

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860964

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによる多能性維持転写因子NACC1制御下遺伝子の網羅的同定

研究課題名(英文)Global analysis for downstream of NACC1 gene expression by next generation of sequencing method.

研究代表者

角田 加奈子(Tsunoda, Kanano)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：10611030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：抑制性の転写因子NACC1の標的分子を網羅的に解析するために次世代シーケンサーを用いて、transcriptomeならびに、ChIP-sequenceを行った。NACC1はSETDB1との転写領域を共有し、TAP解析でもこれらの結合が確認された。Complexの中にはNACC1/NANOG/HDAC6/SETDB1が含まれていた。NACC1とHDAC6の間には直接結合が確認されたが他の分子との間には認められなかった。NACC1/NANOG/HDAC6/SETDB1はp16癌抑制遺伝子の発現抑制に強く係わり、発癌に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：There has been increasing interest in the cancer research field concerning the BTB/POZ (bric-a-brac tramtrack broad complex/ pox virus and Zn finger) family of proteins. NACC1 is a member of the BTB/POZ family and a transcriptional repressor associated with tumor cell growth, survival and chemosensitivity. To clarify other functions of NACC1 associated with tumor biology, we performed global analysis using next generation of sequencing method,. NACC1 occupied the promoters accompanying with SETDB1. NACC1 and cytoplasmic HDAC6 were demonstrated by coimmunoprecipitation, pull-down, and yeast two-hybrid assays. NACC1/NANOG/HDAC6/SETDB1 complex regulated p16 expression through epigenetic mechanisms. The study presented the role of NACC1 gene in malignant tumor behaviors.

研究分野：皮膚科学

キーワード：NACC1 網羅的解析 HDAC6

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ES細胞を初めとした幹細胞の多能性維持に関連する転写因子ネットワーク (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Dax1, Rex1, Zfp281, NACC1) の活性化が、腫瘍の分化度や予後と密接な関連を持つことが報告されている。このネットワークのダイナミクス (図1) は、がん幹細胞の持つ自己複製能ばかりでなく、周辺部の大多数を占めるがん細胞への分化誘導・増殖に関与する事が予測されている。多能性維持に関連する転写因子ネットワークを制御することが可能であれば、がん幹細胞の活動を休眠させ、がんと共に共生するドーマントセラピー (休眠療法) を開発する糸口となる。

我々は、このネットワークの一員である NACC1 (nucleus accumbence associated) が、核内外で多彩な翻訳後修飾を受けることで、複数のがん関連蛋白質との相互作用を生じ、がんの生物学的特性 (浸潤・転移、転写制御) の形成に関与していることを明らかにした。NACC1 は BTB/POZ 型の転写因子であり、HDAC (histone deacetylase) family や CoREST などと協調してエピジェネティックな機構により、標的遺伝子の発現を抑制することが推測されている。しかし、NACC1 標的遺伝子の種類や、その発現制御に係る他の多能性維持関連転写因子との相互関係 (交絡) は未だ不明である。

NACC1 は大脳辺縁系の側坐核で過剰発現し、軸索輸送/神経伝達物質の分解に関わる蛋白質として単離された。アミノ酸配列は BCL6 などの BTB/POZ family と高い相同性を示し、HDAC-3, -4, CoREST/Sim3 などと巨大な複合体を形成し、抑制型の転写因子として働く。腫瘍の生物学的特性との関連では、過剰発現の見られる卵巣癌、子宮体癌の予後は不良である。細胞周期関連蛋白質 GADD45GIP1 の発現制御により、細胞増殖能を抑制する。taxane 系抗がん薬に対する抵抗性の原因と

なるなどの報告があった。NACC1 は、in vivo, in vitro でヒト腫瘍の悪性形質に影響を与えている可能性があった。

また、核内では、NACC1 - 相互作用蛋白質間の結合は、NACC1 自身に生じる SUMO 修飾と、それを認識する SUMO interaction motif (SIM) に依存していることを明らかにした。この SUMO-SIM に見られる結合は、PML (promyelocytic leukemia) 蛋白質の nuclear body (PML-NB) 形成に必須の結合様式であり<sup>8)</sup>、NACC1 も PML-NB にリクルートされていた。また、NACC1-SIM の変異体では、この結合が解除されることも示した。また、NACC1 と結合する事が報告されていた CoREST も SUMO 化する事が別に報告されており、NACC1 の転写制御に SUMO 化修飾は重要な機構である。

以上、NACC1 は核 - 細胞質をシャトルし、翻訳後修飾を受け、複数のがん関連蛋白質の発現制御あるいは相互作用の結果により、がん細胞の悪性形質 (細胞増殖、浸潤、転移、薬剤感受性) 形成に関与していると推定される。しかし、NACC1 のトランスクリプトームに与える影響は未解明の部分が多く、加えて多能性維持関連の転写因子ネットワーク内での役割も明らかになっていない。

そこで本研究では、次世代シーケンサーによる網羅的解析を行い、「NACC1 の多能性維持関連転写因子ネットワークでの役割を明らかにする」ことを最低限の達成目標として研究を展開する。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、次世代シーケンサーを用いた網羅的解析により、NACC1 標的がん関連遺伝子の特定 (STEP1: トランスクリプトーム解析) 個々の NACC1 標的遺伝子の発現に関する他の多能性維持関連転写因子との相互関係 (交絡) (STEP2: ChIP sequence 解析) を決定し、NACC1 の多能性維持関連転写因子ネットワークでの役割を明らかにした上で (達成目標) がん幹細胞あるいは

iPS 細胞でのネットワーク存在の検証 (STEP3:努力目標)を行い、がんのドーマントセラピー開発の糸口を見出したい。

### 3. 研究の方法

本研究は、研究期間内に最低限達成する達成目標 (STEP1, 2) と、発展研究 (STEP3) に分かれる STEP1 (トランスクリプトーム解析)、STEP 2 (chromatin immunoprecipitation sequence; CHIP sequence 解析)。STEP3 (がん幹細胞あるいは iPS 細胞でのネットワーク存在の検証)(努力目標)。

Tet-ON shRNAi system (トランスクリプトーム解析用) および tet-ON overexpression system (tandem affinity purification, TAP-tag 付き) (CHIP sequence 解析用) によってがん培養細胞株を用いて inducible clone を作製した。

次世代シーケンサーを用いて NACC1 が結合する遺伝子のプロモーター領域の決定、および発現の変化する遺伝子の網羅的解析を行う。解析データを突合することで、NACC1 の直接転写制御下にある遺伝子を網羅的に同定した。

特定された候補遺伝子の内、がん関連遺伝子に着目しその検証を細胞株で行う。同時に、各遺伝子の転写制御に、他の 8 つの多能性維持関連転写因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Dax1, Rex1, Zpf281) が関与しているか検証した。

培養細胞株の解析結果から得られた NACC1 の標的遺伝子制御と他の 8 つの転写因子との交絡状態の検証をがん幹細胞あるいは iPS 細胞で行う過程を STEP3 とする。

追記：研究の遂行にあたって確実な成果をあげるために、扱いの比較的容易ながん培養細胞を用いる研究を主体とし、細胞の採取あるいはメンテナンスに困難の予測されるがん幹細胞、iPS 細胞を STEP3 として 3 年目の研究課題としたがこの部分関しては技術的

問題が解決せず途中で終了した。

tet-ON shRNAi system による NACC1 knockdown inducible clone の作製 clone tech 社製の shRNAi system のベクターを用い inducible clone を作製する。既に 3 種類のベクターを作製し、MCF-7, HeLa, HEK293 細胞で cloning を行った。

Invitrogene 社製の tet-ON TAP system による NACC1 overexpression inducible clone の作製した。(STEP2)

Life Tec 社製の次世代シーケンサー (Solid system) を用い、上記の inducible clone を用いてトランスクリプトーム解析を行った。(STEP1)

次世代シーケンサー (Solid system, Life Tech) を用い、TAP 法により NACC1 と結合する遺伝子のプロモーター領域を決定した。

### 4. 研究成果

他の 8 つの多能性維持関連転写因子 (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog, Dax1, Rex1, Zpf281) との交絡性は Nanog で最も強く、最も強く、Gene enrichment analysis では SET domain を持つ histone 3 lysine 9 (H3K9)-specific methyltransferase である、SETDB1 と転写領域を共有していた。他の SET family (SET 2 や SETD7) とは領域を共有化してはいなかった。

TAP 解析の結果でも同様の結果は得られたが、遺伝子工学的手法を用いて、IP-western blot ならびに GST-pull down 法に於いて、3 者の結合解析を行ったものの direct の interaction は確認できなかった。当所、HEK293 細胞を使って、相互作用を検討していたが、これを悪性黒色腫細胞株 (SK-MEL28, A7) に変更したことで、弱いながらもこれらの 3 者の結合が確認された。この事はかねてから SETDB1 の存在する、染色体 1 番の短腕の増幅が悪性黒色腫の発生と何らかの関連がある事と密接に関連して

いるのかもしれない。

さらに A7 を用いて、TAP 解析を行ったところこの中に HDAC6 が含まれる事が明らかとなった、HDAC6 と NACC は DAC domain で結合し、SETDB1 とは結合していなかった (図 1、図 2)。HDAC6 と NACC1 の結合は、核内で SETDB1 のリクルートメントに関与している事が推測された。SETDB1 の下流で抑制を受ける代表遺伝子には p16 があり、これが悪性黒色腫の発生に強く関与している可能性が示唆された。

そこで、元細胞に戻り、NACC1 の SUMO 化との関連を解析した。

我々は、NACC1 は K167 で強く SUMO 化を受ける事を明らかにしたが、強く SUMO 化を受けている場合には上記の 4 者の結合が高まり、p16 の発現も抑制されている。この事は TAP-seq でも確認され、p16 癌抑制遺伝子の発現制御に、NACC1/NANOG/SETDB1/HDAC6 の介在剤の可能性が示唆された。

今後は悪性黒色に於けるがん幹細胞に於いて、これらの機構が維持されていることは細胞増殖の面に於いても貢献し、生物学的特性の形成に役立つと考えられた。

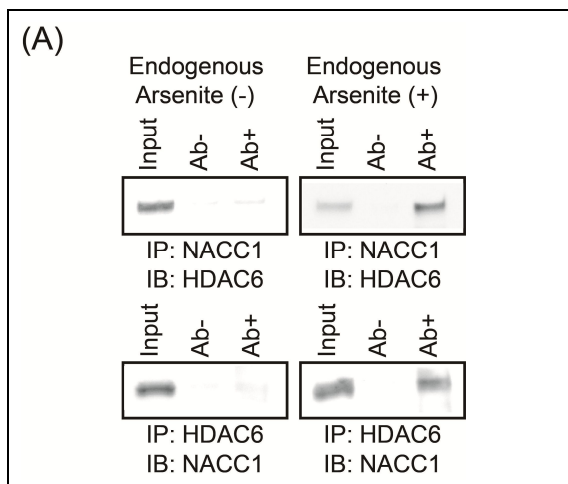


図 1

## 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 2件)

1. Tsunoda K, Arakawa N, Akasaka T. A case of pigmented pilomatricoma (calcifying epithelioma): the role of mast cells in pigmentation. Eur J Dermatol. 2016 Jun1;26(3):308-9. doi:10.1684/ejd.2016.2746. PubMed PMID: 26985675. (査読有り)
2. Tsunoda K, Oikawa H, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T. A Case of Cellular Fibrous Histiocytoma on the Right Elbow with Repeated Relapse within a Short Period. Case Rep Dermatol. 2015 Jan 22;7(1):10-6. doi: 10.1159/000371790. eCollection 2015 Jan-Apr. PubMed PMID: 25759652; PubMed Central PMCID:PMC4327403. (査読有り)

[学会発表](計 0件)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等  
該当なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者

角田 加奈子 (Tsunoda Kanako)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：10611030

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )