

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791364

研究課題名 (和文)

IKK $\alpha$  に関与する未知の分化誘導因子の特定とその機能解析

研究課題名 (英文)

Identification and analysis in inducing factors of associated I $\kappa$ B kinase- $\alpha$ 

研究代表者

前田 元太 (MAEDA GENTA)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：80434140

研究成果の概要 (和文)：

I $\kappa$ B kinase- $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) と同じく口腔扁平上皮癌で高頻度に発現を停止する Mucosa-associated lymphoid tissue 1 (MALT1) 遺伝子に着目し、発現停止機構と癌細胞の表現型に与える影響について検討した。その結果、エピジェネティックな発現抑制が癌の進展と予後不良の原因の一つであると強く示唆した。未知の転写因子もしくは転写共役因子を同定する方法を確立した。その方法を用い GATA3 がプロモーターに直接結合することにより、目的遺伝子の発現を制御することを示唆した。

研究成果の概要 (英文)：

Mucosa-associated lymphoid tissue 1 (MALT1) activates nuclear factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) in lymphocyte lineages and have an effect on differentiation of epithelium. However, its expression and role in the pathology of malignant tumors of epithelial origin is not known. I examined MALT1 expression and its implications for the pathology. In this result, MALT1 expression is epigenetically inactivated during tumor progression, suggesting that the detection of MALT1 expression is a useful predictive and prognostic determinant in the clinical management.

Determining binding sites of transcription factor is important for understanding the transcriptional control of target genes. I developed concatenate ChIP that rapidly and cost effectively specifies genomic fragments. Subsequently I investigated GATA3 binding sites and target genes to employed this new method. These data demonstrate that GATA3 binds to regulatory elements and controls target gene expression through physical interaction with core promoter regions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 歯科

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：IKK $\alpha$ 、MALT1、NF $\kappa$ B、メチレーション、エピジェネティック、GATA3

### 1. 研究開始当初の背景

扁平上皮癌は口腔内で約 90%を占める悪性腫瘍であるが、予後は極めて不良である。そのため、扁平上皮癌の進展に関わる分子機構を解明することは口腔癌の予後改善に不可欠である。また、扁平上皮癌の進展メカニズムの解明は口腔領域に留まらず、他の上皮系悪性腫瘍にも応用が期待でき極めて重要である。

### 2. 研究の目的

申請者は IkB kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) がケラチノサイトの表現系に及ぼす影響について口腔扁平上皮癌を用いて解析し、報告した (Clin Cancer Res., 13, 5041-7, 2007.)。その結果、**予後不良な症例において IKK $\alpha$  の発現が低下することが判明し、予後の指標となる可能性が示唆された。**また、**IKK $\alpha$  が核内に移行することによりケラチノサイトの分化に影響を与えることも明らかにした** (図 1、2)。しかし、IKK $\alpha$  がケラチノサイトの表現系に対する作用機序は不明であり、未知の分化誘導因子の発現を招くと予測される (Sil et al, Nature 428:660 2004)。

本研究の目的は**ケラチノサイトの表現系確立を果たす、IKK $\alpha$  に関与する未知の分化誘導因子の特定とその機能を解析すること**である。

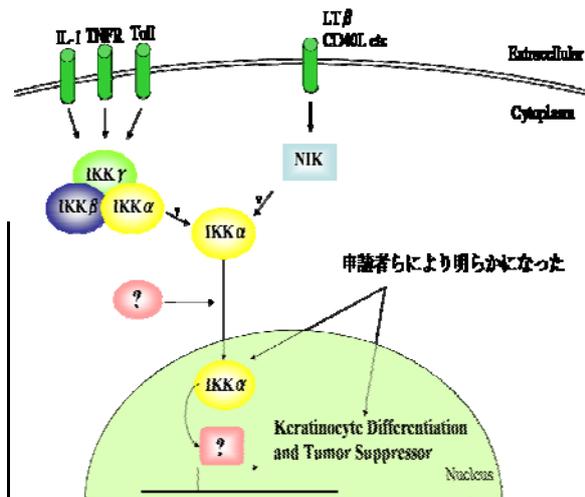


図 1 IKK $\alpha$  の核移行と機能

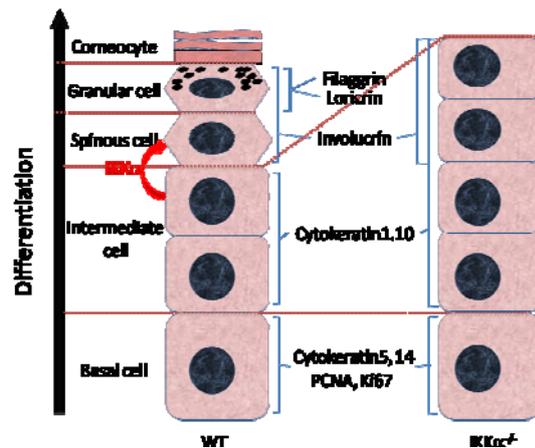


図 2 上皮における IKK $\alpha$  の機能

### 3. 研究の方法

(1) NF $\kappa$ B との関連が報告され、IKK $\alpha$  と同じく口腔扁平上皮癌で高頻度に発現を停止する Mucosa-associated lymphoid tissue 1 (MALT1) に着目し、発現停止機構と癌細胞の表現型に与える影響について検討した。

その結果、MALT1 プロモーターは転写開始点から 256bp 下流のシトシンのみが特異的にメチル化され、それが発現停止の原因であ

ることが明らかになった。MALT1 の発現停止が癌細胞に与える影響を知るため、野生型 MALT1、機能欠失型 MALT1 および siRNA を用いて多角的に検討した。In vitro 浸潤アッセイ、3 次元コラーゲンゲル浸潤アッセイ、ゼラチンザイモグラフィ、evasion アッセイ、wound healing アッセイ、およびマウス造る腫瘍性アッセイを行った。野生型 MALT1 の発現により、細胞の浸潤能、細胞外マトリックス分解能、遊走能および腫瘍発育速度は低下したのに対し、機能欠失型 MALT1 を発現させた場合はこれらの細胞表現形は著しく亢進した。また、siRNA を導入して内在性 MALT1 および野生型 MALT1 の発現をブロックした場合にも同様の亢進が観察された。

これらの結果から、**MALT1 は口腔癌細胞の高度悪性形質を特異的に抑制し、MALT1 のエピジェネティックな発現抑制が癌の進展と予後不良の原因の一つであると強く予想された**(Cancer Res 2009 ; 69 : 7216-7223)。

(2) 未知の分化誘導因子を特定するには、効率良く目的遺伝子の絞り込みをしなくてはならない。申請者は細胞内でゲノム上に結合している転写因子あるいは転写共役因子の遺伝子を未知、既知に関わらず網羅的に同定する方法 (**conChip; concatenate Chip**) を確立した。

その方法を用いて T 細胞の分化決定に重要な因子である GATA3 について網羅的検索を行い、121 の GATA3 結合領域から、81 種類の結合遺伝子を同定した。その結果、**GATA3 がコアプロモーターに直接的に結合することにより、標的遺伝子の発現を制御することが示唆された** (Gene 2009 ; 445 : 17-25)。

遺伝子発現を調節する因子として microRNA (miRNA) が注目されている。IKK $\alpha$  の 3' UTR を検索し、結合が予測される

miRNA (has-let-7a, has-let-7c, has-let-7d, has-let-7f, has-let-7i, has-miR148a, has-miR148b, has-miR520g) について、口腔扁平上皮癌を用い、IKK $\alpha$  と miRNA の発現量の相関を調べた。その結果、口腔扁平上皮癌の発現と miRNA の量に相関は無かった。口腔扁平上皮癌の IKK $\alpha$  の発現はメチレーションや Microsatellite instability と言ったエピジェネティックな変化により制御され、申請者の報告 (Clin Cancer Res., 13, 5041-7, 2007.) を支持する結果となった。

#### 4. 研究成果

本研究において、NF $\kappa$ B との関連が報告され、IKK $\alpha$  と同じく口腔扁平上皮癌で高頻度に発現を停止する MALT1 は口腔癌細胞の高度悪性形質を特異的に抑制し、MALT1 のエピジェネティックな発現抑制が癌の進展と予後不良の原因の一つである事が分かった。

細胞内でゲノム上に結合している転写因子あるいは転写共役因子の遺伝子を未知、既知に関わらず網羅的に同定する方法 (**conChip; concatenate Chip**) を確立し、GATA3 がコアプロモーターに直接的に結合することにより、標的遺伝子の発現を制御することが示唆した。

その結果、英文原著論文 2 編 (Gene 2009 ; 445 : 17-25, Cancer Res 2009 ; 69 : 7216-7223.) 総説 3 編 (Mini Rev. Med. Chem. 2009, 9: 318-323, Trends Cancer Res. 2009 5 : 13-19, 歯学 97 秋季特集号 95-101) を発表し、学会賞 (歯学会学術奨励賞) を受賞した。IKK $\alpha$  を含めた NF $\kappa$ B の分化誘導因子の特定と共に今後の治療や研究に貢献し本研究の有用性を示した。

(アンダーライン、申請者論文)

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 5 件)

1. Chiba T, Maeda G, Kawashiri S, Kato K, Imai K. ; Epigenetic loss of mucosa-associated lymphoid tissue 1 in patients with oral carcinomas. *Cancer Res.*, 15; 7216-23, 2009 査読有
2. Okazaki M, Maeda G, Chiba T, Doi T, Imai K. Identification of GATA3 binding sites in Jurkat cells. *Gene* 445: 17-25, 2009. 査読有
3. Maeda G, Chiba T, Imai K: IKKa as a critical player in epidermal development and carcinoma progression, *Trends Cancer Res*, 5 : 13-19, 2009. 査読無
4. Maeda G. Epigenetic inactivation of IκB kinase-α in oral carcinomas and tumor progression. The award-winning report for the young investigators at the Nippon Dental University (in Japanese). *Shigaku*, Oct.; 95-101, 2009. 査読無
5. Imai K, Chiba T, Maeda G, Morikawa M. The role of WNT in rheumatoid arthritis and its therapeutic implication. *Mini Rev. Med. Chem.* 9: 318-323, 2009 査読無.

[学会発表] (計 1 件)

代表者：前田 元太

学会名：日本歯科大学 歯学会

学術奨励賞受賞講演

表題： 口腔扁平上皮癌における IκB kinase-a のエピジェネティックな発現抑制と癌の進展

場所： 日本歯科大学 新潟生命歯学部

日付 平成 21 年 6 月 6 日

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 元太 (MAEDA GENTA)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：80434140

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：