

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08668

研究課題名(和文) 肺がんにおける癌関連遺伝子MYNNとp53の相互制御機構の解明

研究課題名(英文) Cross-regulatory mechanisms of cancer-associated genes MYNN and p53 in lung cancer.

研究代表者

伊藤 佐智夫 (Ito, Sachio)

岡山大学・医歯薬学域・助教

研究者番号：30335624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は本研究でMYNNの癌に関わる機能解析を行った。MYNN過剰発現により細胞の増殖能と浸潤能が亢進、MYNNとp53が直接結合しており相互制御に関与していることがわかった。MYNNの発現抑制はp53活性化に伴い発現誘導されるmicroRNAによる転写後抑制であることが明らかとなった。さらに抗体を用いたクロマチン免疫沈降-PCRでMYNNがいくつかのp53標的遺伝子の調節領域に結合することを発見した。MYNN過剰発現細胞株とコントロール細胞株のRNA-SEQ解析では、MYNNが抑制する11種類のがん抑制遺伝子を同定し、その遺伝子の中にはp53の標的遺伝子でも確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Myoneurin (MYNN)は、BTB/POZタンパク質ファミリーに属し、肺癌において高頻度に遺伝子増幅がみられる。MYNNがコードされる染色体3q26領域は多くの癌でも増幅が確認され、Cancer driver geneとして機能しているのではないかと考えた。これまでの申請者の研究により、MYNNが強力な転写抑制能、腫瘍形成能、がん抑制遺伝子p53との結合能を有することから、MYNNの機能解析は発癌を理解する上で大変重要である。本研究においてMYNNはp53とその標的遺伝子およびその他多数のがん抑制遺伝子の発現を抑制することにより肺癌の発症と悪性度の獲得に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we analysed the cancer-related functions of MYNNs: MYNN overexpression enhanced cell proliferation and invasiveness, and direct binding between MYNNs and p53 was found to be involved in mutual regulation; repression of MYNN expression was found to be post-transcriptional repression by microRNAs, whose expression is induced upon p53 activation. The results of this study showed that the repression of MYNN is a post-transcriptional repression by microRNAs induced by p53 activation. Furthermore, antibody-based chromatin immunoprecipitation-PCR revealed that MYNN binds to the regulatory regions of several p53 target genes; RNA-SEQ analysis of MYNN-overexpressing and control cell lines identified 11 cancer-suppressor genes that are suppressed by MYNN, some of which were also identified in p53 target genes. 53 target genes were also identified.

研究分野：分子生物学

キーワード：MYNN Myoneurin p53 lung cancer

1. 研究開始当初の背景

MYNN が属する BTB/POZ-ZF ファミリーは、細胞の分裂、老化、アポトーシスを含む多くの細胞のイベントに関与することで、発生や癌において重要な働きを担っている転写関連因子である。TCGA データベースにより肺癌、卵巣癌、食道癌、乳癌、頭頸部癌において MYNN 遺伝子の増幅、MYNN mRNA のアップレギュレーションが報告されている。

我々は、1999 年に OsteoSarcoma Zinc Finger (OSZF) として MYNN を同定し、その後も機能解析を行ってきた。MYNN は BCL6 や PLZF に代表される BTB/POZ ドメインを N 末側に有しており、HDAC1 をリクルートすることで強力な転写抑制能を示した。また MYNN を過剰発現させたマウス NIH3T3 細胞は足場非依存的増殖を獲得し、マウスに移植すると腫瘍を形成すること確認された。

前回の科研費『癌遺伝子候補 MYNN と p53 の統合的解析と肺癌発症メカニズムの解明』(16K10460)で我々は、マウス尾静脈接種実験を行い、MYNN 過剰発現細胞では肺への癌細胞の浸潤および定着が亢進すること、MYNN 発現抑制細胞では浸潤および定着が抑制されることを発見した。また MYNN と p53 が直接結合していること、DNA 損傷刺激による p53 の活性化で MYNN タンパク質量が減少すること、MYNN 過剰発現で p53 および p21 が減少すること、MYNN 抗体を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) で MYNN がいくつかの p53 標的遺伝子の調節領域に結合することを発見した。

我々のこれまでの MYNN の機能解析データと TCGA データから、肺癌での MYNN のアップレギュレーションは、MYNN と p53 間の複雑な分子メカニズムの存在を示しており、細胞レベルを基盤とした MYNN と p53 の統合的機能解析を行うことで肺癌発症メカニズムの解明に繋がると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

この MYNN と p53 の相互調節機構に着目して、以下の項目を実験目標に設定した。

- (1) p53 による MYNN の発現調節もしくはタンパク質分解機構の検討
- (2) MYNN による p53 の発現調節もしくはタンパク質分解機構の検討
- (3) MYNN 単独および p53 との共通標的遺伝子の同定と機能解析
- (4) 肺癌発症における MYNN の役割の解釈

3. 研究の方法

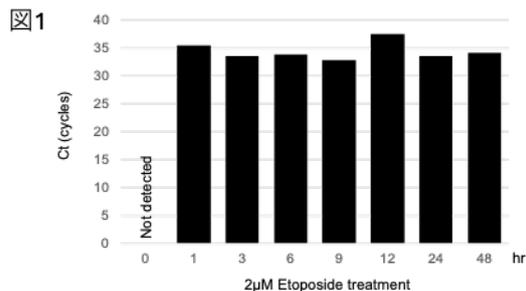
上記の研究項目を遂行するために次に示す方法を行った。(1) p53 活性化に伴い発現誘導される microRNA (miRNA) が報告されており、これら miRNA の標的配列を MYNN mRNA-3' UTR 上で確認している。p53 活性化後、miRNA の発現亢進を TaqMan miRNA アッセイで、MYNN タンパク質発現低下をウェスタンブロット法で検証する。miRNA 発現ベクターと MYNN-3' UTR の標的配列 (wt/mut) をもつルシフェラーゼレポータープラスミドをそれぞれ構築してルシフェラーゼ活性を計測した。(2) MYNN が属する BTB/POZ タンパク質は、HDAC1 をリクルートする転写抑制因子としての機能が知られている。我々は、MYNN 抗体を用いて ChIP-Seq により p53 の調節領域・遺伝子領域より MYNN のコンセンサス配列の同定を試みた。(3) Tet 誘導型 MYNN 高発現細胞株 A549 および H460 を用いて RNA-seq 解析およびクラスター解析を行った。

4. 研究成果

- (1) p53 による MYNN の発現調節もしくはタンパク質分解機構の検討

野生型 p53 をもつ A549 および H460 細胞を用いてルシフェラーゼアッセイと GFP アッセイを行った。A549 細胞を最終濃度が 2 $\mu$ M になるよう etoposide を細胞培養液に加え p53 の活性化を行った。時間毎に細胞を回収し全 RNA を抽出した後、TaqMan より miRNA を定量した。Etoposide 処理前では miRNA は検出されなかったが、1 時間後から 48 時間まで miRNA が検出された (図 1)。

次にルシフェラーゼまたは GFP レポーター遺伝子の下流に miRNA の標的配列となる MYNN-3' UTR の 23bp または 60bp を組み込み、レポータープラスミドを構築した。これらレポータープラスミドを A549 もしくは



H460 細胞に遺伝子導入した後、etoposide で p53 を活性化し、GFP は顕微鏡下で、ルシフェラーゼは測定器にて計測した。MYNN-3' UTR の野生型 (wt) 23bp も 60bp も p53 により GFP が減少していることが確認できた。また変異型 (mut) では、miRNA が結合できず GFP を減少させることができないことが分かった (図 2)。同様にルシフェラーゼレポーターアッセイにおいても野生型ではルシフェラーゼ活性の低下が認められるが、変異型では、対照比較の emp と差が見られないことが分かった。また細胞に miRNA 発現ベクターを遺伝子導入すると内因性の MYNN がタンパク質レベルでも減少していた

図 2

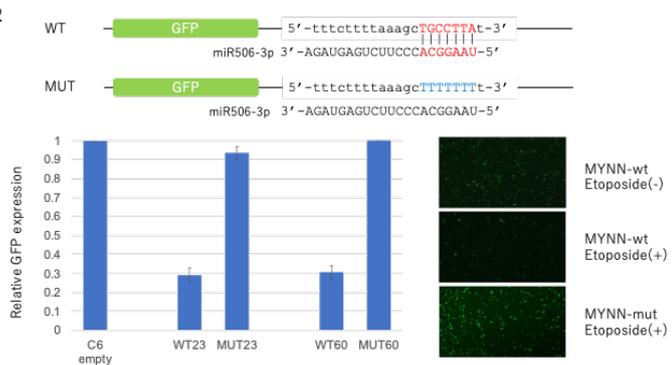
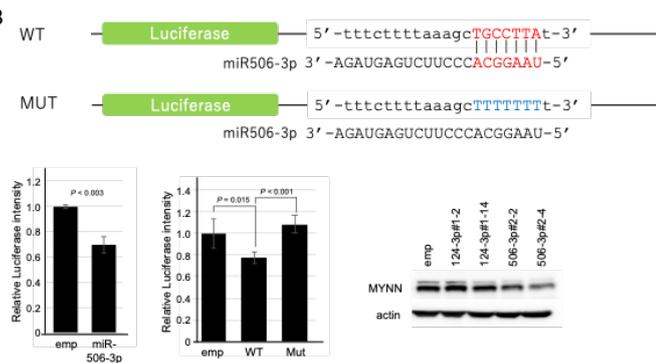


図 3



(図 3)。これらのことから細胞内で p53 が活性化すると miRNA-506-3p が発現誘導され、MYNN が転写後抑制されることが明らかとなった。

(2) MYNN による p53 の発現調節もしくはタンパク質分解機構の検討

転写抑制ドメイン POZ を N 末に持つ MYNN の過剰発現により p53 がタンパク質レベルで減少することから (図 4)、p53 の転写調節領域に MYNN が結合することが考えられた。MYNN は自身の C 末側にジンクフィンガードメインをもっており特定の DNA 配列を認識して結合すると考えられるため、MYNN 抗体を用いた ChIP-Seq により DNA のコンセンサス配列の決定を試みたが、コンセンサス配列を同定するに至らなかった。しかし MYNN は p53 標的遺伝子上の p53-RE (レスポンスエレメント) に p53 と競合的に結合することが分かった。

図 4

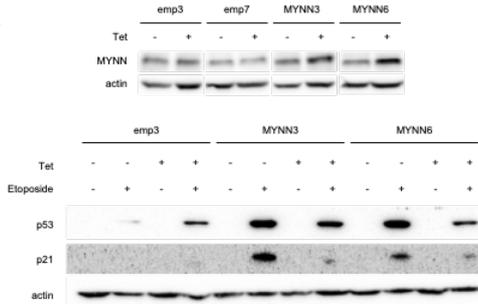
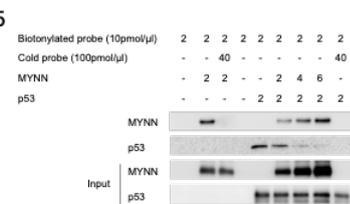


図 5



(3) MYNN 単独および p53 との共通標的遺伝子の同定と機能解析

Tet 誘導型 MYNN 高発現細胞株 A549 および H460 を用いて RNA-seq 解析の結果、対照と比較して 11 種類のがん抑制遺伝子を同定することができた。その遺伝子群のなかには p53 の標的遺伝子も存在していた。また細胞膜や代謝系に参与する多くの遺伝子群も同定されたことから、これらの遺伝子を含めた研究を進める必要がある。

本研究では、MYNN と p53 の相互制御機構がどのように肺がん発症に関与するのかを解明するため、両者の制御機構を調べた。P53 は自身が活性化することで下流の標的遺伝子である miR-506-3p の発現を促し、MYNN の 3' UTR を標的とし転写後抑制に関与していることを発見した。また過剰発現することで MYNN は p53 活性化状態であっても p53 や p21、その他のがん抑制遺伝子を抑制した。これらのことから MYNN と p53 の発現バランスは細胞を通常維持するために必要で、MYNN が過剰発現し、発現バランスが崩れることで p53 の機能を阻害し、その結果、細胞が癌化する機能を獲得する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究分担者	堺 明子  (Sakai Akiko)  (60205698)	岡山大学・医歯薬学域・助教   (15301)	
研究分担者	大内田 守  (Ouchida Mamoru)  (80213635)	岡山大学・医歯薬学域・准教授   (15301)	

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