

機関番号：23903

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590731

研究課題名 (和文) 胃癌の悪性度における転写因子型癌抑制因子 ATBF1 の
核・細胞質移行の意義研究課題名 (英文) The significance of nuclear translocation of transcriptional
regulatory factor & tumor suppressor, ATBF1, for the malignant nature of gastric cancer.

研究代表者

片岡 洋望 (KATAOKA HIROMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40381785

研究成果の概要 (和文)：胃癌細胞において、転写因子型癌抑制因子 ATBF1 は、同じく胃癌で重要な役割を果たしていることが知られている癌抑制因子 RUNX3 と複合体を形成し、TGF- β 1 の刺激によりともに細胞質から核内に移行することを明らかにした。さらに核に移行した ATBF1, RUNX3 は、これら因子のターゲット遺伝子の 1 つである p21 プロモーターを活性化し、転写因子型癌抑制因子としての機能を発揮することが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：Transcriptional regulatory factor, ATBF1 associates with RUNX3. The molecular complex of ATBF1 and RUNX3 translocates to the nucleus in response to TGF- β signal transduction. ATBF1 and RUNX3 activate the promoter of p21. ATBF1 and RUNX3 complex might function in the nucleus as tumor suppressor and transcriptional regulator.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1, 500, 000	450, 000	1, 950, 000
2009 年度	1, 400, 000	420, 000	1, 820, 000
2010 年度	700, 000	210, 000	910, 000
年度			
年度			
総計	3, 600, 000	1, 080, 000	4, 680, 000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：胃癌, 転写因子, 癌抑制因子, ATBF1, p53

1. 研究開始当初の背景

AT motif binding factor1 (ATBF1) は α feto-protein (AFP) 遺伝子のプロモーター領域の AT rich motif に結合し、AFP 遺伝子発

現を抑制する抑制性の転写制御因子として分担研究者の三浦らが 1995 年にクローニングし報告した (J Biol Chem 270 (1995)

26840-8). 4 個のホメオボックスと 23 個の Zinc finger モチーフを有する 404kDa の巨大な転写制御因子で, 前立腺がんでの検討で癌抑制因子であることが報告された (Nat Genet 37 (2005) 407-12).

最近になり, 胃癌では ATBF1 の loss of heterozygosity (LOH)が報告され, 胃癌における重要性が注目されつつある (Clin Cancer Res 13 (2007) 4355-9).

これまでにわれわれは, ATBF1 の発現量が胃癌の悪性度と逆相関すること (Oncogene 20 (2001) 869-73), ATBF1 が p21 のプロモーター活性を増強すること (Cancer Res 63 (2003) 5785-92), その機能発現には ATBF1 の核移行が重要であることなどが報告してきた.

胃癌での ATBF1 の局在を詳細に観察すると, 細胞の核に局在するもの, 細胞質に局在するもの, 全く発現の無いものなどがあり, われわれは胃癌細胞の胃型・腸型粘液形質の検討から, ATBF1 が核に局在する胃癌細胞においては, 胃型の粘液形質である MUC5AC の発現が転写レベルで抑制されることを, 臨床病理学のおよび分子生物学的に明らかにした (Int J Cancer 121 (2007) 241-7).

しかし ATBF1 の核移行メカニズムの詳細は解明されていない.

2. 研究の目的

今回, 胃癌の重要な癌抑制因子として報告羽されている runt domain transcription factor 3 (RUNX3)と ATBF1 との相互作用を検討し, TGF β シグナルとの関連において核移行のメカニズムを解析することを目的とした.

3. 研究の方法

(1) 名古屋市立大学病院で外科的切除された臨床胃癌切除標本 98 例の免疫組織学的検討により ATBF1 と RUNX3 の細胞内局在を評価

した. 抗体としては, 今回, 新たに開発された rat monoclonal 抗ヒト ATBF1 抗体 (R87, MBL)を用いた.

(2) 胃癌細胞株 MKN45 細胞を用い, myc-ATBF1 と flag-RUNX3 の強制発現系で, 抗 flag 抗体で沈降し抗 myc 抗体で blot, 抗 myc 抗体で沈降し抗 flag 抗体で blot することにより, ATBF1 と RUNX3 の蛋白質相互作用を免疫沈降法で評価した.

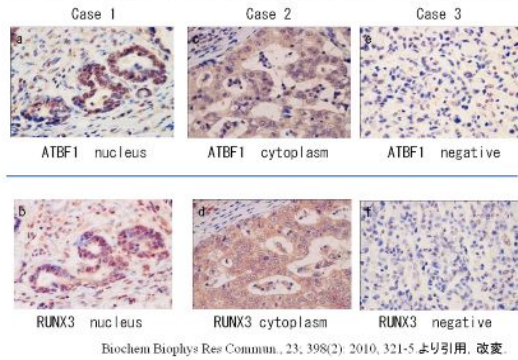
(3) 胃癌細胞株 MKN45 細胞を用い, ATBF1 と RUNX3 の強制発現系で, p21^{Waf1/Cip1} promoter vector として pGL-p21-H2320, internal control vector に pGL4.74 を用いて p21 プロモーター活性を Dual luciferase assay で検討した.

(4) TGF- β 刺激により endogenous レベルの RUNX3 が核内移行することが知られている胃癌細胞株 SNU16 細胞を用い, recombinant TGF- β 1 (2ng/mL)の刺激に反応して細胞内局在が変化する内因性の ATBF1 と RUNX3 蛋白質の細胞内局在を蛍光免疫染色後, 共焦点レーザー顕微鏡 (LSM5 confocal laser scanning microscope Zeiss)下に解析した.

4. 研究成果

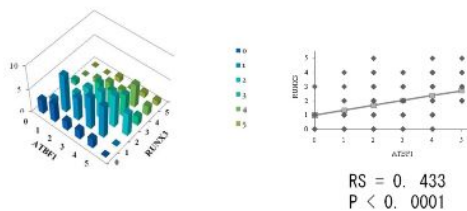
(1) 臨床胃癌切除標本 98 例の免疫組織学的検討により ATBF1 と RUNX3 の核の染色性をそれぞれ 0~5 の 6 段階にスコア化し検討したところ, 統計学的に有意な相関関係が認められた (RS = 0.433, P < 0.0001). (図 1, 図 2 参照).

図 1. 代表的な胃癌切除標本の免疫組織染色例



Biochem Biophys Res Commun., 23, 398(2): 2010, 321-5 より引用, 改変.

図 2. 臨床胃癌切除標本98例の免疫組織学的検討
ATBF1とRUNX3の核の染色性に相関関係を認めた



ATBF1とRUNX3の核の染色性を
0～5の6段階にスコア化した。

ATBF1とRUNX3の核染色には
有意な相関関係を認めた。

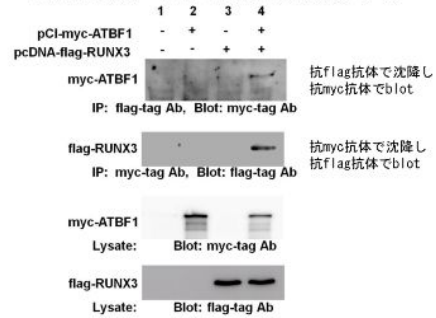
Biochem Biophys Res Commun., 23, 398(2): 2010, 321-5 より引用, 改変.

(2) 強制発現系において ATBF1 と RUNX3 の蛋白質相互作用を免疫沈降法で確認したところ, ATBF1 と RUNX3 の蛋白質相互の結合が確認された。

(3) Dual luciferase assay での検討では胃癌細胞株 MKN45 において ATBF1 と RUNX3 は p21 プロモーター活性を相加的に増強した。

(4) 共焦点レーザー顕微鏡での観察では胃癌細胞株 SNU16 の細胞質に存在する内因性の ATBF1 と RUNX3 が, TGF- β 1 刺激後 24 時間で, ともに核へ移行した。詳細に検討すると ATBF1 は細胞質のほぼすべてが核に移行したが, RUNX3 は刺激後 24 時間後において, 核, 細胞質の両方に局在がみられ, 核において Merge していた。

図 3. MKN45 胃癌細胞株への強制発現系で実施した免疫沈降法 ATBF1 と RUNX3 は結合する



Biochem Biophys Res Commun., 23, 398(2): 2010, 321-5 より引用, 改変

結論

(1). TGF- β シグナル伝達系において ATBF1 は癌抑制因子 RUNX3 と複合体を形成して, 核移行する。

(2) 核移行した ATBF1-RUNX3 は, ターゲット gene の p21 などのプロモーター活性を up-regulate し, 転写因子型癌抑制因子としての機能を発揮すると考えられた。

本論文は胃癌における ATBF1 の転写因子型癌抑制因子としての機能を詳細に検討し, TGF- β シグナル系において ATBF1 が RUNX3 と共役して核移行することを示した初めての論文である。

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 2 件)

① Mabuchi M, Kataoka H, Miura Y, Kim TS, Kawaguchi M, Ebi M, Tanaka M, Mori Y, Kubota E, Mizushima T, Shimura T, Mizoshita T, Tanida S, Kamiya T, Asai K, Joh T.

Tumor suppressor, AT motif binding factor 1 (ATBF1), translocates to the nucleus with runt domain transcription factor 3 (RUNX3) in response to TGF- β signal

transduction.

Biochem Biophys Res Commun., 査読有, 23; 398(2): 2010, 321-5.

② 片岡洋望, 三浦 裕, 馬淵元志, 森 義徳, 志村貴也, 溝下 勤, 谷田諭史, 神谷 武, 川口 誠, 城 卓志. 胃癌の胃型腸型粘液形質制御における転写因子型癌抑制因子 ATBF1 の役割. PROGRESS IN MEDICINE, 査読無し, Vol. 30(3), 2010, 787-790.

[学会発表] (計 4 件)

① 馬淵元志, 片岡洋望, 他. 胃癌細胞における転写因子型癌抑制因子 ATBF1 の TGFbeta による活性化メカニズム. 第 7 回日本消化管学会総会学術集会. 2011 年 2 月 19 日, 京都.

② Mabuchi M, Kataoka H, et al. (Oncology III) Tumor suppressor, AT-motif binding factor 1 (ATBF1), translocates to the nucleus with Runt domain transcription factor 3 (RUNX3) in cooperation with TGF-beta signal transduction. 18th United European Gastroenterology Week. October 27, 2010, Barcelona, Spain.

③ 馬淵元志, 片岡洋望, 他. 胃癌における転写因子型癌抑制因子 ATBF1 の役割—TGFβシグナル伝達系での RUNX3 との共役. 第 95 回日本消化器病学会総会. 2009 年 5 月 8 日, 札幌.

④ 馬淵元志, 片岡洋望, 他. 胃癌における転写因子型癌抑制因子 ATBF1, RUNX3 複合体の TGF-beta1 刺激による核・細胞質移行の意義. 第 5 回日本消化管学会総会学術総会. 2009 年 2 月 12 日, 東京.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 洋望 (KATAOKA HIROMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40381785

(2) 研究分担者

三浦 裕 (MIURA YUTAKA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：90285198

川口 誠 (KAWAGUCHI MAKOTO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：50204699

城 卓志 (JOU TAKASHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：30231369

(3) 連携研究者

該当なし