

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：15101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06414

研究課題名(和文)テロメラーゼ抑制遺伝子の機能解析から解き明かすがんの不死化形質

研究課題名(英文)Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity and cell immortalization.

研究代表者

大平 崇人(Takahito, Ohira)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60757665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：テロメラーゼは、多くのヒトがん細胞で活性化されており、不死化能と増殖能亢進に重要な役割を担っている。これまで我々は、テロメラーゼ抑制遺伝子としてPITX1を同定した。本研究において、PITX1に結合する新規分子を明らかにするためにFLAGタグを付加したPITX1タンパクを用いて、免疫沈降法とLC/MS/MSタンパク同定法によるプルダウン解析を実施した。その結果、テロメラーゼ抑制機構に関わる新規のタンパク複合体としてPITX1/ZCCHC10の存在を明らかにし、新たなテロメラーゼ制御機構の可能性を提唱した。

研究成果の概要(英文)：Telomerase ribonucleic enzyme plays an essential role in cellular immortalization. The catalytic subunit of telomerase holoenzyme is hTERT know key regulator of telomerase activity. Thus, hTERT is an attractive target for the discovering of cancer-specific treatment. Previously, we reported PITX1 can suppress hTERT expression for regulation of transcription manner in melanoma cells. However, the detailed mechanism underlying which negative regulation including counterpart factors remains unclear.

Here, using FLAG pull-down methods, we identified ZCCHC10 as a novel PITX1 interacting protein. PITX1 protein interacts via their homeodomain with the CCHC domain of ZCCHC10. Furthermore, co-expression of PITX1 and ZCCHC10 inhibition of hTERT transcription in A2058 cells. Additionally, ZCCHC10 expression level is decrease in melanoma cell lines and tissues. These data suggested that ZCCHC10-PITX1 complex proteins are a novel regulator of telomerase activity.

研究分野：腫瘍学

キーワード：テロメラーゼ hTERTメラノーマ LC/MS/MS PITX1 不死化 がん抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

研究の学術的背景

正常体細胞は、増殖に伴い染色体末端構造であるテロメアが短縮し、最終的には細胞老化またはアポトーシスが誘導される。一方、がん細胞ではテロメアを合成伸長するはたらきをもつテロメラーゼの活性化により、分裂停止を回避、無限の増殖能を獲得している。正常ヒト体細胞では、テロメラーゼ活性は認められないが、がん細胞においては 80-90% ときわめて高い頻度で活性が認められている。したがって、テロメラーゼ制御機構を理解することは、発がん機構の解明およびがんの無限増殖性を標的とした治療薬の開発へ展開できる研究として期待されている (Oncology Reports,28:1945-1952, 2012)。

正常ヒト体細胞あるいは ES 細胞が分化過程でテロメラーゼ活性を失うことから正常な細胞中にテロメラーゼの発現を抑える内在性因子の存在が予測されていたものの、その多くが外来性遺伝子の強制発現を用いた解析によるものであり、従来法ではその同定は困難であり、長らく実体は不明であった。申請者らは、独自の染色体導入法を用いて、ヒト 5 番染色体上にコードされている paired-like homeodomain 1(PITX1)遺伝子とその本体であることをつきとめた (Mol.Cell.Biol,31:1624-36,2011)。

染色体導入法の特徴として、プロモーター領域を含めた遺伝子の全長 1 コピーを任意の細胞に導入することが可能であり、より生理的な条件下で遺伝子の機能を解析することが可能となる。つまり、PITX1 によるテロメラーゼの抑制効果は、過剰発現系に頼ることなく、遺伝子が本来もつ生理的な機能再現によって、がんの不死化能を阻害する真の効果であると考えられる。

PITX1 は、抑制性転写因子としてテロメラーゼの主要構成因子である telomerase reverse transcriptase:TERT 遺伝子の 5' 制御領域に直接結合し、TERT の発現を抑制していた。また、PITX1 を制御している上流因子としてマイクロ RNA19b(miR-19b)を同定し、マイクロ RNA が直接がん抑制遺伝子を調節することでテロメラーゼをコントロールする制御経路をはじめ明らかにし報告した (T ohira et al, Scientific Reports :online, 2015)。さらに、申請者および他のグループの報告から、PITX1 はメラノーマを始め、大腸がん、肺がん、食道がん、胃がん、口腔扁平上皮がんなど多岐のがん種において発現低下が報告されている (European Journal of Dermatology, 23: 344-349, 2013)。

一方、がんは遺伝子の発現異常による疾患であることから、分子メカニズムの理解を基盤とした発がん経路研究により、がん細胞の生存に重要な機能を担うドライバー遺伝子が次々と明らかにされ、近年ではドライバー遺伝子をターゲットとした分子標的薬の開発が盛んに行われ成果を上げている。そこで

本研究では、がん細胞に必須な不死化形質を標的にし、PITX1 による TERT 遺伝子抑制機能に着目、その詳細な機能解析から新規制がん戦略の基盤となる分子経路を明らかにし、抗がん剤や予後予測マーカー等の応用開発への可能性を見出すことを目的とする。

多くのタンパク質は単独で機能するわけではなく、他のタンパク質との相互作用によって複合体を形成して機能していることから、機能単位としてはたらくタンパク複合体の構成成分を決定することは、目的遺伝子自身の機能を解析する上で特に有効な手段である。そこで、先行研究において、PITX1 に結合する新規分子を明らかにするために FLAG タグを付加した PITX1 タンパクを作製し、免疫沈降法と LC/MS タンパク同定法を用いたプルダウン解析を行った。その結果、テロメラーゼ活性が抑制されている U2OS 細胞内で特異的に、PITX1 と結合する新規の遺伝子として Zinc Finger CCHC domain containing 10(ZCCHC10)を同定した。一方、テロメラーゼ活性をもつ HeLa 細胞や 293T 細胞では、ZCCHC10 の PITX1 タンパクへの結合は検出されなかった。さらに、PITX1 と ZCCHC10 遺伝子を一過性に共発現させたヒトメラノーマ細胞株 A2058 において、PITX1 単独の発現実験と比べて、さらに高い TERT の抑制効果が認められた。これらのことより、テロメラーゼ抑制機構に関わる新規の可能性として PITX1/ZCCHC10 機能性タンパク複合体の存在が示唆された。

そこで本研究では、PITX1/ZCCHC10 複合体の詳細な分子動態および機能解析を通して、テロメラーゼ制御の新たな知見から、がん細胞の不死化能獲得の分子機序に迫り、その情報を元に新規的な制がん戦略の基盤となる戦略提示を行いたいと考えた。

2. 研究の目的

テロメラーゼは、がんに無限の不死化形質を与える酵素である。がんの無制限な増殖は正常な細胞の機能を著しく低下させ、最終的には臓器全体の機能不全につながる。したがって、テロメラーゼの制御機構を理解することは、発がん機構の解明およびがんの無限増殖性をターゲットとした治療薬の開発に直接繋がると期待される。

これまで申請者は、がん細胞へ正常ヒト染色体を導入することのできる独自の染色体工学的手法を用いて、新規テロメラーゼ抑制遺伝子 PITX1 を同定し、さらに FLAG タグを用いたプルダウン解析により PITX1 タンパクに直接結合する新たな遺伝子として ZCCHC10 を発見した。興味あることに PITX1/ZCCHC10 複合体は機能性タンパクとしてテロメラーゼ活性の阻害に関与している可能性が示唆された。したがって、本研究では PITX1/ZCCHC10 複合体のテロメラーゼ活性制御に関わる詳細な機能解析を通

して、がん細胞における不死化能の理解から新たな制がん戦略の提示を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)PITX1 と ZCCHC10 のタンパク結合部位の決定

PITX1 と ZCCHC10 の結合部位を探索するために、PITX1 上と ZCCHC10 上の特徴的なドメインを検索したところ、PITX1 上には homeodomain と OAR domain を、ZCCHC10 上は CCHC domain をタンパクの構造内に含むことを確認した。

次に、FLAG-ZCCHC10 の過剰発現用のプラスミドである pFLAG-CAG ZCCHC10 vector を鋳型にして、インバース PCR 法により CCHC domain を欠損させた ZCCHC10 を発現する pFLAG-CAG ZCCHC10 Δ CCHC vector を構築(図 1a)、続いてそれらの vector と Wild Type(WT) PITX1 を A2058 細胞に導入し、免疫沈降法(IP)による PITX1 との結合部位探索を行った。

また同様に、PITX1 上の ZCCHC10 の結合部位を決定するために、FLAG-PITX1 の過剰発現用プラスミドである pFLAG-CAG PITX1 vector を鋳型にして、インバース PCR により homeodomain と OAR domain を欠損させた PITX1 を発現する pFLAG-CAG PITX1 Δ homeodomain1/2(Δ H1 および Δ H2) vector と pFLAG-CAG PITX1 Δ OAR vector を構築(図 2a)、続いてそれらの vector と WT ZCCHC10 を A2058 細胞に導入し、IP による ZCCHC10 との結合部位探索を行った。

(2)PITX1/ZCCHC10 タンパク複合体形成とその阻害条件における TERT 抑制効果への影響検討

pFLAG-CAG PITX1 Δ H1, Δ H2, Δ OAR vector と pFLAG-CAG ZCCHC10 Δ CCHC vector をそれぞれ用いて、A2058 細胞へトランスフェクションを行い、複合体形成阻害条件下での hTERT 抑制効果の検討を qRT-PCR によって検討を行った。

(3)メラノーマにおける PITX1/ZCCHC10 の発現動態解析

PITX1 はメラノーマにおいて正常細胞と比べて発現低下していることを確認していたので、本研究では正常細胞であるメラノサイトとメラノーマ細胞株における ZCCHC10 の発現動態解析をウェスタンブロッティングにより行った。加えて、ヒトメラノーマ組織における ZCCHC10 の発現についてもリアルタイム RT-PCR(qRT-PCR)によって検討を行った。

(4) PITX1 および ZCCHC10 ノックアウト(KO)による TERT 発現誘導の可能性の検討

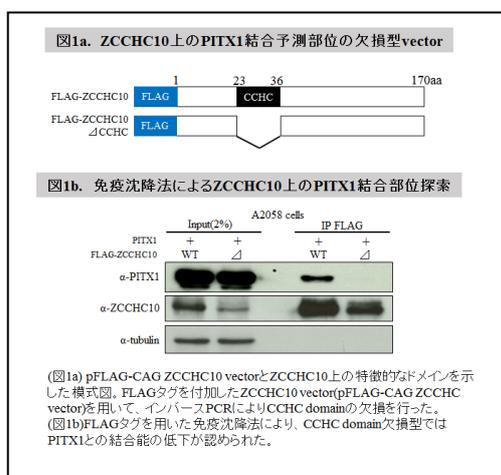
当初予定していた、CRISPER/Cas9 を用い

たゲノム編集での KO および siRNA でのノックダウン(KD)の実験が予定通りに進まなかったため、Pitx1 のコンディショナル KO マウスの作製を行った。Pitx1 の KO マウスは胎生致死となるため時期特異的な Pitx1-CKO マウスを作製するために、ゲノム編集技術(CRISPR/Cas9 システム)を用いてマウス ES 細胞への効率的な Pitx1 flox/flox 遺伝子変異導入を行った。

4. 研究成果

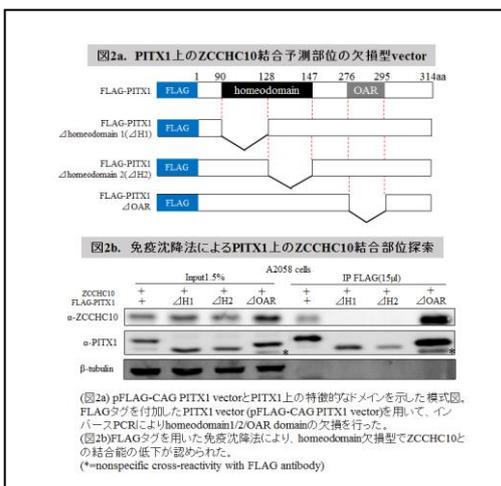
(1)PITX1 と ZCCHC10 のタンパク結合部位の決定

PITX1 および ZCCHC10 の発現量がもとと十分低い A2058 細胞において、ZCCHC10 の CCHC domain を欠損させたタンパクを発現させた場合、IP の結果、WT の



ZCCHC10 と比べて PITX1 への結合が顕著に低下した(図 1b)。

一方、PITX1 の homeodomain を前半部分と後半部分を欠損させて2種類のタンパクを発現させた場合、IP の結果、WT の PITX1 と比べて ZCCHC10 との結合が顕著に低下

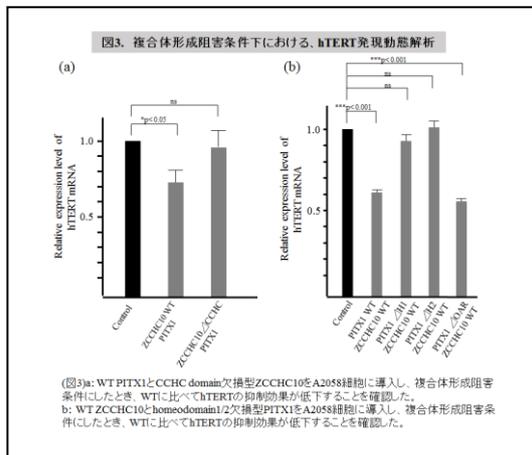


した。OAR domain の欠損では WT と変化は認められなかった(図 2b)。

以上の結果から、PITX1 の homeodomain と ZCCHC10 の CCHC domain で PITX1 と ZCCHC10 はタンパク複合体を形成していることが強く示唆された。

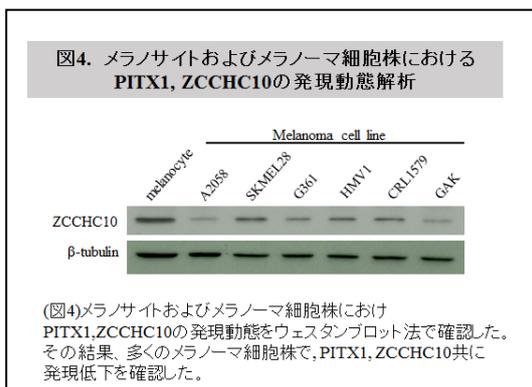
(2) PITX1/ZCCHC10 タンパク複合体形成とその阻害条件下における TERT 抑制効果への影響検討

CCHC 欠損型 ZCCHC10 は WT に比べ、hTERT の抑制効果が低下することが認められた(図 3a)。さらに、2 種の Homeodomain 欠損型 PITX1 は WT や OAR 欠損 PITX1 に比べ、hTERT の抑制効果が低下することが認められた(図 3b)。これらの結果から、PITX1 と ZCCHC10 は複合体を形成することで、hTERT 発現の抑制効果をより高く発揮する新規のタンパク相互作用機構の存在が強く示唆された。

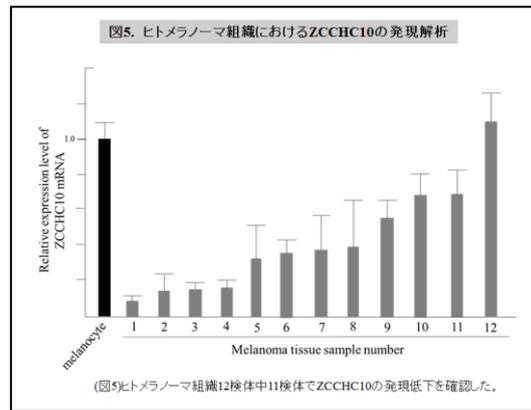


(3)メラノーマにおける PITX1/ZCCHC10 の発現動態解析

メラノサイトとメラノーマ細胞株における ZCCHC10 の発現動態解析をウェスタンブロッティングにより行った。その結果、メラノサイトと比較して、解析した 6 つ全てのメラノーマ細胞株 A2058、SKMEL28、G361、HMV1、CRL1579、GAK において ZCCHC10 のタンパク発現レベルの低下が認められた(図 4)。

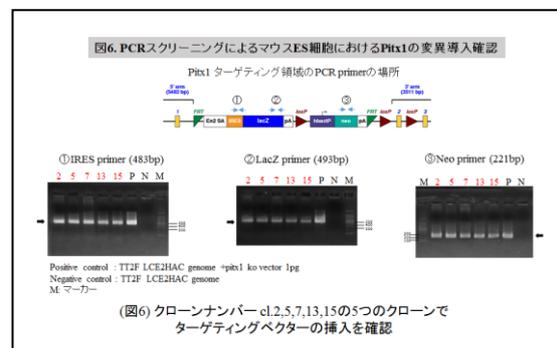


また、ヒトメラノーマ組織における ZCCHC10 の発現についてもリアルタイム RT-PCR(qRT-PCR)によって検討を行った結果、12 検体中 11 検体で ZCCHC10 の発現低下が認められた(図 5)。これらの結果から PITX1、ZCCHC10 の発現低下がメラノーマの発生・進展に強く関与している可能性が示唆された。



(4) PITX1 および ZCCHC10 ノックアウト(KO)による TERT 発現誘導の可能性の検討

ターゲティング用のベクターは IMPC より入手、Pitx1 のエクソン 2 番を Cre/loxP システムによって欠損させることのできるベクターコンストラクションとなっている。このターゲティングベクターをゲノム編集技術(CRISPR/Cas9 システム)を用いてマウス ES 細胞へ導入、Pitx1 遺伝子変異株の取得を行った。結果、87 個の薬剤耐性 ES クローンの内、5 クローンで Pitx1 領域への loxP サイトの挿入を PCR 解析によって確認した(図 6)。現在は、キメラマウスの作製を行っており、今後は両アレルに loxP 変異をもつ Pitx1 CKO マウスを作製し、Pitx1 の機能不全下における tert 発現への影響を解析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 1 件)

著者：H. Kugoh, T. Ohira, M. Oshimura
 題名：Studies of Tumor Suppressor Genes via Chromosome Engineering
 掲載雑誌:Cancers
 巻号：DOI:10.3390/cancers8010004.
 発行年：2016 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

① 著者：T. Ohira, H. Kojima, Y. Kuroda, D. Inaoka, K. Moriwaki, K. Kasuga, M. Kataoka, T. Inoue, M. Oshimura, H. Kugoh

題名 : PITX1 タンパク質は hTERT 発現を制御
するために ZCCHC10 と相互作用する
学会名 : 第 39 回 日本分子生物学会
場所 : パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
月・年 : 12 月 2016 年

② 著者 : T. Ohira, N. Sunamura, D Inaoka,
Y Nakayama, M Osaki, F Okada, M. Oshimura,
H. Kugoh.

題名 : miR-19b up-regulates hTERT
expression by inhibition of PITX1 in
melanoma cells

学会名 : 第 13 回 国際人類遺伝学会
場所 : 国立京都国際会館(京都府京都市)
月・年 : 4 月 2016 年

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

①鳥取大学大学院医学系研究科遺伝子工学
部 門 HP

<https://saiboukougaku.jimdo.c>

②鳥取大学染色体工学センターHP

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/chromosome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大平 崇人 (Takahito Ohira)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号 : 60757665

研究協力者

稲岡 大悟 (Daigo Inaoka)

黒田 悠子 (Yuko Kuroda)