

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792012

研究課題名(和文) HMGA2 v 2 による標的遺伝子発現制御と口腔癌進展機構の解析

研究課題名(英文) Ectopic expression of HMGA2 in oral carcinomas and tumor progression

研究代表者

前田 元太 (Maeda, Genta)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：80434140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：High mobility group-A2 (HMGA2) の異所的発現は上皮間葉移行 (EMT) を誘導し、高度悪性型発現型を獲得させる。本研究は口腔扁平上皮癌の HMGA2 未知の標的遺伝子を明らかにし、その発現機構と口腔癌細胞表現型へ与える影響を検討した。その結果、HMGA2 自身は遺伝子転写活性を持たないが ZIC1/4 のプロモーター領域に結合することにより、遺伝子プロモーターの構造を変化させる事が示唆された。さらに HMGA2 は Zic1 遺伝子プロモーターに直接結合することにより目的遺伝子の発現を制御することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：HMGA2 is expressed typically in the mesenchymal cell before its differentiation, but it is also expressed in tumors of epithelium. Ectopic expression of High mobility group-A2 (HMGA2) in epithelial tumor cell is a driver of mesenchymal transition (EMT), which has been implicated in the achievement of metastatic characters in tumor cells. Those data demonstrate that HMGA2 combined the Zic1 promoter site and controlled target gene expression in oral tumor cells, thereby inducing invasion and metastasis of human epithelial cancers.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学 歯科放射線学

キーワード：癌 EMT HMGA2

1. 研究開始当初の背景

口腔癌は頭頸部領域で最も発生頻度の高い悪性腫瘍であり、罹患患者数は世界的に上昇傾向にある。しかし、未だ約30%の症例に再発がみられ、予後は十分に改善されたとはいえない。口腔癌患者の予後の改善を目標とする場合、癌の進展に働く分子機構を解明し、それを抑制することが重要な戦略となる。口腔癌を含む上皮系癌の高度悪性形質獲得には多くのメカニズムが働くが、癌細胞 EMT はそれらの中でも中心的な役割を果たすと考えられている。細胞が上皮細胞としての形質を失い、間葉系細胞に類似した表現型を呈する EMT は、胚発生時に外胚葉から中胚葉が誘導される現象として定義された。その後、EMT は組織・臓器の形成にくわえて、創傷治癒過程や各種疾患（肺線維症等）の病態へ関与することが知られるようになった。最近、上皮系癌の進展にも極めて密接な関連をもつことが明らかにされつつある。癌細胞が EMT に陥ると、遊走能、浸潤・転移能、治療抵抗性および幹細胞様形質を獲得し、アポトーシスと細胞老化に抵抗性となることが知られている（文献1）。

2. 研究の目的

研究代表者が所属する研究室は、口腔癌細胞 EMT 関連分子の発現とその制御機構を中心に解析を行ってきた(文献2-4)。その中で、予後が不良な症例の浸潤先端部癌細胞が HMGA2 を高頻度に発現し、細胞分化マーカー（E-カドヘリン）の消失と関連していることを明らかにした(図1、文献5)。癌細胞 EMT の研究のほとんどは細胞株を用いた培養系で行われ、実際のヒト組織で EMT がおきているかは不明であったが、この研究により浸

潤先端部の癌細胞が EMT に陥っていることを初めて明確に示した。

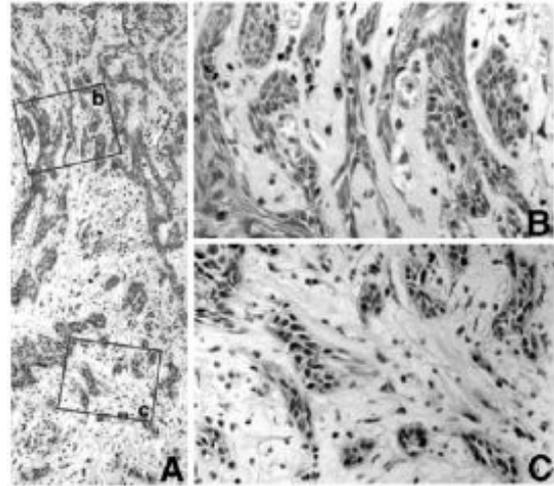


図1 口腔癌組織におけるHMGA2の発現
HMGA2は腫瘍中心部（B）では主に間葉系細胞に発現するが、浸潤先端部（C）では癌細胞に高頻度に発現する。

研究代表者は、細胞が発現する内在性転写因子の結合部位を同定する方法を開発した(文献6)。その方法を用い HMGA2 が ZIC ファミリーとの関連性に着目した。ZIC ファミリーは中枢神経系細胞の表現型確立にはたらく遺伝子群であり、上皮系細胞における異所的発現が細胞の動態におよぼす影響は未知である。悪性腫瘍組織における ZIC ファミリーの発現の有無については少数の検討が行われているが、その結果は大きく異なり、上皮系癌細胞の表現型と癌の進展に与える影響を検討した研究はない。そこで HMGA2 がどのように ZIC ファミリーに影響を与え、その結果がどう EMT に結びつくかを検討した。

3. 研究の方法

(1) 未知の分化誘導因子を特定するには、効率良く目的遺伝子の絞り込みをしないで行うべきではない。申請者は細胞内でゲノム上に結合している転写因子あるいは転写共役因子

の遺伝子を未知、既知に関わらず網羅的に同定する方法 (conChip; concatenate Chip) を確立した。

その方法を用いて口腔扁平上皮癌細胞株の分化決定に重要な因子である HMGA2 について網羅的検索を行い、多数の結合遺伝子を同定した。その結果、HMGA2 が ZIC1 と ZIC4 プロモーター領域に直接的に結合することにより、標的遺伝子の発現を制御することが分かった (図 2)。

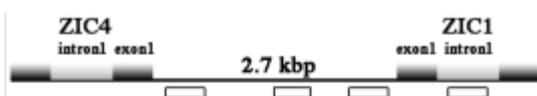


図 2 ZIC遺伝子プロモーターの構造
ZIC遺伝子とプロモーターの模式図を示す。□はHMGA2結合配列が集中する領域を示す。

(2) HMGA2 アイソフォームの解析と cDNA のクローニングカルシウム不含培養液中で培養して脱分化させた正常口腔上皮細胞あるいは口腔癌細胞株から全 RNA を抽出し、それらの細胞が発現する HMGA2 のアイソフォームを逆転写 PCR で決定する。その後、その cDNA を遺伝子発現プラスミドにクローニングした。

(3) HMGA2 による ZIC1/4 遺伝子発現の解析 HMGA2v2 cDNA をエレクトロポレーションで多種類の口腔癌細胞株に導入し、ZIC1/4 の発現をウエスタンブロット法と定量的リアルタイム PCR で解析する。および HMGA2 に対する short interfering RNA (siRNA) を導入した細胞を用いる。これにより、ZIC1/4 遺伝子の HMGA2 依存性について調べた。

(4) ZIC1/4 遺伝子発現機構の解析
ZIC1 と ZIC4 遺伝子のプロモーターをプラ

スミドにクローニングする。ヒトと他の動物種間で保存されたプロモーター領域を Bac クローンから単離し、様々な長さの断片を製作する。ルシフェラーゼをレポーター遺伝子としてもつプラスミド (pGL-4.1) にプロモーター断片をサブクローニングしてレポーターアッセイを行い標的遺伝子 (ZIC1/4) の発現制御に働くプロモーター領域と HMGA2 依存性を解析する。ZIC 遺伝子の発現制御に深く関与していると予想されるプロモーター領域内の HMGA2 結合配列の有無を検索する。存在する場合には、結合配列に変異を導入し、HMGA2 依存性を確認した。また、HMGA2 と共役し、遺伝子発現制御に不可欠な働きをしていると予想される転写因子について、その siRNA 導入し HMGA2 が両 ZIC 遺伝子の発現に明らかな関与を調べた。

4 . 研究成果

conChip により HMGA2 が ZIC1 と ZIC4 に挟まるプロモーター領域に結合することが分かった。さらに結合部位に対し、ルシフェラーゼレポートアッセイをした結果、HMGA2 は ZIC1 遺伝子の発現に関与することが示唆された。このことから HMGA2 自身は遺伝子転写活性を持たないが ZIC1/4 のプロモーター領域に結合することにより、遺伝子プロモーターの構造を変化させる事が示唆された。さらに HMGA2 は ZIC1 遺伝子プロモーターに直接結合することにより目的遺伝子の発現を制御することを示唆した。

ZIC1 遺伝子は TGF を介して上皮癌に EMT を生じさせることが報告されており、この実験の結果からも HMGA2 の発現制御が癌転移に関与していると考えられる。

【参考文献】

1. Thierry JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA. Cell 139: 871-890, 2009.

2. Mizunuma H, Miyazawa J, Sanada K, Imai K. Br. J. Cancer. 88: 1543-1548, 2003.
3. Uruguchi M, Morikawa M, Shirakawa M, Sanada K, Imai K. J. Dent. Res. 83: 327-332, 2004.
4. Imai K, Chada KK. Res. Adv. Cancer 5: 41-47, 2005.
5. Miyazawa J, Mitoro A, Kawashiri S, Chada KK, Imai K. Cancer Res. 64: 2024-2029, 2004.
6. Okazaki M, Maeda G, Chiba T, Doi T, Imai K. Gene 445: 17-25, 2009.

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 4 件)

1. Concomitant loss of p120-catenin and β -catenin membrane expression and oral carcinoma progression with E-cadherin reduction. Sasa ya K, Sudo H, Maeda G, Kawashiri S, Imai K., PLoS One. 2013 Aug 6;8
2. Mutational analysis of HRAS and KRAS genes in oral carcinoma cell lines, Maemoto S, Yumoto M, Ibata M, Torizuka S, Ozawa N, Tatsumi S, Hashido M, Morikawa M, Maeda G, Imai K., Odontology. 2012 Jul;100(2):149-55.
3. Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway., Cooke VG, LeBleu VS, Keskin D, Khan Z, O'Connell JT, Teng Y, Duncan MB, Xie L, Maeda G, Vong S, Sugimoto H, Rocha RM, Damascena A, Brentani RR, Kalluri R, Cancer Cell. 2012 Jan 17;21(1):66-81.

4. Progression of oral squamous cell carcinoma accompanied with reduced E-cadherin expression but not cadherin switch., Hashimoto T, Soeno Y, Maeda G, Taya Y, Aoba T, Nasu M, Kawashiri S, Imai K., PLoS One. 2012;7

{ 学会発表 }(計 1 件)

1. 代表者：前田 元太
学会名：日本歯科基礎医学界
題名：血管周皮細胞欠失による上皮間葉移行と癌転移は Met シグナルにより制御される。
場所：奥羽大学
日付：平成 24 年 9 月 15 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

前田 元太 (MAEDA GENTA)
日本歯科大学・生命歯学部・助教
研究者番号：80434140