

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590351

研究課題名(和文)ミトコンドリア転写因子mtTFAの核内発現の意義とストレス耐性機構の解明

研究課題名(英文)Significance of nuclear expression of mitochondrial transcription factor mtTFA and elucidation of stress resistance

研究代表者

和泉 弘人 (IZUMI, Hiroto)

産業医科大学・産業生態科学研究所・准教授

研究者番号：50289576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：TFAM (transcription factor A, mitochondrial) から合成された転写因子mtTFAは、ミトコンドリアに移行し、種々の遺伝子発現を転写レベルで制御している。本研究では、mtTFAは、ミトコンドリアだけでなく核内にも存在すること、抗アポトーシス遺伝子であるBIRC5 (Survivin)やBCL2L1 (BCL-xL)の発現を転写レベルで制御すること、がん細胞の増殖がmtTFAの発現と密接に相関すること、mtTFAの核内発現は漿液性卵巣がんの予後不良因子であることを見出した。これらの研究成果は、mtTFAを分子標的とするがん治療に貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：mtTFA synthesized from TFAM (transcription factor A, mitochondrial) gene translocates to mitochondrion and regulates various gene expressions. In this study, we found that mtTFA was also present in not only mitochondrion but also nucleus, mtTFA regulated anti-apoptotic gene expressions such as BIRC5 (Survivin) and BCL2L1 (BCL-xL) at the transcriptional level, the growth of cancer cells was closely correlated with the expression of mtTFA and the nuclear expression of mtTFA was a poor prognostic factor in serous ovarian cancer. These findings suggest that mtTFA might function as anti-apoptosis through gene expressions. Molecular mtTFA targeted therapy might contribute to cancer treatment.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：mtTFA 遺伝子発現 転写因子 抗アポトーシス ストレス耐性

1. 研究開始当初の背景

(1) TFAM は核にコードされた遺伝子で、TFAM から合成されたタンパク質 mtTFA (mitochondrial transcription factor A)はミトコンドリアに移行し、種々の遺伝子発現を転写レベルで制御している(文献1)。mtTFAの構造的特徴はミトコンドリア移行シグナルと DNA に結合する HMG (high mobility group)ボックスを持つことである。HMG ボックスをもつ HMGB1 は、p53 や NF- κ B などの転写因子の機能発現に重要な核内 DNA 結合タンパク質であると同時に、活性化された樹状細胞、マクロファージ、あるいは壊死細胞から細胞外に放出され、周辺細胞が発現している RAGE、TLR2 や TLR4 にリガンドとしても作用する。また、HMGB1 はシスプラチン修飾 DNA に高い親和性があることが報告されているが、我々は HMGB1 が p53 と分子会合すること、また、p53 との分子会合により HMGB1 のシスプラチン修飾 DNA の結合能が亢進することを報告した(文献2)。次に、同じ HMG ボックスをもつ mtTFA で検討したところ、mtTFA はシスプラチン修飾 DNA のみならず酸化損傷 DNA にも結合することを見出した(文献3)。さらに、p53 はミトコンドリアに移行し、mtTFA と分子会合すること、分子会合により mtTFA の損傷 DNA 結合能が制御されることを見出した(文献4)。Thioredoxin2 はミトコンドリアで機能する抗酸化タンパク質であるが、最近、mtTFA と分子会合すること、分子会合により Thioredoxin2 が mtTFA の損傷 DNA 結合能を制御していることを報告した(文献5)。

(2) 臨床検体を用いた解析から子宮内膜がんにおいて mtTFA の発現が高いほど予後不良になることを見出した(文献6)。未発表であるが、大腸がん症例においても mtTFA は予後不良分子であることを観察している。しかしながら、mtTFA の高発現がどうして予後不良になるのか、その分子機序は全く不明である。ミトコンドリアの ATP 合成に関わる遺伝子発現には mtTFA は必須であるが、がん細胞では嫌氣的解糖系を優位に利用しているため ATP 合成の視点から mtTFA の発現が亢進している理由は不明である。

(3) がんににおいて mtTFA はミトコンドリア以外で機能しているのではないかと考えて検索した。mtTFA は HMG ボックスを2つ有しているが、HMG ボックス内には共通して核移行シグナルがあるため核に移行し転写因子として機能する仮説を立てた。現時点で確認できていることは、抗 mtTFA 抗体を用いたウエスタンブロットの結果から mtTFA は培養がん細胞の核内にも発現していること、mtTFA の発現を mtTFA siRNA でノックダウンさせた細胞を用いた cDNA マイクロアレイの結果から核にコードされ

ている遺伝子の発現が mtTFA のノックダウンに伴い多数減少していることである。これらの結果は mtTFA が核内で遺伝子発現を制御していることを強く示唆するものである。しかしながら mtTFA が核の転写因子として機能する可能性だけでなく、核に存在することすら全く報告されていない。

参考文献

1. Parisi MA, Clayton DA. Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins. *Science* 1991;252:965-9.
2. Imamura T, Izumi H, Nagatani G, Ise T, Nomoto M, Iwamoto Y, Kohno K. Interaction with p53 enhances binding of cisplatin-modified DNA by high mobility group 1 protein. *J Biol Chem* 2001;276:7534-40.
3. Yoshida Y, Izumi H, Ise T, Uramoto H, Torigoe T, Ishiguchi H, Murakami T, Tanabe M, Nakayama Y, Itoh H, Kasai H, Kohno K. Human mitochondrial transcription factor A binds preferentially to oxidatively damaged DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:945-51.
4. Yoshida Y, Izumi H, Torigoe T, Ishiguchi H, Itoh H, Kang D, Kohno K. P53 physically interacts with mitochondrial transcription factor A and differentially regulates binding to damaged DNA. *Cancer Res* 2003;63:3729-34.
5. Kidani A, Izumi H, Yoshida Y, Kashiwagi E, Ohmori H, Tanaka T, Kuwano M, Kohno K. Thioredoxin2 enhances the damaged DNA binding activity of mtTFA through direct interaction. *Int J Oncol* 2009;35:1435-40.
6. Toki N, Kagami S, Kurita T, Kawagoe T, Matsuura Y, Hachisuga T, Matsuyama A, Hashimoto H, Izumi H, Kohno K. Expression of mitochondrial transcription factor A in endometrial carcinomas: clinicopathologic correlations and prognostic significance. *Virchows Arch* 2010;456:387-93.

2. 研究の目的

本研究の目的は、mtTFA が核に移行する機序、核内における遺伝子発現調節機能の解明および標的遺伝子を同定し、種々のストレス耐性に対する mtTFA の核内発現の意義を明らかにすることである。

(1) ストレス応答遺伝子やアポトーシス関連遺伝子に注目して mtTFA の核内標的遺伝子の同定を行う。酸化ストレスや抗がん剤ストレスによる細胞応答に mtTFA がどのように関与しているのかを明らかにする。

(2) 臨床検体を用いて、mtTFA の核内発現と予後との相関を検討し、核内発現の意義を明らかにする。

(3) 最終的に「mtTFA はストレス耐性分子である」という仮説を証明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) mtTFA の核内発現解析

抗 mtTFA 抗体を用いたウエスタンブロット解析：抗 mtTFA 抗体はすでに作製している。培養がん細胞を核と細胞質に分画したウエスタンブロットを行い、mtTFA が核内に発現していることを確認する。がん細胞は前立腺がん細胞株 (PC3 細胞、SKR1 細胞、Caki-1 細胞) と卵巣がん細胞株 (A2780 細胞、MCAS 細胞、OVK18 細胞、OVK18#102 細胞、OVMG1 細胞、RMG1 細胞、TYK-nu 細胞) を用いる。これらがん細胞における mtTFA の核と細胞質の存在比率を求める。これらの結果から、mtTFA の核内発現と細胞・組織特異性を検討する。

抗 mtTFA 抗体を用いた免疫染色解析：培養がん細胞および組織における mtTFA の発現を検討する。培養がん細胞では細胞から核を分離して免疫染色を行う。組織染色では、1995年から2007年までの間に産業医科大学で治療を受けた漿液性卵巣がん患者 60 症例と1997年から2000年までの間に産業医科大学で治療を受けた原発性大腸がん患者 105 症例について行う。これらの症例の組織評価や予後評価と mtTFA 発現の相関・関連を検討する。

(2) mtTFA の核内標的遺伝子の同定作業

mtTFA 標的遺伝子の探索：mtTFA siRNA で処理した前立腺がん PC3 細胞を用いた DNA マイクロアレイ解析の結果をすでに得ている。この中から、細胞増殖および細胞分裂、ストレス応答、アポトーシス関連の遺伝子に焦点を絞り検索する。また、Database of Transcriptional Start Sites (<http://dbtss.hgc.jp/>) のプログラムを使用して mtTFA が結合する遺伝子のプロモーターを探索する。これらの解析から mtTFA 標的遺伝子の候補を選定する。

mtTFA のプロモーター結合解析：抗 mtTFA 抗体を用いてクロマチン・転写因子複合体を免疫沈降し、選定された遺伝子のプロモーターに mtTFA が結合しているか PCR で検討する。

mtTFA の転写活性の解析：(2) のおよびの結果から、mtTFA が結合する遺伝子のプロモーターを単離し、ルシフェラーゼ遺伝子を連結させたレポータープラスミドを作製する。このレポータープラスミドをがん細胞に導入し、mtTFA の発現を増加あるいは減少させた時の転写活性を測定する。mtTFA の発現増加には mtTFA 発現プラスミ

ドを利用し、発現減少には mtTFA siRNA を利用する。

(3) mtTFA の細胞生物学的機能解析

mtTFA siRNA で処理し mtTFA の発現を減少させたがん細胞や mtTFA を過剰に発現させたがん細胞を用いて細胞増殖能の変化を比較する。細胞の増殖が影響を受けた場合は細胞周期解析 (フローサイトメトリー) を行う。

4. 研究成果

(1) mtTFA は核内で転写因子として機能し、がん細胞の増殖を制御する。

2 種類の前立腺がん細胞株 (PC3 細胞、SKR1 細胞) を用いて、細胞を核と細胞質に分画したのち、ウエスタンブロットで mtTFA のタンパク発現を検討したところ、両細胞株において細胞質分画だけでなく核分画にも mtTFA のシグナルが観察された。また、核を単離して行った免疫染色でも核内に mtTFA のシグナルが観察されたことから mtTFA は核内に存在することが示唆された。さらに3種類の前立腺がん細胞株 (PC3 細胞、SKR1 細胞、Caki-1 細胞) を用いて、mtTFA の核と細胞質の発現比率を検討したところ、33%から43%が核に発現していた。さらに、核内の約半分の mtTFA はクロマチンに強固に結合していることが示唆された。

mtTFA が核内で転写因子として機能することを証明するために mtTFA が結合するプロモーターを Database of Transcriptional Start Sites (<http://dbtss.hgc.jp/>) で検索した。その結果、ゲノム DNA にコードされ、抗アポトーシス遺伝子の一つである BIRC5 (Sruvivin) がその候補にあがった。そこで mtTFA が BIRC5 の発現を転写レベルで制御しているか検討した。クロマチン免疫沈降法により、mtTFA は BIRC5 のプロモーターに結合することを観察した。BIRC5 のプロモーター領域 (-992 から+110) がルシフェラーゼ遺伝子に連結されたレポータープラスミドを前立腺がん PC3 細胞に導入して解析した結果、mtTFA の発現を増加させるとルシフェラーゼ活性は上昇し、逆に減少させるとルシフェラーゼ活性は低下した。これらの結果は、mtTFA は BIRC5 のプロモーターに直接結合し、転写を正に制御していることを示唆する。これに一致して、mtTFA の発現を増加させると BIRC5 のタンパク量は増加し、逆に mtTFA の発現を減少させると BIRC5 のタンパク量は減少することをウエスタンブロットで確認した。

前立腺がん PC3 細胞を用いて mtTFA を過剰発現させるとがん細胞の増殖は促進し、逆に siRNA で mtTFA の発現を一過性に減少させると細胞の増殖は著しく低下した。この原因として mtTFA の発現低下により細胞周期 G1 停止が誘導されることが示唆された。

(2) mtTFA は BCL2L1 の遺伝子発現を制御し、漿液性卵巣がんの予後因子である。

卵巣がん培養細胞株 (A2780 細胞、OVK18#102 細胞) を用いて mtTFA の核内発現をウエスタンブロットで検討した。その結果、A2780 細胞では 55% が、OVK18#102 細胞では 87% が核に発現していた。60 症例の漿液性卵巣がん患者において mtTFA の核内発現と予後を検討した結果、mtTFA が核内に染色されると予後が不良であった。

② 7 種類の卵巣がん細胞株を用いて mtTFA、BIRC5、BCL2L1 の発現をウエスタンブロットで検討した。その結果、mtTFA の核内発現と BCL2L1 の発現に有意な正の相関を観察した。一方、BIRC5 の発現と mtTFA の核内発現に相関は見られなかった。

③ mtTFA siRNA を用いて A2780 細胞および OVK18#102 細胞の mtTFA の発現を減少させると BCL2L1 の発現は減少した。この発現低下が転写レベルで起こっているのか検討した。その結果、クロマチン免疫沈降法により mtTFA は BCL2L1 のプロモーターに結合することを観察した。BCL2L1 のプロモーター領域 (-1915 から +235) がルシフェラーゼ遺伝子に連結されたレポータープラスミドを卵巣がん A2780 細胞に導入して解析した結果、mtTFA の発現を増加させるとルシフェラーゼ活性は上昇し、逆に減少させるとルシフェラーゼ活性は低下した。これらの結果は、mtTFA は BCL2L1 のプロモーターに直接結合し、転写を正に制御していることを示唆する。

(3) 大腸がんにおける mtTFA 発現は腫瘍の進展と予後不良のマーカーになる。

105 症例の大腸がん患者のがん組織を mtTFA で染色した。その結果、47 人 (44.8%) の患者は mtTFA に陽性であり、陰性の患者に比べて予後が不良であった。

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)

Nakayama Y, Yamauchi M, Minagawa N, Torigoe T, Izumi H, Kohno K, Yamaguchi K.

Clinical significance of mitochondrial transcription factor A expression in patients with colorectal cancer.

Oncol Rep. 27(5):1325-1330, 2012

doi: 10.3892/or.2012.1640.

査読有

Kurita T, Izumi H, Kagami S, Kawagoe T, Toki N, Matsuura Y, Hachisuga T, Kohno K.

Mitochondrial transcription factor A regulates BCL2L1 gene expression and

is a prognostic factor in serous ovarian cancer.

Cancer Sci. 103(2):239-444, 2012

doi: 10.1111/j.1349-7006.2011.02156.x.

査読有

Han B, Izumi H, Yasuniwa Y, Akiyama M, Yamaguchi T, Fujimoto N, Matsumoto T, Wu B, Tanimoto A, Sasaguri Y, Kohno K.

Biochem Biophys Res Commun. 29:408(1):45-51, 2011

doi: 10.1016/j.bbrc.2011.03.114.

査読有

[学会発表] (計 3 件)

栗田智子, 鏡誠治, 卜部理恵, 川越俊典, 土岐尚之, 松浦祐介, 蜂須賀徹, 和泉弘人, 河野公俊

mtTFA は卵巣漿液性嚢胞腺癌の予後不良分子で Bcl-XL の発現を制御する
第 63 回 日本産科婦人科学会学術講演会

2011 年 8 月 29-31 日

リーガロイヤルホテル大阪および大阪国際会議場 (大阪)

秋山正樹, 和泉弘人, 栗田智子, 山口享宏, 安庭義浩, 河野公俊

mtTFA は核で BCL2L1 の発現を制御し漿液性卵巣がんにおける予後不良因子である

第 15 回 日本がん分子標的治療学会学術集会

2011 年 6 月 22-24 日

ホテル日航東京 (東京)

Akiyama M, Izumi H, Kurita T, Yamaguchi T, Yasuniwa Y, Hachisuga T, Kohno K

mtTFA regulates BCL2L1 gene expression and its one of the prognostic factors in serous ovarian cancer.

第 70 回 日本癌学会学術集会

2011 年 10 月 3-5 日

名古屋国際会議場 (名古屋)

[その他]

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和泉 弘人 (IZUMI Hiroto)

産業医科大学・産業生態科学研究所・准教授

研究者番号: 50289576

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者

島尻 正平 (SHIMAJIRI Shohei)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30320344