

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 は小胞体ストレスや DNA 損傷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 DNA 損傷依存的に活性化した OASIS が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を突き止めた。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。本研究では OASIS プロモーターがメチル化されている癌細胞株に対して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

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 *in vivo* transfection 試薬を用いた直接投与法によってヌードマウスに異種間移植した glioblastoma cell-line U251MG 細胞 (OASIS プロモーターが高メチル化されており、OASIS の発

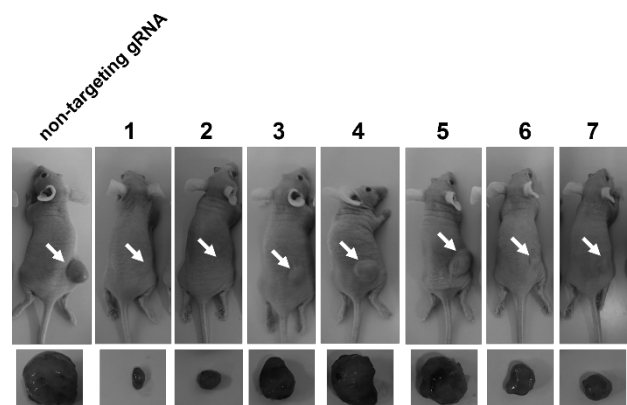


図 1. U251MG 細胞を用いた異種間移植実験。移植した U251MG 細胞が定着した後、OASIS-gRNA-1～7 を U251MG 細胞由来の腫瘍（白矢印）に投与すると、OASIS-gRNA-1, -2, -7 を投与した腫瘍で成長が有意に抑制される（下）。non-targeting gRNA は OASIS プロモーターを認識しない gRNA を発現するコンストラクト。

現が極めて低い）由来の腫瘍に注射した結果、腫瘍の成長を有意に抑制することができた。本年度は gRNA の配列が異なるコンストラクト（OASIS-gRNA-1 ～ -7）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や OASIS および p21 の発現、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検証した。すると OASIS-gRNA-1, -2, -7 を投与した腫瘍においてその成長が顕著に抑制されていた（図 1）。OASIS-gRNA-6 を投与した腫瘍も若干成長が抑制されていたが、有意な抑制効果ではなかった。OASIS-gRNA-1 ～ -7 を投与した腫瘍から DNA を回収して bisulfite sequencing 解析を行うと、OASIS-gRNA-1, -2, -7 を投与した腫瘍において OASIS プロモーターが特異的に脱メチル化されていることもわかった。また、摘出した腫瘍

を用いて組織染色を実施すると、OASIS-gRNA-1, -2, -7 を投与した腫瘍において p21 および SA- β -gal 陽性の老化細胞の増加も確認できた(図2)。

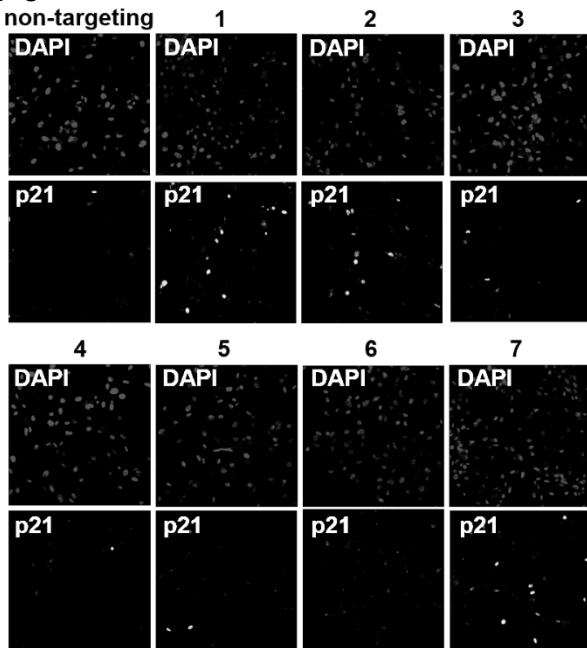


図2. OASIS-gRNA-1~7 を投与した後、摘出した U251MG 細胞由来の腫瘍を用いた免疫染色。OASIS-gRNA-1, -2, -7 を投与した腫瘍で p21 陽性細胞が増加する。DAPI は核染色。

【2】研究成果

[2-1] 本共同研究で明らかになった研究成果

OASIS プロモーター内における gRNA の認識部位が異なると、腫瘍成長に対する抑制効果に差があることがわかった。この効果は、OASIS プロモーターの脱メチル化効率と関連したことから、gRNA の認識部位によって脱メチル化効率が変わること、脱メチル化効率が高いと p21 の発現上昇と細胞老化誘導に繋がって大きな腫瘍抑制効果が期待できることが明らかになった。これらの研究成果は一部を学術論文としてまとめて発表済みであり、未発表部分もまとめて学術雑誌に投稿する準備を進めている。

[2-2] 本共同研究による波及効果及び今後の発展性

本共同研究において、我々が作製した OASIS プロモーターの脱メチル化コンストラクトが *in vivo* でも脱メチル化と OASIS の発現を誘導できること、その脱メチル化効率は gRNA の認識部位によって異なり、高効率であれば腫瘍成長を抑制する効果も高くなることを示すことができた。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。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を目指す際に、コンストラクトの適切な設計によって効果的に腫瘍成長を抑制できることを示唆している。また、OASIS に限定せず、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高効率で脱メチル化する手法に発展することも期待できる。

一方で OASIS プロモーターは glioblastoma 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メチル化されている。その高メチル化部位は細胞・組織によって異なる可能性も見出している。このことは癌種によって効果的な gRNA 配列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期待できる。

【3】主な発表論文等

[3-1] 論文発表

Saito A., Kamikawa Y., Ito T., Matsuhisa K., Kaneko M., Okamoto T., Yoshimaru T., Matsushita Y., Katagiri T., Imaizumi K. : p53-independent tumor suppression by cell cycle arrest via CREB/ATF transcription factor OASIS. *Cell Reports*, 42 : 112479, 2023.

[3-2] 学会発表

第 16 回小胞体ストレス研究会, 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, 小胞体を基軸とする新たなオルガネラ間連携. 金沢, 9/29, 2023.

第 82 回日本癌学会学術総会, 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, p21 を誘導する OASIS の発現低下が膠芽腫発生に関与する. 横浜, 9/23, 2023.

[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。