

## 研究題目 小胞体膜局在転写因子 OASIS による細胞老化制御を介した抗腫瘍効果の解析

### 研究組織

研究代表者：今泉 和則（広島大学大学院 医系科学研究科 分子細胞情報学）

共同研究者：片桐 豊雅（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：齋藤 敦（広島大学大学院 医系科学研究科 分子細胞情報学）

### 【1】研究の概要

#### [1-1]本研究の目的・概要

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多数報告されている。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。そこで本研究では OASIS の発現レベルが異なる癌細胞株を用いて異種間移植実験を実施し、OASIS の発現が腫瘍成長に与える影響を評価する。さらに OASIS プロモーターが高度にメチル化されている癌細胞株を移植後、当該プロモーター領域の人為的な脱メチル化を誘導することで腫瘍の成長を抑制することを試み、新たな癌治療の基盤構築に繋げることを目指す。

#### [1-2]研究の方法・経過

(1) OASIS プロモーターが高度にメチル化されており、その発現がみられない human glioblastoma U251MG 細胞および U251MG 細胞を親株として樹立した OASIS 全長型ならびに OASIS N 末端断片を安定的に発現する細胞株を用いて異種間移植実験を実施した。OASIS 全長型あるいは N 末端断片の安定発現細胞株を由来とする腫瘍の成長は抑制されており（図 1）、

細胞増殖マーカー ki67 陽性細胞数が有意に減少していた。一方で細胞老化マーカー p21 陽性細胞数は増加していた。senescence-associated- $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -gal) 染色を実施すると、SA- $\beta$ -gal 陽性の老化細胞が多数検出された。

(2) CRISPR-Cas9 システムを応用したエピゲ

ノム編集技術によって特定の DNA 領域を脱メチル化する手法 (Morita et al., *Nat. Biotech.* 2016) を駆使して、U251MG 細胞を由来とする腫瘍における OASIS プロモーターの特異的脱メチル化を試みた。具体的には、DNA 切断活性をもたない変異 Cas9 と脱メチル化酵素 TET1 の酵素活性領域および OASIS プロモーターを特異的に認識するガイド RNA (gRNA) を all-in-one システムで同時に発現するコンストラクト (Oasis-gRNA) を in vivo transfection 試薬を用いて U251MG 由来腫瘍に投与した。現在は予備実験の段階だが、Oasis-gRNA を投与した腫瘍ではその成長が抑制されることを見出した。

### 【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

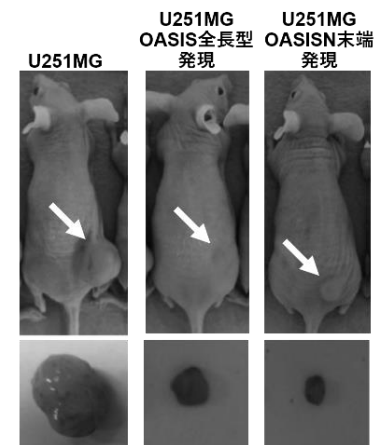


図 1. U251MG 細胞を用いた異種間移植実験。OASIS 全長型 (中) あるいは N 末端断片 (右) 安定発現 U251MG 細胞を移植する (白矢印) と、親株 U251MG 細胞 (左) より腫瘍 (下図) の成長速度が遅い。

OASIS の発現がほとんどみられない U251MG 細胞に OASIS を発現させると、移植した腫瘍において細胞老化が誘導され、その成長が抑制された。このことは OASIS 低発現腫瘍でもその発現を回復させることで、腫瘍の成長を十分に抑制できることを示している。この腫瘍抑制効果は OASIS の N 末端断片のみを発現させた場合も観察されたことから、OASIS の転写因子としての機能のみで腫瘍成長を抑制できることがわかった。また、予備実験で *Oasis-gRNA* を U251MG 由来腫瘍に投与すると、腫瘍の成長が抑制されることを発見した。この成果から、OASIS プロモーター領域の脱メチル化が腫瘍成長抑制の新規治療ターゲットとなり得ることが示唆された。これらの研究成果は現在論文としてまとめ、投稿の準備を進めている。

#### [2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

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。本共同研究において、腫瘍に *Oasis-gRNA* を投与することで U251MG 細胞を由来とする腫瘍の成長を抑制することができた。この成果は、特定 DNA 領域のエピゲノム編集を介した癌治療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、新たな癌治療戦略の選択肢となることが期待される。また、研究の概要に記載した通り 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、本共同研究成果が 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。

### 【3】主な発表論文等

#### [3-1]論文発表

なし

#### [3-2]学会発表

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.

#### [3-3]成果資料等

なし

### 【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本共同研究の成果を踏まえ、今後は *Oasis-gRNA* の投与による腫瘍成長の抑制効果について再現性を検証するとともに、投与による OASIS プロモーターのメチル化レベル変動や OASIS 発現、細胞老化誘導を多角的に調べる。これらの解析を通して、*Oasis-gRNA* によって OASIS プロモーターの特異的脱メチル化とその発現上昇が誘導されていることを確認する。さらに *Oasis-gRNA* による OASIS 発現誘導が細胞老化を引き起こし、腫瘍の成長を抑制している可能性を調べる。また、*Oasis-gRNA* に組み込んだ gRNA とは異なる配列の gRNA を発現する複数のコンストラクトを作成する。これらのコンストラクトと U251MG 細胞を用いて異種間移植実験を実施し、gRNA による認識部位の違いが脱メチル化および細胞老化誘導と腫瘍成長を抑制する効果に及ぼす影響を比較検証する。また、前述のように U251MG 細胞以外にも乳癌細胞をはじめとする複数の癌細胞において 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見出している。そこでこれら癌細胞株を用いて異種間移植実験を実施する。本実験により各種エピゲノム編集コンストラクトによる腫瘍成長の抑制効果を調べ、エピゲノム編集コンストラクトがもつ癌抑制効果の汎用性を明らかにするとともに最も効果的な増殖抑制効果を示す gRNA 配列を癌細胞のタイプによって分類することを試みる。