

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592839

研究課題名(和文) 口腔がん発症における脱アセチル化酵素と転写因子の果たす役割

研究課題名(英文) The roles of HDAC and transcription factors in oral cancer development

研究代表者

小林 正伸 (KOBAYASHI, Masanobu)

北海道医療大学・看護福祉学部・教授

研究者番号：80241321

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、脱アセチル化酵素Sirtuinと発がんに関わる転写因子との相互作用に着目し、Sirtuinによる転写因子の機能調節が遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかを解析することにより、がん細胞におけるSirtuinの役割を明らかにすることを目的とした。

SIRT7は、脱アセチル化酵素活性依存的に、BCL6タンパク質の発現を正に制御することで、転写抑制活性を増強することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the roles of sirtuin in cancer cells, we examined how sirtuin regulated the expression of hypoxia-induced genes, because we found that the expression of sirtuin mRNA under hypoxic conditions.

We found that SIRT7 stimulated the expression of BCL6 and that SIRT7 increased the suppressive activity of transcription by BCL6.

研究分野：腫瘍学

キーワード：低酸素 低栄養 転写因子 脱アセチル化酵素

1. 研究開始当初の背景

真核細胞における遺伝子発現は、クロマチン構造が可逆的に凝集・弛緩することによりその ON/OFF が制御されている。クロマチンの凝集・弛緩には、ヌクレオソーム構成するヒストンタンパク質のアセチル化が関与しており、アセチル化の亢進によりクロマチンの弛緩し、脱アセチル化の亢進によりクロマチンの凝集が起こる。ヒストンのアセチル化修飾反応は、ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) によるアセチル化と、ヒストンデアセチラーゼ (HDAC) による脱アセチル化により制御されており、この両者のバランスがアセチル化状態を規定する。さらに、アセチル化修飾は、ヒストンのみならず様々な転写調節タンパク質に対しても起こり、その活性制御に関与していることも知られている。(Peserico and Simone, J. Biomed. Biotechnol., 2011)。このようにアセチル化修飾は、遺伝子発現の制御において中心的な役割を果たしており、その制御の破綻は、様々な疾患の原因となりうる。白血病など、細胞のがん化においてもヒストンのアセチル化修飾の変動が報告されており、特定領域の遺伝子発現低下が発がんの一因と考えられていることから、ヒストンや転写調節因子のアセチル化修飾の制御機構の解明は、がん細胞の特性の理解や、治療法開発において極めて重要な課題であるといえる。

一方、我々は、これまで腫瘍環境の特性である低酸素・低栄養状態に着目し、低酸素・低栄養状態への適応応答が、血管新生や転移浸潤の促進など、がん細胞の性質を悪性化させることを明らかにしてきた (Akakura et al., Cancer Res., 2001; Chen et al., Am. J. Pathol., 2003; Cui et al. Cancer Res., 2007; Natsuizaka et al., Exp. Cell Res., 2007)。これらの研究過程で、DNA マイクロアレイ解析から、低酸素・低栄養状態において、Class HDAC に属する Sirtuin 遺伝

子の発現が上昇することを見出した。Sirtuin は、酵母の寿命決定遺伝子として発見された Sir2 のヒトホモログであり、ヒトでは SIRT1-SIRT7 までの 7 種類が存在する。Sirtuin は、低栄養による NAD⁺ の増加によってその脱アセチル化酵素活性が上昇することが知られており、細胞のエネルギーセンサーとして機能する。Sirtuin は、PGC-1、p53、NF- κ B など様々な基質の脱アセチル化を介して、抗酸化ストレス応答や抗炎症、アポトーシス抑制、ゲノム安定化などの生理作用を発揮することが知られている (Houtkooper et al., Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2012)。しかし、がん細胞における Sirtuin の役割については、がん種や状況により異なり、がんに対して促進的に作用するのか、抑制的に作用するのかは明確ではなく、不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、脱アセチル化酵素 Sirtuin と発がんに関わる転写因子との相互作用に着目し、Sirtuin による転写因子の機能調節が遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかを解析することにより、がん細胞における Sirtuin の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) SIRT7 による癌遺伝子産物 BCL6 の機能制御機構の解析

膀胱癌細胞を用いた DNA マイクロアレイ解析を用いて、低酸素・低栄養状態において発現が上昇する遺伝子として、Sirtuin ファミリーに属する SIRT7 と、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の原因遺伝子である転写抑制因子 BCL6 が同定されたことから、この両者の相互作用を以下のように解析した。

ヒト胎児腎臓 293T 細胞を用いた強制発現系における SIRT7 と BCL6 の物理的相互作用を免疫沈降により解析した。また、ヒト B 細胞リンパ腫 Ramos 細胞およびヒト大腸がん

DLD1 細胞を用いて内在性の SIRT7 と BCL6 の結合を解析した。

ヒト骨肉腫 U2OS を用いた免疫蛍光染色法により両者の細胞内局在性を解析した。

BCL6 に応答するレポーター遺伝子 pBCL6BS-SV-Luc を構築し、293T 細胞を用いた強制発現系における BCL6 依存的な転写抑制に対する SIRT7 の効果を検討した。

DLD-1 細胞およびヒト子宮頸がん HeLa 細胞において、siRNA によりの内在性 SIRT7 をノックダウンした場合の内在性 BCL6 タンパク質の発現量をウェスタンブロッティングにより解析した。

(2) SIRT1 によるインターフェロン-

(IFN-)遺伝子の発現制御機構の解析
ウィルス感染により誘導されるサイトカインである TypeI インターフェロン(IFN)は、細胞増殖抑制活性を有し、腎癌や多発性骨髄腫など一部のがんの治療に抗がん剤として用いられている。本研究では、TypeI IFN である IFN- の発現に SIRT1 がどのような影響を及ぼすかについて検討を行った。

293T 細胞に SIRT1 を過剰発現させる後、B-DNA (poly(dA-dT)) を導入して細胞質核酸センサー系を刺激した場合の IFN- mRNA 発現誘導に対する SIRT1 の影響を、qRT-PCR 法により検討した。

293T 細胞に IFN- 誘導に関わるシグナル伝達のメディエーターである RIG-I、MAVS、もしくは TBK1 と共に SIRT1 を過剰発現させ、IFN- プロモーター活性に対する影響をレポーター遺伝子アッセイにより検討した。

293T 細胞に SIRT1、IRF3、MAVS を過剰発現させ、両者が物理的に結合するか否かを共免疫沈降法により検討した。

293T 細胞に、SIRT1 による脱アセチル化の基質である転写因子 FoxO3a を、RIG-I、MAVS、もしくは TBK1 と共にを過剰発現させ、IFN-

プロモーター活性に対する影響をレポーター遺伝子アッセイにより検討した。

(3) AMPK の新規活性制御機構の解析

SIRT1 は、低栄養下において NAD⁺の増加により活性化されるが、NAD⁺/NADH 比の変動は、SIRT1 の上流に位置する Ser/Thr キナーゼ AMPK (AMP-activated protein kinase) により制御されている。本研究では、SIRT1 シグナルの制御因子である AMPK の新規活性制御機構を解析を行った。

構成的活性型 AMPK 2 を bait に用いて yeast two-hybrid 法により、AMPK 結合タンパク質をスクリーニングした。

293 細胞および U2OS 細胞を用いて、免疫沈降法により動物細胞内における AMPK 2 と Artemis の結合性を検討した。

293 細胞および U2OS 細胞において、siRNA により Artemis をノックダウンした後に、AMPK の活性化薬である phenformin で刺激を行い、AMPK およびその下流シグナル伝達の活性化状態をウェスタンブロッティングにより解析した。

U2OS 細胞において Artemis を過剰発現もしくはノックダウンした条件下で、AMPK 2 とその上流キナーゼ LKB1 との結合性を、免疫沈降法により解析した。

(4) PIAS3 による HIF-1 の転写活性制御機構の解析

転写コファクター PIAS3 は、SIRT1 と機能的に相互作用することが報告されており (Park et al., Nat Commun., 2014) SUMO 化修飾の E3 リガーゼとして機能する。本研究では、低酸素誘導因子 HIF-1 の転写活性制御に対する PIAS3 の効果を検討した。

293 および U2OS 細胞において、PIAS3 共発現が HIF-1 の転写活性化に及ぼす影響を HIF-1 に応答するレポーター遺伝子 pHRE-SV-Luc を用いて、ルシフェラーゼアッセイにより解析した。

U2OS 細胞において、siRNA により PIAS3 をノックダウンした場合の低酸素下における HIF-1 の標的遺伝子の発現変化を qRT-PCR 法

により解析した。

293T 細胞を用いた免疫沈降実験により、HIF-1 と PIAS3 の結合性、および HIF-1 の SUMO 化修飾状態の変化について検討した。

4. 研究成果

(1) SIRT7 による癌遺伝子産物 BCL6 の機能制御機構の解析

免疫沈降の結果から、293T 細胞を用いた強制発現系における SIRT7 と BCL6 の結合が確認された。また、Ramos 細胞および DLD1 細胞において内在性の SIRT7 と BCL6 の結合が確認され、両者の結合は生理的条件下でも起こることが示された。

免疫蛍光染色解析により SIRT7 と BCL6 はいずれも核内に局在し、その一部は斑点状に共局在が観察された。

レポーター遺伝子解析から、SIRT7 の共発現は、BCL6 の転写抑制効果を増強した。また、脱アセチル化酵素活性を欠損した SIRT7 H187Y の共発現では、BCL6 の転写抑制効果の増強は観察されなかった。

ウェスタンブロットティングの結果から、内在性 SIRT7 のノックダウンにより、BCL6 タンパク質発現量の減弱が観察された。

以上の結果から、SIRT7 は、脱アセチル化酵素活性依存的に、BCL6 タンパク質の発現を正に制御することで、転写抑制活性を増強することが示唆された。

(2) SIRT1 によるインターフェロン-

qRT-PCR 解析の結果から、SIRT1 の過剰発現は、B-DNA 刺激による IFN- mRNA 発現誘導を抑制した。

RIG-I、MAVS もしくは TBK1 の過剰発現により増大した IFN- プロモーター活性は、いずれも SIRT1 の用量依存的な共発現により減弱することが観察された。

免疫沈降の結果から、MAVS の共発現により IFN- 誘導シグナルを活性化した場合に、IRF-3 と SIRT1 の結合が見られた。

以上の結果から、SIRT1 は、IRF-3 と直接結合することにより、IFN- 遺伝子の発現を負に制御していると考えられる。今後、さらに詳細に SIRT1 による抑制の分子の機序を明らかにする必要がある。

シグナルメディエーター分子の過剰発現により増大した IFN- プロモーター活性は、いずれも FoxO3a の用量依存的な共発現により減弱することが観察された。

(3) AMPK の新規活性制御機構の解析

ヒト骨髄 cDNA ライブラリーをスクリーニングした結果、AMPK 2 新規結合タンパク質として、NHEJ 型 DNA 修復の制御因子である核内タンパク質 Artemis を同定した。

免疫沈降の結果から、動物細胞内における AMPK 2 と Artemis の結合性が確認された。

Artemis のノックダウンにより、phenformin 刺激で誘導される AMPK のリン酸化および AMPK の基質である ACC のリン酸化の低下が観察され、Artemis は、AMPK の活性化に関与していることが判明した。

免疫沈降の結果から、Artemis を過剰発現は、AMPK 2 と LKB1 との結合性を増強し、逆に、Artemis のノックダウンは、両者の結合を減弱させた。

以上の結果から、核内タンパク質 Artemis は、LKB1-AMPK 複合体を安定化させ、LKB1 による AMPK のリン酸化を促進することにより、AMPK シグナルの活性化因子として機能することが明らかとなった。

(4) PIAS3 による HIF-1 の転写活性制御機構の解析

レポーター遺伝子アッセイの結果から、PIAS3 の共発現は、SUMO E3 リガーゼ活性依存的に HIF-1 の転写活性化を増強させた。

PIAS3 をノックダウンにより、低酸素下における HIF-1 の標的遺伝子 (VEGF, GLUT-1, GLUT-3, ADM など) の発現が減弱した。

免疫沈降実験により、HIF-1 と PIAS3 の

結合が確認され、PIAS3 の共発現は、HIF-1 の SUMO 化修飾を促進した。

以上の結果から、PIAS3 は、HIF-1 の SUMO 化修飾を促進することでその転写活性を増強させ、HIF-1 を介した遺伝子発現に促進的に作用すると考えられる。

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. Ohnishi S.; Maehara O.; Nakagawa K.; Kameya A.; Otaki K.; Fujita H.; Higashi R.; Takagi K.; Asaka M.; Sakamoto N.; Kobayashi M.; Takeda H. (2013). Hypoxia-inducible Factors Activate CD133 Promoter through ETS Family Transcription Factors. *PLoS ONE* 2013, 8: e66255. 査読あり
2. Goudarzi H.; Iizasa H.; Furuhashi M.; Nakazawa S.; Nakane R.; Liang S.; Hida Y.; Yanagihara K.; Kubo T.; Nakagawa K.; Kobayashi M.; Irimura T.; Hamada J.I. Enhancement of in vitro cell motility and invasiveness of human malignant pleural mesothelioma cells through the HIF-1 -MUC1 pathway. *Cancer Lett.* 2013, 39, 82-92. 査読あり
3. Nakagawa K.; Uehata Y.; Natsuzaka M.; Kohara T.; Darmanin S.; Asaka M.; Takeda H.; Kobayashi M. The nuclear protein Artemis promotes AMPK activation by stabilizing the LKB1-AMPK complex *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012, 427, 790-795. 査読あり

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 正伸 (KOBAYASHI Masanobu)
北海道医療大学・看護福祉学部・教授
研究者番号：80241321