

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 25 年 4 月 23 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究（B）
研究期間：平成23年度 ～ 平成24年度
課題番号：23791811
研究課題名（和文）ナノテクノロジーを用いた長寿関連遺伝子 SIRT1 に対する分子標的抗腫瘍剤の開発
研究課題名（英文）Development of anti cancer drug targeting longevity related gene-SIRT1 using nanotechnology.
研究代表者
曾根 献文 （SONE KEMBUN）
東京大学・医学部付属病院・助教
研究者番号：90598872

研究成果の概要（和文）：

我々は長寿関連遺伝子 SIRT1 と、それを制御している乳癌関連遺伝子 DBC-1 のアポトーシスにおける機能解析を行った。また子宮内膜における SIRT1 の機能解析を行った。

1. DBC-1 はアポトーシスを誘導すると、カスパーゼ-7 に分解されることが確認された。また SIRT1 はアポトーシス誘導時に DBC-1 と共に核から核外に局在が移行し、アポトーシスを更に増加させる可能性が示された。
2. 子宮内膜において SIRT1 が細胞接着調節因子である E-cadherin の発現を正に調節し、細胞接着能を増加させる可能性が示された。また子宮内膜における発癌、胚における子宮内膜接着能に SIRT1 が関連している可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We elucidated function analysis of SIRT1 and DBC-1 in apoptosis. And We analyzed the function of SIRT1 in endometrium.

1. We confirmed that DBC-1 is targeted for cleavage by caspase-7 during the process of apoptosis. In addition, Endogenous SIRT1 and DBC-1 localize to the nucleus in healthy cells and to the cytoplasm during apoptosis, and possibly induce apoptosis signal.
2. In endometrium, SIRT1 plays an important role in regulating E-cadherin and induce cell-attachment. and There is possibility that SIRT1 is related to human carcinogenesis in endometrium and capacity of an embryo to attach.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科

キーワード：(1) SIRT1 (2) DBC-1 (3) アポトーシス (4) カスパーゼ (5) E-cadherin
(6)子宮内膜 (7) 子宮体癌 (8) 細胞接着能

1. 研究開始当初の背景

SIRT1 は NAD 依存的脱アセチル化酵素であり、正常細胞においては、糖や脂肪代謝の調節及び神経保護等のアンチエイジング機能を有し、長寿関連遺伝子として近年特に注目されている。しかし腫瘍細胞では細胞増殖、生存に働き癌化に関わっていると言われており、よって SIRT1 は長寿と癌化の誘導という二面性の機能を持ち、SIRT1 が生体内で、どのように調節されているかが注目されている。2008 年に SIRT1 が DBC-1 (Deleted in breast cancer-1) によって抑制されているという報告 (Kim JE et al, Zhao W et al) 以降、SIRT1 と DBC-1 の複合体が癌化に大きく関わると注目されている。

また申請者らのグループにおいて DBC-1 は、BRCA1 (乳癌関連遺伝子) と SIRT1 プロモーター上で複合体を形成することで、SIRT1 の発現を抑制するという報告や DBC-1 が ER β (エストロゲンレセプター β) と核内で複合体を形成し ER β の転写活性を阻害するという報告を発表している。

2. 研究の目的

アポトーシス誘導時における SIRT1-DBC-1 複合体の発現および局在の変化を解析し、この複合体のアポトーシスへの関与を明らかにする。また子宮内膜における SIRT1 の機能解析を行い婦人科癌における SIRT1 の役割を詳細に検討し、将来的にはナノテクノロジーを用いた新規分子標的治療薬の開発を目指す。

3. 研究の方法

- (1) アポトーシス誘導時における SIRT-1 と DBC-1 の関係性の検討

- ① 子宮頸癌細胞株 HeLa cell に UV 照射によるアポトーシス誘導を行い、蛋白質を抽出する。そのサンプルを DBC-1 抗体を用いてウェスタンブロッティング法にて検討する。またカスパーゼ阻害剤を細胞株に添加し、同様の検討を行う。
- ② In vitro translation 法にて RI でラベリした DBC-1 を発現し、recombinant カスパーゼと反応させる。そのサンプルを Autoradiography 法にて解析する。
- ③ Point mutant DBC-1 を作成し、それをカスパーゼと反応させ、DBC-1 におけるカスパーゼ切断部位を検討する。
- ④ HeLa 細胞株にアポトーシス誘導を行い、SIRT1, DBC-1 抗体を用いて蛍光免疫染色を行う。

(2) 子宮内膜における SIRT-1 の機能解析

- ① 子宮体癌細胞株 (Ishikawa, RL95-2) で遺伝子導入法により SIRT1 を強制発現させ、ウェスタンブロッティング法にて E-cadherin の発現を検討した。また siRNA 法により SIRT1 をノックダウンし同様の検討を行った。
- ② SIRT1 賦活剤であるレズベラトロール、SIRT1 阻害剤である sirtinol を添加し、ウェスタンブロッティング法にて E-cadherin の発現を検討した。
- ③ クロマチン免疫沈降法により Ishikawa cell において、SIRT1 が E-cadherin のプロモーターに局在するか否かを検討した。
- ④ JAR cell にて SIRT1 を強制発現させ細胞接着能を検討する spheroid attachment assay を行った。

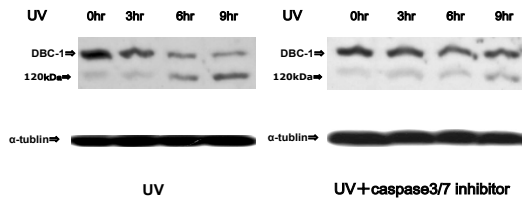
4. 研究成果

- (1) アポトーシス誘導時における SIRT-1 と DBC-1 の関係性の検討

- ① 細胞株にアポトーシス誘導を行い、蛋白質を抽出する。その蛋白質をウェスタン

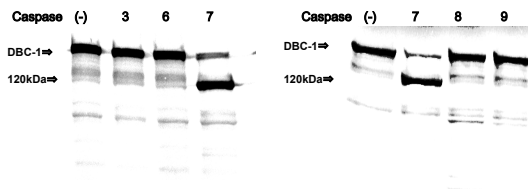
ブロットィング法にて検討すると、DBC-1の分解が認められた。またカスパーゼ阻害剤を加えた細胞株に同様の検討を行うと、DBC-1の分解が抑制された。(図1)

図1



② in vitro translation法にて発現したDBC-1にrecombinantカスパーゼを添加すると、カスパーゼ7による分解が認められた。(図2)

図2



③ 上記よりDBC-1がアポトーシス誘導時に実行カスパーゼであるカスパーゼ7によって分解されることがわかった。次にDBC-1におけるカスパーゼ7の切断部位を検討するためにpoint mutant DBC-1を作成し、カスパーゼ7と反応させた所、切断部位はDBC-1にある核移行シグナルの前後2カ所ということがわかった。

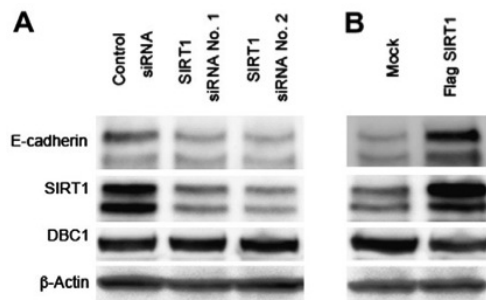
④ 細胞株にアポトーシス誘導を行いSIRT1抗体、DBC-1抗体を用いて蛍光免疫染色を行った所、アポトーシス誘導時にSIRT1はDBC-1と共に核外へ移行した。この事からアポトーシス誘導時にSIRT1

が核において機能しなくなり、アポトーシスが進行するという可能性が示された。

(2) 子宮内膜におけるSIRT-1の機能解析

① 子宮体癌細胞株(Ishikawa, RL95-2)で遺伝子導入法によりSIRT1を強制発現させた所、E-cadherinの発現の増加が認められた。またsiRNA法によりSIRT1をノックダウンした際にE-cadherinの発現の低下が認められた。(図3)

図3



② SIRT1賦活剤であるレスベラトロールを添加した際にE-cadherinの発現の増加が認められた。またSIRT1阻害剤であるsirtinolを添加した際にE-cadherinの発現の低下が認められた。(図4, 5)

図4

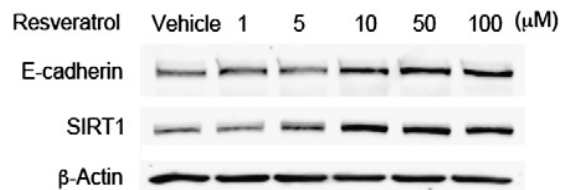
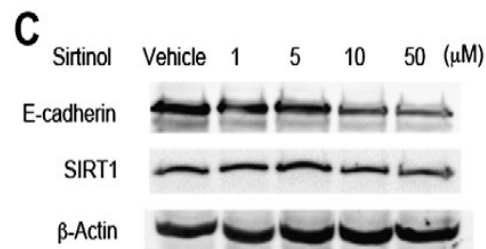
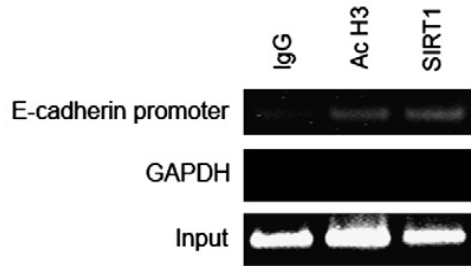


図5



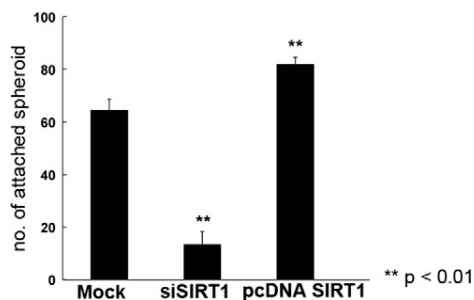
- ③ クロマチン免疫沈降法により Ishikawa cell において、SIRT1 は E-cadherin のプロモーターに局在することが確認された。(図6)

図6



- ④ 細胞接着能を検討する spheroid attachment assay において、SIRT1 を強制発現させた細胞株では細胞接着能の増加を認め、ノックダウンさせた細胞株では細胞接着能の低下を認めた。(図7)

図7



E-cadherin は細胞接着を調節する際の主要な蛋白質であり、その発現が癌化、癌の転移と関連している事が報告されている

上記(2)の研究結果より SIRT1 が E-cadherin の発現を正に調節し、細胞接着能を増加させる可能性が示唆された。また子宮内膜における発癌、胚における子宮内膜接着能に SIRT1 が関連している可能性がある。

また上記(1)、(2)より SIRT1 のアポトーシスにおける機能解析、子宮内膜における機能解析を行ったので、今後はこれらのデータを元にして、分子標的抗腫瘍薬を開発していく予定である。

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5件)

1. Miyamoto Y, Nakagawa S, Wada-Hiraike O,

Seiki T, Tanikawa M, Hiraike H, Sone K, Nagasaka K, Oda K, Kawana K, Nakagawa K, Fujii T, Yano T, Kozuma S, Taketani Y. Sequential effects of the proteasome inhibitor bortezomib and chemotherapeutic agents in uterine cervical cancer cell lines.

Oncology Reports 29:2012, 51-57 査読あり
DOI:0.3892/or.2012.2072.

2. Akira Shirane, Osamu Wada-Hiraike, Michihiro Tanikawa, Takayuki Seiki, Haruko Hiraike, Yuichiro Miyamoto, Kenbun Sone et al

Regulation of SIRT1 determines initial step of endometrial receptivity by controlling E-cadherin expression. Biochemical and Biophysical Research Communication, 424:2012, 604-610 査読あり
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.160

3. Shoji K, Oda K, Kashiyama T, Ikeda Y, Nakagawa S, Sone K, Miyamoto Y, Hiraike H, Tanikawa M, Miyasaka A, Koso T, Matsumoto Y, Wada-Hiraike O, Kawana K, Kuramoto H, McCormick F, Aburatani H, Yano T, Kozuma S, Taketani Y.

Genotype-dependent efficacy of a dual PI3K/mTOR inhibitor, NVP-BEZ235, and an mTOR inhibitor, RAD001, in endometrial carcinomas.

PLoS One 7(5):2012 査読あり
10.1371/journal.pone.0037431

4. Morita Y, Wada-Hiraike O, Yano T, Shirane A, Hirano M, Hiraike H, Koyama S, Oishi H, Yoshino O, Miyamoto Y, Sone K, Oda K, Nakagawa S, Tsutsui K, Taketani Y,

Resveratrol promotes expression on SIRT1 And StAR in rat ovarian granulosa cells: an Implicative role of SIRT1 in the ovary

Reproductive Biology and endocrinology 10:2012, 14 査読あり。
DOI:11,1186/1477-7287-10-14

5. Tanikawa M, Wada-Hiraike O, Nakagawa S, Shirane A, Hiraike H, Koyama S, Miyamoto Y, Sone K, Tsuruga T, Nagasaka K, Matsumoto Y, Ikeda Y, Shoji K, Oda K, Fukuhara H, Nakagawa K, Kato S, Yano T, Taketani Y

Multifunctional transcription factor TF II-1 is an activator of BRCA1 function. British journal of cancer 104:2011, 1349-1355 査読あり。

DOI 10.1038/bjc.2011.75

〔学会発表〕（計5件）

1. 園田 正樹、織田 克利、有本 貴英、武家尾 舞子、曾根 献文、森 繭代、松本 陽子、川名 敬、中川 俊介、矢野 哲、上妻 志郎、武谷 雄二

子宮体癌リンパ節転移陽性（臨床進行期 IIIc）例における予後因子の検討

日本婦人科腫瘍学会 2012年7月19日新高輪プリンスホテル

2. 宮本 雄一郎、佐藤 英貴、三浦 紫保、長阪 一憲、曾根 献文、松本 陽子、有本 貴英、織田 克利、川名 敬、矢野 哲、上妻 志郎、武谷 雄二

当科での子宮内膜異型増殖症、高分化子宮体癌に対するMPA療法を用いた妊孕性温存治療に関する検討

日本婦人科腫瘍学会 2012年7月19日新高輪プリンスホテル

3. 白根 晃 他 抗老化分子SIRT1活性化物質レスベラトロールは細胞接着分子E-cadherinの発現を制御し胚の子宮内膜接着能を向上させる。

日本内分泌学会 2012年4月19日 名古屋国際会議場

4. 曾根 献文、松本陽子、森繭代、有本貴英、織田克利、川名敬、中川俊介、上妻志郎、武谷雄二

再発卵巣癌に対する salvage chemotherapy としての weekly CPT-11 療法の有用性の検討

日本癌治療学会 2011年10月27日 名古屋国際会議場

5. 曾根 献文、有本貴英、川名敬、塚崎雄大、松本陽子、土谷聡、西田晴香、織田克利 中川俊介、上妻志郎、武谷雄二

胚細胞性腫瘍に対するBEP療法の有害事象と妊孕性に関する検討

日本婦人科腫瘍学会 2011年7月22日 札幌コンベンションセンター

6. 研究組織
(1) 研究代表者

曾根 献文 (SONE KEMBUN)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：90598872

研究者番号：

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

