

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20592335

研究課題名 (和文) 口腔癌細胞における新規低酸素誘導遺伝子 EFEMP2 機能解析

研究課題名 (英文) Molecular functions of the novel hypoxia-inducible gene, *EFEMP2*.

研究代表者

谷本 圭司 (TANIMOTO KEIJI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：90335688

研究成果の概要 (和文)：

低酸素環境下にあるがん細胞が放射線療法や化学療法に抵抗性を示すことはよく知られており、低酸素がん細胞の制御はがん克服の重要な鍵になると考えられている。低酸素がん細胞制御因子の探索から新規低酸素誘導遺伝子 *EFEMP2* を見出し、機能解析を行った。まず、食道がんや大腸がん組織では、がん組織では周辺の正常組織より *EFEMP2* 遺伝子発現が高いことが明らかとなった。また、*EFEMP2* 遺伝子発現が低酸素刺激による HIF-1 を介した転写制御を受けていることを明らかにした。次に、*EFEMP2* が p53 に直接結合し、その機能を抑制することを見出した。さらに、*EFEMP2* は幹細胞維持や上皮間葉移行など細胞分化制御において重要な役割を果たしている Notch シグナルに影響を与える可能性を見いだした。

以上より、低酸素シグナルを受けた HIF-1 により発現誘導された *EFEMP2* が、p53 の制御や Notch シグナルとのクロストークを介してがん細胞を制御していることを明らかにすることができた。

研究成果の概要 (英文)：

Tumor hypoxia alters expression of various genes *via* hypoxia-inducible transcription factors, resulting causes numerous changes linked to the biologically aggressive phenotype. We identified *EFEMP2* as a novel hypoxia-inducible gene by using oligonucleotide array, and demonstrated that the gene could decrease p53 activity in cancer cells. The expression levels of *EFEMP2* were significantly higher in both colon and esophageal cancers compared to the adjacent normal tissues. Promoter reporters showed significant activities in several cancer cells and the activities were increased under hypoxic conditions (1% pO<sub>2</sub>) or by cotransfection of HIF-1 $\alpha$ . Forced expression of *EFEMP2* decreased p53 protein levels and its activity in cancer cells, and also attenuated Notch signaling. Taken together, we demonstrated that *EFEMP2* was transcriptionally induced by HIF-1 and its protein regulated cancer cell proliferation *via* p53 regulations.

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	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：低酸素, 遺伝子, 発現制御, 癌

## 1. 研究開始当初の背景

細胞には酸素欠乏(低酸素状態)を感知し、酸素供給の維持を厳密にコントロールするシステムが備わっており、近年その分子機構が次第に明らかとなりつつある。固形癌の微小環境は腫瘍血管新生の遅延や構造異常などによる低酸素・低栄養を特徴としており、酸素感知・供給維持システムが利用(悪用)され、癌細胞の増殖、転移そして治療抵抗性獲得が促進されると考えられている。低酸素応答の中心的役割を果たしている転写因子 hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) および標的遺伝子の癌組織特異的発現亢進や悪性化との関連性、そして、治療標的としての可能性が多数報告されており、低酸素癌細胞の克服が重要な課題であることが認識されている。一方で、癌細胞故の複雑性の為に、その機構の全貌解明および治療法開発への応用展開は未だなされていない。

申請者は、癌細胞における HIF-1 経路活性化機構の解明、癌細胞において活性化された HIF-1 下流経路の解明を通して、低酸素癌細胞を克服するための新規分子標的治療法開発を目指している。がん細胞における低酸素応答分子機構の全体像を明らかにする目的で網羅的遺伝子発現解析を行い、低酸素刺激により発現変動する EFEMP2 など多くの新規遺伝子を見出した。

## 2. 研究の目的

新規低酸素誘導遺伝子として見出された EFEMP2 のがん細胞における意義、機能の詳細を明らかにし、抗癌分子標的としての妥当性を検討する事を目的とする。

## 3. 研究の方法

- 1) 低酸素誘導性の発現調節機構および、癌特異的発現調節機構の解明に取り組む。プロモーター解析により、通常酸素と低酸素における比較から低酸素応答領域を見出し、証明する。
- 2) 癌細胞における機能を分子レベルで明らかにする。cDNA をクローニングし、発現ベクターを作製する。それを用いて、文献や免疫沈降実験から示唆される結合分子(蛋白)との相互作用(相互関係)を検証する。遺伝子導入による高発現細胞株の作製などにより、蛋白発現の細胞レベルでの影響も検討する。
- 3) 分子標的治療対象としての妥当性を分子機能、細胞レベルで検討する。siRNA による発現抑制や、遺伝子導入による発現増強を通して、抗癌分子標的となりうるか検討する。

## 4. 研究成果

- 1) EFEMP2 遺伝子プロモーター融合 luciferase reporter 実験により、EFEMP2 遺伝子発現が低酸素刺激による転写因子 HIF-1 を介した転写制御を受けている

ことを明らかにした。口腔がん細胞組織でも同様の制御を受けている可能性が考えられた。

- 2) EFEMP2 が p53 に直接結合し、蛋白量の減少を引き起こすことによりその機能(標的遺伝子発現抑制など)を抑制することを見出した。さらに、EFEMP2 は幹細胞維持や上皮間葉移行など細胞分化制御において重要な役割を果たしている Notch シグナルに影響を与える可能性を見いだした。変異体を用いた解析により、これらの分子機能に必要な蛋白領域が示唆された。
- 3) EFEMP2 の野生型および2種類の変異体の遺伝子安定導入細胞株を作製し、G418 耐性コロニー形成能の違いが明らかとなった。また、食道がん組織の免疫染色により、一部のがん組織で強発現していることを見いだした。

以上より、低酸素シグナルを受けた HIF-1 により発現誘導された EFEMP2 が、p53 の制御を介してがん細胞増殖に関与していることを明らかにし、抗がん分子標的となり得る可能性を示すことができた。

## 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 22 件)

1. Ujjal K. Bhawal, Fuyuki Sato, Yuki Arakawa, Katsumi Fujimoto, Takeshi Kawamoto, Keiji Tanimoto, Yumi Ito, Tomonori Sasahira, Takashi Sakurai, Masaru Kobayashi, Isamu Kashima, Hiroshi Kijima, Hiroki Kuniyasu, Yoshimitsu Abiko, Yukio Kato, and Sadao Sato. Basic helix-loop-helix transcription factor DEC1 negatively regulates CyclinD1. *Journal of Pathology* 2011, in press. (査読有り)
2. Andika C. Putra, Keiji Tanimoto, Marina Arifin, Keiko Hiyama. HIF-1a polymorphisms associate with genetic aberrations in lung cancer. *Respirology* 2011, in press. (査読有り)
3. Andika C. Putra, Keiji Tanimoto, Marina Arifin, Budhi Antariksa, Keiko Hiyama. Genetic variations in detoxification enzymes and HIF-1 $\alpha$  in Japanese patients with COPD. *Clinical Respiratory Journal* 2011, in press. (査読有り)
4. Maya Shirakura, Keiji Tanimoto\*, Hideaki Eguchi, Mutsumi Miyachi, Hideaki Nakamura, Keiko Hiyama, Kotaro Tanimoto, Eiji Tanaka, Takashi

- Takata, and Kazuo Tanne. Activation of the hypoxia-inducible factor-1 in overloaded temporomandibular joint, and induction of osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; 393: 800-805. (査読有り)
5. Marina Arifin, Keiji Tanimoto, Andika Chandra Putra, Eiso Hiyama, Masahiko Nishiyama, and Keiko Hiyama. Carcinogenesis and cellular immortalization without persistent inactivation of p16/Rb pathway in lung cancer. *International Journal of Oncology* 2010; 36: 1217-1227. (査読有り)
  6. Keiji Tanimoto\*, Keiko Hiyama, Masahiko Nishiyama. Individualized chemotherapy for cancer. In "Clinical Application of Molecular Diagnosis -Cancer, Radiation Effects, and Human Diseases-". Transworld Research Network, Kerala, 65-78, 2010.3. (査読無し)
  7. Marina Arifin, Keiji Tanimoto, Wiwien Heru Wiyono, Keiko Hiyama. Simple *EGFR* mutation screening by conventional PCR. In "Clinical Application of Molecular Diagnosis -Cancer, Radiation Effects, and Human Diseases-". Transworld Research Network, Kerala, 195-203, 2010. 3. (査読無し)
  8. Keiko Hiyama, Eiso Hiyama, Keiji Tanimoto, and Masahiko Nishiyama. Role of Telomeres and Telomerase in Cancer. In "Telomeres and Telomerase in Cancer". Humana press, Springer, New York, 2009. (査読無し)
  9. Shoichi Fumoto, Keiji Tanimoto, Eiso Hiyama, Tsuyoshi Noguchi, Masahiko Nishiyama, and Keiko Hiyama. *EMP3* as a candidate tumor suppressor gene for solid tumors. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 2009; 13: 811-822. (査読有り)
  10. Shoichi Fumoto, Keiko Hiyama, Keiji Tanimoto, Takuya Noguchi, Jun Hihara, Eiso Hiyama, Tsuyoshi Noguchi, and Masahiko Nishiyama. *EMP3* as a tumor suppressor gene for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Letter* 2009; 274: 25-32. (査読有り)
  11. 檜山桂子, 谷本圭司, 檜山英三. 入門腫瘍内科学, I 総論, 3 がんの発生(病因)とその特徴, 5 細胞死;テロメア・テロメラーゼ. 篠原出版社, 44-46, 2009. (査読無し)
  12. 檜山桂子, 谷本圭司, 檜山英三. みんなに役立つ乳癌の基礎と臨床, I. 乳癌の基礎, 10. 乳癌とテロメラーゼ. 医薬ジャーナル社, 東京, 101-111, 2009. (査読無し)
  13. Keiko Hiyama, Keiji Tanimoto, Yohei Nishimura, Momomi Tsugane, Ikuko Fukuba, Yusuke Sotomaru, Eiso Hiyama, and Masahiko Nishiyama. Exploration of the genes responsible for unlimited proliferation of immortalized lung fibroblasts. *Experimental Lung Research* 2008; 34: 373-390. (査読有り)
  14. Hideaki Nakamura, Keiji Tanimoto\*, Mayu Yunokawa, Takeshi Kawamoto, Yukio Kato, Koji Yoshiga, Eiso Hiyama, Lorenz Poellinger, Keiko Hiyama, and Masahiko Nishiyama. Human mismatch repair gene, *MLH1*, is transcriptionally repressed by the hypoxia-inducible transcription factors, DEC1 and DEC2. *Oncogene* 2008; 27: 4200-4209. (査読有り)
  15. Shoichi Fumoto, Tatsushi Shimokuni, Keiji Tanimoto, Keiko Hiyama, Keiko Otani, Megu Ohtaki, Jun Hihara, Kazuhiro Yoshida, Eiso Hiyama, Tsuyoshi Noguchi, and Masahiko Nishiyama. Selection of a novel drug-response predictor in esophageal cancer: A novel screening method using microarray and identification of IFITM1 as a potent marker gene of CDDP response. *International Journal of Oncology* 2008; 32: 413-423. (査読有り)
  16. 谷本圭司\*: がんと低酸素. 医学のあゆみ 2008; 225(13): 1315-1318. (査読無し)
  17. 谷本圭司\*, 檜山桂子, 西山正彦. 固形癌の治療抵抗性に関わる低酸素応答分子機構. 癌の臨床 2008; 54(2): 91-96. (査読無し)
  18. 谷本圭司\*, 中村秀明, 檜山桂子, 江口英孝, 西山正彦. 固形癌の治療抵抗性に関わる低酸素応答分子機構. 放射線生物研究 2008; 43(1): 54-67. (査読無し)
  19. 谷本圭司\*: 分子標的治療法開発にむけた低酸素研究. 日本癌病態治療研究会誌 2008; 14(1), 33-34. (査読無し)
  20. 檜山桂子, 谷本圭司, 檜山英三. 肺癌とテロメア・テロメラーゼ, 肺癌-基礎・臨床研究のアップデート, 疫学・基礎研究II., 分子生物学. 日本臨床 2008; 66(6), 59-64. (査読無し)
  21. 檜山桂子, Marina Arifin, 谷本圭司. 肺癌の分子生物学①-carcinogenesis とはなにか-. 特集「肺癌の Up-To-Date」.

- THE LUNG perspectives 2008; 16(4), 503-507. (査読無し)
22. 檜山桂子, 谷本圭司, 檜山英三. 日本における遺伝子診療・研究の現状. 腫瘍内科 2008; 2(5), 433-439. (査読無し)

[学会発表] (計 15 件)

1. 谷本圭司, 江口英孝, 和田智, 西山正彦, 檜山英三, 中村秀明, Lorenz Poellinger, 檜山桂子: がん細胞における VHL 蛋白質制御機構. 第 8 回がんとハイポキシア研究会, 札幌, 2011.1.30.
2. Keiji Tanimoto, Hidetaka Eguchi, Satoru Wada, Shoichi Fumoto, Hideaki Nakamura, Lorenz Poellinger, Eiso Hiyama, Masahiko Nishiyama, Keiko Hiyama. Molecular mechanisms of regulation of the pVHL by oncogenic UBE2S/E2-EPF. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会, 神戸, 2010.12.7&8.
3. 谷本圭司, 中村秀明, 河本健, 加藤幸夫, 檜山英三, 西山正彦, 檜山桂子: 低酸素下がん細胞における DNA 損傷応答抑制機構. 第 53 回放射線影響学会, 京都, 2010.10.20.
4. Keiji Tanimoto, Hideaki Nakamura, Masahiko Nishiyama, Eiso Hiyama, Keiko Hiyama. Alteration of the DNA repair system in hypoxic cancer cells. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 2010.9.22.
5. Keiji Tanimoto, Maya Shirakura, Hideaki Nakamura, Eiso Hiyama, Keiko Hiyama. Activation of the hypoxia-inducible factor-1 in chondrocytes. Keystone Symposia, Hypoxia. Molecular Mechanisms of Oxygen Sensing and Response Pathway, Keystone, Colorado, USA, 2010.1.22.
6. 谷本圭司, 佐治重衡, 江口英孝, 和田智, 西山正彦, 檜山英三, 小田千代, 檜山桂子: ビスフォスフォネート製剤の抗腫瘍効果分子機構の解明. 第 10 回ホルモンと癌研究会, 仙台, 2009.7.31.
7. Keiji Tanimoto, Hideaki Nakamura, Shoichi Fumoto, Eiso Hiyama, Hidetaka Eguchi, Masahiko Nishiyama, Keiko Hiyama. Molecular mechanisms of degradation of the pVHL, tumor suppressor gene product, by a novel oncogenic protein, UBE2S. 100<sup>th</sup> Annual Meeting of Am. Assoc. Cancer Res, Denver, Colorado, 2009.4.21.
8. Keiji Tanimoto, Keiko Hiyama, K.: Hypoxic signaling in cancers. Plenary Symposium, The 7<sup>th</sup> Scientific Respiratory Medicine Meeting PIPKRA2009, Jakarta, Indonesia, 2009.2.15
9. Keiji Tanimoto, Keiko Hiyama, K. Diagnostic factors in cancers. Satellite Symposium, The 7<sup>th</sup> Scientific Respiratory Medicine Meeting PIPKRA2009, Jakarta, Indonesia, 2009.2.14
10. 谷本圭司, 中村秀明, 麓祥一, 檜山英三, 西山正彦, 檜山桂子: がん細胞における低酸素誘導性 EFEMP2 機能解析. 第 31 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2008.12.9.
11. 谷本圭司, 中村秀明, 麓祥一, 檜山英三, 江口英孝, 西山正彦, 檜山桂子: E2-EPF/UBE2S による癌抑制遺伝子産物 pVHL 制御機構. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 2008.10.29.
12. 谷本圭司, 吉賀浩二: 低酸素下口腔癌細胞における HIF-1-DEC1 機構の意義. 第 53 回日本口腔外科学会総会, 徳島, 2008.10.20.
13. 谷本圭司, 江口英孝, 西山正彦, 檜山桂子: HIF-1-DEC 経路による DNA 修復遺伝子発現制御. 第 12 回がん分子標的治療研究会総会, 東京, 2008.6.27.
14. Keiji Tanimoto, Hideaki Nakamura, Shoichi Fumoto, Eiso Hiyama, Koji Yoshiga, Hidetaka Eguchi, Masahiko Nishiyama, Keiko Hiyama. HIF-1-DEC pathway regulates expressions of DNA repair genes. Annual Meeting of Am. Assoc. Cancer Res 2008, San Diego, CA, USA, 2008.4.14.
15. 谷本圭司: がんの生物学. 第 1 回がん治療認定医制度のための教育セミナー, 別府, 2008.1.23

[図書] (計 5 件)

1. Keiji Tanimoto\*, Keiko Hiyama, Masahiko Nishiyama. Individualized chemotherapy for cancer. In "Clinical Application of Molecular Diagnosis -Cancer, Radiation Effects, and Human Diseases-". Transworld Research Network, Kerala, 65-78, 2010.3.
2. Marina Arifin, Keiji Tanimoto, Wiwien Heru Wiyono, Keiko Hiyama. Simple EGFR mutation screening by conventional PCR. In "Clinical Application of Molecular Diagnosis -Cancer, Radiation Effects, and Human Diseases-". Transworld Research Network, Kerala, 195-203, 2010. 3.
3. Keiko Hiyama, Eiso Hiyama, Keiji Tanimoto, and Masahiko Nishiyama. Role of Telomeres and Telomerase in Cancer. In "Telomeres and Telomerase in Cancer". Humana press, Springer, New York, 2009.
4. 檜山桂子, 谷本圭司, 檜山英三. 入門腫瘍内科学, I 総論, 3 がんの発生 (病因) とその特徴, 5 細胞死; テロメア・テロ

- メラゼ. 篠原出版社, 44-46, 2009.
5. 檜山桂子, 谷本圭司, 檜山英三. みんなに役立つ乳癌の基礎と臨床, I. 乳癌の基礎, 10. 乳癌とテロメラゼ. 医薬ジャーナル社, 東京, 101-111, 2009.

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷本 圭司 (TANIMOTO KEIJI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：90335688

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：