

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：15201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893136

研究課題名(和文) 膵癌の治療標的としての転写制御因子NAC1とその下流遺伝子群の基盤研究

研究課題名(英文) Transcriptional regulatory protein NAC-1 and its downstream genes as therapeutic targets for the treatment of pancreatic cancer

研究代表者

中山 真美 (Nakayama, Naomi)

島根大学・医学部・特別協力研究員

研究者番号：60713188

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：NAC1は、卵巣がんで高発現しているタンパク質として申請者らが同定し、腫瘍再発や腫瘍悪性度に関与していることを報告してきた。本研究により、がんの中でも極めて悪性度の高い膵がん細胞株において、1) NAC1のC末端に存在するBEN領域がDNAと直接結合する能力を有し、2) 特定のDNA配列を認識し、3) 細胞内において350-450kDaの複合体として転写制御因子複合体として核内に存在していることを明らかにした。今後さらに研究を進め、膵がんの細胞浸潤能を制御するNAC1の下流遺伝子群を同定解析し、治療標的への応用を目指す。

研究成果の概要(英文)：NAC1 is a BTB/POZ-domain transcription factor. It is overexpressed in ovarian serous carcinoma and NAC1 knock-down resulted in the apoptosis of ovarian cancer cell lines and rescued their sensitivity to chemotherapy, suggesting that NAC1 may be a potential therapeutic target. In this study, we elucidated that 1) NAC1 binds DNA through its BEN domain, 2) identification of the consensus DNA-binding sequence of NAC1, and 3) NAC1 forms a nuclear protein complex capable of modulating gene expression with an apparent molecular weight of 350-450 kDa. To conquer pancreatic cancer, further analysis requires to find out true downstream genes of NAC1.

研究分野：腫瘍医学

キーワード：がん関連転写制御因子 膵がん NAC-1

1. 研究開始当初の背景

がんは我が国において死亡原因の第1位であり、今後も高齢者を中心に増加が予想され、国民の健康に対する最大の脅威となっている。全国がん罹患モニタリング集計によれば、予後が悪いことが知られている肺がんは29.7%（胃がんは63.3%、大腸がんは69.2%）である。一方、膵がんの5年相対生存率は7.0%とがんの中でも最下位である。多くのがん患者が治癒できる可能性があるなかで、膵がん患者は“死亡宣告”を受けたにも等しい状況である。このように膵がんは生物学的悪性度の高い疾患で、発見時の切除率は低く、切除後の再発率も高い。そのため、新しい治療標的の発見を視野に入れた、分子生物学的に腫瘍特性を解析した研究は非常に重要であり、かつ切望されている。

NAC1 (Nucleus accumbens-associated protein 1) は BTB/POZ (bric-a-brac tramtrack broad complex/ pox virus and Zinc finger) ファミリーに属するタンパク質である(図1)。BTB/POZ 領域はタンパク質-タンパク質結合能を有することが報告されている。BTB/POZ ファミリータンパク質の多くは Zinc finger 構造を持つ DNA 結合タンパク質であり、転写因子として働く。BTB/POZ ファミリータンパク質の働きは、細胞増殖やアポトーシスなど多岐にわたっており、B 細胞リンパ腫や白血病細胞など悪性腫瘍の生物学的特性に関係していると考えられている。



図1 NAC-1 の構造

NAC-1にはBTBおよびBENという二つの機能領域が存在する。

NAC1 は、卵巣がんで高発現しているタンパク質として申請者が同定し、腫瘍再発や腫瘍悪性度に関与していることを報告してきた。その後、婦人科腫瘍の分野において研究を進めた結果、子宮頸がんや子宮内膜がんにおいてもNAC1 の発現上昇は生物学的悪性と関連していることが明らかになった。さらに、パクリタキセルといった抗腫瘍薬への耐性機構とも関連していることが判明した。卵巣がん以外にも、膵がん、乳がん、大腸がんなどのがん種においても mRNA レベルで NAC1 の発現が高いことが確認されている。そこで申請者は、NAC1 の膵がん組織における発現と臨床病理学的因子との検討を開始した。正常膵組織の膵管上皮に NAC1 の発現は認められた。膵がん組織では正常膵組織よりも NAC1 の発現が高い症例や低い症例が認められた。しかし、NAC1 低発現群において静脈侵襲度やリンパ節転移率が高く、無病生存期間および全生存期間がともに不良であった

(図2)。この膵がんにおける結果は、卵巣がんを始めとする婦人科がんとは相反するものであった。さらに膵がん細胞株 MIA PaCa-2 および PANC-1 において NAC1 の発現を抑制したところ浸潤能が有意に亢進した(図3)。NAC1 が転写制御因子であることを考えると、がん種間において下流遺伝子が異なっており、膵がんにおいて NAC1 は下流遺伝子を制御して細胞浸潤能に関与していると考えられる。

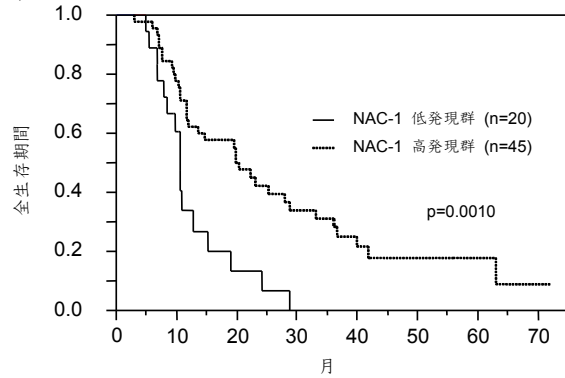


図2 NAC1 発現と全生存期間の関係

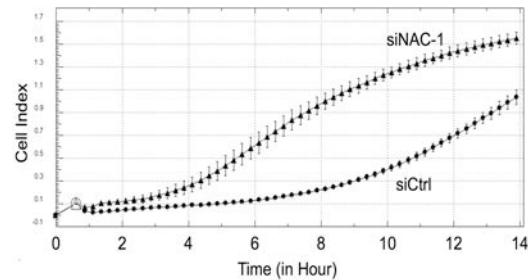


図3 NAC1 発現と細胞浸潤能の関係

膵がん細胞株 MIA PaCa-2 において、マトリジェールを用いた細胞浸潤能をリアルタイムに定量解析した。NAC1 の発現を抑制 (siNAC1) したところ、コントロール (siCtrl) に比べ浸潤能が有意に亢進した。

2. 研究の目的

本研究において膵癌の細胞浸潤能を制御する NAC1 下流の遺伝子を同定し機能解析することで、膵癌の分子標的治療戦略の基礎的研究とする。

3. 研究の方法

(1) DNA 結合領域の決定:

BTB 領域を有する多くのタンパク質と異なり、NAC1 には Zn フィンガーモチーフなどの明らかな DNA 結合領域が存在しない。また NAC1 が DNA と直接結合するという報告もない。申請者は、NAC1 が C 末端領域に存在する BEN 領域を介して DNA と直接結合するのではないかと考えた。大腸菌より精製した GST-NAC1 タンパク質溶液をアガロースゲル電気泳動し、NAC-1 と大腸菌由来のゲノム DNA との直接結合

を迅速かつ容易に判定する方法を開発し用いた。

(2) DNA 結合配列の決定：

大腸菌より精製した GST-NAC1 タンパク質、ランダムオリゴ DNA および PCR を用いて認識配列を同定する方法を用いた。

(3) NAC1 複合体の同定：

HeLa 細胞の核分画を superdex 200 カラムを用いたサイズ分画後、NAC-1 抗体により検出した。

(4) NAC1 の下流標的遺伝子群の同定：

NAC-1 の発現を確認している子宮頸がん細胞株 HeLa 細胞および膀胱がん細胞株 MIA PaCa-2 の2種類の細胞株を用いて、siRNA ノックダウンにおけるマイクロアレイ解析を行い、下流遺伝子群の候補を同定する。

4. 研究成果

(1) DNA 結合領域の決定：

大腸菌より精製した全長 GST-NAC-1 には、大腸菌由来のゲノム DNA が結合していた。DNA との結合には、BEN領域を含むC末端領域 (251-527) だけで十分であった。

さらに BEN 領域に存在し、高度に保存されている L432 を N に置換した変異型 (L432N) では DNA 結合能を完全に失った。

NAC1 の C 末端に存在する BEN 領域が、DNA と直接結合する能力を有することを明らかにした。

(2) DNA 結合配列の決定：

大腸菌より精製した GST-NAC1 タンパク質、ランダムオリゴ DNA および PCR を用いて認識配列を同定した。

(3) NAC1 複合体の同定：

NAC-1 は細胞内において 350-450kDa の複合体として核内に存在していることを明らかにした (図4)。質量解析の結果、NAC-1 は転写制御因子複合体として存在することが明らかとなった。

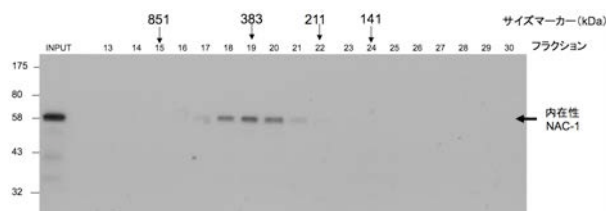


図4 NAC1 複合体

(4) NAC1 の下流標的遺伝子群の同定：

siRNA ノックダウン細胞株を用いたマイクロアレイ解析を行い比較解析により同定し、さらに (2) で同定した NAC1 の認識配列をそのプロモータ領域に有する候補下流遺伝子について、実際クロマチン免疫沈降法

により NAC1 と DNA との結合を確認した。候補遺伝子の siRNA を行いマトリジェルを用いた細胞浸潤能への影響を検討したが、細胞浸潤能を制御する NAC1 の真の下流遺伝子は現在まだ同定できていない。現在、これまでの結果をまとめて論文を作成中である。

今後さらに研究を進め、膀胱がんの細胞浸潤能を制御する NAC1 の下流遺伝子群を同定解析し、治療標的への応用を目指す。

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 Ishikawa M, Nakayama K, Rahman MT, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Iida K, Nakayama N and Miyazaki K.

Therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia following chemotherapy (paclitaxel and carboplatin) and radiation therapy in ovarian cancer: a case report.

Eur J Gynaecol Oncol., 35: 443-448, 2014

PMID: 25118489

② Nakayama K, Ishibashi T, Ishikawa M, Katagiri A, Katagiri H, Iida K, Nakayama N and Miyazaki K.

Microwave endometrial ablation at a frequency of 2.45 GHz for menorrhagia: analysis of treatment results at a single facility.

J Obstet Gynaecol Res. 40: 224-229, 2014

doi: 10.1111/jog.12163

③ Rahman MT, Nakayama K, Rahman M, Ishikawa M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Sato E, Iida K, Ishikawa N, Nakayama N and Miyazaki K.

ESR1 gene amplification in endometrial carcinomas: a clinicopathological analysis.

Anticancer Res., 33: 3775-3781, 2013

PMID: 24023309

④ Rahman MT, Nakayama K, Rahman M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Ishikawa M, Sato E, Iida K, Nakayama N, Ishikawa N and Miyazaki K.

KRAS and MAPK1 Gene Amplification in Type II Ovarian Carcinomas.

Int J Mol Sci., 14: 13748-13762, 2013

doi: 10.3390/ijms140713748.

⑤ Nakayama K, Ishikawa M, Katagiri H, Katagiri A, Ishibashi T, Iida K, Nakayama N and Miyazaki K.

Surgical treatment outcomes of serious chronic tubo-ovarian abscess: a single-center series of 20 cases.

Clin. Exp. Obstet. Gynecol., 40: 377-380, 2013

PMID: 24283169

〔学会発表〕（計 0件）

〔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〕

ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 真美 (NAKAYAMA, Naomi)

島根大学・医学部・特別協力研究員

研究者番号：60713188

(2) 連携研究者

浦野 健 (URANO, Takeshi)

加藤 太陽 (KATO, Hiroaki)