

平成 30 年 10 月 3 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08438

研究課題名(和文) 低酸素ストレス応答が制御する発がん機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of carcinogenesis regulated by oxidative stress response

研究代表者

若林 雄一 (WAKABAYASHI, Yuichi)

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・室長

研究者番号：40303119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Meis1の皮膚発がんにおける機能についてはあまり知られていない。c-MetインヒビターであるSU11274はHOXA9とMEIS1により誘導された白血病細胞株に対するドラッグスクリーニングから同定された。Meis1ノックダウン細胞をSU11274で処理するとMeis1存在下でのみ細胞増殖を抑制した。さらに皮膚腫瘍を用いてChIP sequencingを行った。同定されたMeis1下流候補遺伝子のひとつのStk25のプロモーター配列はMeis1存在下で強いルシフェラーゼ活性を示した。さらにStk25ノックダウン細胞では、Meis1ノックダウン細胞株と同程度に遊走能の低下が見られた。

研究成果の概要(英文)：Meis1 has been shown to play an important role in leukemogenesis. However, its functions in skin carcinogenesis remain poorly understood. The c-Met inhibitor SU11274 has been identified through drug screening with HOXA9/Meis1-induced AML cell lines. We treated Meis1 knockdown cells with SU11274. As a result, SU11274 suppressed cell proliferation only in the presence of Meis1. In addition, to investigate the downstream genes of Meis1, we carried out ChIP sequencing analysis using chemically induced skin tumors. We carried out the luciferase assay with the promoter region of Stk25, one of Meis1 downstream candidate genes. As a result, strong luciferase activity was detected when B9 cells were transfected with the luciferase construct and full length Meis1 vector. We then generated Stk25 knockdown cell lines and did the invasion assay. As a result, Stk25 knockdown cells showed the reduction of the invasion activity as Meis1 knock down cell lines did.

研究分野：マウス遺伝学

キーワード：Meis1 Stk25 皮膚発がん

1. 研究開始当初の背景

我々はMeis1をマウスの皮膚全体で欠損させたところ、その正常表皮形成、皮膚発がんへの強い影響が見られたことを報告した。さらにMeis1非存在下では、表皮幹細胞数の減少、良性腫瘍パピローマの減少、腫瘍悪性化率の低下が観察されたことから、Meis1の調節因子や下流遺伝子を探索することを着想した。

2. 研究の目的

皮膚発がんにおいてMeis1の上流で機能する調節因子やMeis1が転写調節する下流遺伝子を探索すること。

3. 研究の方法

Meis1ノックダウン細胞株を樹立し、調節因子候補のひとつであるc-Metのインヒビターで処理しその影響について調べる。さらに、化学発がんにより誘導した腫瘍から調整したクロマチン分画を用い、抗Meis1抗体によりChIP sequencingを行い、下流遺伝子の探索を行う。

4. 研究成果

マウス皮膚扁平上皮がん細胞であるB9とD3をSU11274により処理した。その結果、1μMの低濃度ではほとんど効果を示さなかったものの、10μMの濃度では有意な増殖抑制効果を示した。そこで、2種類のMeis1に対するshRNAを作製し、Meis1ノックダウン細胞株をB9、D3の2種類の細胞を用いて作製した。それらの細胞株をSU11274により処理を行った。その結果、すべてのノックダウン細胞株において、SU11274の増殖抑制効果は見られなくなった。すなわち、SU11274がMeis1を直接的、または間接的にMeis1を標的として皮膚腫瘍細胞に対しても増殖抑制効果を示すことが示された。また、Meis1は転写因子としてHif1α、p16、p19の発現を制御することが既に示されているが、それらのMeis1の下流の遺伝子の発現についても、ノックダウン細胞株を用いて調べた。その結果、Hif1αに関しては、Meis1ノックダウン細胞株では発現が低下し、これをSU11274で処理しても発現が上昇することはなかった。しかし、p16、p19に関してはMeis1ノックダウン細胞株では発現の低下が見られたが、これをSU11274で処理することで発現の再上昇が見られた。すなわち、p16とp19はMeis1を介さない経路からもc-Metにより発現が制御されていることが示唆された。

さらに、変異原性物質であるDMBA (dimethylbenz(a)anthracene) と炎症剤であるTPA (tetradecanoyl-phorbol-acetone) を用いて誘導した良性腫瘍パピローマ、皮膚扁平上皮がん、コントロールとして正常皮膚からクロマチンを分離し、anti-Meis1抗体を用いて免疫沈降を行い、沈殿したクロマチンからDNAを抽出してsequencingを行うというChIP sequencingを行った。その結果、悪性腫瘍において48のMeis1結合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遺伝子を抽出したところ10個の遺伝子が検出された。このうち、4つの遺伝子(Dedd2、Sh2b1、Cep120、Stk25)の発現がMeis1ノックダウン細胞からRNAを抽出してqRT-PCRを行い発現を確認したところ、Meis1の発現と連動することを確認した。これらのうち、Stk25 (Serine/threonine protein kinase25)は耐糖能を低下させ、インスリン感受性を減弱させることが知られており、糖代謝における役割が知られている。そこで、この遺伝子の機能解析から行った。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。

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 6 件)

1. Okumura K, Saito M, Yoshizawa Y, Munakata H, Isogai E, Miura I, Wakana S, Yamaguchi M, Shitara H, Taya C, Karaplis AC, Kominami R, and Wakabayashi Y. The parathyroid hormone regulates skin tumour susceptibility in mice. *Scientific Reports*. 7 (1) : 11208. (2017). doi: 10.1038/s41598-017-11561-x. (査読有)
2. Okumura K, Kagawa N, Saito M, Yoshizawa Y, Munakata H, Isogai E, Fukagawa T, and Wakabayashi Y. CENP-R acts bilaterally as a tumor suppressor and an oncogene in the two-stage skin carcinogenesis model. *Cancer Science*. 108 (11) : 2142-2148. (2017). doi: 10.1111/cas.13348. (査読有)
3. Aoto Y, Hachiya T, Okumura K, Hase S, Sato K, Wakabayashi Y, Sakakibara Y. DEClust: A statistical approach for obtaining differential expression profiles of multiple conditions. *PLoS One*. 12 (11) : e0188285. (2017). doi: 10.1371/journal.pone.0188285. eCollection 2017.
4. Saito M, Okumura K, Yoshizawa Y, Munakata H, Isogai E, and Wakabayashi Y. Meis1 is required for c-Met inhibition to suppress cell proliferation of skin squamous cell carcinoma cells. *Journal of Biosciences and Medicines*. 4 (7) :

- 53-65. (2016). doi: 10.4236/jbm.2016.47007. (査読有)
5. Yoshizawa Y, Wada K, Shiomi G, Kameyama Y, Wakabayashi Y, Fukuta K, and Hashizume R. A 1-bp deletion in Fgf5 causes male-dominant long hair in the Syrian hamster. *Mammalian Genome*. 26 (11) : 630-637. (2015). doi: 10.1007/s00335-015-9608-5. y (査読有)
 6. Isogai E, Okumura K, Saito M, Yoshizawa Y, Itoh K, Tando S, Ohira M, Haraguchi S, Nakagawara A, Fushiki S, Nagase H, and Wakabayashi Y. Oncogenic Lmo3 cooperates with Hen2 to induce hydrocephalus in mice. *Experimental Animals*. 64 (4) : 407-414. (2015). doi: 10.1538/expanim.15-0026. (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

1. 斎藤慈、奥村和弘、磯貝恵理子、三浦郁夫、若菜茂晴、若林雄一 発がん抵抗性遺伝子座 Stmm3 の探索と遺伝学的機能解析 第62回日本実験動物学会総会 2015年5月 京都
2. 奥村和弘、斎藤慈、磯貝恵理子、三浦郁夫、若菜茂晴、島貫碧、設楽浩志、多屋長治、木南凌、若林雄一 副甲状腺ホルモンのマウス皮膚腫瘍形成における機能 第62回日本実験動物学会総会 2015年5月 京都
3. 斎藤慈、奥村和弘、磯貝恵理子、若菜茂晴、木南凌、若林雄一 Stmm3 遺伝子座の遺伝学的解析 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月 名古屋
4. 奥村和弘、斎藤慈、吉澤康博、磯貝恵理子、木南凌、若林雄一 マウス皮膚発がんにおける副甲状腺ホルモンの機能解析 第74回日本癌学会学術総会 2015年10月 名古屋
5. 斎藤慈、奥村和弘、吉澤康博、宗形春花、磯貝恵理子、若林雄一 マウス4番染色体上に存在する腫瘍悪性化を制御する原因遺伝子の探索 第63回日本実験動物学会総会 2016年5月 川崎
6. 吉澤康博、奥村和弘、斎藤慈、宗形春花、青戸良賢、磯貝恵理子、榊原康文、若林雄一 ChIP sequencing をもちいた皮膚腫瘍における Meis1 の機能解析 第63回日本実験動物学会総会 2016年5月 川崎
7. 奥村和弘、斎藤慈、吉澤康博、宗形春花、磯貝恵理子、三浦郁夫、若菜茂晴、木南凌、若林雄一 コンジェニックマッピングおよび遺伝子発現解析による皮膚がん抵抗性遺伝子座 Stmm1a の原因遺伝子探索 第63回日本実験動物学会総会 2016年5月 川崎
8. 吉澤康博、奥村和弘、斎藤慈、宗形春花、青戸良賢、磯貝恵理子、榊原康文、若林雄一 ChIP sequencing により示唆された Meis1 の皮膚腫瘍におけるグルコース代謝の制御 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月 横浜
9. 斎藤慈、奥村和弘、吉澤康博、宗形春花、磯貝恵理子、若林雄一 マウス4番染色体上に存在する腫瘍悪性化を制御する原因遺伝子の探索 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月 横浜
10. 奥村和弘、斎藤慈、吉澤康博、宗形春花、磯貝恵理子、木南凌、若林雄一 Stmm1 の遺伝的解析と候補遺伝子の探索 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月 横浜
11. 斎藤慈、奥村和弘、吉澤康博、宗形春花、磯貝恵理子、若林雄一 発がん抵抗性遺伝子座 Stmm3 の原因遺伝子の同定と機能解析 第76回日本癌学会学術総会・2017年9月 横浜
12. 奥村和弘、斎藤慈、吉澤康博、宗形春花、磯貝恵理子、木南凌、若林雄一 副甲状腺ホルモンは表皮細胞内カルシウムを制御し皮膚腫瘍形成を抑制する 第76回日本癌学会学術総会・2017年9月 横浜
13. 石川冬木、八尾良司、若林雄一 発がん過程におけるストレス獲得耐性 第76回日本癌学会学術総会 2017年9月 横浜

[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 0 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
<https://www.pref.chiba.lg.jp/gan/kenkyujo/soshiki/jikkendobutsu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若林 雄一 (WAKABAYASHI, Yuichi)

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・室長
研究者番号：40303119

(2) 研究分担者

磯貝 恵理子 (ISOGAI, Eriko)
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
研究者番号：40300917

(3) 連携研究者

榊原 康文 (SAKAKIBARA, Yasubumi)
慶応義塾大学理工学部・教授
研究者番号：10287427

(4) 研究協力者

()