

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：32713

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861515

研究課題名(和文) 卵巣明細胞腺癌のクロマチン再構築因子を介した発症機構の解明と新規治療戦略の構築

研究課題名(英文) Construction of new therapeutic strategy and elucidation of pathogenic mechanism through chromatin remodeling factor of ovarian clear cell adenocarcinoma

研究代表者

上川 篤志 (Uekawa, Atsushi)

聖マリアンナ医科大学・医学部・研究技術員

研究者番号：60534253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：SWI/SNFクロマチンリモデリング複合体を構成する因子群は、多くのがんで変異による発現消失を伴う。本研究では、新規癌抑制遺伝子として同定されたSWI/SNF複合体因子であるARID1Aの転写制御因子としての機能に着目し、ARID1Aの細胞増殖抑制作用とDNA損傷に応答したタンパク質の蓄積およびp53と協調的に作用することでDNA損傷シグナルによるp21遺伝子発現の活性化に重要な働きを持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：ARID1A encodes BAF250a, a key component of the SWI-SNF chromatin remodeling complex. ARID1A mutations are observed in various tumors, including ovarian clear cell and endometrioid carcinomas, endometrial, and breast carcinomas. In this study, we demonstrated that ARID1A negatively regulates cellular proliferation. This negative regulation is achieved through molecular collaboration between ARID1A and p53, to regulate tumor-inhibiting p53-downstream target genes such as CDKN1A (p21).

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣明細胞腺癌

1. 研究開始当初の背景

表層上皮性卵巣癌の中でも卵巣明細胞腺癌は、既存の抗癌剤に抵抗性を示すことから難治性の卵巣癌である。本邦において卵巣明細胞腺癌は卵巣癌全体の約25%を占め、諸外国と比較すると高率となっている。しかし、卵巣明細胞腺癌に対する化学療法のレジメンは確率されておらず、さらに近年急速に増加していることから、卵巣明細胞腺癌に対する新たな治療法の開発のための基礎的研究が、特に日本において重要な研究課題である。

多くのヒト腫瘍では、癌遺伝子の活性化に付随して起こる癌抑制遺伝子の機能欠損が細胞のがん化を引き起こしている。卵巣明細胞腺癌では、PIK3CAやKRASの変異が報告されているが、2010年には卵巣明細胞腺癌の約50%においてSWI/SNFクロマチンリモデリング複合体のサブユニットであるARID1A遺伝子に変異していることが報告された (Science. 330:228-30, 2010, N Engl J Med. 363:1532-43, 2010)。ARID1Aの体細胞変異の大部分はフレームシフト変異やナンセンス変異であることから、癌抑制遺伝子として機能していると考えられるものの、どのような分子機構で癌抑制機能を発揮しているのかについては不明な点が多い。ARID1Aの欠失は卵巣明細胞腺癌において無増悪生存期間の短縮と化学療法抵抗性に関連していることから、白金製剤併用療法で治療された患者の予後因子であることが示されている。さらにARID1Aは、髄芽腫、乳癌、胃癌、大腸癌、肝癌、肺癌などの多くの癌腫においても変異が確認されており、様々な細胞系列において腫瘍抑制機能を有していると考えられる。

SWI/SNF複合体は、転写やDNA合成、DNA修復などの多くの細胞機能の発揮において必須となるクロマチンの構造変換を担っている。ヌクレオソームのリモデリングに関する報告は多くなされているが、重要なことは、SWI/SNF複合体がクロマチンタンパク質以外の因子と相互作用し、それによってより高次のクロマチン構造上における機能を持つ、と考えられることである。さらに転写活性化における役割に基づいて同定されたSWI/SNF複合体は、転写の活性化と抑制化の双方を制御しているという証拠が示されている。一方、いくつかのSWI/SNFサブユニットの不活性化型変異が多くの癌で同定され、クロマチン構造と腫瘍抑制との間に明らかな関連があることが示唆されているものの、我々はこれらの真の標的についてほとんど何も知らない。クロマチンリモデリング因子などのエピゲノム修飾因子の変異は、下流の遺伝子発現を一挙に変えることができることから、がん化にとって有利な経路であると同時に有効な治療標的となりうる。

2. 研究の目的

これらの知見から、本研究はARID1Aの癌抑制機能を解明するため、標的遺伝子や相互作用因子の同定と、それらの癌抑制機能に対する役割を明らかにすることを目的とした。特にがん化に伴い起こるARID1Aの発現消失に焦点を当てた解析を行う。

3. 研究の方法

(1) DNAマイクロアレイによるARID1A標的遺伝子の同定

ARID1Aを過剰発現あるいはノックダウンさせた細胞よりtotal RNAを抽出し、DNAマイクロアレイ解析を行い、ARID1Aが標的とする遺伝子を同定した。マイクロアレイの結果より、ARID1Aの過剰発現において2倍以上且つノックダウンにおいて1/2以下、あるいはARID1Aの過剰発現において1/2以下且つノックダウンにおいて2倍以上のシグナル変化が認められた遺伝子を変動遺伝子の候補として抽出した。

(2) ARID1AのDNA損傷シグナルに対する応答

p53やRbなどに代表されるがん抑制遺伝子は、細胞増殖の抑制、DNAの修復、細胞周期の抑制、適切なアポトーシスの誘導などの機能を持つものが多い。DNAの変異や損傷の蓄積は異常細胞の出現を惹起する。これらの異常細胞の増殖を防ぐために細胞周期の抑制や停止を誘導し、DNA修復や必要に応じて細胞死を誘導することでがん化を防ぐことからがん抑制遺伝子はブレーキとして重要な働きがある。ARID1Aは多くの腫瘍で変異が確認されているものの基本的な役割には不明な点が多い。そこで細胞にDNA損傷を与えたときのARID1Aの挙動を調べることでがん抑制機構にどのように関与しているのかを明らかにするために、細胞にドキソルビシンを添加することでDNAダメージを誘導させた。ARID1Aを過剰発現させた細胞あるいはノックダウンさせた細胞にドキソルビシンを0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ Mとなるよう添加し、24時間処理した。これらの細胞ライセートをARID1A, p53, p21の抗体でWestern blot解析した。

(3) ARID1Aによるp21の転写活性制御

ARID1Aが細胞周期抑制因子であるp21の転写活性に寄与するかどうかをルシフェラーゼアッセイにより検討する。またp21の転写誘導において直接の上流因子であるp53との協同作用があるか否かも検討した。さらにDNA

ダメージ存在下における変化についても解析した。ルシフェラーゼ遺伝子の上流にp21の転写制御領域を組み込んだレポータープラスミド(pGL4-p21)を作製し、ARID1A発現プラスミドと共にco-transfectした細胞のライセート中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。上記に加え、p53をさらに発現させたときの条件およびドキシソルピシン添加によるDNAダメージ存在下においても同様にルシフェラーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

(1) DNAマイクロアレイによるARID1Aの標的遺伝子の同定

マイクロアレイを用いてARID1Aの標的遺伝子の抽出を試みた結果、ARID1Aの過剰発現において2倍以上且つノックダウンにおいて1/2以下のシグナル値を示した遺伝子として38遺伝子を、さらにARID1Aの過剰発現において1/2以下且つノックダウンにおいて2倍以上のシグナル値を示した遺伝子として58位遺伝子が抽出された。これらARID1Aの標的候補遺伝子群のプライマーを設計し、リアルタイムPCR法にて定量解析を行い、確実に変動が起きている遺伝子群をARID1A標的遺伝子の最終候補として同定した。この遺伝子リストの中にはがん化に深く関与している遺伝子もいくつか含まれていた。特にARID1Aの発現低下に伴い活性化される遺伝子群においてはがん化との関係を詳細に検討することでARID1A変異がんの発生メカニズムにせまることが出来る。これら個々の遺伝子とARID1Aとの詳細な関係については解析を進めており、今後も継続して研究を続ける。

(2) ARID1AのDNA損傷シグナルに対する応答

ARID1Aを過剰発現させた細胞にDNAダメージを与えた場合の変化をWestern blotで解析した。細胞にDNAダメージを与える目的でドキシソルピシンを0.1, 0.3, 1, 3, 10 μ Mの濃度で添加し24時間後の細胞ライセートを用いてWestern blotしたところ、ARID1Aのタンパク質量は、ドキシソルピシンの濃度依存的に増加していた。このARID1Aタンパク質量の変化はmRNAレベルの変動ではないことをリアルタイムPCRにより確認した。一方、p53, p21発現量もドキシソルピシン濃度依存的に増加した。例外的に10 μ Mのドキシソルピシンでは上記の変動は認められなかったが、これは細胞死が誘導されているためと考えられた。これらの結果からARID1Aは、DNAダメージに応答して自身のタンパク質量を蓄積させることがわかった。またこの蓄積は転写レベルの変動ではないことからタンパク質の分解制御が関与

していることが推察された。一方DNAダメージに応答して誘導されるp21発現は、ARID1Aノックダウン細胞では抑制された。このときp53タンパク質量の蓄積は正常に起きていたことから、DNAダメージによるp21発現誘導にはARID1Aが協調的に関わっていることが推察された。

(3) ARID1Aによるp21の転写活性制御

ARID1Aノックダウン時には、DNAダメージによるp21発現誘導が抑制されたことから、ARID1Aがp21の転写誘導に関与していることが推察された。さらにARID1Aはp53と相互作用していることも免疫沈降-Western blot解析により明らかとなり、ARID1Aはp53と協調的に作用してDNAダメージ存在時に細胞周期を抑制するためにp21発現を誘導する機能を持つことが示唆された。この仮説を検証するためにルシフェラーゼアッセイによりARID1Aとp21プロモーター活性の関係を検討したところ、ARID1Aの発現量依存的にp21のプロモーター活性が上昇することがわかった。さらにARID1Aとp53との同時発現では相乗効果が見られたことから、ARID1Aにはp53と協調的に作用することでDNAダメージ時におけるp21の転写誘導をサポートしている機能を持っていることが明らかとなった。

以上の成果より、ARID1AはDNAダメージに応答して自身のタンパク質量が安定化され蓄積されることにより、p53と協調的に作用してp21の発現誘導を促し、細胞周期を抑制させることにより細胞のがん化を防ぐ働きを持つことが明らかとなった。

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0件)

〔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：
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

上川 篤志 (UEKAWA, Atsushi)

聖マリアンナ医科大学・医学部

研究技術員

研究者番号：60534253

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：