

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462906

研究課題名(和文) 上皮ケラチノサイトにおけるクロマチン制御転写因子FoxO1の役割

研究課題名(英文) Functional analysis of the pioneer transcription factor FoxO1 in keratinocytes

研究代表者

八田 光世 (HATTA, MITSUTOKI)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：30344518

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々は上皮ケラチノサイトにおけるクロマチン制御転写因子FoxO1の役割を明らかにするため、テトラサイクリン誘導性FoxO1発現上皮ケラチノサイト(Tet-On Ty1-FoxO1細胞)を作製し、網羅的な遺伝子発現解析によりFoxO1依存的な発現変動遺伝子を同定した。さらに口腔がん細胞を薬剤(3-deazaneplanocin A)処理することにより、FoxO1がタンパクレベルで減少することを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated a tetracycline-inducible FoxO1 expressing keratinocyte cell line (Tet-On Ty1-FoxO1 cells), in order to clarify the functional roles of FoxO1 in keratinocytes. Tet-On Ty1-FoxO1 cells were treated with doxycycline to induce the expression of FoxO1, and then subjected to a global gene expression analysis. We identified FoxO1-regulated genes in keratinocytes, and confirmed the FoxO1 binding to genomic DNA of the target genes. Furthermore, we found that 3-deazaneplanocin A reduced the protein levels of FoxO1 in an oral squamous cell carcinoma cell line.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：FoxO1 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

重層扁平上皮(表皮、口腔粘膜上皮など)は上皮ケラチノサイトにより構築される。基底膜上に位置する基底層の細胞は増殖能を維持しており、恒常的な非対称分裂により自己複製と分化へと進む細胞を供給する。有棘層から顆粒層へと細胞分化が進む過程では、細胞間接着および構造タンパク(ケラチン、フィラグリンなど)合成が活性化することによりバリア機能を発現する。そして最終的に脱核し膜状構造に変化した細胞が重層化した角質層になる。また外傷などで組織損傷が生じたときは、TGF や TNF などのサイトカインシグナルが上皮ケラチノサイトの細胞接着や遊走能など細胞機能を変化させることで治癒(再上皮化)を促すことが知られている。

FoxO1 はフォークヘッド転写因子ファミリーに属する転写因子であり、生体のさまざまな細胞・組織に発現する。細胞の生命活動の基本となる細胞周期およびストレス応答関連遺伝子、さらに組織・臓器レベルにおける組織特異的遺伝子の発現調節において重要な役割を担うことが知られている。我々はこれまで FoxO1 の分子機能に焦点を当てた研究から、FoxO1 が ATP 非依存的なクロマチン構造変換活性を保持していることなどクロマチン環境における遺伝子発現調節に重要な機能を明らかにしてきた。また FoxO1 はインスリンやサイトカインシグナル応答性に分子機能が制御されることから、細胞機能の動的変化に関与することが予測される。FoxO1 によるクロマチン環境制御が上皮ケラチノサイトにおいて遺伝子発現および細胞特性の発揮に関与するのではないかと考え、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、クロマチン制御転写因子 FoxO1 が上皮ケラチノサイトにおける遺伝子発現の調節および細胞機能の発現にどのような役割をしているのか、その分子メカニズムを明らかにする。FoxO1 依存的な遺伝子発現および細胞機能の変化について上皮ケラチノサイト株化細胞を用いて解析をおこなう。

## 3. 研究の方法

### (1) テトラサイクリン誘導性 FoxO1 発現上皮ケラチノサイト(Tet-On Ty1-FoxO1 細胞)の作製

N 末端に Ty1 タグ(アミノ酸配列: EVHTNQDPLD)を付加したマウス FoxO1cDNA を pRet-roX-TetOne-Puro(レトロウイルスベクター)にサブクローニングしてテトラサイク

リン誘導性に FoxO1 を発現する組換えレトロウイルスベクターを構築した。さらにパッケージング細胞を用いて産生した組換えレトロウイルスを上皮ケラチノサイト株 Pam212 細胞に感染させてゲノムにテトラサイクリン誘導性に FoxO1 を発現する遺伝子を組み込ませた。導入した遺伝子にはピューロマイシン耐性遺伝子が含まれているのでピューロマイシン処理による薬剤耐性選択をおこない、遺伝子導入細胞をクローン化した。

### (2) 上皮ケラチノサイトにおける FoxO1 の遺伝子発現の調節および細胞機能の発現に対する役割の検討

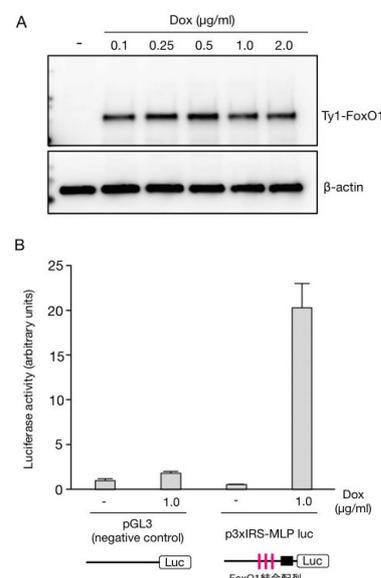
Tet-On Ty1-FoxO1 細胞を用いてドキシサイクリン(テトラサイクリン系薬剤)処理した細胞における遺伝子発現パターンおよび細胞機能について比較・検討をおこなった。また上皮ケラチノサイトに由来する口腔がん細胞(SAS 細胞)を 3-deazaneplanocin A (DZNep)処理し、FoxO1 と悪性形質関連遺伝子の発現変化を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) Tet-On Ty1-FoxO1 細胞の樹立

Tet-On Ty1-FoxO1 細胞においてドキシサイクリン(dox)(最終濃度 0.1 ~2.0 μg/ml)処理により Ty1-FoxO1 が発現誘導されることを抗-Ty1 抗体を使用したウエスタンブロット(図 1A)および免疫染色にて確認した。また FoxO1 結合配列を連結したルシフェラーゼレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイをおこない、Ty1-FoxO1 が転写活性化能を発揮することを確かめた(図 1B)。

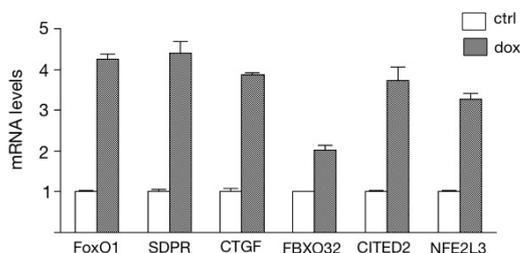
《図 1》



(2) 上皮ケラチノサイトにおける FoxO1 の遺伝子発現の調節および細胞機能の発現に対する役割の検討

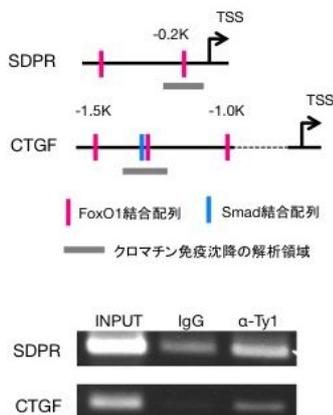
上皮ケラチノサイトにおける FoxO1 依存的な遺伝子発現変化：コントロールと dox 処理した Tet-On Ty1-FoxO1 細胞から total RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析により網羅的に遺伝子発現変化を調べた。発現上昇(2倍以上)および発現低下(50%以下)したものが、それぞれ約 500 スポット検出された。発現上昇する遺伝子群には dox 処理により発現誘導された FoxO1 も含まれていた。さらに SDPR, CTGF, FBXO32, CITED2, NFE2L3 など発現上昇が検出された遺伝子群について qRT-PCR による定量解析をおこない、DNA マイクロアレイの結果を確認した(図2)。

《図2》



FoxO1 結合クロマチン領域の解析：Dox 処理により発現が変化した遺伝子のゲノム DNA 配列について UCSC Genome Browser Gateway および TheJASPAR database を利用して in silico 解析をおこない、FoxO1 結合候補領域を抽出した。さらに CTGF および SDPR については、dox 処理した Tet-On Ty1-FoxO1 細胞を用いたクロマチン免疫沈降により in vivo における FoxO1 のゲノム結合を確認した(図3)。

《図3》



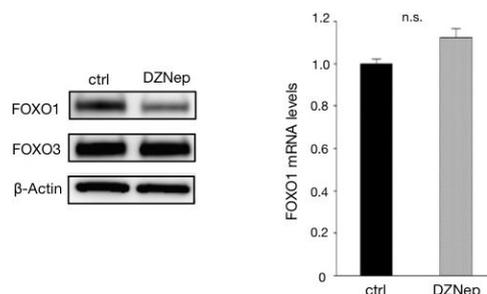
TGF- $\beta$  シグナルとのクロストークについて：ゲノム DNA 配列の解析から TGF- $\beta$  シグナルと協力的に発現調節される可能性のある FoxO1 標的遺伝子を見出すことができた。とくに CTGF 遺伝子は FoxO1 結合配列と TGF-

シグナルにより活性化される転写因子 Smad 結合配列がゲノム上に近接して位置しており、両因子による相互作用が予測された。コントロール、dox 処理、TGF- $\beta$  処理および dox+TGF- $\beta$  処理した Tet-On Ty1-FoxO1 細胞から total RNA を抽出し、qRT-PCR により CTGF mRNA 発現を定量解析した。CTGF mRNA 発現は dox+TGF- $\beta$  処理において相乗的な発現増加が確認された。

FoxO1 発現と細胞機能の変化について：FoxO1 発現が細胞増殖や細胞遊走能に与える影響について、コントロールと dox 処理した Tet-On Ty1-FoxO1 細胞を用いて検討した。細胞増殖については、WST-8 アッセイにて検討したがほとんど差は認められなかった。また細胞遊走能についてスクラッチアッセイをおこなった。しかし、コントロールと dox 処理において差はなかった。

上皮ケラチノサイトに由来する口腔がん細胞における FoxO1 について：これまでに低分化型口腔がん細胞株 SAS に対して 3-deazaneplanocin A (DZNep) を処理すると非角化扁平上皮の分化マーカー keratin 13 の mRNA 発現が回復することが明らかになっている。本研究では SAS 細胞における FoxO1 と悪性形質関連遺伝子の発現に対する DZNep の影響について検討した。SAS 細胞に DZNep を 48 時間処理したところ、FoxO1 の mRNA 発現レベルは変化しないが、タンパクレベルが低下することが明らかになった(図4)。FoxO1 と同じく FoxO 転写因子ファミリーに属する FoxO3 については、DZNep により影響を受けないことがわかった。またヒストン H3K27 メチル化酵素 Ezh2 のタンパクレベル、クロマチンのヒストン H3K27 トリメチル化および H2AK119 モノユビキチン化を低下させることが確認された。さらに DZNep が悪性形質を誘導することが報告されている液性因子 (TGF- $\beta$  1, WNT5B, APLN) や間葉系マーカー (-smooth muscle actin, TWIST2 など) の mRNA 発現レベルを低下させ、上皮マーカー (E-cadherin, Claudin 4 など) を上昇させることが明らかになった。

《図4》



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 2 件)

1. Hatta M, Arita S, Yamazaki J. Mechanistic insight into the aberrant silencing of the keratin 13 gene in oral squamous cell carcinoma cells. J Oral Biosci. 査読有, 58(2), 45-9, 2016 doi: 10.1016/j.job.2016.01.001
2. Hatta M, Naganuma K, Kato K, Yamazaki J. 3-Deazaneplanocin A suppresses aggressive phenotype-related gene expression in an oral squamous cell carcinoma cell line. Biochem Biophys Res Commun. 査読有, 468(1-2), 269-73, 2015 doi: 10.1016/j.bbrc.2015.10.115.

〔学会発表〕(計 1 件)

八田 光世、永沼 香織、有田 晴一、石井 太郎、大久保 つや子、山崎 純  
3-Deazaneplanocin A は口腔がん細胞の遺伝子発現パターンを変化させる 第 57 回  
歯科基礎医学会学術大会、2016 年 9 月  
11-13 日、朱鷺メッセ新潟コンベンション  
センター(新潟県新潟市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

八田 光世(HATTA, Mitsutoki)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・講師  
研究者番号: 30344518

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし