

研究報告書
令和2年度：A課題

令和4年4月14日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田 知光 殿

研究施設 広島大学大学院 医系科学研究科

住所 広島県広島市南区霞 1-2-3

研究者氏名 齋藤 敦

(研究課題)

小胞体膜貫通型転写因子 OASIS を介した p53 非依存的な細胞老化と癌化制御

令和3年1月19日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

[背景および目的]

小胞体膜局在転写因子 OASIS は DNA 損傷に応答して切断を受け、DNA 結合領域を含む N 末端断片が核内に移行して転写因子として機能する。研究代表者は DNA 損傷依存的に活性化した OASIS が細胞周期抑制因子群の発現を誘導し、細胞老化を引き起こすことを見出している。細胞周期の安定的な停止状態である細胞老化は、癌細胞の増殖および腫瘍成長を抑制することが報告されている。また、複数の癌細胞および腫瘍において OASIS プロモーターが高度にメチル化されており、その発現が抑制されていることを発見している。このことから、OASIS の発現低下による細胞老化の抑制が、腫瘍の発達に繋がる可能性が示唆される。本研究では研究代表者が見出した OASIS による細胞老化誘導機構の全貌を解明し、その破綻から細胞・生体の老化制御の異常と癌誘発に至る分子機序の全貌を明らかにすることを目的とする。さらに癌で多く見られる p53 変異型の癌にフォーカスし、エピゲノム編集技術を応用した OASIS プロモーターの人工的な特異的脱メチル化とその発現誘導法による p53 活性非依存的な癌化抑制を試みる。

[方法と結果]

1. 細胞老化における OASIS の役割解明

OASIS はアストロサイトをはじめとする特定の細胞で優勢的に発現していることがわかっている。マウスより採取した初代培養アストロサイトを抗癌剤の一種ドキソルビシンで処理

後 (DNA damage induction)、培養 medium で wash して 24 時間維持してウェスタンブロッティングを行うと、OASIS の全長型および切断された N 末端断片のタンパク量がともに増加した。OASIS 全長型およびその N 末端断片の増加と連動して、癌抑制遺伝子であり、細胞老化のマーカーとしても知られる p21 の発現レベルも上昇した。一方で OASIS 欠損アストロサイトではドキシソルビシンによって誘導される p21 の発現上昇が有意に抑制された。

p21 は p53 によってその発現が誘導されることが知られている。そこで OASIS が誘導する p21 の経路と p53 が誘導する p21 の経路のクロストークが成立するのかが OASIS 欠損細胞および p53 に対する siRNA を用いて調べた。p53 のタンパク量および活性化フォーム (リン酸化 p53) の量は OASIS 野生型および欠損アストロサイトで大きな差がなかった。一方で p53 をノックダウンしてもドキシソルビシン処理による OASIS 全長型および N 末端断片の量は変化しなかった。このことから両経路にクロストークは存在せず、OASIS は p53 非依存的に p21 の発現と細胞老化を誘導できることがわかった。

2. 癌細胞における OASIS プロモーター脱メチル化法の確立

p53 変異型ヒト glioblastoma U251MG 細胞では OASIS の発現レベルが低く、ドキシソルビシン処理を行っても OASIS の発現は誘導されない。DNA メチル化レベルを検出する bisulfite sequencing 解析を実施すると、この細胞では OASIS プロモーターが高度にメチル化されることがわかった。エピゲノム編集技術を駆使し、DNA 切断活性を欠損した変異 Cas9 に脱メチル化酵素 TET1 を連結したタンパクと、OASIS プロモーターを特異的に認識する gRNA を同時に発現する all-in-one コンストラクト (OASIS-gRNA) を作成して U251MG 細胞に導入すると、OASIS プロモーターが特異的に脱メチル化されるとともに OASIS と p21 の発現レベルが誘導された。OASIS-gRNA を導入した細胞では細胞老化が誘導されていることもわかった。

3. 腫瘍組織における OASIS プロモーター脱メチル化法の確立

さらに異種間移植実験によってヌードマウスに移植した U251MG 由来の腫瘍に対し、OASIS-gRNA を in vivo transfection 試薬を用いて投与した。OASIS-gRNA を投与した腫瘍ではその成長が抑制された。OASIS-gRNA を投与した腫瘍から DNA を回収して bisulfite sequencing 解析を行うと、OASIS プロモーター領域が特異的に脱メチル化されていることがわかった。この腫瘍では OASIS 全長型およびその N 末端断片の発現レベルが上昇していることが western blotting によって示された。OASIS-gRNA を投与した腫瘍を用いて組織染色を実施すると、増殖細胞のマーカーである ki67 陽性細胞数の減少と p21 および SA- β -gal 陽性の老化細胞増加も観察された。

以上の研究成果は現在学術論文としてまとめ、投稿する準備を進めている。

[今後の展望]

多くの癌細胞において、癌抑制遺伝子のプロモーター領域は OASIS と同様に高メチル化状態となっており、その発現が抑制されていることが報告されている。本研究において、腫瘍に OASIS-gRNA を投与することで OASIS プロモーターの脱メチル化とその発現上昇を誘導できることを示した。この成果は、腫瘍における特定プロモーター領域の脱メチル化法を確立するための足掛かりとなる。すなわち OASIS と同様にプロモーターが高メチル化状態にある癌抑制遺伝子の特異的脱メチル化とその発現誘導の実現に発展する可能性を秘めており、新たな癌治療法の選択肢となることが期待される。また、[背景および目的]にも記載した通り OASIS プロモーターは U251MG 細胞以外にも乳癌細胞や膀胱癌組織をはじめとする様々な癌細胞および腫瘍組織で高度にメチル化されていることを発見している。OASIS-gRNA は U251MG 細胞と同様にこれら癌細胞の増殖も抑制する可能性があることから、本研究成果が glioblastoma に留まらず様々な腫瘍に対する新規治療戦略の構築へと波及することが大いに期待できる。

[成果発表]

齋藤 敦. 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS による細胞老化と癌化制御. 第4回徳島大学統合的がん創薬研究クラスター合同ミーティング, Web 開催, 3/8, 2021.

齋藤 敦. 小胞体膜貫通型転写因子 OASIS を介した核膜ストレス応答シグナルによる細胞老化と癌化制御. 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会, Web 開催, 3/28-3/30, 2021.

Atsushi Saito, Tetsuro Yoshimaru, Yosuke Matsushita, Toyomasa Katagiri, Kazunori Imaizumi: Regulations of cellular senescence in glioblastoma mediated by ER-resident transcription factor OASIS. 第64回日本神経化学学会大会, web 開催, 9/30, 2021.

[謝辞]

本研究遂行のために多大なるご助力を賜りました公益財団法人がん研究振興財団に深く感謝申し上げます。