

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18413

研究課題名(和文) 遺伝子増幅を標的とするがん治療の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular basis of cancer therapy targetting the gene amplification

研究代表者

南 謙太郎 (MINAMI, KENTARO)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任研究員

研究者番号：20735956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子増幅は腫瘍の発生や進展、抗がん剤耐性に重要であるものの、遺伝子増幅の制御機構はこれまでよくわかっていない。本研究では、BHLHE41の機能と発現制御機構を解析した。ドキシサイクリン誘導性にBHLHE41の発現細胞株を樹立した。誘導後の14日目で遺伝子増幅が減少することがわかった。遺伝子増幅を減少させる分子の発現が低い肺腺癌細胞株A549にBHLHE41を遺伝子導入した細胞を単離した。A549/BHLHE41細胞は親株の増殖より遅かった。BHLHE41の発現制御にユビキチン・プロテアソーム経路によるBHLHE41タンパク質の分解が関わっていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Although gene amplification is important for tumor development, progression and resistance to anticancer agent, the regulation mechanism of the gene amplification has not been understood. In this study, we investigated the function and regulation mechanism of BHLHE41. We established doxycycline inducible BHLHE41 expressing cells from cells having RRM1 gene amplification. After treatment doxycycline, RRM1 gene amplification in BHLHE41 expressed cells decreased at 14 days. We established BHLHE41 expressing cells from lung adenocarcinoma cell line A549. These cells grew more slowly than parental cells on dishes and in soft agar. We found that BHLHE41 was targeted for proteasome dependent degradation by ubiquitination.

研究分野：分子腫瘍学分野

キーワード：遺伝子増幅 抗癌剤耐性

#### 1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子の遺伝子増幅は腫瘍の発生、進展、患者の予後に関わり、がん治療にきわめて重要であるものの、がん遺伝子の増幅の制御機構はこれまでよくわかっていない。研究代表者は遺伝子増幅が原因で抗がん剤に対して耐性をもった複数の細胞について研究を行ってきた。これら細胞に、転写抑制因子 BHLHE41 を強制発現すると、遺伝子増幅が抑制され、mRNA とタンパク質の発現低下とともに抗がん剤の耐性が低下することを見いだした。この結果は、抗がん剤耐性遺伝子だけではなく、他の増幅した遺伝子も減少することが示唆される

#### 2. 研究の目的

遺伝子増幅の発生については増幅遺伝子の解析から、染色体の断裂と融合、染色体分裂での再断裂の周期 Breakage-fusion-bridge (BFB) cycle の存在が関わっていると考えられているが、遺伝子増幅がどのように制御されているのかについては不明である。本研究は BHLHE41 による遺伝子増幅の減少の制御機構の理解と BHLHE41 の発現制御機構の解明を目指すとともに、遺伝子増幅をターゲットとした新たな腫瘍の治療の可能性を探ることを目的とする。

#### 3. 研究の方法

(1) 遺伝子増幅減少効果がいつどのように起こるのかを RRM1 遺伝子増幅を持つ MGEM6 にドキシサイクリン誘導性に BHLHE41 が発現する細胞株を樹立する。樹立後、ドキシサイクリン投与有り無しで一定時間ごとにゲノム DNA を回収し、増幅した遺伝子がいつ減少するかを real-time PCR を用いて調べる。

がん遺伝子 N-myc の遺伝子増幅を持つ細胞株に BHLHE41 を発現させ、遺伝子増幅の減少効果を real-time PCR、それに伴う腫瘍増殖抑制効果を MTT 法または in vivo で検討する。

(2) より広範な各種のヒト腫瘍臨床サンプルの広範な遺伝子と予後の情報などが蓄積されている TCGA データベースからの情報を解析し、BHLHE41 発現と増幅が予測されるがん遺伝子の遺伝子発現の相関、予後を比較して解析する。

(3) BHLHE41 の発現が低い肺腺がん細胞株に BHLHE41 の遺伝子導入したときの腫瘍増殖への影響を MTT 法または軟寒天増殖法で検討する。さらに、NOD/SCID マウスに BHLHE41 の強制発現細胞もしくは親細胞を移植した時の腫瘍重量を検討する。

(4) BHLHE41 の発現制御機構を解析する。

#### 4. 研究成果

(1) MGEM6 にドキシサイクリン誘導性に BHLHE41 が発現する細胞株を樹立した。この細胞にドキシサイクリンを処理し、七日ごとにゲノム DNA を回収、real-time PCR 法を

用いて RRM1 の遺伝子増幅の減少を調べた。その結果、ドキシサイクリン処理後 14 日目から RRM1 の遺伝子増幅が減少した(図 1)。この結果は複数の BHLHE41 発現誘導株で得られた。

がん遺伝子 N-myc 遺伝子の増幅を持つ SK-N-BE 細胞に BHLHE41 発現誘導株を樹立したが、すでに BHLHE41 が N-myc を転写的に負に調節する報告があり、遺伝子増幅減少効果の解析に用いることができなかった。

(2) TCGA の乳癌のがんゲノム解析データから遺伝子増幅の有無と BHLHE41 mRNA の発現との関係を調べた。その結果、がん遺伝子 myc、CCNE2(サイクリン E2)、ZNF217、SRSF2 遺伝子の増幅の有無と BHLHE41 の発現量の間には逆相関があることを見出した(図 2)。さらにこれらのカプランマイヤー解析から、myc、CCNE2 の遺伝子増幅の有無はそれぞれ乳癌の予後不良因子であることを見いだした。また、データ数が少ない為、有意差は認められないが ZNF217 や SRSF2 の遺伝子増幅は予後不良の傾向があった。

(3) BHLHE41 の発現が低い肺癌細胞株 A549 細胞に BHLHE41 安定発現株を作製した。MTT 法を用いて増殖能を調べたところ A549/BHLHE41 細胞は A549 に比べて増殖能が遅かった。さらに、軟寒天を用いた増殖アッセイでも A549/BHLHE41 細胞の増殖は遅かった。次に、A549 もしくは A549/BHLHE41 細胞を NOD/SCID マウスに移植し、四週間後に腫瘍重量を測定したところ。A549/BHLHE41 の腫瘍重量は A549 より 1/2 から 1/3 であった。このことから BHLHE41 は腫瘍抑制因子としても働くことが示唆された。

(4) A549 に BHLHE41 を強制発現すると、mRNA とタンパク質レベルの相関が得られない細胞株が得られた。A549 では BHLHE41 のタンパク質の分解が亢進しているのではないかと考え、プロテアソーム阻害剤 MG132 を処理すると BHLHE41 のタンパク質が増加した。BHLHE41 がユビキチン化されてプロテアソームで分解されることを調べるために、HEK293FT 細胞を用いて、BHLHE41 と ubiquitin の遺伝子導入を行い、免疫沈降を行った。その結果、同時に遺伝子導入した細胞にだけラダー状のバンドが得られた。このことから、BHLHE41 の発現制御機構の一つにユビキチン・プロテアソーム経路による BHLHE41 のタンパク質分解が関わっていることが示唆された。

#### 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 4 件)

1. Tabata S, Yamamoto M, Goto H, Hirayama A, Ohishi M, Kuramoto T, Mitsuhashi A, Ikeda R, Haraguchi M, Kawahara K, Shinsato Y, Minami K, Saijo A, Hanibuchi M, Nishioka Y, Sone S, Esumi H, Tomita M, Soga T, Furukawa T, Akiyama SI. Thymidine Catabolism as a Metabolic Strategy for Cancer Survival. *Cell Rep.* 19:1313-1321, 2017. (査読有), doi: 10.1016/j.celrep.2017.04.061.
  2. Shashni B, Alshwimi A, Minami K, Furukawa T, Nagasaki Y, Nitroxide radical-containing nanoparticles as potential candidates for overcoming drug resistance in epidermoid cancers, *Polymer*, 116, 429-438, 2017 (査読有), doi:10.1016/j.polymer.2017.02.052
  3. Tanabe K, Shinsato Y, Furukawa T, Kita Y, Hatanaka K, Minami K, Kawahara K, Yamamoto M, Baba K, Mori S, Uchikado Y, Maemura K, Tanimoto A, Natsugoe S. Filamin C promotes lymphatic invasion and lymphatic metastasis and increases cell motility by regulating Rho GTPase in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 8:6353-6363, 2017. (査読有), doi: 10.18632/oncotarget.14087.
  4. Moinuddin FM, Shinsato Y, Komatsu M, Mitsuo R, Minami K, Yamamoto M, Kawahara K, Hirano H, Arita K, Furukawa T. ATP7B expression confers multidrug resistance through drug sequestration. *Oncotarget.* 7(16):22779-90, 2016 (査読有) doi: 10.18632/oncotarget.8059.
- [学会発表](計 22 件)
1. 渡邊 いく子、南 謙太郎、永田 俊行、山本 雅達、新里 能成、河原 康一、下川 倫子、佐藤 雅美、古川 龍彦、腫瘍抑制因子 DEC2 のユビキチン・プロテアソーム系による発現制御、第 70 回日本薬理学会西南部会、2017 年 11 月(鹿児島)
  2. 南 謙太郎、品川 憲穂、新里 能成、山本 雅達、河原 康一、下川 倫子、川畑 拓斗、池田 龍二、武田 泰生、古川 龍彦、gemcitabine 耐性膵癌細胞において ribonucleotide reductase は gemcitabine 耐性克服の標的となる、第 25 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2017 年 7 月(鹿児島)
  3. 下川 倫子、河原 康一、川畑 拓斗、上條 陽平、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、核小体による細胞分裂監視、第 21 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2017 年 6 月(福岡)
  4. 下川 倫子、河原 康一、川畑 拓斗、上條 陽平、白石 岳大、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、核小体の再編成により細胞分裂を制御する新たなストレス応答と癌治療薬の開発、第 8 9 回生化学会大会、2016 年 9 月(仙台)
  5. 川畑 拓斗、河原 康一、下川 倫子、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、エネルギー代謝を制御する核小体ストレス応答の分裂期チェックポイント機構としての新たな役割の解明、第 4 回がん代謝研究会、2016 年 7 月(鹿児島)
  6. 濱崎 健吾、河原 康一、川畑 拓斗、下川 倫子、白石 岳大、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、武井 孝行、吉田 昌弘、古川 龍彦、核小体ストレス応答を利用した新たな抗癌剤の開発、第 4 回がん代謝研究会、2016 年 7 月(鹿児島)
  7. 河原 康一、川畑 拓斗、下川 倫子、上條 陽平、白石 岳大、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、核小体ストレス応答による細胞分裂監視機構とこれを利用した抗がん剤の開発、日本ケミカルバイオロジー学会 第 11 回年会、2016 年 6 月(京都)
  8. 白石 岳大、有馬 一成、河原 康一、上條 陽平、川畑 拓斗、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、濱田 季之、古川 龍彦、バイオインフォマティクス技術を用いた急性リンパ性白血病の再発に関する遺伝子の探索、平成 28 年度日本生化学会九州支部例会、2016 年 5 月(鹿児島)
  9. 濱崎 研悟、河原 康一、川畑 拓斗、下川 倫子、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、武井 孝行、吉田 昌弘、古川 龍彦、核小体を起点としたストレス応答の新たな生理機能の解明と抗がん剤の開発、平成 28 年度日本生化学会九州支部例会、2016 年 5 月(鹿児島)
  10. 下川 倫子、河原 康一、川畑 拓斗、上條 陽平、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、バイオイメージング技術による細胞分裂期チェックポイントとしての核小体ストレス応答の役割の解明、第 20 回日本がん分子標的治療学会 学術集会、2016 年 5 月(別府)
  11. 河原 康一、川畑 拓斗、下川 倫子、上條 陽平、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、核小体ストレス応答による細胞分裂監視機構と抗癌剤の開発、第 20 回日本がん分子標的治療学会 学術集会、2016 年 5 月(別府)
  12. 川畑 拓斗、河原 康一、上條 陽平、白

- 石 岳大、堀口 史人、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、核小体の完全性維持機構による細胞分裂制御と抗腫瘍薬の開発、日本薬学会 第 136 年会、2016 年 3 月（横浜）
13. Takuto Kawahata, Kohichi Kawahara, Fumito Horikuchi, Yohei Kamijyo, Takehiro Shiraiishi, Masatatsu Yamamoto, Yoshinari Shinsato, Kentaro Minami, Kazunari Arima, Toshiyuki Hamada, Tatsuhiko Furukawa. Discovery of Tumor Suppressive Function and Therapeutics by a Novel Reporter System for Nucleolar Stress Response., Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics. 2016. February (Hawaii, USA)
  14. Yohey Kamijo, Kohichi Kawahara, Takuto Kawahata, Takehiro Shiraiishi, Fumito Horikuchi, Masatatsu Yamamoto, Yoshinari Shinsato, Kentaro Minami, Toshiyuki Hamada, Kazunari Arima, Tatsuhiko Furukawa, Identification of novel regulatory genes on nucleolar stress response by combination analysis of shRNA library screening in vitro and cancer patient gene expression data base in silico., Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics. 2016. February (Hawaii, USA)
  15. 上條 陽平、河原 康一、川畑 拓斗、白石 岳大、堀口 史人、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、濱田 季之、有馬 一成、古川 龍彦、shRNA ライブラリーとがん患者遺伝子発現データベースを組み合わせた解析による核小体ストレス応答機構の制御基盤の解明、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学大会・合同大会、2015 年 12 月（神戸）
  16. 川畑 拓斗、河原 康一、上條 陽平、白石 岳大、堀口 史人、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、癌抑制因子 p53 を制御する核小体ストレス応答の可視化レポーターシステムの構築と新たな生理作用の解明、第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学大会・合同大会、2015 年 12 月（神戸）
  17. 河原 康一、川畑 拓斗、上條 陽平、白石 岳大、堀口 史人、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、核小体ストレス応答の可視化レポーターシステムの構築とバイオイメージングによる新たな生理作用の解明、第 24 回日本バイオイメージング学会学術集会、2015 年 9 月（東京）
  18. 藤本 啓汰、南 謙太郎、新里 能成、山本 雅達、河原 康一、上條 陽平、川畑 拓斗、白石 岳大、F.M MOINUDDIN、田辺 寛、永田 俊行、加治 屋勝子、南 雄二、古川 龍彦、Gemcitabine 耐性膵癌細胞における耐性克服剤の探索、第 8 回トランスポーター研究会九州部会、2015 年 7 月（鹿児島）
  19. 白石 岳大、河原 康一、川畑 拓斗、上條 陽平、堀口 史人、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、核小体ストレス応答機構による腫瘍化進展制御と抗癌治療、第 8 回トランスポーター研究会九州部会、2015 年 7 月（鹿児島）
  20. 川畑 拓斗、河原 康一、上條 陽平、白石 岳大、堀口 史人、山本 雅達、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、エネルギー代謝を制御する核小体ストレス応答と新たな抗がん治療の試み、第 3 回がん代謝研究会、2015 年 7 月（金沢）
  21. 河原 康一、川畑 拓斗、堀口 史人、上條 陽平、新里 能成、南 謙太郎、有馬 一成、濱田 季之、古川 龍彦、核小体ストレス応答機構による腫瘍化進展制御と抗癌治療、第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2015 年 6 月（松山）
  22. Kawahara K, Kawahata T, Horikuchi F, Kamijo Y, Yamamoto M, Shinsato Y, Minami K, Arima K, Hamada T, Furukawa T. Ribosomal protein-p53-MDM2 signaling by nucleolar stress response and drug discovery, American Association for Cancer Research (AACR) Annual Meeting 2015, 2015 April (Philadelphia, USA)
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕
- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)
- 〔その他〕  
ホームページ  
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~molo ncl/>
6. 研究組織  
(1) 研究代表  
南 謙太郎 (MINAMI KENTARO)  
鹿児島大学・歯学総合研究科・特任研究員  
研究者番号：20735956