

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700987

研究課題名(和文) 癌の転移におけるC1Dの役割解明と創薬展開

研究課題名(英文) Role of C1D in metastasis of cancer and drug discovery research

研究代表者

灌田 守親 (Takita, Morichika)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：80533455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：C1Dは基本転写やDNA修復に関与するDNA結合タンパク質であるが、その機能は不明である。そこで、本研究ではC1Dのヌクレオソームにおける動態ならびに紫外線(UV)照射によるIL-8の転写におけるその役割について調べた。HeLa細胞においてC1Dタンパク質は通常ヌクレオソームに存在しているが、UV照射を受けるとE3リガーゼのCHIPを介してユビキチン・プロテアソーム系により急速に分解され、それに伴いIL-8 mRNAの発現が亢進することが明らかとなった。本研究により、C1Dはクロマチンにおける転写抑制因子として機能し、C1Dの恒常性の維持によってIL-8の転写が制御されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：C1D, a DNA binding protein, is involved in basal transcription and DNA repair. However, the function of C1D remains elusive. In the present study, we examined the dynamics of C1D protein in the nucleosomes and the role of C1D in IL-8 transcription induced by ultraviolet (UV) irradiation. C1D protein normally binds the nucleosomes in HeLa cells. UV induced a rapid decrease of nucleosomal C1D by an E3 ligase CHIP (carboxyl terminus of the heat shock cognate protein 70 interacting protein)-mediated proteasome-dependent degradation and subsequently up-regulation of IL-8 transcription. Our studies revealed that C1D plays roles in a chromatin-associated transcriptional suppressor, and the homeostatic maintenance of C1D protein regulates IL-8 transcription.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：タンパク質分解 C1D ヌクレオソーム IL-8転写

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々はこれまでにヌクレオチド除去修復の主要な構成因子である XPB (xeroderma pigmentosum group B protein) を欠損する CHO9 細胞亜株の 27-1 細胞において、XPB を発現させると紫外線(UV)照射に感受性を示すことを明らかにした。XPB によって制御される遺伝子を同定するため、ディファレンシャルディスプレイを行った結果、27-1 細胞に XPB 遺伝子を発現させることにより、顕著に発現が上昇した遺伝子として CID を同定し、UV 照射後の CID mRNA の転写誘導には XPB が必須であることを見出した。また、27-1 細胞において UV 照射により CID タンパク質は速やかにユビキチン化され、ユビキチン・プロテアソーム系により分解されることを明らかにした。さらに、UV 照射により CID は XPB と直接的に結合することを明らかにした()。

(2) 癌の遠隔臓器への転移の前には転移予定先の臓器で炎症が起こっており、癌細胞が定着し易い土壌、すなわち前転移性ニッチの形成が示唆されている。我々は癌細胞をマウスの皮下に移入して腫瘍を形成させ、担癌状態にすることにより、転移前モデルを作製したところ、原発巣の癌細胞から分泌された TNF- α が肺に集積した骨髄球系細胞および血管内皮細胞に作用し、S100A8 の産生を亢進し、さらに S100A8 がオートクリンで作用して SAA (serum amyloid A) 3 の産生を亢進すること、SAA3 は TLR4 (toll-like receptor 4) の内因性リガンドであることを見出した。癌細胞には TLR4 が発現しており、SAA3 が TLR4 に結合することにより、癌細胞における NF- κ B シグナルが活性化されて、癌細胞の原発巣から転移巣への遊走が促進されることを明らかにした()。また、マウスにナフタレンを投与して、肺の終末細気管支に存在する Clara 細胞を欠損させると肺への CD11 陽性および TLR4 陽性細胞の肺へのリクルートが抑制され、肺癌細胞の自然転移が抑制されることを見出し、骨髄由来の Clara 細胞が TLR4 を介して SAA3 産生の自己増幅を行うことにより、癌の肺転移が促進されることを明らかにした()。

2. 研究の目的

CID は基本転写因子 TFIID によって制御される遺伝子の基本転写や DNA 修復に関与する DNA 結合タンパク質であり、これまでにコンデンシン、TRAX (translin-associated factor X)、DNA-PK (DNA-dependent protein kinase)

などの多くのクロマチン制御分子との相互作用が報告されている。しかし、CID のヌクレオソームにおける動態ならびに TFIID の構成因子との相互作用と UV によるマクロファージにおけるサイトカイン転写におけるその機能や癌の転移と転移前の転移先臓器における炎症性変化における役割は未だ不明である。そこで本研究における目的は UV 照射により誘導される炎症性サイトカインや走化性因子の転写制御への CID の役割を明らかにし、その機構を癌の転移に拡大応用して、癌の転移と転移前の炎症性変化における CID の役割を明らかにし、CID の DNA への結合を阻害する新規核酸医薬として CID デコイを合成し、CID を標的とした癌の転移を抑制する核酸医薬の創薬展開につなげることである。

3. 研究の方法

(1) ヌクレオソームはヒト子宮頸癌 HeLa 細胞の核抽出物を 5-30%(w/v) ショ糖密度勾配に積層し、100,000 rpm、1 時間、4°C の条件で超遠心を行って調製し、超遠心後の分画はショ糖密度勾配の上面から下面にかけて 0.2 ml ずつ採取し、分画#1 ~ #14 のショ糖密度勾配分画とした。得られた分画における CID およびヒストン H2A タンパク質はウェスタンブロット法により、DNA は 2%(w/v) アガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロミドによる染色により検出した。

(2) 細胞への UV 照射は培養細胞をリン酸緩衝液で洗浄後、完全に溶液を除いた状態で、UV ベンチランプ(15W, XX-15S, 254nm, 100V, UVP 社製)により、UV 照射を行った。UV 照射の強度は UVX 紫外線強度計にて常時モニターし、細胞に適切な強度の UV が照射できるよう、照射時間の調整を行った。

(3) UV 照射によるサイトカイン遺伝子発現変動の解析は細胞に UV を照射(10 J/m²)し、5 時間後に Isogen II を用い、総 RNA の抽出を行った。得られた総 RNA を試料とし、SuperScript III およびオリゴ dT プライマーによる逆転写反応を行い、1 本鎖 cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型とし、各遺伝子に特異的なプライマーセットと SYBER Green Master Mixture を用い、qPCR を行った。

(4) 遺伝子ノックダウン実験は各種 siRNA を Amaxa CLB Transfection Kit を用いたエレクトロポレーションにより、細胞に導入し、48 時間培養後に実験に供した。

(5) クロマチン免疫沈降実験は HeLa 細胞に UV を照射(50 J/m²)し、継時的にホルマリリンによる架橋形成を行い、回収したクロマチ

ンを試料とし、各種抗体を用いた免疫沈降を行った。クロマチン免疫沈降による C1D タンパク質の動態はウェスタンブロット法により、*IL-8* プロモーターへの C1D のリクルートは *IL-8* プロモーター領域に特異的なプロンプおよびプライマーセットを用いた qPCR 法により検討した。

4. 研究成果

(1)ヌクレオソームにおける C1D 動態と UV 照射の影響

ヌクレオソームにおける C1D 動態を調べるため、HeLa 細胞の核抽出物を試料とし、シヨ糖密度勾配遠心分離法により、ヌクレオソームの調製を行った。その結果、C1D タンパク質は主としてシヨ糖密度勾配分画 #3~#7 において顕著に検出された(図 1、上段パネル)。これらの分画にはヒストン H2A および ~147bp の DNA が共存することから、C1D はモノヌクレオソームに存在することが示唆された。さらに、UV 照射(100 J/m²)を行い、30 分後のヌクレオソームにおける C1D 動態を同様に解析したところ、シヨ糖密度勾配分画 #3~#7 における C1D タンパク質の著しい減少が認められ、それと同時にヒストン H2A の減少も認められた(図 1、下段パネル)。これまでに、ヌクレオソームにおけるヒストン H2A は UV 照射により、プロテアソーム系を介したタンパク質分解により減少する、いわ

ゆるヌクレオソームエヴィクションと呼ばれる現象が報告されている()。そこで、C1D タンパク質においても同様の機構で分解されるか否かを調べるため、プロテアソーム阻害剤の MG132 の前処理を行い、同様の実験を行ったところ、UV 照射による C1D のヌクレオソームにおける減少は MG132 の前処理により、顕著に抑制された。したがって、UV 照射による C1D タンパク質のヌクレオソームエヴィクションはプロテアソーム系を介したタンパク質分解に起因することが明らかになった。さらに、C1D のプロテアソーム系での分解に関与するユビキチン E3 リガーゼを特定するため、2 つの E3 リガーゼ CHIP (carboxyl terminus of the heat shock cognate protein 70 interacting protein) と Cul4A に着目した。CHIP の遺伝子欠損マウス(KO)由来胎仔線維芽細胞(MEF)を用い同様に検討した。その結果、野生型マウス(WT)由来 MEF では UV によりヌクレオソームの C1D の減少が認められたが、CHIPKO 由来 MEF では UV によるヌクレオソームの C1D の減少は WT 由来 MEF に比べ抑制されていた。また、HeLa 細胞に Cul4A の siRNA を導入したところ、UV 照射によるヌクレオソームの C1D タンパク質の減少は Cul4A のノックダウンにより抑制された。従って、UV による C1D 分解に関与する実行分子として Cul4A と CHIP の関与が示唆された。

(2) UV 照射によるサイトカイン遺伝子発現における C1D の関与

UV 照射によるサイトカイン遺伝子の発現変動を調べるため、HeLa 細胞およびヒトリンパ腫由来単球様細胞株 U937 を用いて RT-qPCR 法により網羅的解析を行った。その結果、UV 照射により発現が上昇する遺伝子として *IL-8* などがリストされた。なお、*C1D* mRNA の発現は UV 照射により、減少傾向を示していた。*C1D* または *XPB* 遺伝子を siRNA によりノックダウンすると、*IL-8* mRNA は対照の siRNA を導入した細胞に比べ、UV 照射時の発現が増強していた。したがって、C1D は UV 刺激による *IL-8* mRNA 発現を抑制すること、XPB は C1D の安定化を介して *IL-8* mRNA の発現を抑制する可能性が示唆された。

(3)クロマチンにおける C1D と TFIID 構成因子との相互作用と *IL-8* 転写における C1D の関与

HeLa 細胞に UV を照射(50 J/m²)し、継時的にホルマリンによる架橋形成を行ったクロマチンを回収して、クロマチン免疫沈降を行

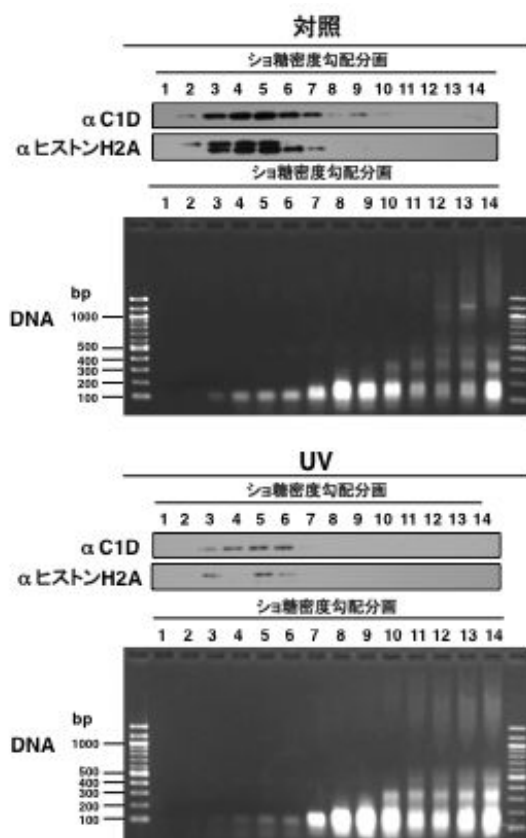


図 1. ヌクレオソームにおける C1D 動態と UV 照射によるヌクレオソームエヴィクション

い、CIDとTFIIHの構成因子XPBおよびCdk7との相互作用を検討したところ、XPBに結合したCIDタンパク質はUV照射後1時間で一過性に増加し、一方でCdk7に結合したCIDはUV照射後6時間まで継続的に増加することが明らかとなった。また、*IL-8*転写におけるCIDの関与を調べるため、CID抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、qPCRにより*IL-8*プロモーター領域へのCIDのリクルートについて検討したところ、UV照射後15分、1時間、8時間においてCIDの*IL-8*プロモーター領域への結合が増加していた。

(4) 組換え体CIDタンパク質の作製

がんの転移と転移前炎症性変化に対するCIDの効果を調べるため、当初はCIDがサイトカイン遺伝子の発現を促進することを想定してデコイの合成を計画していたが、研究の進行に伴い、CIDがサイトカイン遺伝子の発現を抑制する因子であることが判明したため、計画を変更し、組換えCIDタンパク質の作製を行った。その結果、6xHisタグ融合タンパク質として大腸菌で発現させたCIDタンパク質をアフィニティークロマトグラフィーにより高度に精製することができた。得られた組換えタンパク質はDetoxi-Gelを用いてエンドトキシンレベルを極めて低下させることができ、マウスへの投与実験に適用可能である。今後はマウスを用いたがんの転移と転移前モデルを作製し、組換え体CIDタンパク質の投与実験を行い、有効性の検証を行う必要があると考えている。

<引用文献>

Li, G., Liu, J., Abu-Asab, M., Masabumi, S., and Maru, Y., XPB induces CID expression to counteract UV-induced apoptosis. *Mol. Cancer Res.* 8, 2010, 885-895

Hiratsuka, S., Watanabe, A., Sakurai, Y., Akashi-Takamura, S., Ishibashi, S., Miyake, K., Shibuya, M., Akira, S., Aburatani, H., Maru, Y., The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase. *Nat. Cell Biol.*, 10, 2008, 1349-1355

Tomita T., Sakurai Y., Ishibashi S., Maru Y., Imbalance of Clara cell-mediated homeostatic inflammation is involved in lung metastasis. *Oncogene* 30, 2011, 3429-3439

Lan, L., Nakajima, S., Kapetanaki, M.G., Hsieh, C.L., Fagerburg, M., Thickman, K.,

Rodriguez-Collazo, P., Leuba, S.H., Levine, A.S., and Rapic-Otrin, V., Monoubiquitinated histone H2A destabilizes photolesion-containing nucleosomes with concomitant release of UV-damaged DNA-binding protein E3 ligase. *J. Biol. Chem.* 287, 2012, 12036-12049

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Maru Y, Tomita T, Deguchi A, Ieguchi K, Takita M, Tsukahara F, Takemura K, Kitao A, Gusovksy F: Drug targeting based on a new concept-Targeting against TLR4 as an example. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets*, 15, 2015, 83-87

[学会発表](計3件)

瀧田 守親, 丸 義朗, DNA結合タンパク質CIDのDNA損傷修復過程における動態解析, 2015年2月5日~2月6日, 琵琶湖ホテル(滋賀県・大津市)

瀧田 守親, 丸 義朗, 新規ヌクレオソームタンパク質CIDのDNA損傷修復過程における動態解析, 2015年1月27日~1月28日, 一橋講堂 学術総合センター(東京都・千代田区)

瀧田 守親, 丸 義朗, Role of caspase-1 in premetastatic inflammation of cancer, 第2回新学術領域 自然炎症+脂質マーシナリー合同若手ワークショップ, 2013年7月2日~7月4日, ルネッサンスリゾート鳴門(徳島県・鳴門市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

瀧田 守親 (TAKITA, Morichika)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80533455

(2) 研究協力者

丸 義朗 (MARU, Yoshiro)
東京女子医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00251447