

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590390

研究課題名(和文)細胞接着 核機能共役アダプターHIC-5によるがん細胞の足場非依存性増殖能の抑制

研究課題名(英文)Suppressive role of the adaptor protein Hic-5 in anchorage-independent cell growth

研究代表者

森 一憲 (Kazunori, Mori)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60349040

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者らが同定した細胞接着斑-核シヤトル蛋白質HIC-5が浮遊状態にある細胞特異的にその増殖を停止させる分子機構を明らかにした。接着喪失により、HIC-5はその局在を核マトリックスへと変化させ、転写因子KLF4のDNAへの結合を促すことでp21cip1遺伝子を発現誘導する結果、増殖を停止させていた。また、HIC-5機能とがん細胞の増殖・転移能との関連について検討し、HIC-5ががん転移を抑制する結果を得た。がん細胞ではHIC-5によるp21cip1誘導は起こらなかったが、別途HIC-5はTGFb受容体を介してMMP-9発現を抑制することで、転移を抑制的に制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we addressed HIC-5-dependent growth arrest mechanism under nonadherent conditions. The mechanism transcriptionally induced a CDK inhibitor (CKI), p21Cip1, in response to disruption of cell-ECM interactions. The role of HIC-5 in this mechanism was to tether KLF4, a transcription factor essential for transactivation of p21Cip1, to DNA sites in response to cellular detachment.

We also found that MMP-9 expression was upregulated by depletion of HIC-5 with RNAi, which potentially contributes to HIC-5-mediated regulation of tumor metastasis in vivo. Interestingly, ectopic expression of kinase-inactivated TGF- β type I receptor completely blocked the HIC-5 effect. Neither Smads phosphorylation nor expression of other TGF- β -targeted genes were affected by HIC-5 levels. Collectively, a new TGF- β signaling pathway has emerged contributing to cancer progression through the regulation of MMP-9 expression depending on HIC-5.

研究分野：細胞生物学、分子生物学

キーワード：足場非依存性増殖 がん転移抑制

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は浮遊状態でも生存/増殖する能力を獲得している。この能力(足場非依存性増殖能)は生体内での腫瘍形成の礎となるだけでなく、転移過程(接着喪失や異常接着環境に曝される)でのがん細胞の生存を支えるものである。最近、がん組織の中に、幹細胞様の細胞(がん幹細胞)が存在することが証明された。がん幹細胞は、足場非依存性の自己複製能を最大の特徴とすることから、がん細胞集団が示す足場非依存性増殖能はがん幹細胞によって担われていると考えられる。

一方、正常細胞は、浮遊状態では増殖停止や細胞死を誘導し、その生存/増殖を積極的に阻止する。申請者はこれまでに正常細胞の接着喪失応答機構について検討し、申請者らが同定した細胞接着斑-核シヤトル蛋白質 HIC-5 が浮遊状態にある細胞特異的にその増殖を停止させる機能を持つことを明らかにした。発展として、HIC-5 機能とがん細胞の増殖能との関連について新たに検討し、がん細胞で HIC-5 を過剰発現/ノックダウンしたところ、*in vitro* では足場非依存性増殖能と sphere 形成能(がん幹細胞の自己複製能を反映)、*in vivo* では造腫瘍能と転移能が有意に抑制/増強される結果を得た。

2. 研究の目的

本課題では、これまでに明らかにしてきた HIC-5 の分子機能に基づいて、HIC-5 によるがん細胞の足場非依存性増殖能の抑制的制御機構を解明する。がん細胞の集団の中で、がん幹細胞が標的となって制御されている可能性に注目する。成果として、がん細胞の生体内での造腫瘍能/転移能を根本から抑制可能な分子標的の提案を目指す。

3. 研究の方法

本検討ではヒト乳がん細胞株 MDA-MB-231 を用いた。各遺伝子の発現、および抑制は、レンチウイルス発現系、および shRNA 発現系、または siRNA の導入により行った。生体内での造腫瘍性や転移能、腫瘍形成率の検討では、Luciferase、または EGFP 発現安定発現株(MDA-MB-231)を免疫不全マウスに接種(右第4乳腺、また尾静脈)し、Luciferase による発光、または EGFP を指標に腫瘍を確認、定量した(本学動物実験委員会承認済)。

遺伝子発現解析は、luciferase reporter を用いた転写活性の測定、及び real-time RT-PCR 法により mRNA 量を定量した。蛋白質の検出には Western blotting、Zymography を用いた。

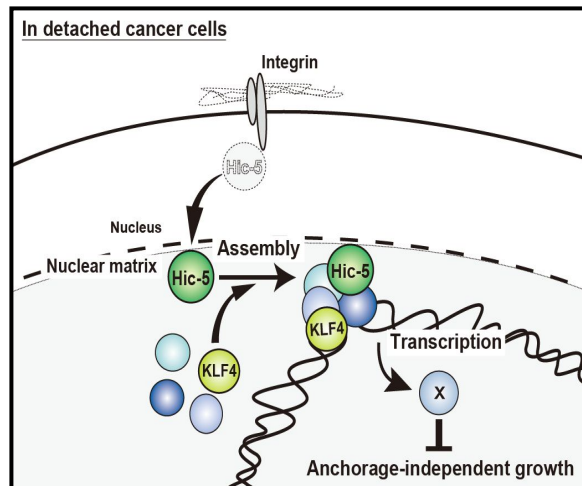
その他、分子・細胞生物学的手法は定法に拠った。

4. 研究成果

(1) HIC-5/KLF4 標的遺伝子の探索

既知の KLF4 標的遺伝子を候補とする検索

これまでの成果のメカニズムを明らかにするため、HIC-5 が関与する KLF4 の転写について、その標的を調べたところ、p21^{cip1} 遺伝子であった。さらに、この p21^{cip1} 遺伝子の転写誘導機構について、詳細な検討を加えた結果、HIC-5 は転写複合体形成のための足場となるためにその局在を核マトリックス画分へと移し、転写因子 KLF4 の DNA への結合を促進させていた。本機構が、接着喪失による増殖停止に寄与することを明らかにした(下図; 雑誌論文 参照)。



未知 KLF4 標的遺伝子 X の探索

さらに本成果を進展させるために、がん細胞を浮遊状態においたが、p21^{cip1} の発現は検出できず、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。そこで、KLF4、HIC-5 の遺伝子操作により発現が変動する遺伝子として、SM22 α を同定した。SM22 α は HIC-5 の knockdown により、その発現は減少し、転写因子 KLF4 の標的となりうる遺伝子である。

(2) HIC-5 機能のがん幹細胞の増殖/生存への影響

HIC-5 の機能として、研究成果(1)で示したように、浮遊状態での増殖制御に関与することから、がん細胞の足場非依存性への影響する可能性がある。また、がん幹細胞は、足場非依存性の自己複製能を最大の特徴とすることから、がん細胞集団が示す足場非依存性増殖能はがん幹細胞によって担われていると考えられる。そこで、shRNA による HIC-5 発現を抑制した乳がん細胞株を免疫不全マウスに移植した。限外希釈により移植細胞数を減らし、その腫瘍形成率を調べたが、HIC-5 の knockdown により、腫瘍形成率に変化はなかった。移植片について、継時的観察したところ、HIC-5 の knockdown により肺転移が有意に増強された。

また、(1) で新たに同定した標的遺伝子、SM22a が関与する可能性を検討した。HIC-5 knockdown により、SM22a 発現は抑制されるため、発現系を導入し、SM22a の発現を回復させた細胞を樹立した。この細胞株を移植したところ、HIC-5 knockdown の影響はより増強し、SM22a 単独でもがん増殖/転移を促進させた。このため、SM22a は造腫瘍能/転移能に影響するが、HIC-5 機能の説明の一助にならないと判断し、SM22a と HIC-5 との関連性に関する検討は中止することとした。

(3) HIC-5 によるがん転移抑制機能の解明

(2)の結果から、HIC-5 はがん転移能を抑制的に制御する可能性が示唆されたため、その制御機構を明らかにすることを試みた。

がん転移には組織浸潤能が必須であることから、浸潤に重要な役割を果たしている MMP 関連の発現を調べた。HIC-5 を knockdown した乳がん細胞株では MMP-9 の発現が特異的に上昇していた。さらに調べると、このがん細胞は、がん悪性化形質に寄与するサイトカイン TGF- β による MMP-9 発現誘導、および足場非依存性増殖能が増強されていた。そこで、TGF- β 受容体のドミナントネガティブ体を発現させたところ、MMP-9 の発現誘導は完全に抑制された。従って、HIC-5 のノックダウンにより、ALK5 を起点とするシグナル伝達が増強されることが考えられたため、TGF- β シグナル伝達分子やその標的遺伝子の関与を調べた。その結果、TGF- β により発現が誘導される NOX4 が HIC-5 knockdown により誘導されることを見出した。さらに、HIC-5 による MMP-9 発現誘導は活性酸素感受性であり、種々の抗酸化剤により抑制されたことから、NOX4 による細胞内活性酸素種の増大が MMP-9 発現誘導に関与する可能性が考えられた。

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)

Mori K, Hamanaka H, Oshima Y, Araki Y, Ishikawa F, Nose K, Shibanuma M., A HIC-5- and KLF4-dependent mechanism transactivates p21(Cip1) in response to anchorage loss. *J Biol Chem.* 査読有、vol. 287, 2012, p.38854-38865, doi: 10.1074/jbc.M112.377721

〔学会発表〕(計 2 件)

森 一憲、石川 文博、柴沼 質子, HIC-5 regulates TGF- β -stimulated MMP-9

expression, anchorage-independent growth, and metastasis of breast cancer cells., 73th annual meeting of the Japan cancer association, 2014 年 9 月 26 日、パシフィコ横浜

森 一憲、石川 文博、柴沼 質子, Adhesion-sensitive transcriptional regulation of p21Cip is dependent on the molecular scaffold HIC-5 and KLF4., 71th annual meeting of the Japan cancer association, 2012 年 9 月 21 日、ホテルロイトン札幌

〔図書〕(計 0 件)
なし

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)
なし

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)
なし

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
昭和大学薬学部生体分子薬学講座腫瘍細胞生物学部門
<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

柴沼 質子 (SHIBANUMA, Motoko)

昭和大学・薬学部・教授

研究者番号：60245876

石川 文博 (ISHIKAWA, Fumihiro)

昭和大学・薬学部・助教

研究者番号：60515667

(3)連携研究者

なし

研究者番号：