

令和 5 年 5 月 23 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07080

研究課題名（和文）多段階発がん過程におけるMeis1経路の網羅的機能解析

研究課題名（英文）Comprehensive functional analysis of the Meis1 pathway in the multistep carcinogenesis process

研究代表者

若林 雄一（Wakabayashi, Yuichi）

千葉県がんセンター（研究所）・がんゲノムセンター 実験動物研究部・部長

研究者番号：40303119

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）：Meis1ノックダウン細胞株を正常皮膚ケラチノサイト由来細胞C5N、皮膚扁平上皮がん由来細胞B9、D3の3種類の細胞株を用いて作成し、RNA sequencingを行った。その結果、上皮性細胞マーカーにも用いられる高分子型のKeratin5/6a/6b/14/15がC5NおよびB9-Meis1ノックダウン細胞株で発現上昇していた。さらにEMT関連転写因子のSnai1/2や間葉系細胞マーカーのVimentinがMeis1ノックダウン細胞株で発現低下する傾向が認められた。Meis1-ChIP-seqデータと併せて解析した結果、RNA sequencingの結果が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、ヒトがんの大規模次世代sequenceが行われているが本課題はそれらとは一線を画し、再現性良くマウスに腫瘍を誘導することのできるマウス皮膚化学発がんモデルを中心にすえたものである。Meis1は古くから研究されているがその機能に関しては不明な点が多く治療標的とすることが困難ながん遺伝子である。その経路を解明することは新たながん治療標的の解明へとつながり、本課題の遂行は基礎科学的解明にとどまらずライフイノベーションの実現に寄与するものである。

研究成果の概要（英文）：Meis1 knockdown cell lines were generated using three cell lines: C5N, derived from normal skin keratinocytes, and B9 and D3, derived from squamous cell carcinoma of the skin, and RNA sequencing was performed. The results showed that high-molecular-weight Keratin5/6a/6b/14/15, which are also used as epithelial cell markers, were upregulated in the C5N and B9-Meis1 knockdown cell lines. The results of RNA sequencing were confirmed when analyzed in conjunction with the Meis1-ChIP-seq data.

研究分野：実験病理学

キーワード：化学はつがん Meis1 RNA sequencing Chip sequencing

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

申請者らの研究グループは以前、マウス皮膚全体で *Meis1* を欠損させた後に、化学発がん剤である DMBA (dimethylbenz(a)anthracene)-TPA (tetradecanoyl-phorbol-acetone) による多段階皮膚発がん実験を行い、*Meis1* 欠損が良性腫瘍数の減少および扁平上皮がんへの悪性化率の有意な低下を引き起こすことを報告した。さらに、各ステージにおける *Meis1* の転写制御の網羅的解析を行うため、マウス各皮膚腫瘍からクロマチンの抽出と抗 *Meis1* 特異抗体による ChIP-sequencing (ChIP-seq) を実施した。その結果、正常皮膚のシーケンスリードのピークをコントロールとした場合、早期良性腫瘍において 9,314 箇所、後期良性腫瘍においては 581 箇所および扁平上皮がんにおいては 48 箇所のピークが検出された。次に、これらのピークがシス領域に存在すると考えられる 10 個の遺伝子を抽出した。マウス皮膚扁平上皮がん細胞である B9 とその *Meis1* ノックダウン細胞株において 10 遺伝子の qRT-PCR を行い、4 つの遺伝子 (*Dedd2*, *Sh2b1*, *Cep120*, *Stk25*) の発現が *Meis1* の発現と連動することを確認した。

2. 研究の目的

以上の *Meis1* 下流候補遺伝子の強制発現細胞やノックダウン細胞を用いた細胞増殖アッセイ等を中心とした機能解析を培養細胞を用いて行うことを本申請課題の目的のひとつとする。また、データのバリデーションも兼ねて腫瘍細胞株由来の RNA を用いて、同様の RNA-seq を再度行い、さらなる新規の *Meis1* 下流候補遺伝子の探索を行う。これらのデータと ChIP-seq のデータとを統合して *Meis1* が制御する網羅的な下流因子の同定およびそれらの遺伝子ネットワーク解析と機能解析を実施することで、*Meis1* を中心とした腫瘍悪性化機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) *Meis1* 下流候補遺伝子の機能解析

既に行った ChIP-seq により *Meis1* 下流候補遺伝子として同定されている *Stk25* のノックダウン細胞株を B9 細胞を用いて作製する。既に作製済みの *Meis1* ノックダウン細胞株と同時に培養し、XTT (細胞増殖) アッセイ、TUNEL アッセイ、酸性 Gal (細胞老化) アッセイ、マイグレーションアッセイ等を行う。

(2) *Meis1* ノックダウン細胞株由来 RNA を用いた RNA sequencing

Meis1 ノックダウン細胞株を正常皮膚ケラチノサイト由来細胞 C5N、皮膚扁平上皮がん由来細胞 B9、D3 の 3 種類の細胞株を用いて作成し、RNA sequencing を行う。Sequence データは TopHat2 によるマッピング後、FPKM (Fragments Per Kilobase of exon per Million mapped fragments) に変換し、発現解析は Agilent Technologies の GeneSpringGX により網羅的遺伝子発現解析を実施する。次に発現変動する遺伝子リストと ChIP-Seq の遺伝子リストから *Meis1* 標的候補遺伝子を抽出する。それらの遺伝子のアノテーションは DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>) による Gene Ontology 解析により実施し、遺伝子ネットワーク解析には IPA (QIAGEN) を使用する。候補遺伝子については qRT-PCR や ChIP-qPCR を行いバリデーションを行う。

(3) *Meis1* の神経幹細胞における機能解析

Meis1 は表皮幹細胞の維持に働くことが示されていたことから、神経幹細胞で Cre を発現する Nestin-Cre マウスと *Meis1* コンディショナルノックアウトマウスとの交配を行い、表現型の解析を行う。

4. 研究成果

(1) *Meis1* 下流候補遺伝子の機能解析

Stk25 のノックダウン細胞株を皮膚扁平上皮がん細胞の B9 を用いて作製した。するとこの細胞株は *Meis1* ノックダウン細胞株と同様に細胞遊走と増殖能に異常を来すことが判明した。さらにプロモーター領域をクローニングしてルシフェラーゼアッセイを行った。*Meis1* の全長 cDNA 配列と *Stk25* のプロモーター領域を連結させたルシフェラーゼコンストラクトを同時に B9 細胞にトランスフェクションしたところ、強いルシフェラーゼ活性が検出され、*Stk25* が *Meis1* の下流で機能することが確認された。*Meis1* ノックダウン細胞株に *Stk25* を高発現させたところ、遊走能にはそれほど影響を与えなかったが、増殖能はレスキューされるという結果が得られた。

(2) *Meis1* ノックダウン細胞株由来 RNA を用いた RNA sequencing

Meis1 ノックダウン細胞株を正常皮膚ケラチノサイト由来細胞 C5N、皮膚扁平上皮がん由

来細胞 B9、D3 の 3 種類の細胞株を用いて作成し、RNA sequencing を行った。4700 万リードから 5500 万リードのリード数を得ることができた。アダプター配列等を除去した後に、ゲノム上にマッピングしたところ、86 パーセントから 96 パーセントのリードをゲノム上にマッピングすることができた。これらの中から、コントロール細胞とノックダウン細胞との間で発現量が 2 倍以上変動した遺伝子を抽出することに成功した。それらの中でも Meis1 の発現減少は表皮細胞株においてサイトケラチンの発現上昇と、EMT(Epithelial-Mesenchymal Transition)関連遺伝子の発現減少を誘導することがわかった。具体的には、上皮性細胞マーカーにも用いられる高分子型の Keratin5/6a/6b/14/15 が C5N および B9-Meis1 ノックダウン細胞株 で発現上昇していた。さらに EMT 関連転写因子の Snai1/2 や間葉系細胞マーカーの Vimentin が Meis1 ノックダウン細胞株 で発現低下する傾向が認められた。さらに、すでに取得済みであった多段階悪性化過程の Meis1-ChIP-seq データと併せて解析した結果、Krt5 および Krt15 において正常皮膚および 早期良性腫瘍で両遺伝子の 5'UTR 上流にリードピークが検出された。一方、EMT 関連転写因子 Snai2 においても同様に検索した結果、早期良性腫瘍においてピークが検出された。そこで Krt5、Krt15 および Snai2 の 5'UTR 上流の配列を検索した結果、1 kb 以内に Meis1 結合モチーフのコンセンサス様配列がそれぞれ 1 つ以上確認できた。

(3) Meis1 の神経幹細胞における機能解析

神経幹細胞で Cre を発現する Nestin-Cre マウスと Meis1 コンディショナルノックアウトマウスとの交配を並行して行った。しかしながら、Nestin-Cre 陽性かつ Meis1flox アレルホモのマウスが得られず、胎生致死の可能性も示唆された。交配を進めると若干、ホモ個体は少ないものの、生まれることはわかった。生まれた個体は野生型に比べてサイズが小さく、水頭症を発症していることがわかった。さらに大脳皮質の層構造に異常を来していることがわかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Saito M, Sada A, Fukuyo M, Aoki K, Okumura K, Tabata Y, Chen Y, Kaneda A, Wakabayashi Y, Ohki R.	4. 巻 142
2. 論文標題 PHLDA3 Is an Important Downstream Mediator of p53 in Squamous Cell Carcinogenesis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatolog	6. 最初と最後の頁 1040-1049
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2021.09.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okumura K, Saito M, Isogai E, Wakabayashi Y.	4. 巻 13
2. 論文標題 The Japanese Wild-Derived Inbred Mouse Strain, MSM/Ms in Cancer Research.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 1026
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers13051026.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Okumura K, Saito M, Wakabayashi Y.	4. 巻 70
2. 論文標題 A wild-derived inbred mouse strain, MSM/Ms, provides insights into novel skin tumor susceptibility genes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental animals	6. 最初と最後の頁 272-283
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.21-0017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 1.Okumura K, Saito M, Yoshizawa Y, Ito Y, Isogai E, Araki K, Wakabayashi Y.	4. 巻 39
2. 論文標題 Pak1 maintains epidermal stem cells by regulating Langerhans cells and is required for skin carcinogenesis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4756-4769
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41388-020-1323-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 2.Saito M, Kagawa N, Okumura K, Munakata H, Isogai E, Fukagawa T, Wakabayashi Y.	4. 巻 111
2. 論文標題 CENP-50 is required for papilloma development in the two-stage skin carcinogenesis model.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science.	6. 最初と最後の頁 2850-2860
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14533.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okumura K, Wakabayashi Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 The role of calcium metabolism in keratinocyte differentiation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Cancer Research.	6. 最初と最後の頁 45-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito M, Okumura K, Isogai E, Araki K, Tanikawa C, Matsuda K, Kamijo T, Kominami R, Wakabayashi Y.	4. 巻 139
2. 論文標題 A Polymorphic Variant in p19Arf Confers Resistance to Chemically Induced Skin Tumors by Activating the p53 Pathway.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1459-1469
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.12.027.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okumura K, Wakabayashi Y	4. 巻 14
2. 論文標題 The role of calcium metabolism in keratinocyte differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends in Cancer Research.	6. 最初と最後の頁 45-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito M, Okumura K, Isogai E, Araki K, Tanikawa C, Matsuda K, Kamijo T, Kominami R, Wakabayashi Y.	4. 巻 in press
2. 論文標題 A Polymorphic Variant in p19Arf Confers Resistance to Chemically Induced Skin Tumors by Activating the p53 Pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.12.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aoto Y, Okumura K, Hachiya T, Hase S, Sato K, Wakabayashi Y, Ishikawa F and Sakakibara Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Time-Series Analysis of Tumorigenesis in a Murine Skin Carcinogenesis Model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-31349-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okumura K, Saito M, and Wakabayashi Y.	4. 巻 5
2. 論文標題 The role of PTH in mouse skin tumorigenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Integrative Cancer Science and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 1000271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15761/ICST.1000271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okumura K, Saito M, Isogai E, Tokunaga Y, Hasegawa Y, Araki K, Wakabayashi Y.	4. 巻 142
2. 論文標題 Functional Polymorphism in Pak1-3' Untranslated Region Alters Skin Tumor Susceptibility by Alternative Polyadenylation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Invest Dermatol.	6. 最初と最後の頁 2323-2333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2022.02.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Isogai E, Okumura K, Saito M, Tokunaga Y, Wakabayashi Y.	4. 巻 43
2. 論文標題 Meis1 plays roles in cortical development through regulation of cellular proliferative capacity in the embryonic cerebrum	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biomed Res.	6. 最初と最後の頁 91-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2220/biomedres.43.91.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計16件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 奥村和弘、斎藤慈、磯貝恵理子、荒木喜美、若林雄一
2. 発表標題 Pak1の3' UTR多型は代替ポリアデニル化を制御しマウス皮膚がん感受性に影響を与える
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村和弘、斎藤慈、吉澤康博、磯貝恵理子、若林雄一
2. 発表標題 ランゲルハンス細胞のPak1遺伝子は皮膚幹細胞の維持に関与し多段階皮膚がんを制御する
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 若林雄一
2. 発表標題 MSM由来ES細胞を用いたがん抵抗性遺伝子座の解析
3. 学会等名 2020年度先端モデル動物プラットフォーム成果発表会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 奥村和弘、斎藤慈、磯貝恵理子、荒木 喜美、若林雄一
2. 発表標題 マウス系統間のPak1-3`UTRのSNPsは発現減少と腫瘍抑制に関連する
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥村和弘、斎藤慈、吉澤康博、磯貝恵理子、荒木 喜美、若林雄一
2. 発表標題 MSMマウスにおける腫瘍抵抗性遺伝子座の探索
3. 学会等名 第32回モロシヌス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥村和弘、斎藤慈、磯貝恵理子、荒木 喜美、若林雄一
2. 発表標題 順遺伝学に基づくMSMマウスの発がん抵抗性の解明
3. 学会等名 第34回発癌病理研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥村和弘、斎藤慈、磯貝恵理子、若林雄一
2. 発表標題 日本産野生由来近交系マウスMSMを用いた皮膚がん修飾因子の同定
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯貝恵理子、奥村和弘、斎藤慈、吉澤康博、田村優希、若林雄一
2. 発表標題 Meis1の脳皮質発生への関連性の検討
3. 学会等名 第32回モロシヌス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥村和弘、斎藤慈、磯貝恵理子、三浦郁夫、若菜茂晴、山口碧、設楽浩志、多屋長治、木南凌、若林雄一
2. 発表標題 順遺伝学的手法により明らかとなったマウス副甲状腺ホルモンの腫瘍抑制効果
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会富山市富山県民会館
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 斎藤慈、奥村和弘、磯貝恵理子、若林雄一
2. 発表標題 がん抑制遺伝子p19Arfに存在する非同義置換多型の機能解析
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会富山市富山県民会館
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥村和弘、斎藤慈、磯貝恵理子、若林雄一
2. 発表標題 順遺伝学に基づくMSMマウスのがん耐性に関する遺伝子の同定
3. 学会等名 第31回モロシヌス研究会札幌市北海道大学地球環境科学研究院
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤慈, 奥村和弘, 磯貝恵理子, 若林雄一
2. 発表標題 がん抑制遺伝子p19Arfに存在する非同義置換多型の腫瘍悪性化における役割
3. 学会等名 第31回モロシヌス研究会札幌市北海道大学地球環境科学研究院
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥村和弘, 齋藤慈, 磯貝恵理子, 荒木喜美, 若林雄一
2. 発表標題 皮膚早期良性腫瘍抵抗性遺伝子座Stmm1aの原因遺伝子の同定
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会大阪市大阪国際会議場
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤慈, 奥村和弘, 磯貝恵理子, 荒木喜美, 若林雄一
2. 発表標題 p19Arfに存在する非同義置換多型の腫瘍悪性化を制御する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会大阪市大阪国際会議場
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥村和弘, 齋藤慈, 徳永夕莉香, 磯貝恵理子, 荒木喜美, 若林雄一
2. 発表標題 Pak1-3'UTRの機能的多型は選択的ポリアデニル化を介して皮膚腫瘍感受性を制御する
3. 学会等名 第69回日本実験動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥村和弘、徳永夕莉香、磯貝恵理子、荒木喜美、若林雄一
2. 発表標題 樹状細胞におけるPak1欠損はDMBA/TPAただ南海皮膚がんによる腫瘍形成を抑制する
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/soshiki/jikkendobutsu/index.html

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	磯貝 恵理子 (Isogai Eriko) (40300917)	千葉県がんセンター(研究所)・発がん研究グループ 実験動物研究室・上席研究員 (82504)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------