

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659168

研究課題名（和文） がんの間質細胞遺伝子依存性を制御する転写因子網の解明

研究課題名（英文） Elucidation of the transcription factor network that regulates cancer-stroma interaction

研究代表者

五十嵐 和彦 (IGARASHI KAZUHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00250738

研究成果の概要（和文）：

がんの形成には間質細胞とのシグナル相互作用が重要であり、間質細胞側の機能変化や遺伝的変化もがん進展に重要と予想される。本研究では間質細胞側の機能を転写因子 Bach1 が制御する可能性に着目し、Bach1 の発がんモデルにおける機能、Bach1 の下流標的遺伝子群の探索、ヒト細胞における BACH1 機能の制御機構の解明を進めた。Bach1 の間質細胞における重要性が明らかとなり、今後、がん組織における Bach1 の機能を追求する基盤を構築することができた。

研究成果の概要（英文）：

Interaction between stroma and cancer cells appears critical for the development of cancer. However, little is known about how the functions of stroma cells are regulated at the level of gene expression. In this project, we focused on the transcription factor Bach1 on which we had several preliminary observations suggesting its important roles in the cancer-stroma interaction. We found that Bach1 is critical for tumor formation in several mouse model systems. We identified downstream genes of Bach1 which appeared to be critical for the stroma function. We also studied the regulation of BACH1 in human stroma cells. These results will be an important foundation for future studies on the cancer-stroma interaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学、転写因子、ケモカイン、サイトカイン、Bach1

1. 研究開始当初の背景

がん細胞の特性に関して、“non-oncogene addiction（非がん遺伝子依存性）”という概念が近年注目を集めつつある。これは、がん遺伝子やがん抑制遺伝子の変異により惹起される細胞内シグナルや代謝の変化ががん細胞に対してストレスを引き起こし、それ

を解消するために代謝系やストレス応答系を中心とする適応反応がおきているという事実に立脚する (Luo et al, Cell 136, 823-, 2009)。このような進展を受け、非がん遺伝子依存性の分子機構をがん治療法へと展開する試みが世界的に始まっている。一方、がん組織の微小環境では間質細胞が様々なシ

グナルを発信し、がん細胞の増殖を促進したり免疫系の攻撃を防いだりすることが知られている。しかし、腫瘍間質細胞の機能ががん微小環境の中でどのように制御されているのか、そしてその結果、いかにしてがん化を促すのか、具体的な知見はまだ乏しい。課題の一つは、がん細胞-間質細胞の相互作用を検出する実験系の開発が遅れていることにある。

申請者らは、がん間質細胞の遺伝子発現が変化することにより、がん進展が著しく促進されることをマウスモデルで見いだした。この実験ではマウス線維芽細胞（それ自体は腫瘍を形成しない）とヒト乳癌細胞とを混合し、ヌードマウスに移植した。転写抑制因子 Bach1 を欠損する線維芽細胞は乳癌細胞の増殖を著しく促進し、血管新生、上皮間葉転換（Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT）も促進されていた。このことから、間質細胞のがん促進に関わる機能を Bach1 が間質細胞中で抑制していると考えられる。この知見から、がん細胞が「間質細胞の特定の遺伝子機能に強く依存する」（stroma gene addiction）というアイデアを得るに至った。non-oncogene addiction は細胞自律性の依存であるのに対して、これは間質細胞中の遺伝子に対する依存である。しかも、ここで想定される遺伝子は間質細胞自体の増殖や生存には必須ではないであろう。こういった点で、stroma gene addiction は概念的にも新しい。

2. 研究の目的

stroma addiction をマウスモデルで評価する実験系を開発し、stroma gene addiction に関わる遺伝子・分子の候補を網羅的に調べる。これにより、新規の予後評価や治療標的分子の開発戦略への端緒とする。本研究の独創性は、stroma gene addiction に関わる間質細胞側の遺伝子応答を転写因子 Bach1 が抑制している点にあり、類似研究は世界的にも見あたらない。

3. 研究の方法

(1) 時間制御可能な腫瘍間質細胞モデルマウス・細胞の作製

loxP システムを用いた条件的ノックアウトマウスを構築し、がん移植実験に活用できるようにする。

(2) 既存のモデルマウスを用いた発現プロ

ファイル比較

既に報告した Bach1 ノックアウトマウス由来の線維芽細胞の遺伝子発現プロファイル比較を行い、間質細胞側における遺伝子発現異常を特定し、Bach1 による制御機構を調べる。

(3) 抗ヒト BACH1 モノクローナル抗体の作製

ヒトがん組織における BACH1 の量的質的異常を検索するために、モノクローナル抗体を作成する。

(4) 候補遺伝子機能の解析

Bach1 下流標的遺伝子の機能を調べる。

(5) がん組織における BACH1 タンパク質発現

上で作成されるモノクローナル抗体を用いた組織染色の条件を決定する。さらに、ヒトがん病理組織を用いて BACH1 タンパク質の量的質的变化の有無を調べる。

4. 研究成果

(1) 時間制御可能な腫瘍間質細胞モデルマウス・細胞の作製

loxP システムを用いた条件的ノックアウトマウスの構築を学外共同研究者とともに進めている。予定よりも大幅に遅れているが、これは当初予定したこの実験の代替実験を構想し、その妥当性を検討していたために着手が遅れたものである。震災により研究室の活動が大きく低下したために代替実験で時間を節約することを考えたが、結果としてはやはり当初計画した研究を遂行することが必要との判断に至ったものである。既にターゲティングベクター構築は終える等、着実に進んでいるので、この萌芽研究の成果に立脚した新しいプロジェクトの中で大いに活用することにしたい。

(2) 既存のモデルマウスを用いた発現プロファイル比較

Bach1 ノックアウトマウス由来の線維芽細胞では、老化細胞に伴う分泌形質 (secretory phenotype) が大幅に上昇することを見いだした。特に、IL-6 や TNF- α など、がん間質細胞の機能を考える上でも重要と思われるサイトカインの上昇を確認できたことは大きな成果と思われる。

この分泌形質の制御機構についても検討を加えた。以前、Bach1 は p53 に結合してその転写活性化を抑えることを報告していた

が、この分泌形質亢進も部分的ではあるが p53 に依存していることを確認した。また、癌抑制因子の一つである p19^{ARF} が誘導されると Bach1 と複合体を形成し、Bach1 と p53 の相互作用を阻害することも見いだした。本来がんを抑制するシステムが、がん間質細胞の側ではその分泌形質の活性化に関わる可能性が考えられた。

また、これらサイトカイン発現を制御することが知られている NEMO の発現も亢進していることを見いだした。

(3) 抗ヒト BACH1 モノクローナル抗体の作製

バキュロウイルスを用いたヒト BACH1 過剰発現系を構築した。これより BACH1 を精製し、マウスへ免疫した。定法に従い、ハイブリドーマを作成し、スクリーニングを行った。ヒト BACH1 を認識するモノクローナル抗体を複数種得ることができた。いずれもウエスタンブロット解析に利用でき、一部は免疫沈降実験やヒト細胞内在性 BACH1 の抗体染色にも利用できることを確認した。

本研究の着手を想定してハイブリドーマのスクリーニングを 2011 年 1 月より開始していたが、震災により全てのクローンを失い、さらに細胞培養関係の設備もほぼ全壊して再開まで時間を要した、などなど、震災により大きな損害をこのテーマでも受けた。しかし、研究期間中に目的のモノクローナル抗体を作成できたことには満足しているところである。

(4) 候補遺伝子機能の解析

NEMO は I- κ B をリン酸化することにより NF- κ B の活性を上昇させることが知られている。そこで、IL-6 や TNF- α などのサイトカインの分泌上昇は、NEMO 発現上昇による NF- κ B 活性の亢進に由来するという仮説をたてた。正確には上に述べたように p53 経路も寄与していることは間違い無いが、本研究の中では NEMO も含めた NF- κ B 経路に焦点をあてることとした。

実際、Bach1 ノックアウト細胞では NF- κ B の活性が上昇していることをゲルシフト法を用いて見いだした。逆に、NEMO をノックダウンすることにより、IL-6 や TNF- α などの発現上昇が減弱することも確認した。さらに、がん間質細胞としての作用（遊走活性化など）も NEMO のノックダウンで低下した。クロマチン免疫沈降実験により、Bach1 は NEMO 遺伝子に直接結合していることを見いだし

た。この結合部位を組み込んだリポータープラスミドを作成し、Bach1 がこの部位を介して NEMO 遺伝子の発現を抑制し得ることも確認した。これらの結果より、Bach1 は直接 NEMO 遺伝子発現を抑制することにより NF- κ B 経路を阻害し、がん間質細胞の機能を抑制する可能性が示唆された。すなわち、細胞内外からのシグナルにより Bach1 の活性が低下した際には、NEMO 発現の上昇により NF- κ B が活性化し、サイトカイン産生などの分泌形質が亢進することが予想される。

(5) がん組織における BACH1 タンパク質発現

上で作成されたモノクローナル抗体を用いた組織染色の条件を決定した。さらに、ヒトがん病理組織を用いて BACH1 タンパク質の染色が可能であることを確認した。現在、いくつかのがん種に絞って病理的検索を進めている。また、ヒトがん培養細胞株を用いることにより、BACH1 の細胞内分布がヘムや各種刺激に応答して大きく変動する（核外への輸送が活性化する）ことを見いだした。これは内在性 BACH1 の制御機構を初めて解明したものであり、ヒトがん組織における BACH1 の機能を考える上で重要な知見と言える。

(6) 震災による影響

この研究課題を開始するための予備的研究は課題採択前に開始していた。震災によりモノクローナル抗体作成は大幅に遅れている。そのため、BACH1 抗原による吸収実験が未了であること、十分な数の検体数を解析できていないこと、などなど、完成には至っていない。また、条件的遺伝子破壊については、震災による研究再開が困難であったことなどから、代替実験も検討したが、最終的には当初計画通り進めることとなった。このように、震災により計画の一部が遅れが生じたが、全体としては萌芽研究としての目的は十分に達成できたものと判断している。得られた成果に基づいてさらに研究を発展させていきたい。

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 5 件)

1. Nakanome A, Brydun 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 fibroblasts by Ras (V12)

- and maintains ERK signaling.、Oncogene、
査読有、印刷中、2013年、DOI (10.1038)
2. Harusato A, Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Mizushima K, Hirai Y, Higashimura Y, Katada K, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Muto A, Igarashi K, Yoshikawa T.、BTB and CNC Homolog 1 (Bach1) Deficiency Ameliorates TNBS Colitis in Mice: Role of M2 Macrophages and Heme Oxygenase-1.、Inflamm Bowel Disease、査読有、19巻、2013年、740-753、DOI(10.1097)
 3. Li J, Shiraki T, Igarashi K.、Bach1 as a regulator of mitosis, beyond its transcriptional function.、Commun Integr Biology、査読有、5巻、2012年、477-479、DOI (10.4161)
 4. Nishizawa H, Ota K, Dohi Y, Ikura T, Igarashi K.、Bach1-mediated suppression of p53 is inhibited by p19(ARF) independently of MDM2.、Cancer Science、査読有、103巻、2012年、897-903、DOI (10.1111)
 5. Ota K, Dohi Y, Brydun A, Nakanome A, Ito S, Igarashi K.、Identification of senescence-associated genes and their networks under oxidative stress by the analysis of Bach1.、Antioxid Redox Signal、査読有、14巻、2011年、2441-2451、DOI (10.1089)

[学会発表] (計1件)

1. BRYDUN ANDREY、The role of transcription factor Bach1 in cancer-stroma interaction (がんと間質の相互作用における転写因子 Bach1 の意義)、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 和彦 (IGARASHI KAZUHIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00250738

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：