

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592129

研究課題名（和文） 癌で高発現するヒストン脱アセチル化酵素活性化因子によるヒト卵巣癌発症機序の解析

研究課題名（英文） Analysis of ovarian tumorigenesis due to activators for histone deacetylases (HDACs) that are highly overexpressed in cancers

研究代表者 東辻久子(HISAKO HIGASHITSUJI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20402852

研究成果の概要（和文）：

癌遺伝子ガンキリンは卵巣癌で高発現し、pRb の分解促進、p16INK4a の cdk4 への結合阻害、p53 の分解促進、NFκB にヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 をリクルートし、NFκB の活性を抑制する。HSCO 遺伝子は卵巣癌で高発現し、p53 にヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1 をリクルートし、p53 の機能を抑制させる。ガンキリンや HSCO による HDAC の活性化は癌細胞の増殖や浸潤、転移能を亢進させた。この際、nicotinamide や TSA(trichostatin A)で HDAC 活性を抑制した場合、癌細胞の増殖や浸潤、転移能は抑制された。

研究成果の概要（英文）：

Protooncogene Gankyrin is overexpressed in ovarian cancer. Gankyrin accelerates to degrade pRb protein. Gankyrin inhibits the interaction of p16INK4a with cdk4. Gankyrin enhances to degrade p53 protein by MDM2. Gankyrin suppresses the activity of NFκappaB, partly due to recruitment of SIRT1 histone deacetylase to NFκappaB protein. HSCO gene is overexpressed in ovarian cancer. HSCO inhibits the activity of p53 due to recruitment of HDAC1 histone deacetylase to p53 protein. Gankyrin and HSCO activate the activity of HDACs. These enhanced activities of HDACs accelerate to grow cancer cells more aggressively. The activities of invasion and metastasis are enhanced due to these activated HDACs. Nicotinamide suppresses SIRT1 activity. TSA (Trichostatin A) inhibits HDAC1 activity. These HDAC inhibitors suppress the growth, invasion, and metastasis of cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産科婦人科学

キーワード：ガンキリン、HSCO、ヒストン脱アセチル化酵素、卵巣癌

## 1. 研究開始当初の背景

1) タンパク質のアセチル化、脱アセチル化は種々の細胞現象に関わっている。アセチル化ではアセチル化酵素 HATs がアセチル CoA の

アセチル基をリジン残基に転移する。ヒストンのアセチル化は遺伝子転写を活性化する。ヒストン脱アセチル化酵素 HDACs はリジン残基のアセチル基を除去する。ヒストンの脱ア

セチル化は転写を抑制する。HSCO-HDAC1 複合体、ガンキリン-SIRT1 複合体はヒストン脱アセチル化により遺伝子発現を変化させている。2) ノンヒストンタンパクのアセチル化、脱アセチル化は機能変換を引き起こす。p53 や NFκBp65 のアセチル化は転写因子としての働きを増強する。FoxO1 は酸化ストレス下で CBP/p300 によりアセチル化を受け、タンパク質が安定化し、核内 PML へ集積するが、PML に結合するヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 により脱アセチル化され、転写活性が上昇する。脱アセチル化 FoxO1 はポリユビキチン化を受けやすく、不安定になる。細胞内局在、タンパク質安定性、転写因子活性の変化が起こる。HSCO-HDAC1 複合体、ガンキリン-SIRT1 複合体は p53、NFκB 以外のノンヒストンタンパクを脱アセチル化することで癌化を促進する可能性がある。3) 我々はヒト卵巣癌において、ガンキリン、HSCO が高発現していることを見出した。ガンキリンは肝癌、食道癌、頭頸部癌、白血病で過剰発現が報告されている。HSCO は代謝異常症の原因遺伝子として同定されている。HSCO は HDAC1 に結合して p53 の脱アセチル化を亢進し、ポリユビキチン化、不安定化、分解を引き起こし、p53 の転写活性化能を抑制する。ガンキリンは SIRT1 に結合して NFκB の DNA 結合部位へ SIRT1 をリクルートして NFκB 転写機能を抑制する。ガンキリンも HSCO も結合するヒストン脱アセチル化酵素の機能を活性化することで働いている。4) 子宮頸癌、子宮内膜癌、卵巣癌で HDAC1 や SIRT1 の遺伝子過剰発現が報告されている。HDAC inhibitors のそれら癌細胞への抗癌作用の報告がある。血液癌において HDACs が急性骨髄性白血病の融合蛋白である PML-RARalpha によってリクルートされている。固型癌において HDACs が BRCA1 と結合している。HDACs の発現や機能異常のあ

る癌に対する HDAC inhibitors の効果は期待できる。

5) 異常な epigenetic な変化は癌細胞の hallmark であるので、HDAC 阻害剤は抗癌剤として適当である。HDAC 阻害剤は cell cycle arrest を引き起こし、細胞分化を促進し、癌細胞の細胞死を誘導する。HDAC 阻害剤は臨床治療で癌疾患に対して効果をあげたが HDACs に対して非選択的に働くものであったので臨床の Phase I trial は副作用が多かった。ある組織型の卵巣癌細胞に発現する HDACs を同定し、それらに特異的だがん細胞にのみ効果を示す HDAC 阻害剤、isoform specific な HDAC 阻害剤を開発する必要がある。ガンキリン、HSCO と SIRT1、HDAC1 との結合を阻害する化学物質を探すことで卵巣癌において SIRT1 や HDAC1 の機能を抑制して抗癌作用を示す isoform specific な HDAC 阻害剤が見つかる可能性がある。

6) ストレス反応において、タンパク質—タンパク質相互作用を介して SIRT1 活性を調節するメカニズムが 2 つ報告されている。AROS は in vitro、in vivo で DNA damage に対する p53 に依存した proapoptotic な遺伝子群 (bax や p21CIP1) の転写活性に対する SIRT1 の抑制的な働きを促進することにより、アセチル化 p53 を脱アセチル化する SIRT1 の活性を亢進する。DBC-1 (deleted breast in cancer-1) は SIRT1 と複合体を形成することで SIRT1 の機能をブロックする。DBC-1 は細胞がストレスをうけたとき、SIRT1 による脱アセチル化に依存した抗アポトーシス遺伝子 (MnSOD や Gadd45) の転写活性化や proapoptotic な遺伝子 BIM の転写抑制をブロックすることで SIRT1 活性を抑制して、細胞死の状態へ向かわせる。SIRT1 activator、inhibitor と SIRT1 との complex 形成を modulate することにより、SIRT1 の機能変換

を起こすことはガンキリンにおいても同様である。

## 2. 研究の目的

1) 卵巣癌細胞株 SK-OV3 に HDAC1 activator である HSCO を高発現、HSCO siRNA で内因性 HSCO を knockdown した場合、SIRT1 activator であるガンキリンを高発現、ガンキリン siRNA で内因性ガンキリンを knockdown した場合、ヒストンアセチル化、細胞増殖能、細胞周期、抗アポトーシス活性、造腫瘍能、細胞運動能等に対する効果を検討する。細胞の mRNA、タンパク発現を DNA microarray、proteomic approach で評価する。

2) 卵巣癌細胞株のゲノム中に存在するガンキリン、HSCO が結合する部位を Chip-on-chip 法で同定する。HSCO-HDAC1 interaction、ガンキリン-SIRT1 interaction によって変化した発現遺伝子を同定する。

3) HSCO-HDAC1 interaction、ガンキリン-SIRT1 interaction を阻害する有機低分子化合物をスクリーニングする。

4) 新しく得られた HDAC inhibitors 活性を有すると考えられる有機低分子化合物について、ヒストンアセチル化、細胞増殖能、細胞周期、抗アポトーシス活性、造腫瘍能、細胞運動能等に対する効果をみる。細胞の mRNA、タンパク発現の変化を DNA microarray、proteomic approach で評価する。

5) 卵巣表面上皮細胞特異的に Cre recombinase を発現する、あるいは、卵巣表面上皮細胞特異的にガンキリン、HSCO が conditionally に高発現する transgenic mouse を作製する。

6) ガンキリン、HSCO で誘導された卵巣癌のヒストンアセチル化、細胞増殖能、細胞周期、抗アポトーシス活性、造腫瘍能、細胞運動能をみる。mRNA、タンパク発現の変化を DNA microarray、proteomic approach で評価す

る。

7) ガンキリン、HSCO で誘導された卵巣癌で新しく得られた HDAC inhibitors 活性を有すると考えられる有機低分子化合物について、その治療効果を判定する。

## 3. 研究の方法

(1) 卵巣癌細胞株 SK-OV3 に HDAC1 activator である HSCO を高発現、HSCO siRNA で内因性 HSCO を knockdown した場合、SIRT1 activator であるガンキリンを高発現、ガンキリン siRNA で内因性ガンキリンを knockdown した場合、ヒストンアセチル化、細胞増殖能、細胞周期、抗アポトーシス活性、造腫瘍能、細胞運動能等に対する効果を検討する。cell proliferation assay は、MTT assay、trypan blue exclusion assay による細胞数のカウントによる。cell cycle progression は、propidium iodine (PI) による染色、BrdU staining を flow cytometry で評価する。apoptosis は PI staining/flow cytometry による subG1、DAPI staining による形態学的評価、annexinV staining、TUNEL staining、抗 cleaved caspase 3 抗体による western blot による。histone acetylation は抗 acetylated histone H3, H4 による western blotting による。造腫瘍能は、soft agar 中での anchorage-independent cell growth で評価する。細胞運動能は、cell scratch assay、double chamber assay による。

(2) 卵巣癌細胞株 SK-OV3 に HSCO を高発現、HSCO siRNA で内因性 HSCO を knockdown した場合、ガンキリンを高発現、ガンキリン siRNA で内因性ガンキリンを knockdown した場合、細胞の mRNA、タンパク発現の変動を DNA microarray、proteomics で評価する。

(3) 卵巣癌細胞ゲノムでガンキリン、HSCO が結合している部位 (配列) を chip on chip 法で同定する。卵巣癌細胞で HDAC1-HSCO 複合体、ガンキリン-SIRT1 複合体により epigenetic な変化を受ける遺伝子群を同定する。ホルムアルデヒド処理、sonication した卵巣癌細胞ゲノムを抗ガンキリン抗体、抗 HSCO 抗体で Chip する。enrich された、ガンキリン、HSCO が結合する DNA を amplify し、label した後、Affymetrix oligonucleotide microarrays (ヒト全ゲノムをカバー) と hybridize させる。ガンキリン、HSCO に対する結合が enrich された genomic regions を generalized Mann Whitney U test で解析して、同定する。同定された結合部位について real-time-PCR による quantitative anti gankyrin, HSCO antibody Chip を施行して、false positive なものを除外する。結合部位の近くにある遺伝子を同定して、卵巣癌細胞で mRNA レベルでの発現で quantitative RT

PCR で検証する。

(4) HSCO-HDAC1 interaction、ガンキリン-SIRT1 interaction を阻害する有機低分子化合物をスクリーニングする。卵巣癌細胞の中での HDAC1-HSCO interaction、SIRT1-gankyrin interaction を研究するために、protein fragment complementation assay (PCA) をおこなう。Complementation system としては、Venus protein、DHFR を使用する。結合阻害物質としては、有機低分子化合物を用いることとする。分子設計には CPADD 法を用いる。HSCO と HDAC1、ガンキリンと SIRT1 との結合表面上に低分子化合物が結合しうるポケットを見出し、このポケットに仮想原子を最密充填し、仮想化合物を得、市販の化合物ライブラリーからリビンスキールール等により、200 前後の医薬候補になりうる低分子化合物をうる。これらの化合物のなかからヒット化合物をうるために、上記の PCA でスクリーニングする。

(5) 新規の HDAC inhibitors と考えられる有機低分子化合物について、characterize する。

1) *in vitro* で HDAC1、SIRT1 のヒストン脱アセチル化酵素活性を阻害することを確認する。2) 卵巣癌細胞株を用いて、ヒストンアセチル化、細胞増殖、細胞周期進行、アポトーシス作用、細胞運動、造腫瘍能などに対する効果を検討する。Balb/c nu/nu マウスにヒト卵巣癌細胞株を皮内移植した xenograft model を用いて、その抗癌活性を *in vivo* で検討する。両者併用の場合についても同様に解析した。3) HDAC inhibitors による卵巣癌細胞の gene expression の変化について、DNA microarray、proteomics で評価する。

(6) 卵巣表面上皮細胞特異的に Cre recombinase を発現する transgenic mouse の作製。Mullerian inhibitory substance type 2 receptor (MIS2R) 遺伝子のプロモーター領域の下流 (CancerRes, 2003, 63) に Cre recombinase をつないだ発現ベクターを作り、transgenic mouse のラインを得る。

(7) 卵巣表面上皮細胞特異的にガンキリン、あるいは HSCO 遺伝子が conditionally に高発現する transgenic mouse の作製：CAG

enhancer/promoter の下流に、loxP-Stop-loxP cassette を配置し、さらにその下流に、FLAG tag 付きのマウスガンキリン cDNA、あるいは同マウス HSCO cDNA をつないだ constructs を作製する。上記の transgene を受精卵に pronuclear microinjection し、transgenic lines を得る。これらのマウスと上記の卵巣表面上皮細胞特異的に Cre recombinase を発現する transgenic mouse を cross させて、卵巣表面上皮細胞特異的にガンキリン、あるいは HSCO を高発現するマウスを得る。

(8) ガンキリン、HSCO で誘導された卵巣癌について、characterize する (担当：東辻)。

1) HDACs の発現を免疫染色で確認する。2) ヒストンアセチル化、細胞増殖、細胞周期進行、アポトーシス作用、細胞運動能について解析する。3) 卵巣癌の epigenetic な変化を DNA microarray、proteomics で評価する。

4) 新規の HDAC inhibitors と考えられる有機低分子化合物について、卵巣癌での治療効果を *in vivo* で判定する。

#### 4. 研究成果

卵巣癌細胞株 SK-OV3 に HDAC1 activator である HSCO を高発現した場合、細胞増殖能は亢進した。細胞周期は G1-S 期の進行が増加した。抗癌剤に対する抗アポトーシス活性が亢進した。soft agar 中での anchorage-independent cell growth には変化がなかった。cell scratch assay、transwell assay による細胞運動能にも変化はなかった。HSCO siRNA で内因性 HSCO を knockdown した場合、細胞増殖能は抑制された。細胞周期は G1 cell cycle arrest を示した。癌細胞へのアポトーシスの誘導が見られた。抗癌剤に対するアポトーシス感受性が亢進した。soft agar 中での anchorage-independent cell growth には変

化がなかった。cell scratch assay、transwell assay による細胞運動能にも変化はなかった。SIRT1 activator であるガンキリンを高発現した場合、細胞増殖能は亢進した。細胞周期は G1-S 期の進行が増加した。抗癌剤に対する抗アポトーシス活性が亢進した。NIH/3T3 細胞の soft agar 中での anchorage-independent cell growth は亢進した。cell scratch assay、transwell assay による細胞運動能は亢進した。ガンキリン siRNA で内因性ガンキリンを knockdown した場合、細胞増殖能は抑制された。細胞周期は G1 cell cycle arrest を示した。癌細胞へのアポトーシスの誘導が見られた。抗癌剤に対してアポトーシス感受性が亢進した。soft agar 中での癌細胞の anchorage-independent cell growth は抑制された。cell scratch assay、transwell assay による癌細胞の運動能は抑制された。卵巣癌細胞株 SK-OV3 に HSCO を高発現、HSCO siRNA で内因性 HSCO を knockdown した場合、ガンキリンを高発現、ガンキリン siRNA で内因性ガンキリンを knockdown した場合、細胞の mRNA 発現の変動を DNA microarray で評価する。HSCO、ガンキリンを高発現した細胞で mRNA 発現がより低下しているいくつかの遺伝子を同定した。その中には癌抑制遺伝子も含まれていた。siRNA で内因性の HSCO、ガンキリンを knockdown した細胞で mRNA 発現がより亢進しているいくつかの遺伝子を同定した。その中には癌抑制遺伝子も含まれていた。

#### 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. Adriamycin enhances proteasome-mediated generation of the proapoptotic processed form of MAGE-A4 in hepatoma cells. Sakurai T, Kudo M, Itoh K, Ryu U, Higashitsuji H, Fujita

J. Oncology. 2011;81 Suppl 1:30-5.

DOI:10.1159/000334307

2. Izumi T, Takaori-Kondo A, Shirakawa K, Higashitsuji H, Itoh K, Io K, Matsui M, Iwai K, Kondoh H, Sato T, Tomonaga M, Ikeda S, Akari H, Koyanagi Y, Fujita J, Uchiyama T. MDM2 is a novel E3 ligase for HIV-1 Vif. *Retrovirology*. 2009 6 : 1-10. 査読有。

DOI:10.1186/1742-4690-6-1

3. Umemura A, Itoh Y, Itoh K, Yamaguchi K, Nakajima T, Higashitsuji H, Onoue H, Fukumoto M, Okanou T, Fujita J. Association of gankyrin protein expression with early clinical stages and IGFBP-5 expression in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008 , 47(2) : 493-502. 査読有。

DOI:10.1002/hep.22027

4. Gankyrin oncoprotein overexpression as a critical factor for tumor growth in human esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance. Ortiz CM, Ito T, Tanaka E, Tsunoda S, Nagayama S, Sakai Y, Higashitsuji H, Fujita J, Shimada Y. *Int J Cancer*. 2008 , 122:325-332. 査読有。

DOI:10.1002/ijc.23106

[学会発表] (計 3 件)

#### 1. 東辻久子

CIRP(cold-inducible RNA binding protein) は癌細胞の浸潤能、転移能を亢進する。  
第 63 回日本産科婦人科学会学術講演会  
2011 年 8 月 30 日

リーガロイヤルホテル大阪、大阪市

#### 2. 東辻久子

がん遺伝子 CIRP(cold-inducible RNA binding protein) は癌細胞の浸潤能と転移能を亢進させる。

JDDW2010

第 5 2 回日本消化器病学会大会

2010 年 10 月 14 日

パシフィコ横浜、横浜市

#### 3. 東辻久子

卵巣癌で過剰発現するがん遺伝子ガンキリンは NFkappaB (RelA) と結合しその転写活性化能を抑制する。

第 61 回日本産科婦人科学会学術講演会

2009 年 4 月 5 日

国立京都国際会館、京都市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

東辻久子 (HISAKO HIGASHITSUJI)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号 : 20402852

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし