

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790945
 研究課題名（和文） 膵臓癌のエピジェネティックな分子病態の解明と治療的アプローチ

研究課題名（英文） The role of high mobility group A proteins in cancers

研究代表者

渡邊 すぎ子（WATANABE SUGIKO）
 熊本大学・発生医学研究センター・助教
 研究者番号：10433012

研究成果の概要：構造的クロマチン因子 high mobility group A タンパク質(HMGA)の癌病態における分子作用機構と治療的アプローチとして、以下の 3 点についての知見が得られた。1) Retinoblastoma タンパク質 (RB) との相互作用による異常増殖への作用。2)膵臓癌において、細胞接着因子 E-cadherin の発現抑制性転写因子 SNAIL 発現活性化による、上皮間葉転換維持。3) let-7micro RNA による HMGA 遺伝子発現制御機構と膵臓癌表現型への影響。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・膵臓外科学

キーワード：HMGA, 癌, エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

細胞のエピジェネティックな制御機構には、DNA メチル化、クロマチン、転写調節因子等でなされている。遺伝子発現の抑制には、DNA メチル化とメチル化 DNA 結合タンパク質 (MBD)、転写不活性型のヒストン修飾とヘテロクロマチンタンパク質 (HP1) が働いている。膵臓を含めた多くの癌細胞では、癌抑制遺伝子がエピジェネティックに不活性化されていることが知られている。一方、個体発生の過程で未分化細胞や幹細胞で高く発現

して、分化した体細胞では不活性化される遺伝子群が癌化で再活性化する例も数多く知られている。癌細胞でゲノム全体の DNA メチル化状態が低下することに加えて、これらの遺伝子群の転写活性化に働く high mobility group タンパク質 (HMG) が関わっている。これらの MBD/HP1 および HMG を総称する構造的クロマチン因子が、膵臓の異型性、悪性化、上皮-間葉転換の分子機構に密接に関わることが予想されるが、詳細は不明である。

2. 研究の目的

癌の発生機序とその悪性化における構造的クロマチン因子の役割を明らかにし、難治性の膵臓癌に対する新しい診断および治療法を目指した基盤研究を推進する。

3. 研究の方法

(1) HMGA タンパク質の過剰発現やノックダウン実験系を用いて、細胞の増殖・上皮-間葉転換への作用を解析する。

(2) リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* 結合実験法、免疫沈降法およびクロマチン免疫沈降法を用いて、HMGA タンパク質と他のクロマチン因子複合体との相互作用を同定し、標的遺伝子発現制御機構を理解する。

(3) 膵臓癌組織アレイを用いて HMGA タンパク質の発現と表現型の相関を解析する。

(4) MAPK 阻害剤を用い、*K-Ras* 活性化経路と HMGA タンパク質との関連性を解析する。

(5) 膵臓癌の治療的アプローチとして HMGA タンパク質を標的とするマイクロ RNA を同定し、癌病態への影響を解析する。

4. 研究成果

(1) HMGA1タンパク質がRBタンパク質と相互作用し、細胞が休止状態(G0 arrest)となるのを阻害することを見いだした。

具体的内容: HMGA1はRBのA, Bポケット構造部と相互作用してヒストン脱アセチル化酵素HDAC1と競合することにより、通常はRBにより抑制されるサイクリンEといったE2F標的遺伝子の発現を活性化させる。

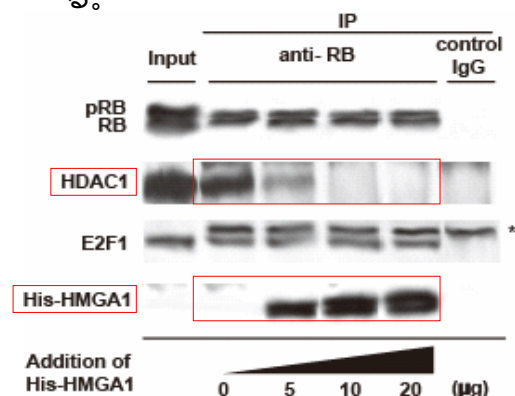


図1: 結合競合アッセイ Rb抗体を用い、T98G細胞からRb複合体を免疫沈降し、リコンビナントHMGA1タンパク質と反応させた。HMGA1はRb複合体のHDAC1と容量依存的に競合する。一方E2F1は影響を受けない。

HMGA1の安定的過剰発現により、低血清状態で休止期に入るべき癌細胞が増殖を続け、さらに染色体不安定性を伴う核分裂異常像を呈した。

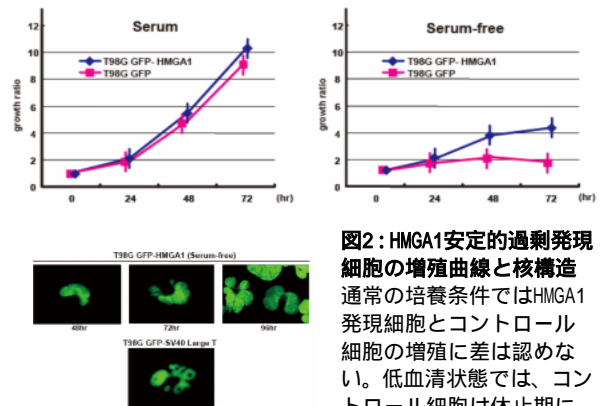


図2: HMGA1安定的過剰発現細胞の増殖曲線と核構造 通常の培養条件ではHMGA1発現細胞とコントロール細胞の増殖に差は認めない。低血清状態では、コントロール細胞は休止期に

入り増殖は止まるが、HMGA1を発現させた細胞は増殖を続ける。このとき、T抗原発現細胞に類似した核分裂異常像(多核等)を呈する。

国内外の位置付けとインパクト: 癌細胞は異常増殖に伴い、虚血や低栄養状態といった環境にさらされる。通常の細胞では休止期に入る状況においても癌細胞は分裂を続け、生き延び得るものが増殖し、進展していくとされる。本研究ではこの分子メカニズムの一つをHMGA1とRBの相互作用をとおして理解するものである。癌の微小環境が治療標的として注目される中、癌細胞が悪条件でいかに分裂を続けるかを理解することは、効果的な治療へつながる基盤研究として極めて重要な点であると考えている。

今後の展望: 膵臓癌を含めた癌進展に対し、HMGAは新たな治療の分子標的として期待できる。さらに血管新生阻害薬といった癌微小環境を標的とした治療薬との併用効果も興味深い点である。

(2) 膵臓癌におけるHMGA2タンパク質の癌特性への役割として、細胞接着因子Eカドヘリンの発現抑制性転写因子SNAILのプロモーターに結合しその発現を活性化することで、転移に有利となる間葉系細胞の表現型維持に作用することを見いだした。さらに治療的アプローチの観点から、膵臓癌におけるmicro RNAによるHMGA2遺伝子発現制御を解析した。

具体的内容: 膵臓癌細胞株においてHMGA2ノックダウンにより、細胞増殖能は低下し、E-カドヘリン発現上昇を伴う高接着性の上皮様に変化した。実際膵臓癌組織

において、E-カドヘリンとHMGA2の発現は逆相関する。

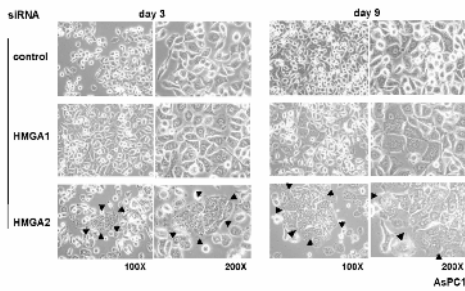


図3: HMGAタンパク質ノックダウン細胞の位相差像
HMGA2ノックダウンにより島状で高接着性の表現型を示す。

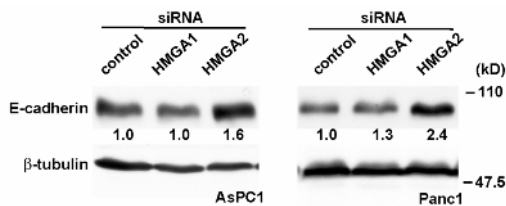


図4: HMGAタンパク質ノックダウン細胞のWestern blot
HMGA2ノックダウンによりEカドヘリンは発現上昇する。

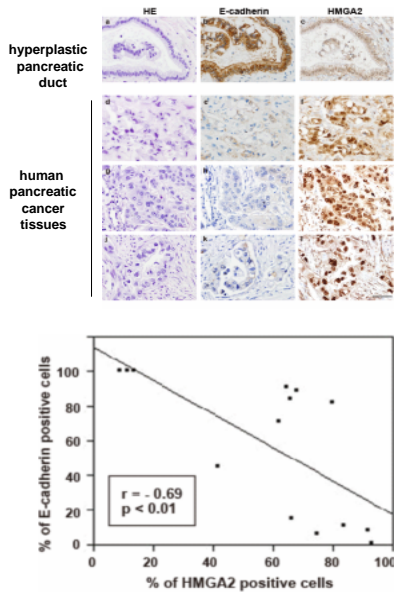


図5: 膵癌組織アレイのHMGA2およびEカドヘリンの免疫化学染色像と膵癌組織14例の両タンパク質陽性細胞の割合の統計学的解析: コントロールの膵管上皮には、細胞間にEカドヘリンの発現がみられる。一方膵癌細胞では79% (11/14例) にHMGA2の核内濃染がみられた。膵癌組織14例において、HMGA2の陽性細胞の割合は、Eカドヘリン陽性細胞の割合と負の相関がみられる。

HMGA2はE-カドヘリンの発現を抑制する転写因子*SNA1L*のプロモーターに作用し、発現を促進する。また、膵癌細胞株をRAS経路阻害剤(U0126)で処理すると、HMGAの発現低下を伴う上皮様の変化を認めた。U0126処理により*SNA1L*の発現は抑制されるが、これはHMGA2の安定的過剰発現により無効となる。また、HMGA2はKRASと同様にlet-7microRNAファミリーの標的となっているが、let-7過剰発現により、増殖抑制や間葉系細胞の特性の変化といった、表現型の変化はみられなかった。

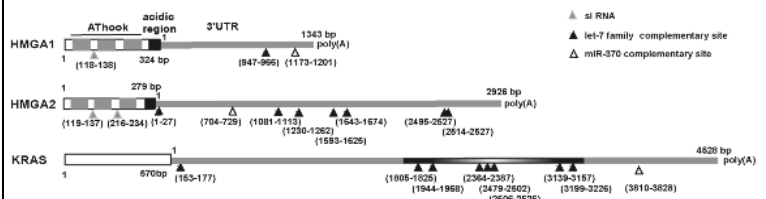


図6: HMGAとKRAS転写産物におけるlet-7microRNAファミリーの標的部位 HMGA1に1カ所、HMGA2に7カ所およびKRASに8カ所認められる。

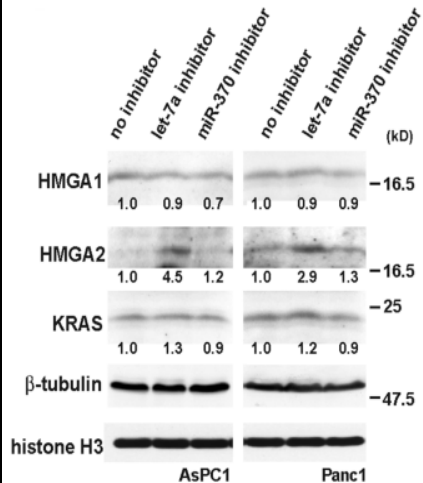


図7: let-7阻害剤導入下膵癌細胞のWestern blot
let-7阻害剤処理により、HMGA2のタンパク質発現量は増加する。

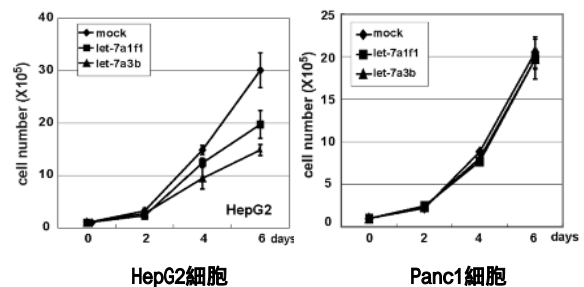


図8: let-7 microRNA過剰発現細胞の増殖曲線
let-7microRNAファミリーの発現が低いHepG2細胞はその過剰発現により増殖低下がみられるのに対し、発現の高いPanc1細胞ではlet-7microRNAを過剰発現させてもコントロールに比し増殖に変化はみられない。同様の結果は他の膵癌細胞株AsPC1細胞でもみられている(データ未提示。)

国内外の位置付けとインパクト：EMTは、癌細胞の起源である上皮細胞から間葉細胞様の形質にエピジェネティックに変化することであり、膵臓癌の浸潤・転移に関わることが注目されているが、その詳細な分子機構は不明である。本研究で、膵癌細胞においてHMGAタンパク質が、変異型RAS経路の下流として増殖能とEMTの維持に必要であることを示した。

HMGA2はまたlet-7の標的である癌原遺伝子であるにも関わらず、let-7の高発現した膵癌細胞ではlet-7をさらに加えても、もはや表現型には作用しえない。microRNAの標的は複数であることから、単一分子の変化はみられても、細胞内の遺伝子発現プロファイル全体にも影響を及ぼすためと考えられる。このような結果は治療標的を検討する上で重要な情報であると考えられる。

今後の展望：HMGA2を標的とすることで、膵臓癌転移の分子機構に重要な上皮間葉転換を阻害する新たな治療の可能性が期待できる。その分子作用機序のさらなる解析は、現行の治療抵抗性破綻を誘導する新たな治療法確立へむけた分子基盤になると考える。

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3件)

Watanabe, S., Ueda, Y., Akaboshi, S., Hino, Y., Sekita, Y. and Nakao, M. HMGA2 maintains oncogenic RAS-induced epithelial-mesenchymal transition in human pancreatic cancer cells. *Am J Pathol.* 174: 854-868. 2009. 査読有。

渡邊すぎ子、赤星慎一、渡邊丈久、中尾光善. miRNA とエピジェネティクス、*実験医学増刊号* 26: 1562-1568, 2008. 査読無。

Ueda, Y., Watanabe, S., Tei, S., Saitoh, N., Kuratsu, J.I., Nakao, M. High mobility group protein HMGA1 inhibits retinoblastoma protein-mediated cellular G0 arrest. *Cancer Sci.* 98: 1893-901. 2007. 査読有。

[学会発表](計2件)

中尾光善、石原宏、三代剛、日野信次朗、渡邊すぎ子、齊藤典子. クロマチン因子による遺伝子・細胞制御機構、第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 2008年12月11日(神戸)

Sugiko Watanabe, Shin-ichi Akaboshi, Yuko Hino, and Mitsuyoshi Nakao
The Global-COE International Summer Retreat 2008年8月28日(阿蘇)

[その他]

ホームページ等

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/medical_cell_biology/

6. 研究組織

(1)研究代表者

渡邊 すぎ子 (WATANABE SUGIKO)
熊本大学・発生医学研究センター・助教
研究者番号：10433012

(2)研究分担者

(3)連携研究者