

令和元年5月30日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07108

研究課題名(和文) BACH1による腫瘍悪性化作用機序の解明

研究課題名(英文) The effect of BACH1 on malignant transformation of tumor

研究代表者

松本 光代 (Matsumoto, Mitsuyo)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：80400448

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)：BTB and CNC homolog 1 (BACH1) は活性変異型RASを導入したマウス胎児線維芽細胞(MEFs)の形質転換、細胞増殖、腫瘍形成を促す。従って、本研究では特にKRAS変異をその90%以上が持つ膵癌に注目し、BACH1のヒト腫瘍における悪性化の有無およびその作用機序の解明を目指した。その結果、BACH1は膵癌の増殖には影響しないが、遊走能、浸潤能、転移能を促進させることを見出した。その機序として、BACH1がFOXA1を含む複数の上皮系遺伝子の発現を抑制することで、上皮系形質の抑制に寄与することを示した。また、本研究は、BACH1が膵癌の予後不良因子であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は最も予後不良な悪性腫瘍の1つである。その原因の1つである腫瘍の悪性形質転換の機序については未だ未解明な点も多い。本研究から腫瘍の悪性形質転換のステップと考えられている上皮間葉転換を、BACH1が直接複数の上皮系遺伝子の転写を抑制することで促すことが示唆された。実際にBACH1高発現膵癌患者の予後は不良であり、BACH1が膵癌の治療標的となり得る可能性を示した点で、その意義は高いと考える。

研究成果の概要(英文)：BTB and CNC homolog 1 (BACH1) promotes transformation, cell proliferation and tumor formation in a model of activated RAS transfected-mouse embryonic fibroblasts (MEFs). We focused on the role of BACH1 in the pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) more than 90% of which has KRAS mutation. Although BACH1 did not affect cell proliferation and tumor growth, but promoted migration ability and invasion ability in vitro and metastasis in vivo. We revealed that BACH1 repressed directly the expression of multiple epithelial-related genes as its mechanism. We showed also BACH1 is a poor prognostic factor on PDAC.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：BACH1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

癌細胞とその微小環境に存在する細胞は、互いにサイトカイン等の刺激を受けあって腫瘍の悪性を加速させる。その中で、線維芽細胞は癌細胞によって局所的に活性型(悪性型)に転化し、癌細胞の増殖を支える。申請者らはこれまでに、転写因子 Bach1 欠損型マウス胎児線維芽細胞 (Bach1欠損型MEFs) が癌細胞の悪性を、野生型細胞よりも強く促すことを見出している。一方で、野生型MEFsに癌遺伝子である活性変異型RASを導入すると、形質転換が誘導されることが知られているが、我々はBach1欠損型MEFsでは形質転換が抑制されること、を報告している。このように、BACH1が腫瘍悪性に影響する可能性は示唆されているが、その詳細については不明であった。

#### 2. 研究の目的

本研究では、癌細胞における BACH1 の腫瘍悪性化作用の有無を調べると共に、その機序の解明を目指すことを目的とした。

#### 3. 研究の方法

BACH1 の *in vitro* での膵癌細胞における増殖への影響を調べるため、リポフェクション法を用いた siRNA による RNA 干渉法によって、膵癌細胞株 (AsPC1 および SW1990) の BACH1 のノックダウンを行い、継時的に細胞数をカウントした。BACH1 ノックダウン細胞とその対照細胞の遊走能と浸潤能の違いを検討するために、スクラッチアッセイおよびボイデンチャンバー法を用いた。BACH1 がその転写に影響する遺伝子を抽出するため、Ion Proton を用いた RNA-sequence を行い、BACH1 ノックダウン AsPC1 細胞とその対照細胞の遺伝子発現量の差を検討した。BACH1 が結合しているゲノム領域を抽出するため、HiSeq 2500 を用いた ChIP-sequence を行った。また、BACH1 は転写因子であるため、ChIP-sequence の結果と RNA-sequence の結果を統合解析することにより、BACH1 が直接転写を調節していると考えられる遺伝子を抽出した。RNA-sequence および ChIP-sequence の検証は qPCR 法を用いて行った。

BACH1 の *in vivo* における癌細胞への効果を検討するために、CRISPR/cas9 システムによって BACH1 をノックアウトした AsPC1 細胞とその対照細胞を、超免疫不全マウス (NOG) に同所移植 (膵臓に移植) した。移植から 5 週間後、膵臓組織重量および肝臓への転移数および腹膜播種として、腸間膜、横隔膜、腹膜への転移数をカウントした。

BACH1 のヒトでの膵癌における影響を検討するため、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会にて承認を得た膵癌患者 116 例の術後組織の免疫組織化学を、抗 BACH1 抗体 (自家製 9D11 抗体) を用いて行い、病理学者によって評価された BACH1 タンパク質量と予後の関係を検討した。さらに、The cancer genome atlas (TCGA) に登録されている 176 例の膵癌患者の RNA-sequence データと臨床情報から、BACH1 の遺伝子量と予後の関係について *in silico* で検討した。

#### 4. 研究成果

活性変異型 RAS 導入 MEFs 細胞では、Bach1 ノックダウンにより、細胞増殖が低下することを背景に記した。しかし、BACH1 ノックダウン AsPC1 細胞とその対象となる細胞の間で、増殖の違いは認められなかった。細胞の形態を顕微鏡下で観察すると、BACH1 ノックダウン AsPC1 細胞ではその対象となる細胞と比べて細胞同士の接着面が増える像が確認され、一方で、

BACH1 の発現量が AsPC1 よりも少ない膵癌細胞株 Panc1 細胞に BACH1 を過剰発現させると、細胞同士の接着面が減る様な像が確認された。遊走能および浸潤能試験を行ったところ、BACH1 ノックダウン AsPC1 および SW1990 細胞で、その対照細胞よりも遊走能および浸潤能は有意に抑制された（全て  $p < 0.05$ ）。癌細胞における上皮間葉移行（EMT）は癌細胞の遊走能や浸潤能を亢進させ、転移に関係する。そこで BACH1 ノックダウンおよびその対照細胞の RNA-sequence データから、上皮系（12 遺伝子）および間葉系関連遺伝子（16 遺伝子）を抽出したところ、間葉系遺伝子発現はほとんど変化が無いものの、E-カドヘリンの遺伝子をはじめ、ほとんどの上皮系関連遺伝子の発現が BACH1 ノックダウン細胞で上昇していることが判明した。BACH1 は転写因子であることから、BACH1 ノックダウンにおいて発現量が変化した上皮系および間葉系関連遺伝子の中に存在する、BACH1 が直接抑制している遺伝子を ChIP-sequence の結果から抽出した。その結果、上皮系関連遺伝子の 4 遺伝子（PKP2、CLDN3、CLDN4、FOXA1）および間葉系関連遺伝子の 1 遺伝子（SNAI2）が BACH1 の直接標的遺伝子であることが判明した。これらの結果は、BACH1 が複数の上皮系遺伝子の発現を抑制することで、転移を促進させる可能性があることを推測させた。

BACH1 の癌細胞における in vivo での腫瘍増殖や転移への影響を調べるため、BACH1 ノックアウト AsPC1 細胞とその対照細胞を膵臓に移植した。原発巣である膵臓組織重量に変化は無かったが、肝臓への転移数および腹膜播種は有意に BACH1 をノックアウトすることで減少した（ $p = 0.0025$  および  $p = 0.0032$ ）。

膵癌患者の予後に及ぼす BACH1 の効果を検討するため、116 例の膵癌組織で抗 BACH1 抗体を用いた、免疫組織化学を行った。膵癌組織における BACH1 高発現患者（28 例）と低発現患者（88 例）の予後を比較したところ、有意に BACH1 高発現患者の予後が不良であることが判明した（log-rank  $p < 0.021$ ）。さらに、TCGA で公開されている膵癌患者の膵癌細胞における BACH1 遺伝子の発現量を、Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線にて域値を算出し、高発現群と低発現群に分けてその予後を確認したところ、タンパク質同様に BACH1 高発現群において予後不良の結果を得た（log-rank  $p < 0.0001$ ）。また、BACH1 の機能と予後との関係をより確実に評価するために、BACH1 の下流因子の FOXA1 遺伝子発現量と BACH1 の遺伝子発現量を組み合わせて解析することで再評価した（高 BACH1-低 FOXA1（28 例）と低 BACH1-高 FOXA1（43 例）間での評価）。その結果、BACH1 単独評価よりも高い予後予測が可能であることが判明した。

本研究は、BACH1 が膵癌細胞において複数の上皮系関連遺伝子の発現を直接および間接的に抑制することで、遊走、浸潤、転移といった細胞の可動性の形質を促すことを示した。また、BACH1 が膵癌の新規予後予測バイオマーカーであることを示し、治療標的ともなり得る可能性を見出した。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Kato H, Itoh-Nakadai A, Matsumoto M, Ishii Y, Watanabe-Matsui M, Ikeda M, Ebina-Shibuya R, Sato Y, Kobayashi M, Nishizawa H, Suzuki K, Muto A, Fujiwara T, Nannya Y,

- Malcovati L, Cazzola M, Ogawa S, Harigae H, Igarashi K. Infection perturbs Bach2- and Bach1-dependent erythroid lineage 'choice' to cause anemia. *Nat Immunol*. 19:1059-1070, 2018. doi: 10.1038/s41590-018-0202-3. 査読あり
2. Miura Y, Morooka M, Sax N, Roychoudhuri R, Itoh-Nakadai A, Brydun A, Funayama R, Nakayama K, Satomi S, Matsumoto M, Igarashi K, Muto A. Bach2 Promotes B Cell Receptor-Induced Proliferation of B Lymphocytes and Represses Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors. *J Immunol*. 200:2882-2893, 2018. doi: 10.4049/jimmunol.1601863 査読あり
  3. Li J, Shima H, Nishizawa H, Ikeda M, Brydun A, Matsumoto M, Kato H, Saiki Y, Liu L, Watanabe-Matsui M, Iemura K, Tanaka K, Shiraki T, Igarashi K. Phosphorylation of BACH1 switches its function from transcription factor to mitotic chromosome regulator and promotes its interaction with HMMR. *Biochem J*. 475:981-1002, 2018. doi: 10.1042/BCJ20170520. 査読あり
  4. Shima H, Matsumoto M, Ishigami Y, Ebina M, Muto A, Sato Y, Kumagai S, Ochiai K, Suzuki T, Igarashi K. S-Adenosylmethionine Synthesis Is Regulated by Selective N(6)-Adenosine Methylation and mRNA Degradation Involving METTL16 and YTHDC1. *Cell Rep*. 21:3354-3363, 2017. doi: 10.1016/j.celrep.2017.11.092. 査読あり
  5. Tamahara T., Ochiai K., Muto A., Kato Y., Sax N., Matsumoto M., Koseki T., Igarashi K. mTOR-Bach2 cascade controls cell cycle and class switch recombination during B cell differentiation. *Mol Cell Biol*. 37 (24), pii:e00418-17, 2017. doi: 10.1128/MCB.00418-17. 査読あり
  6. Ebina-Shibuya R., Matsumoto M., Kuwahara M., Jang K.J., Sugai M., Ito Y., Funayama R., Nakayama K., Sato Y., Ishii N., Okamura Y., Kinoshita K., Kometani K., Kurosaki T., Muto A., Ichinose M., Yamashita M., Igarashi K. Inflammatory responses induce an identity crisis of alveolar macrophages leading to pulmonary alveolar proteinosis. *J Biol Chem*. 292:18098-18112, 2017. doi: 10.1074/jbc.M117.808535. 査読あり
  7. Seguin A., Takahashi-Makise N., Yien Y.Y., Huston N.C., Whitman J.C., Musso G., Wallace J.A., Bradley T., Bergonia H.A., Kafina M.D., Matsumoto M., Igarashi K., Phillips J.D., Paw B.H., Kaplan J., Ward D.M. Reductions in the mitochondrial ABC transporter Abcb10 affect the transcriptional profile of heme biosynthesis genes. *J Biol Chem*. 292:16284-16299, 2017. doi: 10.1074/jbc.M117.797415. 査読あり
  8. Itoh-Nakadai A., Matsumoto M., Kato H., Sasaki J., Uehara Y., Sato Y., Ebina-Shibuya R., Morooka M., Funayama R., Nakayama K., Ochiai K., Muto A., Igarashi K. A Bach2-Cebp Gene Regulatory Network for the Commitment of Multipotent Hematopoietic Progenitors. *Cell Rep*. 18:2401-2414, 2017. doi: 10.1016/j.celrep.2017.02.029. 査読あり
  9. Ebina-Shibuya R., Watanabe-Matsui M., Matsumoto M., Itoh-Nakadai A., Funayama R., Nakayama K., Muto A., Igarashi K. The double knockout of Bach1 and Bach2 in mice reveals shared compensatory mechanisms in regulating alveolar macrophage function and lung surfactant homeostasis. *J Biochem*. 160:333-344, 2016. Doi: 10.1093/jb/mvw041. 査読あり
  10. Matsumoto M., Kondo K., Shiraki T., Brydun A., Funayama R., Nakayama K., Yaegashi N., Katagiri H., Igarashi K. Genomewide approaches for BACH1 target genes in mouse embryonic fibroblasts showed BACH1-Pparg pathway in adipogenesis. *Genes Cells*. 21:553-567, 2016. doi: 10.1111/gtc.12365. 査読あり

〔学会発表〕(計 1件)

1. 松本光代、ブリドンアンドレイ、熊谷さやか、五十嵐和彦：転写因子 Bach1 による酸化ストレス依存メラノーマ細胞増殖抑制機序. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会(神戸)2017年12月6日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称： 新規膵臓癌上皮間葉移行マーカー

発明者： 五十嵐和彦、松本光代、佐藤正規、西澤弘成

権利者： 五十嵐和彦、松本光代、佐藤正規、西澤弘成

種類： PCT

番号： PCT/JP2019/006886

出願年： 2019

国内外の別： 国外

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.biochem.med.tohoku.ac.jp>

## 6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：佐藤 正規

ローマ字氏名：SATO, masaki

研究協力者氏名：五十嵐 和彦

ローマ字氏名：IGARASHI, kazuhiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。