

令和 2 年 4 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10460

研究課題名(和文) 癌遺伝子候補MYNNとp53の統合的解析と肺癌発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Integrated analysis of oncogene candidates MYNN and p53 and elucidation of lung cancer development mechanism

研究代表者

伊藤 佐智夫 (Ito, Sachio)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30335624

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)：新規癌遺伝子Myoneurin (MYNN)は、BTB/POZ-Zinc Fingerタンパク質ファミリーに属し、肺癌、卵巣癌、食道癌、乳癌等において高頻度に遺伝子増幅がみられる。MYNNがコードされる染色体3q26領域は多くの癌で増幅が確認され、近年、この領域からのCancer driver geneの同定が盛んに試みられている。MYNNが強力な転写抑制能、腫瘍形成能、p53結合能を有することから、MYNNの機能解析は発癌を理解する上で大変重要であると考えた。本研究では、MYNNとp53の機能相互作用について新しい知見を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで機能未知であったがん遺伝子MYNNについての新しい知見を示した。MYNNとp53の発現バランスは細胞を通常状態に維持するために必要で、MYNNが過剰発現し発現バランスが崩れることでp53の機能を阻害し細胞が癌化する機能を獲得する可能性が示唆された。このことは肺癌発症のメカニズムを解明する上で有益な学術的意義を持ち、さらには癌の早期発見・治療応用・予後管理へと発展できるための社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The novel oncogene Myoneurin (MYNN) belongs to the BTB / POZ-Zinc Finger protein family. MYNN has a high frequency of gene amplification in lung cancer, ovarian cancer, esophageal cancer, breast cancer, etc. Amplification of the MYNN-encoded chromosome 3q26 region has been confirmed in many cancers, and in recent years, the Cancer driver gene has been actively identified from this region. Since MYNN has strong transcription repressing ability, tumorigenicity, and p53 binding ability, it was considered that functional analysis of MYNN is very important for understanding carcinogenesis. In this study, we have presented new findings on the functional interaction between MYNN and p53.

研究分野：細胞生物学

キーワード：MYNN BTB/POZ p53 Lung cancer

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肺癌は世界的に増加傾向にあり、本邦においても死亡率第一位を占める未だ予後不良の疾患である。癌は遺伝子の異常が蓄積することによる多段階発癌の過程を辿るとされるが、肺癌においては未だ不明な点が多く解明されていない。

新規癌遺伝子 Myoneurin (MYNN)は、BTB/POZ-Zinc Finger タンパク質ファミリーに属し、肺癌、卵巣癌、食道癌、乳癌等において高頻度に遺伝子増幅がみられる。この MYNN がコードされる染色体 3q26 領域は多くの癌で増幅が確認され、近年、この領域からの Cancer driver gene の同定が盛んに試みられている。

MYNN は、BCL6 や PLZF に代表される BTB/POZ ドメインを N 末側に有している。BTB/POZ-ZF ファミリーは、細胞の分裂、老化、アポトーシスを含む多くの細胞のイベントに関与することで、発生や癌において重要な働きを担っている転写関連因子である。HIC-1、BCL6、PLZF、Nac-1 など多くの BTB/POZ タンパク質は、直接あるいは間接的に p53 の制御に関わっている。PLZF は p53 と相互に遺伝子発現を調節するとともに、PLZF は p53 のユビキチン化を促進し p53 の分解にも関与することが報告されている。我々は、MYNN を OsteoSarcoma Zinc Finger (OSZF)として骨肉腫細胞株 Saos2 より同定し [gDNA(accession:AB079779)、mRNA(accession:AB079777)、mRNA isoform(accession:AB079778)]、機能解析を行ってきた。MYNN は、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 複合体構成因子 mSin3A と結合して HDAC をリクルートすることで強力な転写抑制能を示しこと、MYNN を過剰発現させたマウス NIH3T3 細胞は足場非依存的増殖を示し、それらの細胞をマウスに移植すると腫瘍を形成すること、そして MYNN が p53 と結合することを発見した。また TCGA データベースによると肺扁平上皮癌 (50%)、卵巣癌 (34%)、食道癌 (33%)、乳癌 (27%)、頭頸部癌 (20%) において MYNN 遺伝子の増幅、MYNN mRNA のアップレギュレーションが認められている。

我々のこれまでの MYNN の機能解析データと TCGA データベースによる肺扁平上皮癌での MYNN のアップレギュレーションから、MYNN と p53 との複雑な分子メカニズムの存在を示しており、細胞レベルを基盤とした MYNN と p53 の統合的機能解析を行うことで肺癌発症メカニズムの解明に繋がると考え、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

肺癌において、がん遺伝子である MYNN とがん抑制遺伝子である p53 がどのように機能的に拮抗もしくは協調しているのかを証明するために、本研究では以下の 3 項目を目標として設定した。

- (1)MYNN の腫瘍形成能の確認と転移能の検討
- (2)MYNN と p53 の統合的解析と共通する標的遺伝子の同定
- (3)MYNN の肺癌発症メカニズムにおける役割

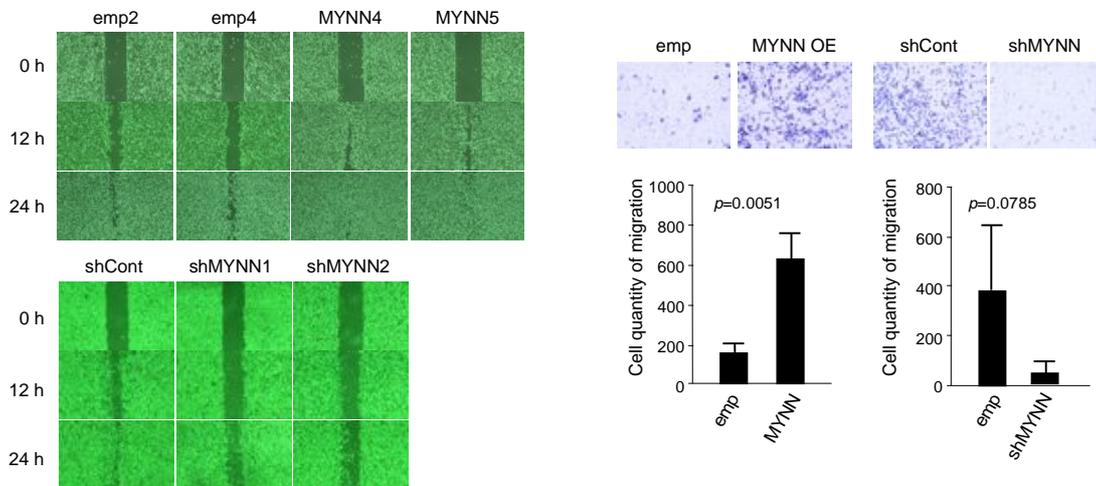
### 3. 研究の方法

上記研究項目を遂行するため次に示す方法で行った(1)MYNN 高発現とノックダウン細胞株作製し、それぞれのクローンの細胞増殖能と細胞遊走能を調べた。これらクローンをヌードマウスに尾静脈に移植し造腫瘍と転移を検討した。(2) in vitro translation 法と GST pull down 法で MYNN と p53 の結合様式を調べた。p53 の標的遺伝子に対して ChIP-PCR を行い、MYNN と p53 の共通の標的遺伝子が存在するかを検証した。抗がん剤のエトポシドまたは MDM2 インヒビター Nutlin-3a を用いて p53 を活性化し MYNN に対する影響を検証した。活性化状態の p53 存在下で MYNN を過剰発現させ、p53 の影響を検証した。miRNA による MYNN 転写後抑制を luciferase 法と western blot 法で検証した。(3)クラスタリング解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) MYNN の腫瘍形成能の確認と転移能の検討

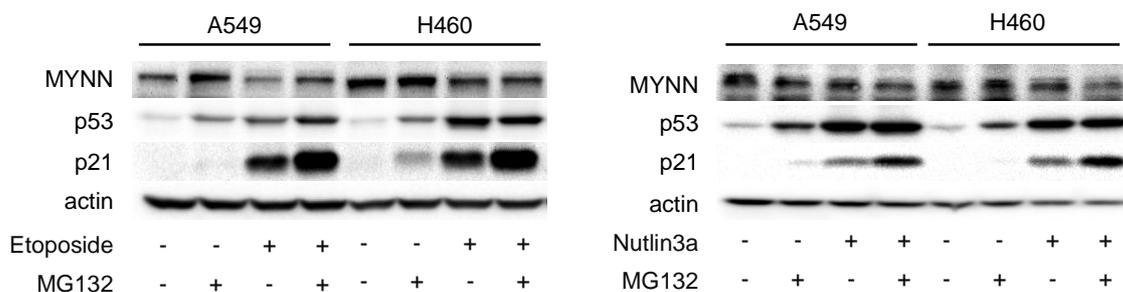
MYNN 発現量の少ない肺癌細胞株 A549 を用いて MYNN 安定発現細胞株 (MYNN-OE 細胞株) を、また MYNN 高発現の肺癌細胞株 H1299 を用いて MYNN 発現抑制細胞株 (shMYNN 細胞株) を樹立し機能解析を行った。MYNN-OE 細胞株では、細胞増殖能および細胞遊走能が対照細胞に比べ亢進され、一方、MYNN-shRNA 細胞株では、細胞増殖能および細胞遊走能が対照細胞に比べ抑制されること分かった(下図)。これら両樹立細胞をそれぞれマウスの皮下および肺組織に移植しがんの進展および転移を観察した。その結果、MYNN-OE 細胞株を移植したマウスでは、対照マウスと比較して腫瘍体積の増大(皮下移植)、全身転移(肺移植)が認められた。shMYNN 細胞株を移植したマウスでは、対照マウスと比較して腫瘍体積が減少し、脳への転移においても減少傾向であった。これらの結果およびこれまで結果から MYNN の過剰発現はがんの発症、進展、転移に関与することが分かった。



## (2) MYNN と p53 の統合的解析と共通する標的遺伝子の同定

MYNN と p53 が直接もしくは間接的に結合しているかを *in vitro* translation と GST pull-down 法を用いて検証した。 *in vitro* translation kit で MYNN タンパク質を合成し、GST 融合 p53 タンパク質を大腸菌で合成し精製した。双方を用いて pull-down 法を行った結果、MYNN と p53 は直接結合していることが明らかになった。次に MYNN と p53 の機能的関与を検証するため、野生型 p53 をもつ細胞株 A549、H460、MCF7 に抗がん剤のエトポシドまたは MDM2 インヒビター Nutlin-3a を暴露させ p53 を活性化させたときの MYNN の及ぼす効果を検証した。その結果、両薬剤で p53 を活性化すると MYNN のタンパク質量が減少することが分かった（下図）。この時、real time PCR で MYNN の mRNA 量を調べると mRNA 量の減少は見られなかったことから、転写後抑制あるいはユビキチン化等によるプロテアソーム系で分解されると予想された。転写後制御では miRNA による抑制効果が考えられるため、MYNN-3' UTR 上に結合する miRNA を *in silico* 解析を行った。その結果、p53 により発現誘導が報告される 2 つの miRNA を同定した。これらの miRNA を用いた luciferase assay および western blot 法において、luciferase 活性と MYNN のタンパク質量を有意に減少させる結果となった。一方、p53 活性化状態であっても MYNN を強制的に過剰発現させると p53 タンパク質の減少とそれに伴い p21 の減少が確認された。しかし MYNN がどのように p53 を抑制するのかは検証できなかった。

他の BTB/POZ タンパク質が p53 の標的遺伝子の発現を抑制するという報告がある。MYNN が p53 標的遺伝子の転写抑制に関わるかを ChIP-PCR で検証した。その結果、MYNN は p21 など幾つかの p53 標的遺伝子の転写調節領域に結合することが分かった。また p53 レスポンスエレメント (p53-RE) と *in vitro* translation kit で合成した MYNN を用いた DNA pull down 法の結果では、p53-RE と MYNN が直接結合していることを確認した。



## (3) MYNN の肺癌発症メカニズムにおける役割

肺癌発症に MYNN と p53 が機能的にどのように関与するのかを検証するため、クラスタリング解析を行ったが、MYNN の機能情報がデータベース上にないため分子間ネットワークを構築することはできなかった。そのためアレイ解析から得られた発現変動示した MYNN 下流で機能する遺伝子との関連を機能面から解析した。細胞膜や代謝系に関与する遺伝子群の変動が顕著に見られる結果であったことから、これらの遺伝子を含めた研究を進める必要がある。

本研究では、MYNN と p53 の機能相互作用がどのように肺癌発症に関与するのかを解明するため MYNN の造腫瘍効果と p53 相互作用について調べた。MYNN-OE 細胞では細胞増殖と細胞遊走能が亢進すること、MYNN-OE 細胞のマウス移植では腫瘍体積の増大と脳転移を引き起こすことがわかり、対照的に shMYNN 細胞では抑制的に機能することが明らかとなった。MYNN が p53 と直接結合

していること、p53 標的遺伝子の p53-RE に結合することを発見した。MYNN 発現量が標準から少ない条件下では、p53 の活性化により MYNN のタンパク質量が減少することが分かり、この MYNN の抑制には、p53 により誘導される microRNA が関与していることを発見した。また MYNN の過剰発現時には p53 が活性化状態であっても p53 を減少させ p21 の誘導も阻害することも分かった。MYNN 過剰発現による p53 の抑制に関しては次の課題として検証する必要がある。これらのことから MYNN と p53 の発現バランスは細胞を通常状態に維持するために必要で、MYNN が過剰発現し発現バランスが崩れることで p53 の機能を阻害し細胞が癌化する機能を獲得する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

|                                       |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>伊藤佐智夫                      |
| 2. 発表標題<br>肺癌における癌遺伝子候補MYNNとp53の統合的解析 |
| 3. 学会等名<br>第41回日本分子生物学会年会             |
| 4. 発表年<br>2018年                       |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>伊藤佐智夫・Qiu YanYan・堺明子・殷佩浩・片山博志   |
| 2. 発表標題<br>The role of MYNN transcription factor in the progression of lung cancer |
| 3. 学会等名<br>第4回中西医结合思維在腫瘍防治研究中的应用（招待講演）   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>伊藤佐智夫・Qiu YanYan・堺明子・殷佩浩・片山博志                     |
| 2. 発表標題<br>肺癌の進行におけるMYNN転写因子の役割                              |
| 3. 学会等名<br>第17回全国中西医结合腫瘍学術会議/2019年中医薬がん予防国際フォーラム（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年<br>2019年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                    | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 笹井 香織<br><br>(Sasai Kaori)<br><br>(50722162) | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教<br><br><br><br>(15301) |    |

## 6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(研究者番号)                               | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)             | 備考 |
|-------|---|-----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 阪口 政清<br>(Sakaguchi Masakiyo)<br>(70379840) | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授<br><br>(15301)  |    |
| 研究分担者 | 片山 博志<br>(Katayama Hiroshi)<br>(90713975)   | 岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授<br><br>(15301) |    |