

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11252

研究課題名(和文)新規低酸素誘導性初期化遺伝子GLIS1機能解析および診断・治療法開発研究

研究課題名(英文)Functions of a novel hypoxia-inducible reprogramming factor GLIS1 in cancer cells

研究代表者

谷本 圭司(Tanimoto, Keiji)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：90335688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：iPS細胞誘導において、新たな細胞初期化因子として証明されたGLIS1ですが、その制御・機能は全く明らかにされていません。そこで、GLIS1の詳細な制御機構、分子機能について検討することを本研究の目的としました。GLIS1を強制発現する乳がん細胞やsiRNAを用いた抑制実験の結果、GLIS1は、がん細胞の増殖能に対しては抑制的であるが、遊走能やSphere形成能(または幹細胞形質)に対しては促進的に機能していることが明らかとなった。一方、多くのがん細胞において、DNAメチル化により発現抑制されていることも示され、その機能ががん細胞において精密に制御されていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：GLI-similar 1 (GLIS1) is important for the reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells (iPSCs). However, the molecular mechanisms of regulation of GLIS1 expression and its function remain unclear. We previously demonstrated that GLIS1 expression was dramatically increased under hypoxic conditions by HIF-2 cooperating with AP-1 family members in cancer cells. We thus conducted this study to analyze GLIS1 functions in cancer cells. As results of functional analyses by using GLIS1-overexpressing cells or inhibition with siRNA, GLIS1 was found to inhibit cell proliferation, but increase cell migration and sphere formation capacity in cancer cells. Comprehensive gene expression analyses indicated that GLIS1 regulated tissue remodeling, EMT, adipogenesis, glycolysis, and so on. Further inhibitor of DNA methylation (5-azaC) treatment increased expressions of GLIS1 in various cancer cell lines, suggesting epigenetic regulation in cancer cells.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん 低酸素 遺伝子 がん幹細胞 がん細胞分化

1. 研究開始当初の背景

ストレス応答機構のひとつである低酸素応答機構の活性化は、がんの増殖、転移、治療抵抗性獲得に関与している事が明らかにされています。最近では、がん幹細胞様形質の獲得・維持や転移機構としての上皮間葉移行(脱分化)に低酸素応答機構が重要な役割を果たしていることが示されており、低酸素がん細胞の分子機構を解明し、克服することが予後改善の重要課題であると考えられています。

これまでに、申請者は、低酸素がん細胞を克服するための新規分子標的治療法開発をめざし、癌細胞における hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) を介した低酸素応答の分子機構解明、および、同機構の様々ながん腫における HIF-1 経路の役割について継続して検討をおこなってきました。

一方、Krüppel-like protein, Gli-similar 1 (GLIS1) は、いわゆる山中因子であるがん遺伝子産物 MYC の代わりに OCT3/4 (POU5F1), SOX2 や KLF4 と強制発現することにより、induced pluripotent stem cell (iPSC) 誘導、すなわち細胞初期化を効率的に、しかも発がんする事無く、促進する事が報告されています (Maekawa *et al* Nature 2011)。申請者は、口腔がんなど様々な臓器由来のヒトがん細胞株を用いた研究において、GLIS1 遺伝子発現は低酸素下で転写因子 HIF-2 α および API の協調機構により亢進することを見だし報告しました (Khalessi *et al* BBRC 2013)。しかしながら、その分子機構について、明らかになっていませんでした。

2. 研究の目的

正常細胞とがん細胞、または原発組織間における発現制御の相違、がん細胞における機能的意義、それらの詳細な分子機構の解明、さらには将来的な臨床研究に向けた制御機構の検出法の開発をめざして、本申請研究を立案しました。

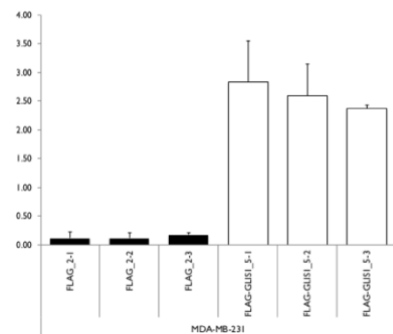
3. 研究の方法

1. 口腔がん細胞株 HSC-2 細胞由来 cDNA を鋳型として、PCR により GLIS1 遺伝子 coding 領域を増幅し、p3xFLAG-CMV10 プラスミドベクターにサブクローニングした (3xFLAG-GLIS1)。
2. 口腔がん細胞株 HSC2, 肺がん細胞 A549, 乳がん細胞 MDA-MB-231 に 3xFLAG または 3xFLAG-GLIS1 発現プラスミドベクターを遺伝子安定導入した。
3. GLIS1 特異的 siRNA (QIAGEN) を用いて BT-474 細胞の GLIS1 遺伝子発現を抑制した。
4. 上記細胞株を用いて、増殖能 (MTT 法), 郵送能 (Wound Healing 実験), スフェア形成能 (ノンコートディッシュによる培養), 遺伝子発現 (RNAseq, real-time RT-PCR) への影響を評価した。

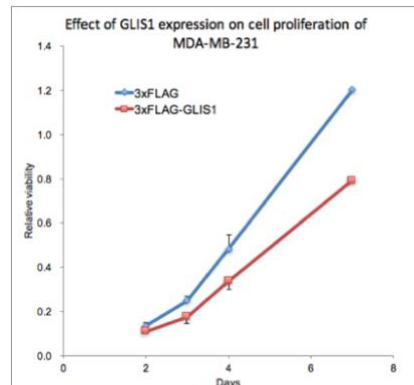
4. 研究成果

1. コントロール FLAG 遺伝子または FLAG-GLIS1 遺伝子発現ベクター導入細胞株の作製を試み、まずは MDM-MB-231 細胞にて 3 クローンずつ確立した。すなわち、限界希釈法にて複数の候補クローンを拾い、それぞれのクローンにおける GLIS1 遺伝子およびタンパク発現量を real-time RT-PCR または Immunoblotting 法にて測定し、その結果発現量の高いクローンを選別し (図 1)、これらを用いて、下記実験を行なった。

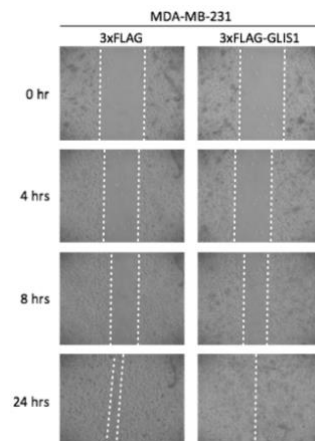
GLIS1 expressions in MDA-MB-231 transfectants



2. 細胞増殖能を MTT 法にて測定し、比較したところ、GLIS1 強発現細胞株の増殖能はコントロール細胞株に比べて、明らかに低下していた (図 2)。

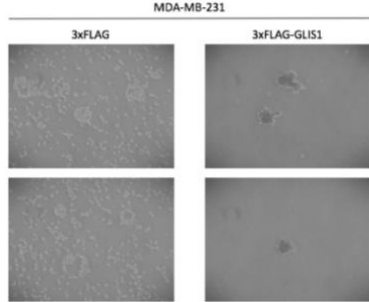


3. 細胞遊走能を Wound Healing 実験にて比較したところ、GLIS1 強発現細胞株の遊走能はコントロール細胞株に比べて、明らかに亢進していた (図 3)。



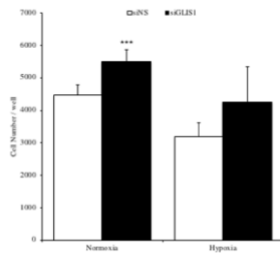
4. 非コーティングディッシュによる培養による, Sphere 形成能を比較したところ, GLIS1 強発現細胞株の Sphere 形成能はコントロール細胞株に比べて, 明らかに亢進していた (図 4)。

GLIS1 confers sphere formation capacity of MDA-MB-231



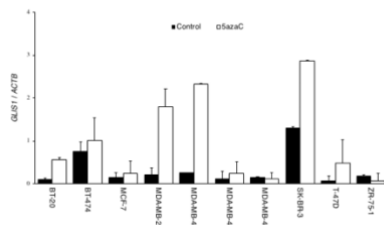
5. BT-474 細胞株の GLIS1 遺伝子発現を特異的 siRNA にて抑制し, 細胞増殖能を比較したところ, GLIS1 抑制細胞はコントロール細胞 (非特異的 siNS 導入細胞) に比べて, 増殖亢進していた (図 5)。

GLIS1 inhibition increased BT-474 cell numbers

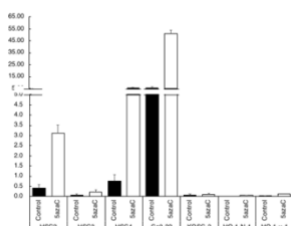


6. これらの条件下で調製した total RNA を用いて, マイクロアレイ解析による網羅的遺伝子発現変化を観察した結果, 組織のリモデリング, 上皮間葉移行 (EMT), 脂質や糖質などの代謝, p53 経路などに関わる遺伝子の発現変動が観察された。
7. 様々な細胞株を DNA メチル化阻害剤 5-azaC にて処理したところ, 多くの乳がん細胞株や口腔がん細胞株において, GLIS1 遺伝子発現の増加が観察された (図 6)。

Effect of 5-aza-Cytidine on GLIS1 expression in breast cancer cell lines



Effect of 5-aza-Cytidine on GLIS1 expression in oral cancer cell lines



8. これまでのところ, GLIS1 は, がん細胞の増殖能に対しては抑制的であるが, 遊走能や Sphere 形成能 (または幹細胞形質) に対しては促進的に機能していることが明らかとなった。一方, 多くのがん細胞において, DNA メチル化により発現抑制されている可能性も示されており, その機能ががん細胞において精密に制御されている可能性が考えられた。
9. 現在, 上記再現性評価, 放射線との関連性, 上流および下流シグナルを検討中である。

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 8 件)

*責任著者

- Keiji Tanimoto* *et al* (12名中12番目). Differentiated Embryo Chondrocyte plays a crucial role in DNA damage response via transcriptional regulation under hypoxic conditions. *PLOS ONE* 2018, 13(2): e0192136. (査読有)
- Keiji Tanimoto et al (21名中15番目). A chemical modulator of p53 transactivation that acts as a radioprotective agonist. *Molecular Cancer Therapeutics* 2018, 17(2): 432-442. (査読有)
- Keiji Tanimoto* (1名中1番目). Genetics of the hypoxia-inducible factors in human cancers. *Experimental Cell Research* 2017, 356(2): 166-172. (査読有)
- Keiji Tanimoto et al (13名中12番目). Hypoxic preconditioning increases the neuroprotective effects of mesenchymal stem cells in a rat model of spinal cord injury. *Journal of Stem Cell Research & Therapy* 2017, Oct 25;555:73-78. (査読有)
- Keiji Tanimoto et al (10名中4番目). The transcribed-ultra conserved regions in prostate and gastric cancer: DNA hypermethylation and microRNA-associated regulation. *Oncogene* 2016, Jul 7;35(27):3598-3606. (査読有)
- Keiji Tanimoto et al (10名中7番目). OASIS modulates hypoxia pathway activity to regulate bone angiogenesis. *Scientific Reports* 2015, Nov 12;5:16455. (査読有)
- Keiji Tanimoto* *et al* (10名中10番目). The A allele at rs13419896 of *EPAS1* is associated with enhanced expression and poor prognosis for non-small cell lung cancer. *PLOS ONE* 2015, Aug 11;10(8):e0134496. (査読有)
- Keiji Tanimoto et al (21名中11番目). UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 α . *Nature*

Communications 2015, Jan 23;6:6153. (査読有)

[学会発表] (計 8 件)

1. Keiji Tanimoto (4名中1番目). Effects of hypoxia signal-modulating reagents on irradiation-induced cell growth inhibition. The 2nd International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radio Disaster Medical Science, Nagasaki, 2018.2.4.
2. 谷本圭司 (4名中1番目). 低線量率放射線の低酸素応答シグナルへの影響. 第60回日本放射線影響学会, 千葉, 2017.10.26.
3. 谷本圭司 (1名中1番目). 低酸素シグナルのゲノム解析. がんとハイポキシア勉強会-ゲノム医療従事者の育成プログラム開発-, 佐賀, 2017.10.23.
4. Keiji Tanimoto (6名中1番目). Differentially Expressed in Chondrocyte plays a crucial role in DNA damage response *via* transcriptional regulations. The 1st International Symposium of the network-type Joint Usage/Research Center for Radio Disaster Medical Science, Hiroshima, 2017.2.22.
5. 谷本圭司 (1名中1番目). Hypoxia-inducible factor制御機構のゲノム解析 - Hypoxia-inducible factor (HIF) シグナル分子機構の解明 -. 旭川血管新生フォーラム, 旭川, 2015.8.20.
6. 谷本圭司 (3名中2番目). 乳がんにおけるレスベラトロールと腫瘍微小環境の相互作用. 第74回日本癌学会学術集会, 名古屋, 2015.10.8.
7. Keiji Tanimoto (5名中1番目). GLI-similar 1 is regulated by hypoxia-inducible factors *via* non-canonical mechanisms. Keystone Symposia, Hypoxia: From Basic Mechanisms to Therapeutics, Dublin, Ireland, 2015.5.12.
8. Keiji Tanimoto (11名中3番目). Myoblast Differentiation and DNA Demethylation in Simulated Microgravity. 31st Annual Meeting of the American Society for Gravitational and Space Research, Alexandria, VA, USA, 2015.11.11.

[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

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 圭司 (TANIMOTO Keiji)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：90335688