

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07573

研究課題名(和文)小胞体を起点とする細胞周期の分子制御

研究課題名(英文)Regulation of cell cycle by the signaling from endoplasmic reticulum.

研究代表者

齋藤 敦(Saito, Atsushi)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：30580394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小胞体膜局在転写因子OASISは小胞体ストレスに反応して膜内切断を受け、DNA結合領域を含むN末端断片が核内に移行して転写因子として機能する。研究代表者はOASISがDNA損傷に反応して活性化し、p53非依存的にp21の誘導を介して細胞周期を停止させることを証明した。OASISは多くのglioma患者やglioblastoma細胞でプロモーターが高度にメチル化されており、その発現が低下していた。エピゲノム編集技術によって高メチル化を解除すると、その発現が回復し、癌細胞の増殖や腫瘍の成長を抑制することができた。本成果はOASISがp53に匹敵する癌抑制因子として機能することを示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々が作成したエピゲノム編集用コンストラクトをglioblastomaに導入してその増殖を抑制できたことから、OASISが腫瘍成長抑制の新規治療ターゲットとなり得ることを示すことができた。本研究の成果はOASISと同様にプロモーターが高メチル化状態にある癌抑制遺伝子の特異的脱メチル化とその発現誘導の実現に発展する可能性を秘めており、新たな癌治療法の選択肢となることが期待される。また、OASISプロモーターは乳癌細胞や膀胱癌組織などでも高度にメチル化されていることを発見していることから、glioblastomaに留まらず様々な腫瘍に対する新規治療戦略の構築へと波及することが大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：endoplasmic reticulum (ER)-resident transmembrane transcription factor OASIS is cleaved in response to ER stress. The cleaved N-terminal fragments containing DNA-binding domain translocate into the nucleus and act as a transcription factor. We demonstrated that OASIS is activated in response to DNA damage, and induces cell cycle arrest via p21 induction independently of p53. We found that many glioma patients and glioblastoma cell lines exhibited low expression of OASIS due to high methylation of its promoter. Specific removal of this hypermethylation in glioblastomas by epigenomic engineering suppressed the proliferation and tumorigenesis. These findings suggest OASIS as a novel cell cycle inhibitor with potential to act as a tumor suppressor.

研究分野：分子生物学

キーワード：OASIS 癌 メチル化 エピゲノム編集 p21 細胞老化 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

細胞はゲノム不安定性などを感知するとエラーを含んだ DNA を持ったまま増殖することを防ぐために、細胞老化などが引き起こされて増殖が停止する。細胞老化をはじめとするゲノム不安定性に反応して誘導される応答系 (DNA 損傷応答) は、核タンパク質による DNA 修復と細胞周期制御の観点からの研究が精力的に行われてきた。疾患発症の観点から視ると、DNA 損傷応答による細胞増殖の停止は癌抑制機構としても認知されている。細胞周期の安定的な停止状態は、癌細胞の増殖および腫瘍成長を抑制することが多数報告されている。しかし、DNA 損傷応答の詳細なメカニズムやその破綻から病態発症に至る分子機序は未解明の部分が多く、その分子の実体についても希薄である。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで多彩な生理機能を有する「小胞体」にターゲットを絞り、小胞体ストレスの感知、シグナル発信、転写・翻訳までの分子機構を解明してきた。一連の研究の中で、小胞体ストレスセンサーとして機能する小胞体膜局在転写因子 OASIS を見出し、その生理機能を明らかにしてきた。OASIS (Old Astrocyte Specifically Induced Substance) はもともと過度な細胞分裂による DNA 複製ストレスと細胞周期停止が引き起こされている長期培養アストロサイトで発現誘導される小胞体膜局在転写因子として同定された。細胞周期停止を引き起こす DNA 損傷ストレスを負荷すると、OASIS は膜内切断を受けて転写因子として活性化することを見出した。細胞周期停止時に OASIS によって転写誘導される遺伝子を網羅的に解析した結果、細胞周期抑制因子 p21 を同定した。本研究では DNA 損傷に応答する機構を「小胞体機能」の視点から分子レベルで解明し、その破綻が癌誘発に至る分子機序を理解することを目指した。さらに p21 の発現を誘導することが知られている p53 とのシグナルクロストークにも言及し、OASIS の人為的活性化による p53 非依存的な癌治療戦略の基盤構築を試みた。

3. 研究の方法

OASIS および p53 のシグナルクロストーク解明

採取したマウス初代培養アストロサイトを抗癌剤の一種ドキシソルビシンで処理後、培養 medium で wash して 24 時間維持してウェスタンブロッティングを行うことで OASIS のタンパク質量を調べた。また、OASIS 欠損初代培養アストロサイトあるいは p53 をノックダウンした野生型初代培養アストロサイトをドキシソルビシンで処理して western blotting を行い、OASIS および p53 の転写因子としての活性化を調べた。

OASIS 発現とプロモーターメチル化の関連解明

多くの細胞・組織でエピキタスに発現している p53 と異なり、OASIS の発現には比較的高い特異性がある。各細胞種における OASIS 発現制御と細胞周期停止との関連を調べるために、OASIS が発現しているマウス初代培養骨芽細胞および OASIS が発現していないマウス初代培養繊維芽細胞に DNA 損傷を負荷し、p53 や p21 の発現変化を western blotting で調べた。さらに各細胞種における OASIS の発現がエピジェネティックな機構によって制御されている可能性を疑い、bisulfite sequencing 解析によって OASIS プロモーターのメチル化レベルを調べた。

OASIS プロモーター特異的脱メチル化による新規癌治療法の開発

OASIS プロモーターをターゲットとするガイド RNA (gRNA) と DNA 切断活性をもたない変異 Cas9 (dCas9) を用いて脱メチル化酵素 TET1 を OASIS プロモーターに近接させ、その酵素活性によって DNA の脱メチル化を誘導するエピゲノム編集法を確立する (図 1) ことを試み、実際に細胞や組織に導入して脱メチル化効率や OASIS の発現変化を bisulfite sequencing 解析や western blotting で検証した。

4. 研究成果

OASIS および p53 のシグナルクロストーク解明

採取したマウス初代培養アストロサイトを抗癌剤の一種ドキシソルビシンで処理後、培養 medium で wash して 24 時間維持してウェスタンブロッティングを行うと、OASIS のタンパク質量は増加した。小胞体膜に局在している OASIS は切断を受けて活性化し、細胞質側にあたり DNA 結合領域を含む N 末端側が核内に移行して転写因子として機能する。細胞内における OASIS N 末端断片の量を調べると、ドキシソ

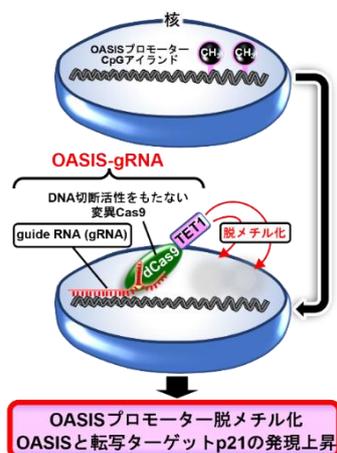


図 1. エピゲノム編集のコンセプト。OASIS プロモーターにアクセスできるガイド RNA (gRNA)、DNA 切断活性をもたない変異 Cas9 (dCas9) と脱メチル化酵素 TET1 を連結した融合タンパク質を癌細胞に発現させて OASIS プロモーターを特異的に脱メチル化することで OASIS の発現を回復させる。

ビシン処理によって増加した。OASIS タンパク質およびその N 末端断片の増加と連動して、癌抑制遺伝子であり、細胞老化のマーカーとしても知られる p21 の発現レベルも上昇した。一方で OASIS 欠損アストロサイトではドキシソルビシンによって誘導される p21 の発現上昇が有意に抑制された。p21 は p53 によってその発現が誘導されることが知られている。そこで OASIS が誘導する p21 の経路と p53 が誘導する p21 の経路のクロストークが成立するの否かを OASIS 欠損細胞および p53 に対する siRNA を用いて調べた。p53 のタンパク質量および活性化フォーム（リン酸化 p53 : P-p53）の量は OASIS 野生型および欠損アストロサイトで大きな差がなかった。一方で p53 をノックダウンしてもドキシソルビシン処理による OASIS 全長型および N 末端断片の量は変化しなかった。このことから OASIS はアストロサイトにおいて DNA 損傷後に p53 非依存的に p21 の発現を誘導し、細胞増殖を負に制御することがわかった。

OASIS 発現とプロモーターメチル化の関連解明

アストロサイトと同様に内在性の OASIS が強く発現しているマウス初代培養骨芽細胞に DNA 損傷を加えると、アストロサイトと同様に p53 非依存的に p21 を介した細胞周期の停止を引きこした。一方で OASIS がほとんど発現していない初代培養線維芽細胞では、OASIS プロモーターが高度にメチル化されてその発現が抑制されており、p53 が優勢的に p21 を介した細胞増殖抑制を制御していることを見出した。さらに興味深いことに、線維芽細胞などと同様に一定数の膠芽腫患者および膠芽腫細胞株において OASIS プロモーターの高メチル化を伴ってその発現レベルが低下していることを突き止めた。

OASIS プロモーター特異的脱メチル化による新規癌治療法の開発

膠芽腫細胞株における高メチル化状態を解除して OASIS の発現を回復させるために「研究の方法」で示したエピゲノム編集技術の応用を実施した。即ちターゲットとするプロモーター領域（OASIS プロモーター）に gRNA を用いて脱メチル化酵素 TET1 を近接させ、その酵素活性によって DNA の脱メチル化を誘導する。作製したエピゲノム編集用コンストラクト（OASIS-gRNA）を OASIS プロモーターが高メチル化状態にある p53 変異型膠芽腫細胞株 U251MG 細胞に導入した。すると効率的に脱メチル化を誘導し OASIS と p21 の発現が回復してその増殖を停止させることに成功した。以上より、OASIS 低発現はそのプロモーター領域の高メチル化に起因することが示唆された。また、エピゲノム編集技術でこの高メチル化状態を解除すると OASIS による細胞周期抑制を誘導できることがわかった（図 2、左）。

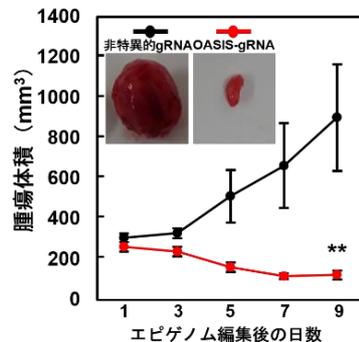
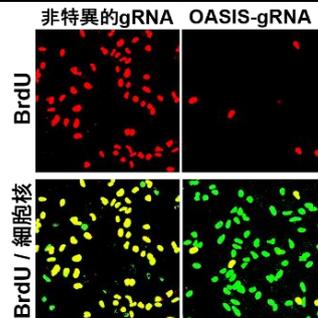


図 2. (左) p53 変異型膠芽腫細胞株 U251MG 細胞を用いた BrdU 取り込みアッセイ。OASIS-gRNA 導入で増殖が抑制される。(右) 癌細胞をマウスに移植後、OASIS-gRNA を注射投与すると腫瘍成長が抑制される。

エピゲノム編集法による癌化抑制効果を *in vivo* でも検証した。ヌードマウスに U251MG 細胞を異種間移植した後、移植した癌細胞由来の腫瘍の周辺に非特異的 gRNA を発現するコンストラクトあるいは OASIS-gRNA コンストラクトを直接注射した。OASIS-gRNA を投与した腫瘍では OASIS プロモーターの脱メチル化を伴って OASIS および p21 の発現が回復し、癌細胞の増殖が停止して腫瘍成長が顕著に抑制された（図 2、右）。エピゲノム編集技術を駆使することによってこのメチル化を解除することから、OASIS が p53 非依存的に機能する新たな癌抑制因子であることが示された。

さらにエピゲノム編集法の効率を検証するため、OASIS プロモーター上における認識部位が異なる各種 gRNA を発現するコンストラクト（OASIS-gRNA-1 ~ -7）を作成した。これらを U251MG 細胞に導入し、bisulfite sequencing 解析によって OASIS プロモーターのメチル化レベルを調べたところ、gRNA の認識部位によって脱メチル化効率が異なり、複数のコンストラクトにおいて有意にプロモーター領域が脱メチル化されることがわかった（図 3）。最も脱メチル化レベルが高かったコンストラクト（OASIS-gRNA-1）を導入した細胞では OASIS および p21 の発現が強く誘導され、細胞増殖も抑制された。OASIS-gRNA-1 をはじめとする各種 RNA を発現するコンストラクトをそれぞれ *in vivo*

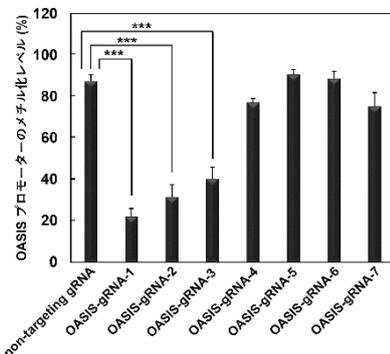


図 3. U251MG 細胞を用いた bisulfite sequencing 解析。OASIS プロモーター上における認識部位が異なる各種 gRNA を発現するコンストラクト（OASIS-gRNA-1 ~ -7）を U251MG 細胞に導入すると、複数の gRNA 配列を発現するコンストラクトにおいて（OASIS-gRNA-1、OASIS-gRNA-2、OASIS-gRNA-3）有意にプロモーター領域が脱メチル化される。

transfection 試薬を用いた直接投与方法によってヌードマウスに異種間移植した U251MG 細胞由来の腫瘍に投与した結果、脱メチル化効率が良好だった OASIS-gRNA-1、OASIS-gRNA-2、OASIS-gRNA-3 で腫瘍の成長を有意に抑制することができた。OASIS-gRNA-1 を投与した腫瘍から DNA を回収して bisulfite sequencing 解析を行うと、OASIS プロモーター領域が特異的に脱メチル化されていることがわかった。この腫瘍では OASIS とその N 末端断片の発現レベルが上昇していることが western blotting によって示された。OASIS-gRNA-1 を投与した腫瘍を用いて組織染色を実施すると、p21 陽性の老化細胞の増加も観察された。このことから、gRNA の認識部位が異なると OASIS プロモーターの脱メチル化効果に差があることがわかった。

多くの癌細胞において、癌抑制遺伝子のプロモーター領域は OASIS と同様に高メチル化状態となっており、その発現が抑制されていることが報告されている。本共同研究において、腫瘍に OASIS-gRNA を投与することで OASIS プロモーターの脱メチル化とその発現上昇を誘導できることを示した。この成果は、腫瘍における特定プロモーター領域の脱メチル化法を確立するための足掛かりとなる。すなわち OASIS と同様にプロモーターが高メチル化状態にある癌抑制遺伝子の特異的脱メチル化とその発現誘導の実現に発展する可能性を秘めており、新たな癌治療法の選択肢となることが期待される。また、研究の概要に記載した通り OASIS プロモーターは U251MG 細胞以外にも乳癌細胞や膀胱癌組織をはじめとする様々な癌細胞および腫瘍組織で高度にメチル化されていることを発見している。OASIS-gRNA は U251MG 細胞と同様にこれら癌細胞の増殖も抑制する可能性があることから、本共同研究成果が膠芽腫に留まらず様々な腫瘍に対する新規治療戦略の構築へと波及することが大いに期待できる。

エピゲノム編集治療は作用機序が新規であり、本法の臨床応用は従来の抗癌剤との相乗効果が期待できる。また、エピゲノム編集はゲノムに変異を与えることなく原因遺伝子の発現を調節できる安全性に優れた手法である。さらに本法の基盤であるエピジェネティクスに着目したメチル化検出法を確立すれば多様な膠芽腫の分類・早期診断・治療法選択の強力なツールとなることから、診断と治療をセットにした医療が実現できるという点で臨床医学的に極めて意義深い。これは高い予後不良率を示す膠芽腫に対する新たな基盤整理を導き、革新的治療への扉を開くことになる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito Atsushi, Kamikawa Yasunao, Ito Taichi, Matsuhisa Koji, Kaneko Masayuki, Okamoto Takumi, Yoshimaru Tetsuro, Matsushita Yosuke, Katagiri Toyomasa, Imaizumi Kazunori	4. 巻 42
2. 論文標題 p53-independent tumor suppression by cell-cycle arrest via CREB/ATF transcription factor OASIS	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 112479
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2023.112479	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 上川泰直, 呉祖倩, 齋藤敦, 今泉和則
2. 発表標題 Toward understanding the molecular mechanisms of Nuclear Envelope Stress Response and its physiological impact.
3. 学会等名 日本生理学会 第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Atsushi Saito, Yasunao Kamikawa, Taich Ito, Kazunori Imaizumi
2. 発表標題 Cell cycle arrest mediated by endoplasmic reticulum-resident transcription factor OASIS suppresses glioblastoma development.
3. 学会等名 American Society for Cell Biology 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasunao Kamikawa, Zuqian Wu, Atsushi Saito, Kazunori Imaizumi
2. 発表標題 Cell type-specific response to rupture of the nuclear envelope.
3. 学会等名 American Society for Cell Biology 2022（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤敦, 上川泰直, 伊藤泰智, 今泉和則
2. 発表標題 Cell cycle arrest mediated by ER-resident transcription factor OASIS suppresses glioblastoma development.
3. 学会等名 第26回グリア研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤敦, 今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜局在転写因子BBF2H7を介した褐色脂肪細胞のミトコンドリア機能制御
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤敦, 上川泰直, 伊藤泰智, 今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜局在分子OASISによる細胞増殖と癌化制御
3. 学会等名 第16回 日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤敦, 上川泰直, 伊藤泰智, 吉丸哲郎, 松下洋輔, 片桐豊雅, 今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜局在分子OASISによる核膜ストレス応答を介した細胞増殖と癌化制御
3. 学会等名 第15回小胞体ストレス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yasunao Kamikawa, Atsushi Saito, Kazunori Imaizumi
2. 発表標題 Molecular mechanism of nuclear envelope stress response mediated by ER-resident transcription factor OASIS in astrocytes.
3. 学会等名 NEURO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Atsushi Saito, Yasunao Kamikawa, Kazunori Imaizumi
2. 発表標題 p53-independent regulation of astrocyte proliferation mediated by ER-resident transcription factor OASIS activated by DNA damage.
3. 学会等名 NEURO2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤敦, 山下真弘, 今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜局在転写因子BBF2H7による褐色脂肪細胞の機能制御
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上川泰直, 齋藤敦, 松久幸司, 今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜貫通型転写因子OASISによる核膜ストレス応答機構解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上川泰直, 齋藤敦, 今泉和則
2. 発表標題 アストロサイトにおける核膜ストレスの分子機構
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Saito, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Toyomasa Katagiri, Kazunori Imaizumi
2. 発表標題 Regulations of cellular senescence in glioblastoma mediated by ER-resident transcription factor OASIS.
3. 学会等名 第64回日本神経化学学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤敦
2. 発表標題 小胞体膜貫通型転写因子OASISを介した核膜ストレス応答シグナルによる細胞老化と癌化制御
3. 学会等名 第126回 日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤敦
2. 発表標題 小胞体局在転写因子OASISによる細胞老化と癌化制御
3. 学会等名 第4回 徳島大学統合的がん創薬研究クラスター合同ミーティング（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤敦
2. 発表標題 小胞体膜局在転写因子OASISによる核膜ストレス応答を介した細胞老化と癌化制御
3. 学会等名 オルガネラ疾患研究拠点第1回ミーティング
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松久幸司、齋藤敦、今泉和則
2. 発表標題 希少疾患原因遺伝子産物のERAD回避による機能回復と疾患治療薬の探索
3. 学会等名 オルガネラ疾患研究拠点第1回ミーティング
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今泉和則、齋藤敦、上川泰直、松久幸司、金子雅幸
2. 発表標題 核膜ストレスと細胞老化、癌化の制御
3. 学会等名 2020年度 新学術領域「オルガネラゾーン」Zoom班会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上川泰直、齋藤敦、松久幸司、金子雅幸、今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜貫通型転写因子OASISによる核膜ストレス応答機構解明
3. 学会等名 新学術領域研究 第3回オルガネラ・ゾーン若手の会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤敦、今泉和則
2. 発表標題 小胞体膜貫通型転写因子OASISによる細胞老化と癌化制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上川泰直、松久幸司、齋藤敦、今泉和則
2. 発表標題 核膜ストレスに应答して活性化する小胞体膜貫通型転写因子OASISの機能解明
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Atsushi Saito, Sachiko Fujiwara, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Toyomasa Katagiri, Kazunori Imaizumi
2. 発表標題 Regulations of senescence in glioblastoma and tumorigenesis mediated by ER-resident transcription factor OASIS
3. 学会等名 第63回日本神経化学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 OASIS遺伝子の脱メチル化のための核酸及びそれを用いた脱メチル化方法	発明者 今泉和則、齋藤敦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-097184	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------