

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 5月31日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570137

研究課題名（和文） 肝細胞増殖因子による癌遺伝子 ID1 の発現抑制と癌細胞の不可逆的増殖停止誘導の関係

研究課題名（英文） Relationship between inhibition of ID1 expression and induction of irreversible suppression of cell proliferation in HepG2 hepatoma cells treated with HGF

研究代表者

田中 利明 (TANAKA TOSHIAKI)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：40263446

研究成果の概要（和文）：

癌遺伝子 ID1 は、ヒト肝癌細胞株 HepG2 において肝細胞増殖因子 HGF により発現量が減少する。本成果により、ユビキチン転移酵素 E3 の構成因子 Skp2 の HGF による発現減少が、ID1 量を制御することを見出した。一方、Skp2 による ID1 量の制御はユビキチン化とは関係がなく、Skp2 による転写因子 Myc の活性化により転写レベルで制御されていた。また、HGF 刺激により HepG2 細胞は不可逆的増殖停止に至るが、この時に発現遺伝子群が大きく変化すること、ヒストン H3K9me3 の核内局在部位が変わること、その制御に H3K9 メチル化酵素 G9a が係ること、HGF により G9a が増加することを見出し、Skp2/Myc/ID1 が癌細胞の不可逆的増殖停止に係る可能性を得た。

研究成果の概要（英文）：

HGF treatment of HepG2 hepatoma cells decreases expression of an oncogene ID1. This study showed that the decrease in ID1 is regulated through downregulation of Skp2, a component of E3 ubiquitin ligase, in the presence of HGF. However, Skp2 was involved in the regulation of ID1 expression by regulating transcription activity of Myc independently of ubiquitination. This study also showed that G9a histone methyltransferase, which expression may be regulated through Skp2/Myc/ID1, is involved in the alteration of H3K9me3 localization in cell nuclei induced by HGF, leading to the irreversible suppression of cancer cell proliferation by HGF.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			0
年度			0
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：ホルモンと生理活性物質

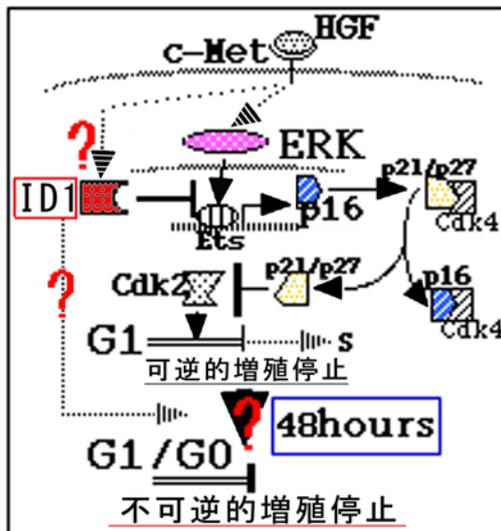
1. 研究開始当初の背景

肝細胞増殖因子(HGF)は、正常な肝細胞や表

皮細胞、および一部の癌細胞株の増殖を促進する一方で、他多数の癌細胞株の増殖を抑制

する。HGF のシグナルは、膜貫通型チロシンリン酸化酵素である受容体 c-Met を通して細胞内に伝わる為、この相反する作用は HGF の細胞内シグナルの違いに由来すると考えられるが、その違いの原因は明らかになっていない。一方、ヒト乳頭状腎癌や幼児性肝臓癌等の癌が c-Met 細胞内部位の変異で発生することから、c-Met による細胞増殖制御の分子機構解明が必要となっている。また、HGF の癌細胞増殖抑制作用による癌の抑圧法が探られているが、HGF の持つ細胞増殖促進作用が大きな障害となっている為、HGF による細胞増殖制御の分子機構解明が急がれている。

本研究は、ヒト肝癌細胞株 HepG2 における HGF による細胞増殖抑制作用に着目し、特に癌抑制遺伝子と細胞周期制御の視点から細胞内シグナル解析に取り組んだ結果、これまでに以下の発見に至った(下図参照)。



①HGF による ERK の強活性化(参考文献(1), (2))が癌抑制遺伝子(G1 期制御因子)p16INK4a の発現量を急増させる(ERK-p16 経路;参考文献(3))、②HGF 刺激により他の癌抑制遺伝子 p21CIP1 の発現が一過的に増えると共に(参考文献(4))、p16 が p21CIP1/p27KIP1 の分子間局在変化を誘導する、③その結果、細胞周期を進める因子 Cdk2 の活性が抑制され細胞周期を G1 期に停止させる。これらにより、HGF の細胞増殖抑制作用における ERK-p16 経路の重要性を明らかにした。さらに、H19-20 年の基盤研究により ERK-p16 経路の制御機構解析を進めた結果、①HepG2 細胞では、癌遺伝子である転写制御因子 ID1 が高発現していること、②HGF により ID1 の発現が急速に減少すること、③ID1

の発現制御は転写レベルあること、④この ID1 減少は p16 の発現上昇を制御して HGF の細胞増殖抑制作用の鍵となっていること、を明らかにし(参考文献(5))、ERK-p16 経路の重要な制御因子として ID1 を見出すに至った。

ID1 は、細胞分化を阻害し増殖を進める因子として見出されたが、その発現は細胞老化制御にも係わり、また各種ヒト癌で過剰発現していることから、分化・老化制御遺伝子および癌遺伝子として注目されている。近年、ID1 の重要性から機能解析が進む一方、発現制御に関する解析は遅れており情報は僅かである。また ID1 量の減少が、p16 の発現上昇を誘導し一過的な増殖停止に至ることは参考文献(5)において認めているが、どの様にして分化、老化に見られる不可逆的増殖停止に至るかは不明である。

2. 研究の目的

本研究では、HGF による癌細胞増殖抑制に直接関わる ID1 発現抑制の分子機構を明らかにする。また、HGF による HepG2 細胞の増殖停止が、HGF 刺激時間依存的に不可逆的となる(HGF により増殖抑制された細胞が、刺激48時間以上でHGF非存在下でも増殖しなくなる(上図))という重要な発見をもとに、分化・老化に係わる因子 ID1 と、この HGF による不可逆的細胞増殖停止をつなぐ。これらを総合することで、HGF による ID1 の発現抑制の研究を、新たに見出した HGF による癌細胞の不可逆的細胞増殖停止誘導の研究へと発展させる。また、無限増殖という癌細胞の基本性質を不可逆的に喪失させる分子機構に係わる本研究の結果を生体癌に適用するため、マウス個体による解析を進める。

<参考文献>

- (1) A. Kondo, N. Hirayama, Y. Sugito, M. Shono, **T. Tanaka** and N. Kitamura. *J. Biol. Chem.* 283, 1428-1436, 2008.
- (2) M. Maemura, A. Yoshimoto, Y. Tsukada, Y. Morishita, K. Miyazawa, **T. Tanaka** and N. Kitamura. *Cancer Science* 97, 1343-1350, 2006.
- (3) J. Han, Y. Tsukada, E. Hara, N. Kitamura and ***T. Tanaka**. *J. Biol. Chem.* 280, 31548-31556, 2005. * :Corresponding Author.
- (4) E. Shirako, N. Hirayama, Y. Tsukada, ***T. Tanaka** and N. Kitamura. *J. Cell. Biochem.* 104, 176-188, 2008. * :Corresponding

Author.

(5) K.Ushio, T.Hashimoto, N.Kitamura and ***T. Tanaka**. *Mol. Cancer Res.* 7, 1179-1188, 2009. *:Corresponding Author.

3. 研究の方法

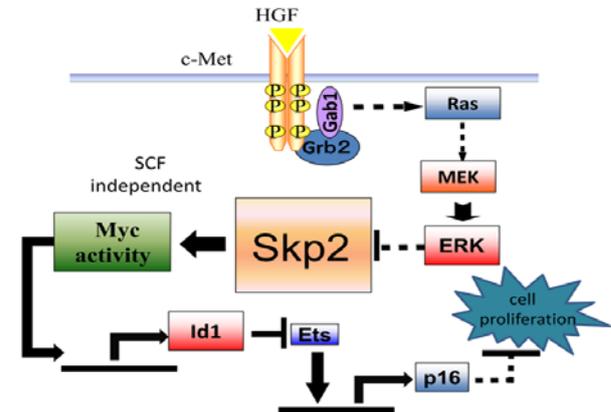
まず ID1 遺伝子のプロモーター解析により、HGF による発現抑制を担う転写因子を探った。また、HGF から ID1 の発現抑制に至る経路を知るために、HepG2 細胞を HGF 刺激した際に減少することを見出していたユビキチン転移酵素 E3 の構成因子 Skp2 の機能を調べた。ID1 減少による一過的な細胞増殖停止が不可逆的増殖停止に至る機構の解析については、不可逆的増殖停止の原因を、細胞老化など各種不可逆的細胞変化の分子マーカーから調べた。また、近年、情報蓄積が目覚ましいエピジェネティクスの観点から、不可逆的増殖停止した際のゲノム構造(ヒストンメチル化)変化を蛍光抗体法により調べ、その変化を担う酵素を探った。さらに、癌細胞の不可逆的増殖停止誘導に係わる本研究の結果を生体癌に反映させるため、マウス個体に形成させた癌に対する HGF の効果を調べた。加えて、これら各種の HepG2 細胞における発現遺伝子の違いをマイクロアレイにより調べた。

4. 研究成果

(1) HepG2 細胞における HGF による ID1 の発現抑制機構を知るため、ID1 の発現制御が転写レベルである結果から、転写開始点上流 1.38Kbp までの領域の転写活性をレポーターアッセイで調べた。その結果、この領域では HGF により発現が抑制されず、むしろ HGF で一過的に活性化されることが分かった。この 1.38Kbp の領域には、乳癌細胞で ID1 の発現抑制を担う領域が含まれていたことから、HepG2 細胞における ID1 発現の制御は、乳癌細胞の制御とは異なることが示された。次に、この 1.38Kbp に ID1 遺伝子の 5' 非翻訳領域を付加したところ、活性が 1/10 以下に抑制された。この 5' 非翻訳領域には転写因子 Myc 結合部位である E-box 様配列が存在したことから、ID1 の発現抑制に Myc など E-box タンパク質が係わることが示唆された。一方で、この 5' 非翻訳領域による転写抑制は HGF の有無で変化しなかったことから、HGF 応答性の制御部位が他に存在すると考えられた。

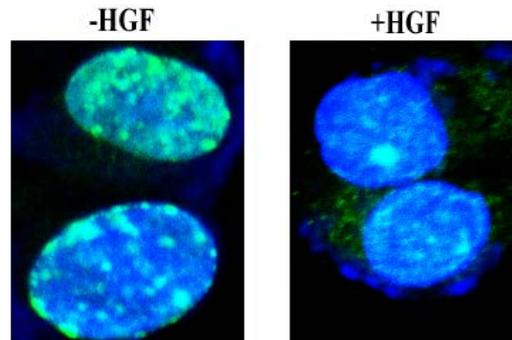
(2) HGF から ID1 発現抑制に至る制御経路を

知るため、HepG2 細胞において HGF 刺激で減少するユビキチン転移酵素 E3 の構成因子 Skp2 の役割を調べたところ、ユビキチン化と



は別に、Skp2 が転写因子 Myc の活性を上昇させ、これによって ID1 の発現が正に制御されていることを見出した。

(3) HGF による HepG2 細胞の不可逆的増殖停止時におけるエピゲノムを調べた結果、ゲノムからの転写不活性化に係わるヒストン H3K9me3 の核内局在が大きく変化することを見出した。



Nuclear staining with anti-H3K9me3 antibody

(4) H3K9 メチル化酵素 G9a のタンパク質量が ERK 活性依存的に HGF 刺激後 48 時間から増加していた。そこで、G9a 特異的阻害剤 BIX01294 により阻害実験を行ったところ、HepG2 細胞の増殖を抑制する p16 の発現上昇が HGF 刺激 48 時間以後において抑制されると共に、HGF による細胞周期停止(細胞増殖停止)の解除が認められた。また、BIX01294 により、HGF による H3K9me3 の局在に変化に変化がみられた。これらのことから、不可逆的増殖停止に至る HGF 刺激 48 時間以後の細胞変化に G9a が係わることが明らかとなった。

(5) HGF による不可逆的増殖停止誘導時の HepG2 細胞の状態を探るため、各種不可逆的細胞変化のマーカーとなる遺伝子の発現を RT-PCR により調べたところ、HGF により肝細胞

胞癌マーカーである AFP には変化がみられないものの、癌抑制因子とされる Klf4、および細胞老化マーカーである p16Ink4a と p14Arf の発現が上昇していた。これらのことから、HepG2 細胞は、HGF 存在下でも癌形質を有するものの、Klf4 によって癌形質が抑えられると共に、HGF により急速に老化が進行し不可逆的増殖停止に至る可能性が考えられた。その一方で、HGF により、肝分化状態の維持に係わる HNF4a が減少し、細胞の未分化状態に係わる SOX2 が上昇していた。これらは、HGF により HepG2 細胞が未分化状態に向かうことを示しており、老化が進行する上述の考えとは符合しない。これらのことから、遺伝子マーカー変化だけでは細胞状態の統一的な見解には至らなかった。

(6) HGF の増殖抑制作用を癌の治療に応用する可能性を探るため、HepG2 細胞によって重度免疫不全マウスに形成させた癌に対し HGF 投与を行った。形成された癌に対しコラーゲンマトリゲル除放剤 (製品名 MedGel) により HGF を投与したが、癌の増殖抑制は見られなかった。この時のマウス血中の HGF 濃度から、除放剤からの HGF 放出不良が原因であると考えられたため、癌への HGF 直接投与に変更したところ、Skp2 の発現量の減少が認められた。このことから個体の癌に対しても HGF が増殖抑制する可能性が得られた。

(7) 増殖状態が異なる HepG2 細胞間 (増殖中、HGF による一過的増殖停止中、不可逆的増殖停止誘導後、およびマウスに形成させた癌) における発現遺伝子を、遺伝子発現マイクロアレイによって比較した結果、増殖中と一過的増殖停止の細胞間では発現遺伝子は近いが、それらと不可逆的増殖停止した細胞間では大きく異なっていることが分かった。今後の詳細な解析により癌細胞が不可逆的増殖停止に至る分子機構の解明が期待できる。一方で、マウスに形成させた癌では、その他の細胞状態とは異なる遺伝子が発現していたことから、個体の癌に対する HGF の効果については慎重に検討する必要がある。

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) S. Nejigane, S. Takahashi, Y. Haramoto,

T. Michiue and M. Asashima.

“Hippo signaling components, Mst1 and Mst2, act as a switch between self-renewal and differentiation in *Xenopus* hematopoietic and endothelial progenitors.” **International Journal of Developmental Biology** in press. 査読あり

(2) T. Fujino, A. Takeuchi, A. Maruko-Ohtake, Y. Ohtake, J. Satoh, T. Kobayashi, T. Tanaka, H. Ito, R. Sakamaki, R. Kashimura, K. Ando, T. Nishimaki-Mogami, Y. Ohkubo, N. Kitamura, R. Sato, K. Kikugawa, and M. Hayakawa.

“Critical role of farnesoid X receptor (FXR) for hepatocellular carcinoma cell Proliferation.” **Journal of Biochemistry** 152, 577-586, 2012 査読あり

(3) M. Hara, Y. Abe, T. Tanaka, T. Yamamoto, E. Okumura and T. Kishimoto. “Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of M-phase promoting factor.” **Nature Communications** 3, 1059, 2012. 査読あり (doi:10.1038/ncomms2062)

(4) D. Susuki, S. Kimura, S. Naganuma, K. Tsuchiyama, T. Tanaka, N. Kitamura, S. Fujieda and H. Itoh. “Regulation of microRNA expression by hepatocyte growth factor in human head and neck squamous cell carcinoma.” **Cancer Science** 102, 2164-2171, Picked Up in “High Light”, 2011. 査読あり

(5) H. Fujie, T. Tanaka, M. Tagawa, N. Kaijun, M. Watanabe, T. Suzuki, K. Nakayama and M. Numasaki. “Antitumor activity of type III interferon alone or in combination with type I interferon against human non-small cell lung cancer.” **Cancer Science** 102, 1977-1990, 2011. 査読あり

(6) R. Igarashi, T. Sakai, H. Hara, T. Tenno, T. Tanaka, H. Tochio and M. Shirakawa. “Distance determination in proteins inside *Xenopus laevis* oocytes by double electron-electron resonance experiments.” **Journal of the American Chemical Society** 132, 8228-8229, 2010. 査読あり

[学会発表] (計 24 件)

(1) 田中利明. 「新規 Cdk インヒビター Ink4X によるツメガエル初期発生関連 mRNA の翻訳制御」第 7 回長野ミーティング、2013 年 2 月 27 日、ラフォーレ倶楽部白馬八方 (長野県) .

(2) 田中利明. 「ツメガエル初期発生過程の

中期胞胚遷移におけるサイクリンEのリン酸化—ユビキチン化依存的タンパク質分解による尾部形成の制御」科学研究費補助金新学術領域研究「ユビキチンネオバイオロジー」班会議、2013年1月29日、淡路夢舞台国際会議場（兵庫県）。

(3) T. Kwon, **S. Takahashi**, **T. Tanaka**, H. Noguchi, A. Toyoda, A. Fujiyama, Y. Suzuki, N. Ueno, M. Taira, J. B. Wallingford, E. M. Marcotte. “What we can do with over 300 billion bases of RNA-seq data: The case of *Xenopus laevis* genome project” International Symposium on Genome Science, 2013年1月9日, The University of Tokyo.

(4) 仁禮綾香、駒田雅之、喜多村直実、**田中利明**。「新規 Cdk inhibitor Ink4X のツメガエル初期発生過程における役割と細胞質における局在の解析」第35回日本分子生物学会年会、2012年12月13日、於：福岡国際会議場、マリンメッセ福岡（福岡県）。

(5) 辺穎、瀧澤有里、李曉然、駒田雅之、喜多村直実、**田中利明**。「肝細胞増殖因子HGFによる肝癌細胞株HepG2の不可逆的な増殖停止誘導におけるヒストンH3K9のメチル化局在変化の解析」第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日、於：福岡国際会議場、マリンメッセ福岡（福岡県）。

(6) Y. Kikuchi, H. Suzuki, M. Sato, **S. Takahashi**, K. Yoshimoto. “3-D construction of adipose derived stem cells cultured on a microfabricated surface: effects on stemness and differentiation.” 日本生物工学会、2012.10.23-26、神戸国際会議場（兵庫県）。

(7) **S. Takahashi**, A. Toyoda, Y. Kuroki, Y. Uno, Y. Izutsu, A. Suzuki, T. Michiue, H. Ogino, H. Ochi, **T. Tanaka**, A. Fukui, Y. Ito, N. Ueno, M. Asashima, Y. Matsuda, M. Taira, A. Fujiyama. “Analysis of the *Xenopus laevis* J-strain genome by BAC end sequencing, FISH, and RNA-sequence.” The 14th International *Xenopus* Conference, 2012年9月10日、於：Giens Peninsula, France.

(8) Y. Haramoto, **S. Takahashi**, Y. Onuma, Y. Ito, M. Asashima. “Functional analyses of a novel insulin like factor that are required for neural development.” The 14th International *Xenopus* Conference, 2012.9.9-13, Giens Peninsula, France.

(9) S. Nejigane, **S. Takahashi**, Y. Haramoto, T. Michiue, M. Asashima. “Hippo signal components, Mst1 and Mst2 are involved in

primitive hematopoiesis, myelopoiesis and vascular formation in *Xenopus tropicalis* blood island.” The 14th International *Xenopus* Conference, 2012.9.9-13, Giens Peninsula, France.

(10) Y. Satou, T. Shibano, H. Mamada, **S. Takahashi**, M. Asashima, M. Taira. “Roles of C2H2-type zinc finger proteins, Zbtb11 and Znf668, in Otx2 functions in early *Xenopus* eye development.” The 14th International *Xenopus* Conference, 2012.9.9-13, Giens Peninsula, France.

(11) Y. Yasuoka, Y. Suzuki, **S. Takahashi**, N. Sudou, Y. Haramoto, K. W. Cho, M. Asashima, S. Sugano, M. Taira. “Head specification mediated by Otx2 partner with Lim1 or Gsc and control expression of thousands of target genes in a massively parallel fashion.” The 14th International *Xenopus* Conference, 2012.9.9-13, Giens Peninsula, France.

(12) **田中利明**「ヒト由来不死化遺伝子導入による金魚うろこ形成細胞の株化について」第25回魚コラーゲン研究会、2012年7月17日、於：北海道大学（北海道）。

(13) 瀧澤友里、辺穎、小山遼、楊宇、駒田雅之、福光寛、中尾祥絵、皆川香織、山岡華児、住吉秀明、稲垣豊、喜多村直実、**田中利明**。「Hepatocyte growth factor (HGF)による細胞増殖制御機構の解明」第19回肝細胞研究会、2012年6月29日、札幌医科大学（北海道）。

(14) T. Michiue, R. Terada, H. Ninomiya, **S. Takahashi**, K. Ohnuma, M. Kusuda-Furue, A. Miyajima, M. Asashima. “Induction of pancreatic cells from human iPS cells in a serum-free monolayer condition.” 2012 ISSCR 10th Annual Meeting, 2012.6.13-16, Pacifico Yokohama (Kanagawa).

(15) Y. Yasuoka, Y. Suzuki, **S. Takahashi**, N. Sudou, Y. Haramoto, Y. Tandou, K. Kubokawa, K. W. Cho, M. Asashima, S. Sugano, M. Taira. “Massively parallel regulation of head and non-head genes by Otx2, Lim1 and Gsc underlies the evolution of the head organizer in the chordate.” 第45回日本発生物学会大会、2012年5月28日～31日、神戸国際会議場（兵庫県）。

(16) Y. Satou, T. Shibano, **S. Takahashi**, M. Asashima, M. Taira. “Roles of C2H2-type zinc finger proteins, Zbtb11 and Znf668,

in Otx2 functions in early *Xenopus* eye development.” 第45回日本発生生物学学会大会. 2012年5月28日~31日、神戸国際会議場(兵庫県).

(17) 瀧澤有里、辺頴、小山遼、楊宇、駒田雅之、福光寛、中尾祥絵、皆川香織、稲垣豊、喜多村直実、田中利明. 「肝細胞増殖因子HGFが有する肝癌細胞増殖抑制作用の解析」第25回肝臓洞壁細胞研究会学術集会、2011年12月18日、東京ガーデンパレス(東京都).

(18) 仁禮綾香、田中利明. 「ツメガエル初期発生過程における新規Cdkインヒビターの解析」第5回*Xenopus* Community in Japan首都圏支部会研究集会、2011年12月17日、(独)産業技術総合研究所・臨海副都心センター別館(東京都).

(19) M. Hara, Y. Abe, T. Tanaka, E. Okumura, T. Kishimoto. “Greatwall kinase and cyclin B-Cdk1 are both critical constituents of MPF.” 第34回日本分子生物学学会年会 ワークショップ、2011年12月16日、パシフィコ横浜(神奈川県).

(20) 瀧澤有里、福光寛、辺頴、小山遼、楊宇、駒田雅之、稲垣豊、喜多村直実、田中利明. 「肝細胞増殖因子HGFによる細胞内シグナルの連続した活性化は肝癌細胞株HepG2の不可逆的な増殖停止を誘導する」第34回日本分子生物学学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜(神奈川県).

(21) X. Li, M. Komada, N. Kitamura, T. Tanaka. ” Involvement of ERK-dependent SKP2 down-regulation in HGF-induced inhibition of HepG2 hepatoma cell proliferation.” 第34回日本分子生物学学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜(神奈川県).

(22) 仁禮綾香、戸井田英俊、駒田雅之、喜多村直実、田中利明. 「新規CdkインヒビターInk4Xのツメガエル初期胚頭部形成における役割」第34回日本分子生物学学会年会、2011年12月13日、パシフィコ横浜(神奈川県).

(23) M. Hara, Y. Abe, T. Tanaka, T. Kishimoto. “Greatwall kinase is an essential component of MPF” The 2011 ASCB Annual Meeting (The American Society for Cell Biology) Mini-symposium, 2011年12月5日, Denver, CO, USA.

(24) 仁禮綾香、戸井田英俊、喜多村直実、田中利明. 「ツメガエル初期発生過程における新規CdkインヒビターInk4Xの形態形成への係わりの解析」第33回日本分子生物学学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、2010

年12月10日、神戸ポートアイランド(兵庫県).

〔図書〕(計 1 件)

高橋秀治(分担執筆) 「東大オープンキャンパス発 生命科学の未解決問題、第7章 進化とゲノム」石浦章一 監修、p118-127、2012、西村書店.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hyoka.koho.titech.ac.jp/eprd/recently/research/research.php?id=300>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 利明 (TANAKA TOSHIAKI)
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教
研究者番号：40263446

(2) 研究分担者

高橋 秀治 (TAKAHASHI SHUJI)
東京大学・教養学部・特任准教授
研究者番号：90447318

(3) 連携研究者

なし