を形成して転写を抑制することが知られている MafK 抗体を用いて、免疫沈降を行った。脱クロスリンク後、DNA 精製を行い、これを用いて DNA ライブラリーを調整した。シーケンスのマッピングには Bowtie を用い、ピーク解析には MACS を用いた。Bach1 結合モチーフ解析は MEME および TOMTOM によって行った。

また、Bach1 の機能的な標的を予測するために、Bach1 欠損型不死化 MEF 細胞と野生型不死化 MEF 細胞の DNA マイクロアレイ (Whole Mouse Genome oligo DNA Microarray kit, 4x44K; Agilent) 遺伝子発現解析を行った。この際、各系、異なる胎児由来不死化 MEF 細胞 3 株を実験に供した。マイクロアレイの結果の解析には GeneSpring を用いた。

Bach1 のゲノム結合配列を同定するため、ゲルシフトアッセイを行った。プローブは ChIP-seq において Bach1 の結合が確認された領域内における、MEME で検出されたモチーフ様配列について作製した。Bach1 および MafK タンパク質は大腸菌発現系によって作製した、各全長タンパク質を用いた。

Pparg1、HO-1、Fabp4、ADRP、LXRA および CD36 遺伝子の qPCR はライトサイクラー (ロシュ) を用いて行った。

ウエスタンブロッティングには、抗 Ppar γ モノクローナル抗体 (E-8, santa

cruz biotech.)、および内部標準コントロールとして、抗 GAPDH モノクローナル抗体 (ab8245, abcam) を用いた。

不死化 MEF 細胞の脂肪細胞への分化誘導のため、10 $\mu\text{g/ml}$ インスリン、0.5 mM IBMX および 1 μM DEX を誘導剤として用いた。また、更なる分化誘導促進剤として、5 μM ロシグリタゾンを添加した。誘導剤添加後、2 日間培養した後、一日置きに、メンテナンス培地 (1 $\mu\text{g/ml}$ インスリン、5 μM ロシグリタゾン、10% FBS を含む DMEM 培地) を用いて培地交換を行った。脂肪細胞分化誘導開始、8 日後、不死化 MEF 細胞の脂肪細胞への分化はオイルレッド O 染色を行うことで確認した。

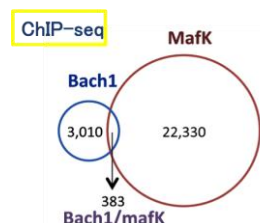
4. 研究成果

(1) Bach1 ノックアウト超免疫不全マウスの作出 まだ Bach1 欠損型 NOG マウスの作出にはいたっていない。しかし、NOG と Bach1 ノックアウトマウスの掛け合わせには成功しており、平成 25 年年度中の完成を目指している。

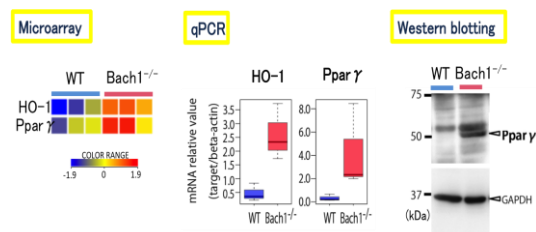
(2) 間質細胞にあたる Bach1 の影響およびそのメカニズムの解明 不死化 MEF 細胞を用いた Bach1 および MafK の ChIP-seq 解析によって、不死化 MEF 細胞ゲノム上での Bach1 の結合領域として、3,393 箇所、MafK の結合領域として 22,713 箇所が同定された。その内、Bach1 と MafK が同じ領域に結合していると考えられたのは 383 箇所であった。

383 箇所の内、DNA マイクロアレイ遺伝子発現解析によって、Bach1 が無いと発現が上昇する

ことが確認され、なおかつ、その遺伝子近傍の同領域に Bach1 と MafK が結合していたの



は、Bach1 と MafK によって転写抑制されていることが既によく知られているの HO-1 遺伝子と本研究によって初めて明らかになった Pparg 遺伝子のみであった。Pparg は Bach1 欠損不死化 MEF 細胞において、野生型不死化 MEF 細胞と比較して、mRNA 量においても、タンパク質量においても発現が上昇していることを確認した。

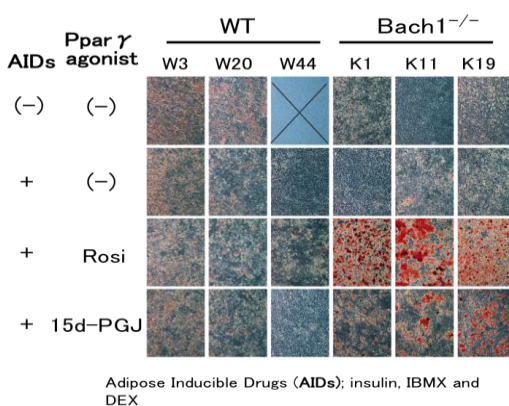


そこで、我々は、Bach1 の新規機能的転写抑制標的として、Pparg 遺伝子への Bach1 の結合に注目した。ChIP-seq 解析によって、Bach1 は Pparg 遺伝子の intron 1 に結合していることが分かった。従って、モチーフ解析から得られた配列を参考に、Bach1 結合領域から類似の配列を抽出し、プローブを設計後、ゲルシフトアッセイを行うことで、Bach1 結合配列の同定を試みた。その結果、Bach1 は TGCTTTGCA という MARE 様配列に結合していることが判明した。そこで、次に Bach1 の欠失によって発現が上昇した Ppar γ が機能的に作用できるかを調べた。Ppar γ はリガンド依存的に標的遺伝子の転写を活性化する。Bach1 欠損型および野生型不死化 MEF 細胞に Ppar γ のアゴニストである、プロスタグランジン J2 を添加した後、Ppar γ の標的遺伝子である、脂肪代謝関連遺伝子群 (Fabp4, ADRP, LXRA, CD36) の発現を qPCR にて確認した。この時、脂肪代謝関連遺伝子群は Bach1 欠損不死化 MEF 細胞のみで、リガンド依存的に発現を上昇させた。また、Ppar γ のアゴニストの添加は、これら遺伝子群の発現上昇を抑制した。Ppar γ は脂肪細胞の分化にとって、重

要な因子である。従って、我々はさらに、Bach1 欠損型および野生型不死化 MEF 細胞の脂肪細胞への分化誘導を試みた。その結果、Bach1 欠失型不死化 MEF 細胞のみで、Ppar γ アゴニスト依存的に脂肪細胞への分化が促進されることが判明した。以上より、Bach1 は機能的な Ppar γ を抑制制御していることが示唆された。

Ppar γ は微小環境での腫瘍への抑制効果が報告されているが、我々はBach1欠失型MEF細

Oil-red O staining



胞が腫瘍との共培養によって、その悪性化に寄与することを観察している。間質細胞由来のPpar γ が本当に腫瘍の抑制に働くならば、Bach1を抑制すると同時にPpar γ の発現を抑制することによって、本研究の最終目標である、腫瘍定着モデルマウスの向上につながるかもしれない。

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. Kera Y, Katoh Y, Ohta M, Matsumoto M, Takano-Yamamoto T, Igarashi K. Methionine Adenosyltransferase II-dependent Histone H3K9 Methylation at the COX-2 Gene Locus.

J Biol Chem. 査読有, 2013, 288:13592-13601.

2. Gohno T, Seino Y, Hanamura T, Niwa T, Matsumoto M, Yaegashi N, Oba H, Kurosumi M, Takei H, Yamaguchi Y, Hayashi S. Individual Transcriptional Activity of Estrogen Receptors in Primary Breast Cancer and Its Clinical Significance. Cancer Medicine. 査読有, 2012, 1:328-337.

3. Nakanome A, Brydoun A, Matsumoto M, Ota K, Funayama R, Nakayama K, Ono M, Shiga K, Kobayashi T, Igarashi K. Bach1 is critical for the transformation of mouse embryonic fibroblast by RasV12 and maintains ERK signaling. Oncogene. 査読有, 2012. Published online : doi: 10.1038/onc.2012.336.

[学会発表] (計 2 件)

1. 松本光代、ブリドンアンドレイ、舟山 亮、西田有一郎、中山啓子、八重樫伸生、五十嵐和彦、Bach1 の繊維芽細胞における Pparg 遺伝子発現制御を介した脂肪分化誘導 第 35 回分子生物学会、2012 年、12 月 11 日、福岡

2. 松本光代、ブリドンアンドレイ、中目亜矢子、舟山 亮、西田有一郎、中山啓子、八重樫伸生、五十嵐和彦、Bach1 の転写制御標的遺伝子の同定 第 34 回分子生物学会、2011 年、12 月 15 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 光代 (MATSUMOTO MITSUYO)

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号 : 8 0 4 0 0 4 4 8