

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 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 年～2011 年

課題番号：22790327

研究課題名（和文） 接着喪失による p21^{Cip1} 転写活性化機構とがん転移抑制への応用研究課題名（英文） A molecular scaffold HIC-5- and KLF4-dependent mechanism transactivates p21^{Cip1} in response to loss of anchorage.

研究代表者

森 一憲 (Mori Kazunori)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60349040

研究成果の概要（和文）：本課題では、細胞を浮遊状態におくと、細胞周期阻害因子 p21^{Cip1} が転写レベルで誘導されるメカニズムの解明、およびこの接着応答性を利用して、転移過程（特に体循環中）にあるがん細胞に選択的細胞死を誘導する手段の開発を試みた。p21^{Cip1} プロモーター上に存在する接着喪失に応答する領域を特定し、当該領域に働きかける転写因子として、KLF4 および Runx1 を同定した。また、KLF4 の DNA への結合に細胞接着斑-核シャトル蛋白質 Hic-5 が関与していることを明らかにした（Runx1 は別蛋白質による制御）。KLF4 のリクルートには、Hic-5 の核マトリックスへの結合が重要であった。さらに、がん転移抑制への応用を視野に入れるため、がん細胞およびその多くが由来する上皮細胞での脱接着応答性を検討したが、同定した配列は応答しなかった。そこで、上皮細胞、がん細胞で脱接着に応答して発現が変化する遺伝子群を網羅的に検索し、両細胞で発現が変化する 56 遺伝子、上皮細胞のみで変化する 184 遺伝子、がん細胞のみで変化する 258 遺伝子を同定した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we show that HIC-5 is also engaged in transcriptional upregulation of a cyclin-dependent kinase inhibitor (CKI) p21^{Cip1} in non-adherent cells, thereby contributing to the growth arrest. The transactivation of p21^{Cip1} was regulated at the upstream element, designate detachment-responsive element (DRE), consisting of binding sites for the two transcription factors, Kruppel-like KLF4 and runt-related RUNX1; Both sites were necessary but not sufficient alone for the transactivation. HIC-5 was critically involved in the transactivation by facilitating the tethering process of KLF4 onto the DNA sites in association with its increased localization to the nuclear matrix under non-adherent conditions. At the Runx1 site, a LIM-only protein, CRP2, imposed negative regulation under adherent conditions, which was assumingly removed upon loss of anchorage and contributed to the elevated transcriptional activity of DRE collaboratively with the regulation at the KLF4 sites. In conclusion, this study uncovered a novel transcriptional mechanism regulating gene expression in a detachment-dependent manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：足場依存性増殖/非依存性増殖

1. 研究開始当初の背景

がん転移は多くの過程からなる複雑な機序であるが、いずれの段階においても接着状態の劇的な変化が伴い、転移過程のがん細胞は正常な接着状態を喪失しているか、もしくは浮遊状態にあると考えられる。正常細胞の場合、そのような接着喪失下では増殖停止や細胞死を誘導し、浮遊状態での細胞増殖/生存を積極的に阻止する。これは、本来細胞には接着喪失を感知して応答するシステムが備わっているためと考えられる。

申請者は、細胞接着斑-核シャトル蛋白質 Hic-5 について解析を続けている。この蛋白質は細胞接着斑と核との間を行き来しており、接着状態と核機能を共役させるアダプター蛋白質である。最近の研究成果として、Hic-5 は細胞の接着状態の異常、特に接着喪失下で、その局在を核へと変化させ、その核機能が増殖停止と細胞死の誘導に関わっていることを明らかにした。さらに、接着喪失に反応して、細胞周期阻害因子 p21^{cip1} が転写レベルで誘導され、Hic-5 が関与することを見出した。また、p21^{cip1} 遺伝子の転写制御機構について、Hic-5 が関与する可能性を以前に見出している。

Hic-5 による接着応答性 p21^{cip1} 遺伝子転写制御の解明は、これまでの知見をさらに展開させるものであり、また接着応答機構について新たな知見が得られることが期待される。従来の抗がん剤はがん細胞の異常増殖性を標的とした細胞毒性効果に基づいており、正常細胞への副作用は免れない。本課題はがん細胞に特異的な接着環境の異常性に着目し、転移予防/抑制を目指す独創性の高いものであると考える。

2. 研究の目的

転移はがんによる死亡率を左右する主要因であり、その有効な予防/抑制手段の開発は急務である。申請者は、細胞の接着環境の変化に対する応答機構について細胞接着斑-核シャトル蛋白質 Hic-5 を中心に機能解析を続けており、最近、細胞を浮遊状態におくと細胞周期阻害因子 p21^{cip1} が転写レベルで誘導され、そこに Hic-5 が関与することを見出した。本課題では p21^{cip1} プロモーター上流に存在する接着喪失に反応する転写制御機構を明らかにすることを目的とし、最終的にこの応答領域を利用して、転移過程（特に体循環中）にあるがん細胞に選択的細胞死を誘導する手段の開発、すなわちがん転移の予防/抑制を目指す。

3. 研究の方法

(1) 接着喪失による p21^{cip1} 遺伝子転写活性化制御メカニズムの解明

脱接着応答性転写活性化について、関与する転写因子、ならびに Hic-5 や核マトリックスとの関係を明らかにするとともに、接着応答性を担う機序も明らかにすることを目指す。また、細胞内レドックスによる制御の実体も明らかにする。

(1)-① 脱接着応答領域の同定

p21^{cip1} 遺伝子上流に存在する脱接着応答領域を絞込むために、様々な長さのプロモーター領域を組み込んだ deletion reporter を構築し、ルシフェラーゼアッセイを行う。また、絞り込んだ領域が接着喪失に反応する十分な領域であるか検討するために、当該領域をルシフェラーゼに繋いだレポーターを構築し、その脱接着応答性をルシフェラーゼアッセイで検討する。

(1)-② 脱接着応答領域に働きかける転写因子の同定

脱接着応答領域に働きかける転写因子の同定には、まずデータベースを用いて、その領域に含まれる結合予想配列から候補転写因子の候補をリストアップし、それらの発現を確認した後に関与を検討する。検討手段としては、予想結合配列に変異を導入したレポーターの構築し、ルシフェラーゼアッセイを行う。また、RNA 干渉により各因子をノックダウンして検討する。その後、同定した因子の応答配列への結合とその接着依存性について、クロマチン免疫沈降法により検討し、転写因子を同定する。

(1)-③ Hic-5 と脱接着応答性転写因子との関連性の解明

Hic-5 は核マトリックスと結合することから、Hic-5 は核マトリックスでの転写因子や転写共役因子を呼び込み、転写因子複合体の形成を介して p21^{cip1} 転写活性化に働く可能性を考えている。同定した転写因子と Hic-5 との結合、ならびに Hic-5 とラミンとの結合への影響、及びそれら転写因子複合体の核マトリックス成分への局在について調べ、結合がみられたら、さらにその接着依存性を調べる。ここまでで当該エレメント上で形成される転写因子複合体の実態とその接着依存性に関する情報が得られる予定である。

(1)-④ 細胞内レドックスによる制御

レドックスによる制御の関与について、低分子抗酸化剤 N-acetyl-cysteine、および各種 ROS 消去系酵素 (CuZnSOD、MnSOD、catalase、glutathione peroxidase、thioredoxin) の発現系を細胞に導入し、1)-2、-3 で脱接着に応答した結果がレドックス変化により仲介されたものかを検討する。

(2) がん転移抑制手段への応用の可能性について

本課題の応用として、単純ヘルペスウイルス (HSV) 由来チミジンキナーゼとガンシクロビルを利用し、浮遊状態でのみ作動する細胞死誘導系の構築を試みる。すなわち、当該エレメント下流に HSV 由来チミジンキナーゼを組み込み、脱接着に応答して発現させ、ガンシクロビル存在下、細胞死の誘導を試みる。

(2)-① 正常細胞とがん細胞の相違点

正常ヒト乳腺上皮由来細胞を入手し、遺伝子導入により不死化、がん化させた一連の細胞株を樹立した。また、複数の乳がん細胞株を取り揃え、悪性化段階に伴う変化の検討を可能とした。(1)で検討した知見について、上記細胞株を用い、その挙動を比較検討する。細胞のがん化、悪性化に伴って、当該エレメントの脱接着応答性が失われる可能性が予想されるので、その原因を正常細胞との比較から推測し、脱接着応答性の再構築を試みる。

(2)-② 脱接着応答エレメントの最適化

脱接着時に特異的、かつ高い転写活性を得るために、いくつかの工夫が必要になることが予想される。まずは正常細胞を用いて、余分な転写活性の除去やエレメントを重複させるなどの応答性の最適化を行う。もし、当該エレメントの有用性に限界があった場合には、脱接着により誘導される他のエレメント (例えば、Bim、IAP などアポトーシス関連遺伝子) の使用に切り替える。

4. 研究成果

(1) 接着喪失による p21^{cip1} 遺伝子転写活性化制御メカニズムの解明

p21^{cip1} プロモーター上に存在する接着喪失に応答する領域、及び応答性を担う転写因子を同定するため、様々な luciferase reporter を作製し、脱接着応答領域を特定した。また、この領域のみで接着応答性を確認した。さらに、当該領域に働きかける転写因子として、KLF4 および Runx1 を同定した。また、これら転写因子と細胞接着斑 Hic-5 の関連性について、検討したところ、Hic-5 は KLF4 の DNA への結合に関与し、p21^{cip1} 転写制御に関わっていることを明らかにした。また、Hic-5 と KLF4

は直接的な相互作用はなかった。さらに、KLF4 の DNA 上へのリクルートには、Hic-5 の核マトリックスへの結合が重要であった。一方、活性酸素の関与はあるものの、必須ではなかった。これらのことから、Hic-5 は脱接着応答領域での転写複合体形成を促進していると考えられた。また、Runx1 は Hic-5 ではなく、CRP2 による制御下、接着状態での p21^{cip1} 発現を抑制的に制御していた。

(2) 脱接着応答領域を利用したがん転移抑制への応用に向けた検討

本課題では、接着喪失応答性転写活性化機構を利用して、がん転移抑制への応用を視野に入れた検討を行った。がん細胞およびその多くが由来する上皮細胞では、同定した脱接着応答配列は応答せず、細胞種によって HIC-5/KLF4 が標的とする遺伝子が異なることが考えられた。そのため、研究方法にある (2) 代替として、上皮細胞、がん細胞で脱接着に応答して発現が変化する遺伝子群を網羅的に検索し、新規遺伝子を単離することとした。両細胞で共通して発現が変化する 56 遺伝子、上皮細胞のみで変化する 184 遺伝子、がん細胞のみで変化する 258 遺伝子を同定した。これらのうち、アポトーシス関連因子である BIM、BNIP3、Caspase-14 について、その制御が接着喪失による引き起こされる細胞内レドックスの酸化シフト

により誘導されることを明らかにした。なお、これらのうち、Caspase-14 については、樹立した一連の細胞株 (遺伝子導入により不死化、がん化させた細胞株) いずれにおいても接着喪失に応答することを見出し、今後、遺伝子上流プロモーター領域の接着応答性を最適化することで、浮遊状態の細胞を選択的に細胞死に導くために応用できる可能性が示唆された。

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 1 件)

① 柴沼 質子、森 一憲、野瀬 清、A mobile molecular scaffold regulating the anchorage dependence of cell growth. Int J. Cell Biol.、査読有、in press、2011

[学会発表] (計 3 件)

① 森 一憲、石川 文博、柴沼 質子、A suppressive role of a focal adhesion protein, Hic-5, in anchorage-independent cell growth and tumorigenicity., 70th annual meeting of the Japan cancer association、2011 年 10 月 3 日、名古屋国際会議場

② 柴沼 質子、溝手 優子、大島 由起子、

濱中 浩之, 牛田 喬太, 内田 徹, 石川 文博, 森 一憲, 野瀬清、接着環境異常シグナルとしての活性酸素種、及びp21^{Cip1}による足場依存性細胞増殖/生存の制御、日本組織培養学会 第83回大会、2010年5月21日、岡山大学 創立五十周年記念館ホール

③ 森 一憲、石川 文博、柴沼 質子、Cell growth/death control by ROS, p21Cip1, and a focal adhesion protein, Hic-5, upon loss of intrinsic anchorage to ECM.、69th Annual meeting of the Japanese cancer association、2010年9月22日、大阪国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www10.showa-u.ac.jp/~cancer/publication.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 一憲 (Mori Kazunori)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号: 60349040

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: