

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22501012

研究課題名（和文） 新規テロメラーゼ活性抑制遺伝子の機能解析による発がん機構の解明

研究課題名（英文） Mechanical analysis for carcinogenesis by functional studies of a novel telomerase repressor gene

研究代表者

久郷 裕之(KUGOH HIROYUKI)

鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40225131

研究成果の概要（和文）：

本研究では、新規 *TERT*(telomerase reverse transcriptase)抑制遺伝子である *PITXI* (paired-like homeodomain1)の機能解析を行った。1) 質量分析解析によって、*PITXI*に直接結合する新規の遺伝子として *DDX5* (DEAD-box helicase)を同定した。2) *PITXI*の発現消失がメラノーマの悪性度と相関を示すことを明らかにし、メラノーマにおける悪性度を決定する診断マーカーとしての応用の可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

To clear the molecular pathways associated with the telomerase suppressor role of *PITXI* in cancers, we carried out LC/MS proteomics analysis and identified *DDX5* as a counter part of *PITXI*. Furthermore, we found that *PITXI* might serve as a novel biomarker for malignant melanomas (CMM).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん制御遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

テロメラーゼは、がんに無限の増殖性すなわち不死化形質を与える酵素であり、*TERT*はテロメラーゼの酵素活性中心として働き、その機能の中心を担っている遺伝子である。正常体細胞は、増殖に伴い染色体末端のテロメアが短縮し、最終的に細胞老化が誘導される。一方、がん細胞ではテロメアを合成伸張のはたらきをもつテロメラーゼの活性化により、分裂停止を回避し無限の増殖を可能に

している。ヒトの正常体細胞においては、ほとんどテロメラーゼ活性が認められないが、がん細胞では80-90%ときわめて高い頻度で活性が確認されている。したがって、テロメラーゼ抑制機構を理解することは、発がん機構の解明およびがんの無限増殖性を選択的に阻害する治療薬の開発に直接繋がるとして注目されてきた。

正常ヒト体細胞あるいはES細胞が分化過程でテロメラーゼ活性を失うことから正

常な細胞中にテロメラーゼの発現を抑える内在性因子の存在が予測されていたものの従来法ではその同定は困難であり、長らく実体は不明であった。我々は、染色体工学の手法を用い、*PITX1* がその本体であること、皮膚がんであるメラノーマ細胞(悪性黒色腫)では *PITX1* が消失するためテロメラーゼが発現することを突きとめ、*PITX1* を新規のがん抑制遺伝子として報告してきた(図1、2)。

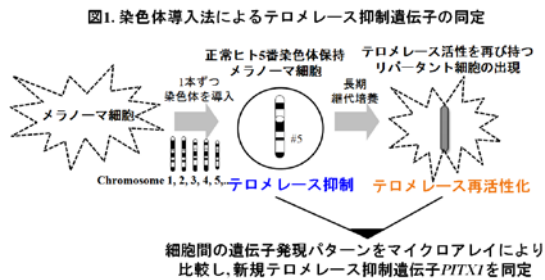
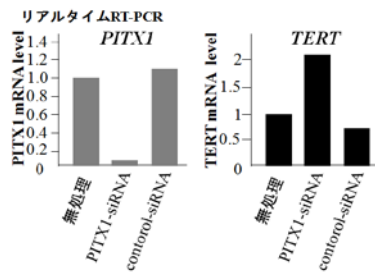


図2. *TERT* の発現を抑制する遺伝子として *PITX1* を同定



5番染色体導入ヒトメラノーマ細胞株に対し、siRNAで *PITX1* をノックダウンすると *TERT* の発現上昇が認められた。

テロメラーゼは受精卵から発生初期の組織でも発現しているが、ある時期から体細胞のテロメラーゼ発現は抑えられ、有限分裂寿命になることが知られている。ES 細胞や iPS 細胞においても同様に、未分化状態が維持されている段階ではテロメラーゼ活性をもつが分化とともに活性は抑制される。このような正常細胞におけるテロメラーゼ抑制機構は、発がんやテロメラーゼ活性の関連を探る上で重要な現象であると考えられるが、これまでがん細胞をターゲットとしたテロメラーゼの研究から同定されたテロメラーゼ制御遺伝子に対して、正常細胞での役割について直接言及した報告は少なく、正常細胞での生理的なテロメラーゼ抑制機構についてその存在が確認されているものの、多くは未知なまま残されている。

*PITX1* は胚発生の途中の段階から発現が上昇してくることが確認されており、テロメラーゼの発現動態と逆相関の関係にあることが示唆されている。さらに、成熟した多くの組織細胞において、*PITX1* の発現が維持されていることから、*PITX1* が分化と共に抑制されるテロメラーゼ抑制機構において主要

な因子として機能している可能性が高いと考えられる。しかし、*PITX1* のテロメラーゼ抑制機構の分子メカニズムについては未知な部分が多く残されており、その詳細な機能解析は生体が本来もつ生理的なテロメラーゼ抑制機構の解明において重要な研究課題であると考えられた。

## 2. 研究の目的

これまでに我々は、染色体導入法を基盤とした細胞工学的なアプローチからヒト5番染色体上に存在する新規の *hTERT* 抑制遺伝子として *PITX1* を同定してきた。

本研究では、*PITX1* を足がかりとしてテロメラーゼ制御因子を整理し、その階層構造の理解を通して、生体が本来持つテロメラーゼ抑制機構の解明を目指すものであり、これは発がんや幹細胞の研究に直結し、さらには細胞寿命の制御機構や、幹細胞操作技術(iPS 細胞の癌化抑制)の開発にも繋がる研究になると考えられた。

## 3. 研究の方法

[全体の流れ]

*PITX1* の発現動態に着目し、これまで蓄積した知見と資料を用い、*PITX1* の細胞内局在解析、および *PITX1* と相互作用する関連分子の同定、また臨床検体における病理学的アプローチを通して、*PITX1* を軸としたテロメラーゼ抑制機構の詳細についての解析を行った。

### (1) *PITX1* の発現動態解析

正常細胞(NTI-4, MRV-5)およびメラノーマ細胞(HMV-1)と子宮頸部がん細胞(HeLa)を用いて、*PITX1* 抗体による免疫蛍光染色法に加え、生細胞における *PITX1* の発現動態を観察するために *PITX1* 遺伝子と GFP の融合タンパク質を産生するベクターを構築、目的の細胞へトランスフェクションにより導入し、GFP による蛍光を観察することによって培養細胞内における *PITX1* の発現動態について解析を行った。

### (2) *PITX1* のカウンターパートの網羅的探索

DNA 転写制御を行うタンパク質は単独で機能するわけではなく、他のタンパク質との相互作用によって複合体を形成して機能していることから、機能単位としてはたらく *PITX1* タンパク質複合体を決定することは、*PITX1* の制御機構を明らかにする上で重要な分子情報を得ることができると考えられる。

そこで、FLAG タグを付加した *PITX1* 安定

発現する HeLa 細胞を構築、FLAG 抗体によるプルダウンによって *PITX1* を回収し、質量分析計 LC-MS/MS 解析によって *PITX1* に結合しているタンパク群をペプチドの検索とアミノ酸列決定、得られた結果をもとにそれらの分子を明らかにし、*PITX1* と共に *TERT* 発現制御に関与する新規の遺伝子の同定とその機能解析を行った。

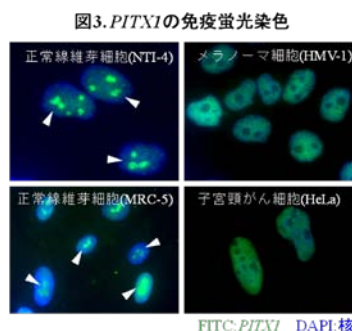
### (3) *PITX1* 発現動態における病理学的検討

ヒトメラノーマにおける *PITX1* 発現と臨床病理学的因子との関連性を検討するために、ヒト正常皮膚標本 3 例およびヒトメラノーマ組織標本 40 例を用いて解析を行った。正常皮膚組織においては、メラノーマの発生源となるメラノサイトにおける *PITX1* 発現を、他方腫瘍組織における発現はメラノーマ細胞に焦点を当て、免疫組織化学的に *PITX1* タンパクを検出した。また、腫瘍部における増殖活性と *PITX1* の発現動態を解析するためにメラノーマ 26 例を対象とし、腫瘍細胞 500 個以上における Ki-67 labeling index (KI, %) を算出した。

## 4. 研究成果

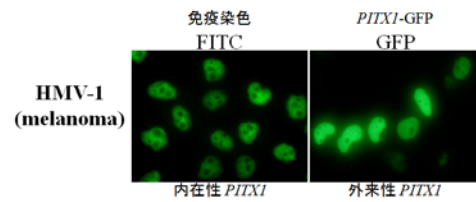
### (1) *PITX1* の発現動態解析

*PITX1* 抗体を用いた免疫蛍光染色法によって、正常ヒト線維芽細胞 NTL-4 および MRC-5 の *PITX1* の局在を確認したところ、興味あることにどちらの細胞においても核内の特定領域への *PITX1* の集積が観察された。一方、テロメラーゼ活性が認められる子宮頸部癌細胞である HeLa 細胞や希に *PITX1* の発現が認められた(メラノーマ細胞株の多くは *PITX1* の発現は消失していた)ヒトメラノーマ細胞 HMV-I では、そのシグナルは核内で散在し特定領域への局在は確認されなかった(図 3)。



加えて、*PITX1*-GFP 融合タンパクを発現させた培養下におけるメラノーマ細胞においても免疫染色と同様に、*PITX1* の核内の特定領域への集積は認められなかった(図 4)。

図4. 免疫染色と *PITX1*-GFP との局在比較

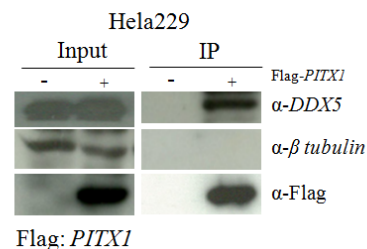


これらのことから、*PITX1* は核小体などの核内に存在する特定器官ではたらいっている可能性が強く示唆され、その局在の破綻がテロメラーゼの再活性化に寄与している可能性を明らかにした。

### (2) *PITX1* のカウンターパートの網羅的探索

*PITX1* に結合する新規の遺伝子群を LC/MS 解析を用いた網羅的探索手法によって同定する実験を行った。FLAG-*PITX1* を発現する HeLa 細胞から *PITX1* タンパクを細胞溶解液から Flag 抗体アガロースにより回収し、樹立し、FLAG 抗体によるプルダウンにより回収し、トリプシン消化後のペプチドサンプルを質量分析計 LC-MS/MS 解析によって解析を行った。その結果、*PITX1* と結合する新たな遺伝子として *DDX5* を同定した(図 5)。

図5. *PITX1* と複合体を形成する新規遺伝子 *DDX5* の同定



次に我々は、*DDX5* のテロメラーゼ制御への関与をより直接的に解析するために、siRNA を用いた *DDX5* の発現抑制実験を行った。細胞には、*DDX5* を発現する HeLa および同じ子宮頸部がんの細胞株である SiHa 細胞を用い、siRNA をリポフェクションにより導入後 48hr および 72hr 後の細胞の RNA をサンプリングし、逆転写酵素によって cDNA を合成後、定量的 RT-PCR 法によって *hTERT* 発現量の測定を行った。その結果、72hr 後では HeLa 細胞ではおよそ 2 倍(図 6)、SiHa 細胞では 3.75 倍の *hTERT* の発現上昇が認められた(図 7)。

これらの結果は、*PITX1* は *DDX5* と機能的な複合体を形成して、テロメラーゼの発現を負に制御していることを示すものであり、さらに *DDX5* はテロメラーゼ抑制遺伝子とし

図6. DDX5 knock down 細胞におけるhTERTの発現変化

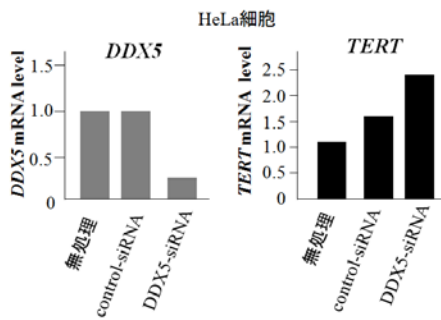
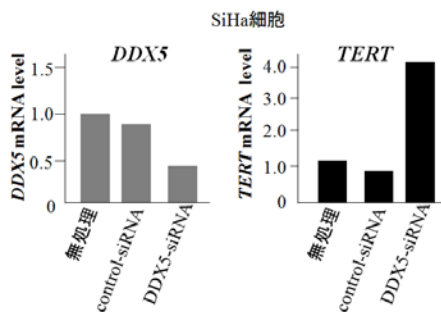


図7. DDX5 knock down 細胞におけるhTERTの発現変化



てこれまで報告のある *p53* や *CTCF*, *HDAC1* などの分子と関連する因子であることから、*PITX1-DDX5* 複合体を介した新たなテロメラーゼ制御機構の分子ネットワークの存在が示唆された。

(3) *PITX1* 発現動態における病理学的検討

メラノーマ症例における *PITX1* 陽性例は 21 例 (52.5%)、陰性例は 19 例 (47.5%) であった。両群間において年齢、性別および組織型に差はなかった。他方、腫瘍の厚みは、陽性例が  $1.90 \pm 7.11\text{mm}$ 、陰性例が  $3.19 \pm 10.3\text{mm}$  であり陰性例で有意に高値を示した ( $P=0.001$ ) (図 8)。また、転移の有無を比較検討したところ、*PITX1* 陽性例では 21 例中 1 例 (4.76%) のみであったのに対し、陰性例では 19 例中 7 例 (36.8%) と陰性例において有意に転移陽性例が多かった ( $P=0.012$ ) (図 8)。

図8. ヒトメラノーマ原発巣における*PITX1*発現と臨床病理学的因子との関係 (メラノーマ切除標本40例)

	陽性例 (21例)	陰性例 (20例)	統計学的有意差
年齢	$69.2 \pm 15.6$	$74.8 \pm 15.2$	有意差なし**
性別	男9:女12	男8:女11	有意差なし***
厚み*	$1.90 \pm 3.19\text{mm}$	$7.11 \pm 10.3\text{mm}$	$P=0.001$ ***
転移例数	1例 (4.76%)	7例 (36.8%)	$P=0.012$ ***

\*メラノーマin situは、0mmとした。

\*\*Student's t-test, \*\*\*Mann-Whitney's U test

*PITX1* 陽性例と比較し、陰性例において厚みおよび転移例数が有意に高値を示した。

さらに、ステージ 0-II 群 (n=30) と III-IV 群 (n=10) に分類したところ、前者における *PITX1* 陽性例は 19 例 (63.3%)、後者では 2 例 (20.0%) と病期の進行に伴って *PITX1* 陽性例が有意に減少した ( $P=0.019$ ) (図 9)。

図9. 臨床病期と*PITX1*発現との関係 (メラノーマ切除標本40例)

	0~I群 (16例)	II~IV群 (24例)	P値
陽性	14例 (87.5%)	6例 (25.0%)	$P=0.0001$
陰性	2例 (12.5%)	18例 (75.0%)	

	0~II群 (30例)	III & IV群 (10例)	P値
陽性	19例 (63.3%)	2例 (20.0%)	$P=0.019$
陰性	11例 (36.7%)	8例 (80.0%)	

Mann-Whitney's U test

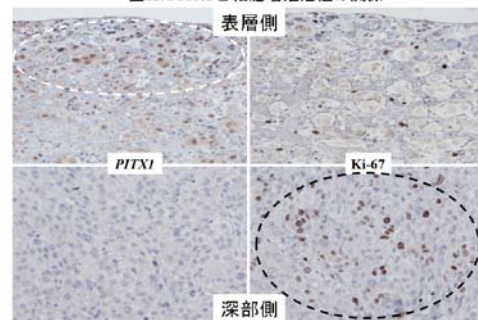
メラノーマ細胞における*PITX1*発現は、病期の進行に伴って低下していることが示唆された。

*PITX1* 陽性例において *PITX1* 陽性領域と陰性領域における KI 値を算出したところ、陽性領域は  $12.5 \pm 1.54$ 、陰性領域は  $29.8 \pm 4.38$  であり *PITX1* 陰性領域において有意に増殖能が高かった (図 10、11)。

図10. *PITX1*発現領域と細胞増殖活性との関係 (メラノーマ切除標本26例)

<i>PITX1</i> 発現	KI (mean±S.E)	P値
陽性例 (8例)		
陽性領域	$12.5 \pm 1.54$	$P=0.018$
陰性領域	$29.8 \pm 4.38$	
陰性例 (18例)	$21.7 \pm 4.80$	N.S.

図11. *PITX1*と細胞増殖活性の関係



*PITX1*陽性領域と比較し陰性領域では、高いメラノーマ細胞の増殖活性を示した。

これらのことより、*PITX1* は細胞増殖を負に制御する因子で、特にメラノーマ細胞においてがん抑制遺伝子として機能していること、さらにその発現低下がメラノーマの悪性度のマーカーになる可能性が示唆された。

我々は独自の染色体工学を応用したアプローチからポジショナルクローニングに

より、内在性制御の真のテロメラーゼ抑制遺伝子として *PITX1* を同定した。この遺伝子は、テロメラーゼ活性制御を通じて幹細胞分化および発がん機構に関与していることが予想されるが、その機能はほとんど知られていない。したがって、本研究の *PITX1* の詳細な解析結果は、発がんのみならず幹細胞の研究に直結し、さらには細胞寿命の制御機構や幹細胞操作技術 (iPS 細胞の癌化抑制) の開発にも展開できると期待される。

#### 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 6 件)

1. Osaki M, Chinen H, Yoshida Y, Ohhira T, Sunamura N, Yamamoto O, Ito H, Oshimura M, Kugoh H. Decreased PITX1 gene expression in human cutaneous malignant melanoma and its clinicopathological significance *European Journal of Dermatology*, in press 査読(有),
2. Li J, Koike J, Kugoh H, Arita M, Ohhira T, Kikuchi Y, Funahashi K, Takamatsu K, Boland CR, Koi M, Hemmi H. Down-regulation of *MutS* homolog 3 by hypoxia in human colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta -Molecular Cell Research*, 査読(有), 1823(4), 889-899, 2012 doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.017.
3. Nawata H, Genro Kashino G, Tano K, Daino K, Shimada Y, H Kugoh H, Oshimura M, Watanabe M. Dysregulation of Gene Expression in the Artificial Human Trisomy Cells of Chromosome 8 Associated with Transformed Cell Phenotypes. *PLoS ONE*, 査読(有), 6(9), e25319, 2011 doi: 10.1371/journal.pone.0025319.
4. Qi DL, Ohhira T, Fujisaki C, Inoue T, Ohta T, Osaki M, Ohshiro E, Seko T, Aoki S, Oshimura M & Kugoh H. Identification of *PITX1* as a *TERT* suppressor gene located on human chromosome 5. *Mol. Cell Biol.*, 31(8), 査読(有), 1624-1636, 2011 doi: 10.1128/ MCB.00470-10.
5. Qi DL, Ohhira T, Oshimura M, Kugoh H. Human chromosome 5 carries a transcriptional regulator of human telomerase reverse transcriptase (hTERT). *Biochem Biophys Res Commun*. 査読(有), 398(4): 695-701, 2010 doi: 10.1016/j.bbrc.2010.07.003.
6. Abe S., Tanaka H., Notsu T., Horike S., Fujisaki C., Qi DL., Ohhira T., Gilley D., Oshimura M., Kugoh H. Localization of an hTERT repressor region on human chromosome 3p21.3 using chromosome engineering. *Genome Integrity*, 査読(有), 1(1): 6, 2010 doi: 10.1186/2041-9414-1-6.

[学会発表] (計 17 件)

1. 吉川なつこ, 末松知久, 大平崇人, 押村光雄, 久郷裕之, 井上敏昭 hTERT発現を抑制するPitx1から解き明かすhTERT発現制御ネットワーク 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 福岡国際会議場・マリニンメッセ福岡 平成24年(2012)12月11-14日
2. 砂村直洋, 中山祐二, 荻野由加利, 難波栄二, 押村光雄, 久郷裕之 染色体免疫沈降法 (ChrIP) を用いた疾患関連リピート配列に結合する因子の探索 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 福岡国際会議場・マリニンメッセ福岡, 平成24年(2012)12月11-14日
3. 大平崇人, 尾崎充彦, 砂村直洋, 吉田雄一, 山元 修, 押村光雄, 久郷裕之 新規テロメラーゼ抑制遺伝子PITX1は悪性黒色腫の増殖を抑制する 第35回日本分子生物学会年会, 福岡, 福岡国際会議場・マリニンメッセ福岡, 平成24年(2012)12月11-14日
4. 久郷裕之, 大平崇人, 砂村直洋, 井藤久雄, 押村光雄, 尾崎充彦: PITX1発現低下は、ヒトメラノーマの進展に関与する第71回日本癌学会学術総会, 札幌, ホテルロイトン札幌, さっぽろ芸文館, 札幌市教育文化会館, 平成24年(2012)9月19-21日
5. 逸見 仁道, 有田 通恒, 小池 淳一, 菊池由宣, 船橋 公彦, 大平 崇人, 久郷 裕之, 近藤 元就: 低酸素によるhMSH3の発現抑制と大腸がんにおけるゲノム不安定性 第71回日本癌学会学術総会, 札幌, ホテルロイトン札幌, さっぽろ芸文館, 札幌市教育文化会館, 平成24年(2012)9月19-21日
6. H. Kugoh: Characterization of a novel telomerase associated protein using microcell-mediated chromosome transfer. Interdisciplinary approaches for the study of senescence (UK/Japan Collaborative Symposium in association with The Japan Society for the Promotion of Science),

Cambridge, UK, Cancer Research UK, Cambridge Research Institute, Feb. 9, 2012

7. 知念日菓利, 尾崎充彦, 大平崇人, 砂村直洋, 吉田雄一, 山元修, 押村光雄, 久郷裕之:PITX1 遺伝子は悪性黒色腫において腫瘍抑制遺伝子として働く「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」「個別レベルでのがん研究支援活動」班 ワークショップ滋賀県大津市「琵琶湖ホテル」,平成 24 年(2012)1 月 18 日-1 月 19 日
8. M. Oshimura, Y. Kazuki, M. Hiratsuka, T. Ohbayashi, Y. Iida, N. Uno, E. Ueno, K. Ueda, T. Ohhira, H. Kurosaki, S. Abe, H. Kugoh. Human artificial chromosomes for gene delivery and stable expression. PepTalk, Coronado, CA, USA, HotelDel Coronado, January 9-13, 2012
9. 瀬古朋美, 山口繁幸, 吉村祐貴, 中山祐二, 加藤基伸, 大林徹也, 押村光雄, 久郷裕之: 特定染色体領域に集積する機能分子複合体の解析第 56 回日本人類遺伝学会, 幕張, 幕張メッセ, 平成 23 年(2011)11 月 9-12 日
10. 久郷裕之, Dong-Lai Qi, 大平崇人, 太田力, 井上敏昭, 押村光雄: 染色体導入による新規テロメラーゼ抑制遺伝子の同定 第 56 回日本人類遺伝学会, 幕張, 幕張メッセ, 平成 23 年(2011)11 月 09-12 日
11. 大平崇人, 阿部智志, 押村光雄, 久郷裕之: 染色体改変技術を応用したテロメラーゼ抑制遺伝子領域 3p21.3 の同定 第 70 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 名古屋国際会議場, 平成 23 年(2011)10 月 3-5 日
12. 大平崇人, Dong-Lai Qi, 藤崎央子, 井上敏昭, 太田力, 尾崎充彦, 大城恵理子, 瀬古朋美, 青木伸介, 押村光雄, 久郷裕之: 染色体導入による新規テロメラーゼ抑制遺伝子の同定 がん若手研究者ワークショップ長野 アートランドホテル蓼科, 平成 23 年(2011)8 月 31 日-9 月 3 日
13. Dong-Lai Qi, 大平崇人, 太田力, 井上敏昭, 尾崎充彦, 押村光雄, 久郷裕之: **PITX1** は **TERT** 遺伝子の抑制調節因子の一つである. 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 平成 22 年(2010)12 月 7-10 日
14. 大平崇人, 阿部智志, 田中宏美, 野津智美, 堀家慎一, 藤崎央子, Dong-Lai Qi, 押村光雄, 久郷裕之: 染色体改変技術を用いたヒト 3p21.3 領域内の **TERT** 抑制遺伝子の同定,

第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 平成 22 年(2010)12 月 7-10 日

15. 久郷裕之, Dong-Lai Qi, 大平崇人, 太田力, 井上敏昭, 押村光雄: ヒト 5 番染色体上に存在する新規テロメラーゼ抑制遺伝子の同定. 第 69 回日本癌学会学術総会, 大阪, 平成 22 年(2010)9 月 22-24 日
16. 大平崇人, 阿部智志, 田中宏美, 野津智美, 堀家慎一, 藤崎央子, Qi Dong-Lai, David Gilley, 押村光雄, 久郷裕之 Localization of an hTERT repressor region on human chromosome 3p21.3 using chromosome engineering がん若手研究者ワークショップ長野 アートランドホテル蓼科平成 22 年(2010)9 月 3 日

[その他]

ホームページ等

文部科学省科学研究費新学術領域研究がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動のホームページで一般用に研究内容が紹介された 2012 年 11 月 19 日 <http://ganshien.umin.jp/public/research/spotlight/kugou/index.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者 久郷 裕之 (KUGOH HIROYUKI)  
鳥取大学・大学院医学系研究科・准教授  
研究者番号: 40225131

(2) 研究分担者  
( )  
研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )  
研究者番号:

(4) 研究協力者  
井上 敏昭 (INOUE TOSHIKI)  
鳥取大学・医学部・准教授  
研究者番号: 80305573

大平 嵩人 (OHHIRA TAKAHITO)  
鳥取大学・大学院医学系研究科

砂村 直洋 (SUNAMURA NAOHIRO)  
鳥取大学・大学院医学系研究科