

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11690

研究課題名(和文) 悪性腫瘍における唾液ヒスタチンの抗腫瘍作用と特異的な遺伝子発現制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation both of antineoplastic actions and of regulatory mechanisms of gene expression for salivary histatin in malignant tumors

研究代表者

今村 泰弘 (Imamura, Yasuhiro)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：00339136

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：唾液成分の量的・質的变化はがんの発症・進行に関係する。唾液蛋白質ヒスタチンには抗菌作用があるが、がんに対するヒスタチンの生理的機能及び遺伝子発現機構は明らかにされていない。ヒスタチン遺伝子の発現は唾液腺細胞で認められ、細胞(組織)特異的である。一方、唾液腺細胞以外では悪性黒色腫細胞でその発現が認められる。本研究では、その機序を解明した。また、ヒスタチンは子宮頸癌細胞の生存を抑制するが、悪性黒色腫細胞では促進することが明らかとなった。これらの知見は、がんに対する唾液蛋白質の新たな生理的機能を見出した結果であり、将来、創薬に結びつく可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

唾液蛋白質ヒスタチンの発現は悪性黒色腫細胞で認められているが、その機序は解明されていなかった。また、ヒスタチンのがん細胞に対する生理的機能は示されていなかった。本研究は、これらを明らかにしたことにより、ヒスタチンのがんの悪性度と関係する可能性やがんのマーカーと成り得る重要性を示唆した。将来的に、本研究の成果はヒスタチンによるがん診断法の確立や創薬に結びつき、社会的に重要な意味を持つと考えられる。

研究成果の概要(英文)： Quantitative and qualitative changes of salivary components are related to cancer onset and progression. Although salivary protein histatins have antimicrobial properties, their physiological functions and gene expression mechanisms against cancers have not yet been clarified. The histatin gene is expressed in salivary gland cells, which exhibits cell type-(tissue-) specificity. While the expression is observed in malignant melanoma cells except for salivary gland cells. In this study, the expression mechanism of the histatin gene in malignant melanoma cells has been elucidated. It has become apparent that histatins inhibit cell survival in the cervical cancer cells whereas they promote it in the malignant melanoma cells. These results indicate that the novel physiological function of salivary protein for cancer is found out. Therefore, this is likely to lead to drug discovery in the future.

研究分野：分子生物学・生化学・免疫学

キーワード：唾液蛋白質 ヒスタチン

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

唾液は1日当り1~1.5ℓ分泌され、口腔内の恒常性維持、浄化、嚥下、咀嚼などに関係している。また、様々な唾液成分の量的・質的变化は、歯周病、う蝕、がん、ウイルス感染症、口腔乾燥症、カンジダ症などの発症や進行と深く関わっている。唾液蛋白質ヒスタチンは自然免疫の働きとして、歯周病原菌 *P. gingivalis*、う蝕原因菌、カンジダ菌などに対する抗菌作用をもつことが知られている。唾液中のヒスタチン量が有意に減少する AIDS 患者では、ヒスタチンによる抗カンジダ作用が著しく低下している<sup>1)</sup>。我々は、ヒスタチンがヒト歯肉線維芽細胞 (HGFs) の増殖・生存を促進すること<sup>2,3)</sup>、Toll 様受容体 (TLR) のリガンドである宿主由来熱ショック蛋白質 HSC70 による炎症性サイトカイン産生を抑制すること<sup>4)</sup>を明らかにした。これらは、唾液蛋白質による口腔内の再生医療や抗炎症薬の開発に繋がる知見であり、宿主に対する生理的機能の一端を新たに解明した成果である。

ヒスタチンが抗菌作用を示すには、それに見合った濃度で唾液中に存在する必要がある。実際、ヒスタチンは唾液蛋白質の約 10% を占め、比較的高濃度で存在する。これは一方で、宿主に何らかの様々な生理的影響を与えている可能性が十分考えられる。ヒスタチンの更なる未知の機能解明、特に、がんに対する新規機能とその機序解明は殆ど行われておらず、極めて重要で必要不可欠な課題である。

### 2. 研究の目的

ヒスタチンは唾液腺で特異的に発現していることが示唆されていたが、その機序は不明であった。我々は、ヒスタチン遺伝子プロモーターの転写活性を解析することにより、その機序を解明した<sup>5)</sup>。これは、ヒスタチン量の減少で発症する疾患への遺伝子治療に応用可能な成果となる。一方、唾液腺以外の組織由来がん細胞の悪性黒色腫細胞において、ヒスタチン遺伝子の発現が認められている。これは、ヒスタチンがそのがん細胞特有の生理的機能に関与している可能性を意味する。これを解明するためにも、まず、がん細胞におけるヒスタチン遺伝子発現制御機構を明らかにする必要がある。一般的に、遺伝子発現はその細胞特異的 (優勢的) な転写因子の関与やエピジェネティックな制御で行われていることが多い。そこで、これらの点に注目しながら悪性腫瘍におけるヒスタチンの新たな特性と機能の解明を目指す。

これまでに、ヒスタチンには HGFs に対して細胞増殖・生存促進作用があることを示唆した<sup>2,3)</sup>。これは、ヒスタチンが HGFs 内に移行して HSC70 と結合後、負の細胞周期制御因子 p27<sup>Kip1</sup> と更に結合し、この三者複合体はユビキチン-プロテアソーム系で分解され、細胞周期 G1→S 期への移行が促進されることによる。以上は、ヒスタチンが重要な細胞周期制御因子であることを示すと同時に、創傷治癒・再生に関与することを示唆する。一方、がん細胞は無限に増殖するため、正の細胞周期制御が行われており、全身への浸潤・転移によるがんの悪性化に繋がる。ここで、がんに対するヒスタチンの生理的意義は明らかにされていない。従って、がんに対するヒスタチンの新たな機能を見出すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究課題の主な成果における研究方法は以下である。

#### (1) 悪性黒色腫細胞におけるヒスタチン遺伝子 (*HIS1*) の転写制御

##### ① *HIS1* プロモーター (-2254~+28) の転写調節

*HIS1* プロモーターにルシフェラーゼ (*Luc*) 遺伝子を連結したプラスミド<sup>5)</sup> (1.0 µg、図 1A) と β-ガラクトシダーゼ (β-gal) 発現ベクター (内部標準: 0.1 µg) を悪性黒色腫 (3×10<sup>5</sup>) A375 細胞 (ヒスタチン発現: 極低) 及び G-361 細胞 (ヒスタチン発現: 高) に導入した。2 日後、細胞を回収して溶解後、細胞抽出液を調製した。この抽出液を用い、*Luc* 及び β-gal の活性を測定し、相対的な *HIS1* プロモーターの転写活性を算出した。

##### ② *HIS1* プロモーター欠失変異体の転写調節

*HIS1* プロモーター (-2254~+28) の上流から欠失させた変異体 (図 2A) に *Luc* 遺伝子を連結したプラスミド<sup>5)</sup> (1.0 µg) と β-gal 発現ベクター (0.1 µg) を G-361 細胞導入した。その後、上記の方法により、*Luc* 及び β-gal アッセイを行った。

#### (2) *HIS1* プロモーター上の正に働く転写調節領域とそこに結合する核内蛋白質

##### ① 詳細な *HIS1* プロモーター上の正に働く転写調節領域の同定

-1361~-681 領域において、-1361 からの欠失変異体 (-1192、-1022、-852 まで欠失) を作製し、G-361 細胞にて *Luc* アッセイを行った。また、-1361~-1192 領域の-1361 からの更なる欠失変異体 (-1319、-1276、-1233 まで欠失) を作製し、同様に *Luc* アッセイを行った。

##### ② *HIS1* プロモーター上の正の転写調節領域に結合する核内蛋白質の解析

正の転写調節領域である-1232~-1192 領域の 2 本鎖 DNA をビオチン標識したプローブ、プローブの 200 倍量の競合オリゴヌクレオチド (-1232~-1213、-1222~-1203、-1212~-1192 各領域) と A375 細胞或いは G-361 細胞由来の核抽出物を混合後、非変性ポリアクリルアミド

ゲル電気泳動 (native PAGE) を行った (競合ゲルシフトアッセイ)。また、-1212~-1192 領域 (MM3) をプローブとして、図 3B に示す競合オリゴヌクレオチド (プローブの 200 倍量) と核抽出物を混合し、同様に競合ゲルシフトアッセイを行った。

2 本鎖及びプラス 1 本鎖 MM3 をビオチン標識したプローブと G-361 細胞由来核抽出物を混合後、紫外線 (254 nm) を 40 分間照射し、DNA-蛋白質複合体を形成させた。その後、12% SDS-PAGE を行い、この複合体をフッ化ポリビニリデン (PVDF) 膜に転写し、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 標識ストレプトアビジンにより検出した (UV クロスリンク法)。

### (3) *HIS1* プロモーターのエピジェネティックな発現制御

G-361 細胞と子宮頸癌 HeLa 細胞 ( $1.4 \times 10^6$ ) のゲノム DNA は NucleoSpin Tissue (タカラバイオ) にて精製した。DNA (0.4  $\mu$ g) は Express DNA methylation kit (Enzo life sciences) にてバイサルファイト処理した。これら DNA (1.4  $\mu$ g) を鋳型とし、プライマー (2  $\mu$ M) : 5'-ATATTTGAATTATATATTTGTTTAAATAAATAATTTATATTTTTG-3' と 5'-TTCATATATATTTATAAAAACCATTTATTTAAATAACTATAT-3'、または 5'-ATATAGTTATTTTAAATAAATGGTTTTTATAAATATATATGAA-3' と 5'-TATTTATTAATAAATCATCTATACTAATTTAAACAATCC-3'、DNA ポリメラーゼ (KOD-Multi & Epi (1 U) : 東洋紡) を混合し、PCR を行った。増幅した 828 bp と 1031 bp フラグメントを pCR-BluntII TOPO (Thermo fisher scientific) にそれぞれクローニング後、塩基配列を決定した。

## 4. 研究成果

### (1) 悪性黒色腫細胞における *HIS1* の転写制御

#### ① *HIS1* プロモーター (-2254~+28) の転写調節

*HIS1* の発現は唾液腺細胞で特異的であるが、ある種の悪性黒色腫細胞でも認められる。そこで、A375 細胞及び G-365 細胞から全 RNA を抽出し、RT-PCR を行った。その結果、ヒスタチンは G-361 細胞で高発現が認められ、A375 細胞では極めて低かった (データ不掲載)。また、*HIS1* プロモーターを Luc に連結したプラスミド (図 1A) を両細胞に導入し、転写活性を解析したところ、G-365 細胞で極めて高かった (図 1B)。以上から、悪性黒色腫細胞の中には、ヒスタチン遺伝子の高発現を認める細胞の存在が示された。

#### ② *HIS1* プロモーター欠失変異体の転写調節

G-361 細胞で *HIS1* プロモーターの転写活性が認められたため、このプロモーターの欠失変異体について (図 2A)、同様に転写活性を Luc アッセイで解析した。その結果、-1361~-681 領域は正の転写調節に関わることが明らかとなった。

### (2) *HIS1* プロモーター上の正に働く転写調節領域とそこに結合する核内蛋白質

#### ① 詳細な *HIS1* プロモーター上の正に働く転写調節領域の同定

上記 *HIS1* プロモーター欠失変異体の転写活性解析から、-1361~-681 領域は正に転写を調節することが判明した。そこで、この領域の欠失変異体 (-1361 からそれぞれ -1192、-1022、-852 まで欠失) を作製し、G-361 細胞にて Luc アッセイを行った。その結果、-1361~-1192 領域は転写を正に調節することが明らか

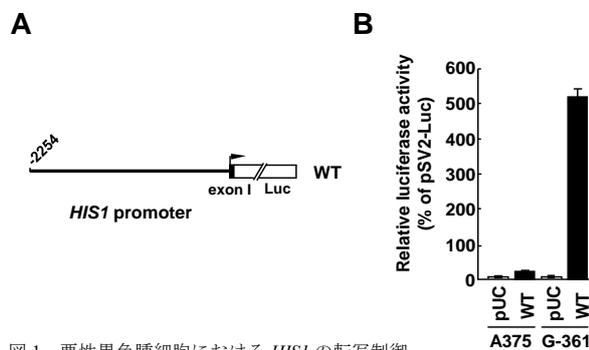


図 1 悪性黒色腫細胞における *HIS1* の転写制御  
A) *HIS1* プロモーター (-2254~+28) レポーター遺伝子  
B) 悪性黒色腫細胞における *HIS1* プロモーターの転写活性  
pUC : Luc 遺伝子のみを有するプラスミド

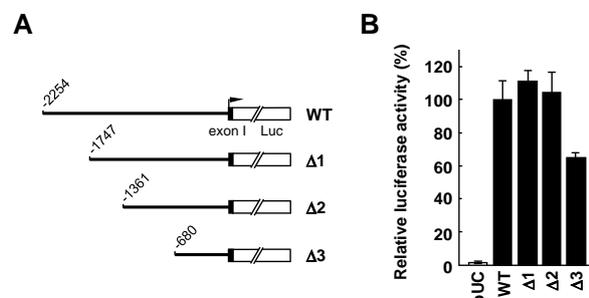


図 2 *HIS1* プロモーター欠失変異体の転写制御  
A) *HIS1* プロモーター欠失変異体レポーター遺伝子  
B) G-361 細胞における *HIS1* プロモーター欠失変異体の転写活性

その結果、-1361~-681 領域は正の転写調節に関わ

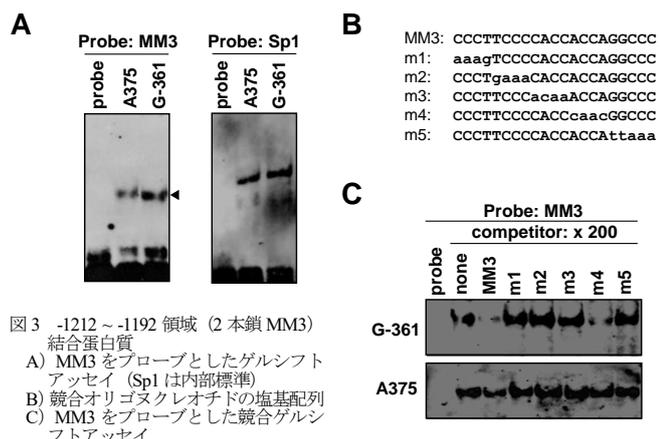


図 3 -1212~-1192 領域 (2 本鎖 MM3) 結合蛋白質  
A) MM3 をプローブとしたゲルシフトアッセイ (Sp1 は内部標準)  
B) 競合オリゴヌクレオチドの塩基配列  
C) MM3 をプローブとした競合ゲルシフトアッセイ

となった（データ不掲載）。更に、この領域の欠失変異体（-1361 からそれぞれ-1319、-1276、-1233 まで欠失）を作製し、同様に解析した。最終的に、-1232~-1192 領域は転写を正に調節することが判明した（データ不掲載）。

## ② *HIS1* プロモーター上の正の転写調節領域に結合する核内蛋白質の解析

-1232~-1192 領域の 2 本鎖 DNA をプローブとし、競合オリゴヌクレオチドと核抽出物を用いて、競合ゲルシフトアッセイを行った。その結果、MM3 に塩基配列特異的に結合する核内蛋白質の存在が明らかとなった（データ不掲載）。また、MM3 をプローブとし、ゲルシフトアッセイを行ったところ、A375 細胞よりも G-361 細胞で高発現している核内蛋白質の存在が示された（図 3A）。更に、MM3 をプローブとし、競合オリゴヌクレオチド（図 3B）存在下でゲルシフトアッセイを行った。その結果、G-361 細胞では完全ではないものの、競合オリゴヌクレオチド MM3 と m4 によりバンド強度は弱くなったが、A375 細胞では顕著な変化はなかった（図 3C）。更に、1 本鎖プラス鎖 MM3 (MM3(+)) をプローブとし、競合ゲルシフトアッセイを行ったところ、G-361 細胞で塩基配列特異的に結合する蛋白質の存在が認められた（データ不掲載）。

次に、MM3 と MM3(+) をプローブとし、G-361 細胞の核抽出物を用いて UV クロスリンク法で解析した。その結果、MM3 では約 50、55 kDa の、また、MM3(+) では約 47.5、65、70 kDa の蛋白質結合性が明らかとなり、コントロールの m1 及び m1(+) プローブでは殆ど認められなかった（図 4A, 4B）。

以上から、MM3 と MM3(+) に結合する G-361 細胞由来核内蛋白質はそれぞれ複数存在し、塩基配列特異的に結合することが示唆された。

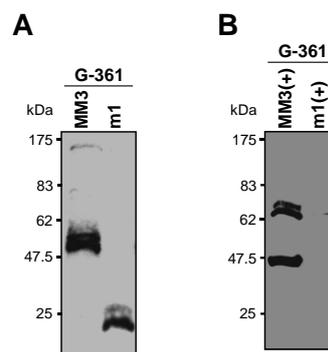


図4 -1212~-1192 領域 (MM3) 結合蛋白質の分子量決定 (UV クロスリンク法)  
A) 2 本鎖 MM3 をプローブとした解析  
B) 1 本鎖プラス鎖 MM3 をプローブとした解析

## (3) *HIS1* プロモーターのエピジェネティックな発現制御

一般的に、遺伝子発現はエピジェネティックな発現制御が関与している。そこで、HeLa 細胞（ヒスタチンの発現は殆ど認められない）及び G-361 細胞の *HIS1* プロモーター (-1340~+175 領域) 中に存在するメチル化 CpG をバイサルファイト法で解析した。その結果、-1340~-367 領域中に存在するメチル化 CpG は G-361 細胞では高頻度であったのに対し、HeLa 細胞では極めて低い頻度であった（表 1）。また、-266~-38 領域では、メチル化 CpG が認められたのは HeLa 細胞であるのに対し、G-361 細胞では全く認められなかった。更に、+175 のメチル化頻度は G-361 細胞で 100%であったが、HeLa 細胞では 6.3%と低レベルであった。以上から、ヒスタチンの発現はそのプロモーターのエピジェネティックな制御に関係していることが示唆される。

表 1 *HIS* プロモーター -1340~-175 領域に存在する CpG のメチル化頻度

promoter position	C (methylation) %	
	HeLa	G-361
-1340	0.0	71.4
-1303	0.0	28.6
-1184	0.0	64.3
-1109	6.3	78.6
-1034	0.0	50.0
-932	0.0	42.9
-827	0.0	85.7
-367	0.0	64.3
-266	0.0	0.0
-256	12.5	0.0
-197	6.3	0.0
-190	6.3	0.0
-98	0.0	0.0
-38	0.0	0.0
+175	6.3	100.0

上記をまとめると、悪性黒色腫 G-361 細胞における *HIS1* の発現は、そのプロモーターの-1212~-1192 領域が正の転写調節領域として働くことによる。この領域において、2 本鎖 DNA では約 50 と 55 kDa の蛋白質が、また、1 本鎖プラス鎖 DNA では約 47.5、65、70 kDa の蛋白質が結合することを認めた。更に、このプロモーターのエピジェネティック解析から、ヒスタチンの高発現が認められる G-361 細胞と認められない HeLa 細胞において、メチル化される CpG の頻度は細胞間で異なっていることが判明した。

*HIS1* の発現は唾液腺細胞で特異的に認められる。一方、がん細胞では少なくとも悪性黒色腫細胞でその発現が示唆されている。がん細胞で発現するそのメカニズムを調べることは、唾液蛋白質の新たな生理的意義を知る上で重要な課題となる。本研究では、悪性黒色腫細胞で正に転写を調節する *HIS1* プロモーターの領域 (-1212~-1192) を見出した。この領域に結合可能な転写因子とそのコンセンサス配列を検索したところ、骨芽細胞分化や骨格形態形成に関わる RUNX2 であった。そこで、抗 RUNX2 抗体を使用したゲルスーパーシフトアッセイを行ったところ、スーパーシフトしたバンドは検出されなかった（データ不掲載）。従って、この領域には RUNX2 ではなく、未知の転写因子が結合すると考えられる。以前に我々は、唾液腺由来細胞で正に転写調節するプロモーター上の領域として HTN27 box (-2112~-2086) を見出している<sup>5)</sup>。これは、悪性黒色腫細胞の場合と異なる領域であることから、*HIS1* の転写制御は細胞のタイプによって異なり、複雑なメカニズムで調節されていることを推測させる。

遺伝子の発現調節に関わる別の要因として、エピジェネティックな制御がある。これには、アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などがあり、DNA やヒストンが修飾されること

により、転写調節が行われている。本研究では、*HIS1* プロモーターにおける CpG メチル化頻度のパターンが G-361 細胞と HeLa 細胞で異なっていた。一般的に、CpG のメチル化は遺伝子発現抑制に関与することが知られている。従って、悪性黒色腫細胞でヒスタチン遺伝子が発現している理由として、プロモーターの -256、-197、-190 部位の CpG 非メチル化が少なくとも関与していると考えられる。また、+175 部位の CpG はメチル化頻度が 100%であることから、遺伝子発現に何かしら関わっていると推測される。更に、上記 -1212~-1192 領域 (MM3) 中には CpG が存在しないことから、この領域の結合蛋白質による転写調節と上記 CpG メチル化との直接的な関係はなさそうである。*HIS1* の発現は様々な要因 (プロモーターの結合蛋白質やエピジェネティックな変化による影響など) により、複雑に制御されていることが考えられる。従って、*HIS1* の発現には、今回明らかにしたプロモーターの転写調節領域の働きだけではなく、プロモーター全体やそれ以外の遺伝子上の領域による制御があるものと考えなければならない。いずれにしても、上記知見はがん細胞におけるヒスタチンの新たな生理的機序の解明に繋がる。

ヒスタチンは正常細胞 HGFs の増殖・生存を促進することが明らかにされている<sup>2,3)</sup>。一方、がん細胞に対するヒスタチンの生理的意義は不明である。そこで、ヒスタチンによる G-361 細胞および HeLa 細胞での生存率への影響を解析したところ、ヒスタチンは濃度依存的に G-361 細胞の生存率を上げ、HeLa 細胞では下げることが示された (データ不掲載)。G-361 細胞では自ら産生したヒスタチンがオートクライン的に作用し、細胞自身の生存率を向上させることが考えられる。これは、がんの悪性度を高め、浸潤・転移を促進させる可能性を意味する。以上から、ヒスタチンはがんに関するマーカーと成り得ると同時に、様々な生理機能を有する唾液蛋白質 (生理活性物質) であることが提唱される。

#### <引用文献>

- 1) Lal K, Pollock JJ, Santarpia RP, Heller HM, Kaufman HW, Fuhrer J, Steigbigel RT, Pilot study comparing the salivary cationic protein concentrations in healthy adults and AIDS patients: correlation with antifungal activity. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.*, 5, 904-914, 1992
- 2) Imamura Y, Fujigaki Y, Oomori Y, Usui S, Wang PL, Cooperation of salivary protein histatin 3 with heat shock cognate protein 70 relative to the G1/S transition in human gingival fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 284, 14316-14325, 2009
- 3) Imamura Y, Wang PL, Masuno K, Sogawa N, Salivary protein histatin 3 regulates cell proliferation by enhancing p27(Kip1) and heat shock cognate protein 70 ubiquitination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 470, 269-274, 2016
- 4) Imamura Y, Wang PL, Salivary histatin 3 inhibits heat shock cognate protein 70-mediated inflammatory cytokine production through toll-like receptors in human gingival fibroblasts. *J. Inflamm.-Lond.*, 11, 4, 2014
- 5) Imamura Y, Fujigaki Y, Oomori Y, Ouryouji K, Yanagisawa S, Miyazawa H, Wang PL, Transcriptional regulation of the salivary histatin gene: finding of a strong positive regulatory element and its binding protein. *J. Biochem.*, 145, 279-288, 2009

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今村 泰弘、王 宝禮、十川 紀夫
2. 発表標題 悪性黒色腫細胞におけるヒスタチン遺伝子の転写調節領域
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 今村 泰弘、王 宝禮、十川 紀夫
2. 発表標題 悪性黒色腫細胞におけるヒスタチン遺伝子の発現
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	安藤 宏  (Ando Hiroshi)  (30312094)	松本歯科大学・歯学部・准教授   (33602)	
研究分担者	雪田 聡  (Yukita Akira)  (80401214)	静岡大学・教育学部・准教授   (13801)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	十川 紀夫  (Sogawa Norio)  (30236153)	松本歯科大学・歯学部・教授    (33602)	
連携 研究者	王 宝禮  (Wang Pao-Li)  (20213613)	大阪歯科大学・歯学部・教授    (34408)	