

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 は小胞体ストレスに応答して膜内切断を受け、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 OASIS が小胞体ストレスだけでなく、抗がん剤処理や放射線照射などによって引き起こされる DNA 損傷にも応答して、転写因子として活性化することを発見した。DNA 損傷依存的に活性化した OASIS の役割を調べると、細胞老化マーカーとしても知られる p21 の発現を誘導し、細胞老化を引き起こすことがわかった。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。さらに既存のデータベースは、多くの癌細胞や腫瘍において 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示している。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 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. 昨年までの共同研究で、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エピゲノムコンストラクト (OASIS-gRNA) を作成した。これを OASIS プロモーターの高メチル化によってそ

の発現がみられない human glioblastoma U251MG 細胞に導入して OASIS の発現を回復させることができた。これらの成果を踏まえて、今年度は OASIS プロモーター上における認識部位が異なる各種 gRNA を発現するコンストラクト (OASIS-gRNA-1 ~ -7) を U251MG 細胞に導入すると、複数の gRNA 配列を発現するコンストラクトにおいて (OASIS-gRNA-1、OASIS-gRNA-2、OASIS-gRNA-3) 有意にプロモーター領域が脱メチル化される。

これらを U251MG 細胞に導入し、bisulfite sequencing 解析によって OASIS プロモーターのメチル化レベルを調べたところ、gRNA の認識部位によって脱メチル化効率が異なり、複数のコンストラクトにおいて有意にプロモーター領域が脱メチル化されることがわかった (図 1)。最も脱メチル化レベルが高かったコンストラクト (OASIS-gRNA-1) を導入した細胞では OASIS および p21 の発現が強く誘導され、senescence-associated-beta-galactosidase (SA-β-gal) 染色陽性の老化細胞も大幅に増加していた。OASIS-gRNA-1 を in vivo transfection 試薬およびアテロコラーゲンをを用いた直接投与方法によってヌードマウスに異種間移植した U251MG 細胞由来の腫瘍に投与した結果、腫瘍

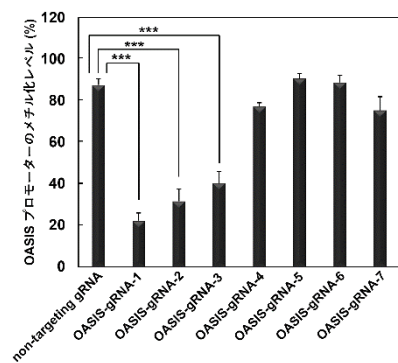


図 1. U251MG 細胞を用いた bisulfite sequencing 解析。OASIS プロモーター上における認識部位が異なる各種 gRNA を発現するコンストラクト (OASIS-gRNA-1 ~ -7) を U251MG 細胞に導入すると、複数の gRNA 配列を発現するコンストラクトにおいて (OASIS-gRNA-1、OASIS-gRNA-2、OASIS-gRNA-3) 有意にプロモーター領域が脱メチル化される。

の成長を有意に抑制することができた (図 2)。OASIS-gRNA-1 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 とその N 末端断片の発現レベルが上昇していることが western blotting

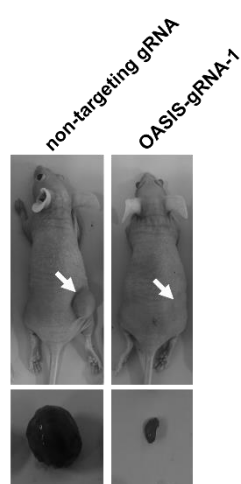


図 2. U251MG 細胞を用いた異種間移植実験。移植した U251MG 細胞が定着した後、OASIS-gRNA-1 (右) を U251MG 細胞由来の腫瘍 (白矢印) に投与すると、non-targeting gRNA を組み込んだコンストラクトを投与した腫瘍(左)よりその成長が抑制される (下図)。

によって示された。OASIS-gRNA-1 を投与した腫瘍を用いて組織染色を実施すると、ki67 陽性細胞数の減少と p21 および SA-β-gal 陽性の老化細胞の増加も観察された。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

gRNA の認識部位が異なると OASIS プロモーターの脱メチル化効果に差があることがわかった。このことは gRNA による認識部位の違いが細胞老化誘導と腫瘍成長を抑制する効果に影響を与えることを示している。これら gRNA コンストラクトの中で最も効率よく OASIS プロモーターを脱メチル化できたコンストラクト (OASIS-gRNA-1) を、異種間移植した U251MG 細胞を由来とする腫瘍に直接投与することで、OASIS プロモーターにおけるメチル化レベルを低下させることができた。この特異的な脱メチル化誘導は OASIS 発現レベルの上昇と細胞老化の誘導を引き起こして腫瘍の成長を抑制したことから、OASIS プロモーター領域の脱メチル化と細胞老化誘導が腫瘍成長抑制の新規治療ターゲットとなり得ることを *in vivo* レベルで示すことができた。これらの研究成果は現在論文としてまとめ、学術雑誌に投稿中である。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究において、我々が作製した OASIS プロモーター脱メチル化コンストラクトが *in vivo* でも脱メチル化と OASIS の発現を誘導す

ることを示すことができた。この成果は、OASIS 発現と細胞老化誘導を標的とした新たな癌治療戦略の構築に繋がる足掛かりとなるだけでなく、腫瘍においてそのプロモーター領域が高度にメチル化されている癌抑制遺伝子などの特定プロモーター領域を脱メチル化する手法に発展する可能性を秘めている。さらにこの脱メチル化効率は gRNA が認識する配列に影響を受けることを明らかにした。これは OASIS プロモーター領域における高メチル化部位やプロモーター周囲の立体構造などに依存するためであると考えられる。OASIS プロモーターは glioblastoma cell line である 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が、その高メチル化部位が細胞・組織によって異なる可能性を見出している。このことは癌種によって効果的な gRNA が異なることを示唆しており、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 (論文投稿中)

[3-2]学会発表

齋藤 敦, 上川 泰直, 伊藤 泰智, 吉丸 哲郎, 松下 洋輔, 片桐 豊雅, 今泉 和則. 小胞体膜局在分子 OASIS による核膜ストレス応答を介した細胞増殖と癌化制御. 第 15 回小胞体ストレス研究会. 京都, 7/31, 2022.

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

本共同研究の成果を踏まえ、今後は OASIS-gRNA-1 以外のコンストラクトを異種間移植した U251MG 細胞由来の腫瘍に注射し、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 *in vivo* でも検証する。また、異なる gRNA を発現するこれらコンストラクトを glioblastoma cell line 以外の各種癌細胞に導入し、脱メチル化効率を比較する。本実験により各種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、最も効果的な細胞老化誘導効果を示す 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。