

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：83901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659170

研究課題名(和文) 悪性腫瘍における新規増殖因子OGFOD1の制がん分子機序の解明

研究課題名(英文) Role of a 2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase OGFOD1 in cancer

研究代表者

齋藤 憲 (Saito, Ken)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍病理学部・研究員

研究者番号：70426584

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、OGFOD1はリボソームタンパク質のプロリン残基を水酸化する機能をもつことが報告されたが、その機能本態および癌での役割はいまだ解明されていない。私たちは、多系統の腫瘍細胞株においてOGFOD1が核に同在すること、また患者病理標本での発現解析により食道扁平上皮癌を含む多種類のがん組織でOGFOD1が高発現していることを認めた。また食道扁平上皮癌細胞におけるOGFOD1 knockdownではp21cip1の低下と細胞周期の停止が認められ、CDK阻害剤によりOGFOD1の発現低下および細胞増殖の抑制が観察された。これらの結果はOGFOD1が食道癌の増殖に必須な分子であることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：OGFOD1 catalyzes hydroxylation of ribosomal protein RPS23 and play a role in the regulation of translation, as recently suggested by several groups. However, functional role and relevance to cancer are poorly understood. In this report, we found that OGFOD1 was primarily a nuclear protein in many cancer cells and highly expressed in cancer tissues including esophageal squamous cell carcinoma. Knock-down of OGFOD1 suppressed cellular proliferation through up-regulation of p21cip1 and cell-cycle arrest. Furthermore CDK inhibitor (Albocidib) affected OGFOD1 expression and cellular growth. These results support that the induction of OGFOD1 is necessary for the cell growth and cell-cycle of malignant tumor.

研究分野：分子生物学

キーワード：水酸化酵素 がん増殖

## 1. 研究開始当初の背景

OGFOD1 (2-oxoglutarate and iron-dependent oxygenase domain containing 1) は、ドメイン構造上プロリン水酸化酵素のファミリーに類似し、核に局在することからヒストンなどの脱メチル化酵素としての可能性が予測されるが、その機能本態は解明されていない。われわれは現在までの先行研究で、低酸素・低グルコース同時条件下で OGFOD1 が HeLa の細胞死誘導に関わること、OGFOD1 変異体とノックアウト細胞は低酸素条件に対し抵抗性を獲得することの 2 点を見出し報告した(Saito K et al. (2010) *FEBS Lett.* 584 3340-3347)。一方、OGFOD1 は mRNA の翻訳抑制に機能するという報告がなされたが(Wehner K et al. (2010) *Mol. Cell. Bio.* 30 2006-2016)、OGFOD1 の機能に関する研究報告は医生物学領域で現在私たちの論文を含めこの 2 つのみである。私たちが実施した本申請のための準備研究では、発生母地の異なる多系統の腫瘍細胞株において OGFOD1 発現量の増減いずれかの方向へのシフトが劇的な細胞死を誘導すること、かつ細胞死誘導が増強によるか抑制によるかが癌腫で分かれるという特徴を見出している。また患者病理標本での発現解析を並行して実施し、食道扁平上皮癌を含む多種類のがん組織で OGFOD1 mRNA の高発現を確認している。以上の背景から、私たちはヒト悪性腫瘍において OGFOD1 の腫瘍における生物学的機能を明らかにし、がん分子治療学へ向けた新たな基盤情報の獲得と同分子の制御を主眼とした制がん技術の基盤開発に挑戦したい。

## 2. 研究の目的

私たちは OGFOD1 が、実際に多種類のヒト固形癌や脳腫瘍、血液腫瘍などのヒト悪性腫瘍細胞および病理組織に豊富かつユビキタスに発現していることを見出している。興味深いことに、これらの発現腫瘍細胞では OGFOD1 という単一の遺伝子の消長が腫瘍の増殖に大きな影響を与えることが準備研究から判明した。本研究では、OGFOD1 遺伝子の発現量の正負の調節によりヒト悪性腫瘍において細胞死が惹起される分子機序を明らかにし、かつその知見に基づき OGFOD1 をキー分子として利用した新たな制がん技術展開のための基盤構築にチャレンジすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

腫瘍組織および細胞株

ヒト食道癌細胞および各種がん細胞株は、抗生物質(ペニシリンとストレプトマイシン)と 10%FBS を含む DMEM 培地で 37℃、5%二酸化炭素存在下で培養した。腫瘍組織および非腫瘍組織パネルはパソロジー研究所と Folio Biosciences から購入した。

## イムノプロット

35mm ディッシュに播種した細胞に 2× SDS サンプルバッファー(250mM Tris/HCL, pH6.8, 4%SDS, 20%glycerol, 10%β-ME, 0.01% bromophenol blue) 200 μl を加え細胞を破壊し、超音波処理および煮沸処理後、蛋白質を 10% SDS-PAGE で分離し PVDF 膜に転写した。転写後 PVDF 膜は 5% (w/v) スキムミルク入り TBST 溶液(50mM Tris/HCL, pH7.2, 140mM NaCl, 0.05% Tween-20) でブロッキングし、次に OGFOD-1 抗体(Sigma, 1000 倍希釈)、アクチン抗体(20000 倍希釈)を含む 5% (w/v) スキムミルク入り TBST 溶液に 4℃で一晩反応させた。その後、TBST 溶液で 10 分間 3 回洗浄した。プロットは HRP 標識した抗ラビットまたはマウス二次抗体(20000 倍希釈)で 1 時間反応させ、TBST 溶液で 10 分間 3 回洗浄した。シグナルは、Supersignal Westpico 試薬(Thermo)で化学発光として検出し、ChemiDoc (BIORAD)にて可視化した。

## 細胞および組織染色

各種癌細胞を 4%パラホルムアルデヒドで固定後、PBST で洗浄し 3%BSA/PBST 溶液でブロッキングを行った。次に抗 OGFOD1 抗体(1000 倍希釈)を一晩反応させ、PBST で洗浄後 Cy3 ラベル抗ラビット二次抗体を反応させた。細胞核についてはヘキストで染色した。細胞は蛍光倒立顕微鏡(オリンパス IX71)で観察した。

腫瘍組織についてはパラフィン包埋切片を脱パラフィン後、Pascal(Dako cytomation)を用いて抗原の賦活化および内因性ペロオキシダーゼ阻害を行った。一次抗体は CanGet signal A immunostain (TOYOBO)で希釈し、4℃で一晩反応させた後、PBS/0.05%Tween-20 で洗浄した。2 次抗体 Envision rabbit-IgG-HRP (Dako) は、溶液をスライドに滴下し反応させた後、洗浄し DAB (Envision+kit / HRP, Dako) で発色した。核染は Mayer's Hematoxylin (武藤化学)で行なった。その後、水洗、脱水(60%から 100%のアルコールに段階的に浸す)、透徹(100%キシレンに 3 回浸す。最後

は10min浸す。)封入(武藤化学:Malinol)し、組織を観察した。

#### RT-PCR

各細胞から total RNA を RNeasy mini kit (Qiagen)を用いて抽出後、ReverTra Ace kit (Toyobo)を用いて cDNA を作製した。PCR は cDNA を鋳型とし Taq ポリメラーゼ (Takara)で行った。

#### 細胞増殖アッセイ

実験前日に各種癌細胞を 24 穴プレートに播種し、翌日に薬剤を添加し 37 °C で 48 時間培養を行った。その後、培地を新鮮な培地に交換し、Cell counting-kit8 試薬 (同仁化学)を用いて使用説明書に従い反応させ、マイクロプレートリーダー(BIORAD)で、ホルマザン産物の吸光度 490 nm を測定することで、細胞増殖を検出した。

#### 4. 研究成果

私たちは OGFOD1 が、多種類のヒト固形癌や脳腫瘍、血液腫瘍などのヒト悪性腫瘍細胞および病理組織に豊富かつユビキタスに発現していることをイムノプロットおよび組織染色より見出した。また興味深いことに、これらの発現腫瘍細胞では OGFOD1 という単一の遺伝子の消長が腫瘍の増殖に大きな影響を与えることが明らかになり、OGFOD1 の機能および発現メカニズムを調べるために、私たちは OGFOD1 が高発現している食道扁平上皮癌を 1 つのモデルとして用いた。OGFOD1 ノックダウンにおける細胞周期を細胞周期依存的蛍光タンパク質の変化を指標にモニターした結果、OGFOD1 ノックダウンは G1 期の停止が誘導されることが示唆された。また OGFOD1 ノックダウンにおける代表的な癌抑制遺伝子 p53, p27, p21, p16 の発現を調べた結果 p21cip1 の発現上昇が mRNA レベルおよびタンパク質レベルで認められた (図 1)。

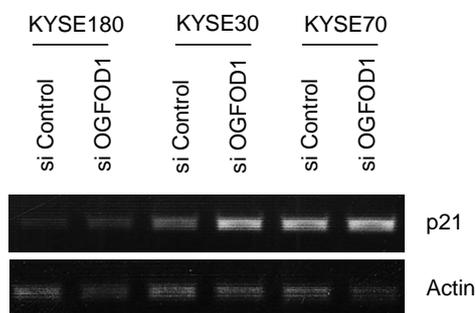


図 1 p21 の mRNA レベル

この p21 の発現上昇は食道癌以外のいくつかの癌細胞株で認められている。

一方で食道癌細胞に対する血清飢餓状態刺激や CDK 阻害剤処理は OGFOD1 の発現低下を誘導することが判明した。このように OGFOD1 発現調節は細胞周期に依存した細胞周期を制御する機能を持つことが推察され、食道癌の増殖に必須な分子であると考えられる。今後、OGFOD1 の活性および p21 の制御についていくつかの癌で比較検討することで OGFOD1 の二面性の機能を具体的に明らかにしたいと考えている。

#### 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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

第 104 回日本病理学会 (2015 年 4 月 30 日-5 月 2 日) 名古屋国際会議場 (名古屋市)

演題「悪性腫瘍における OGFOD1 の役割」

発表者 齋藤憲、飯岡英和、近藤英作

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 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 0 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

齋藤 憲 (SAITO, Ken)

愛知県がんセンター (研究所)・腫瘍病理

学部・研究員

研究者番号: 70426584

(2)研究分担者

近藤 英作 (KONDO, Eisaku)

新潟大学・医学部・実験病理・教授

研究者番号： 30252951