

厚生労働科学研究費補助金

トキシコゲノミクス研究事業

転写因子E2Fによる癌レギュローム解析から
抗がん剤の安全性予測へ向けた研究開発

平成18年度 総括研究報告書

主任研究者 吉田 健一

平成19(2007)年 4月

目 次

I. 総括研究報告

転写因子E2Fによる癌レギュローム解析から
抗がん剤の安全性予測へ向けた研究開発

吉田健一

----- 1

II. 研究成果の刊行に関する一覧表

----- 10

III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 11

厚生労働科学研究費補助金

(トキシコゲノミクス研究事業)

総括研究報告書

転写因子E2Fによる癌レギュローム解析から抗がん剤の安全性予測へ向けた研究開発

主任研究者 吉田 健一 明治大学農学部 専任講師

研究要旨

細胞運命を制御する多くの重要な遺伝子の発現を制御するp53は多くの癌種で突然変異により不活化されている。本研究ではp53とともに細胞周期やDNA修復、さらには細胞死などを遺伝子レベルで調節する転写因子E2Fに焦点をあてた。最近の報告からある種の抗がん剤がp53とは独立した経路で直接E2F1をリン酸化することでE2F1の標的遺伝子のうちアポトーシスに関する遺伝子の発現を優先的に制御することが明らかとなった。一般的にE2F1～3が転写因子として活性型なのに対し、E2F4～6は抑制型であることが知られている。我々はこれまでの研究から、E2F標的遺伝子のプロモーターに対するE2F1とE2F4の競合的かつ選択的結合が、細胞に対する紫外線照射や抗がん剤投与で変化する事実を見出した。

本研究ではヒト細胞に抗がん作用を有する化合物を投与した結果、細胞が示す応答性とE2F標的遺伝子プロモーター上でのE2F1とE2F4のアフィニティーとのパラメトリックな関係を網羅的に解析することで、化合物による細胞傷害を効率的に予測する系の確立を目指す。この目的に沿って、転写因子E2F1とE2F4の標的遺伝子を網羅的に同定した。本年度では同定した遺伝子プロモーターのいくつかについてE2F1とE2F4の結合を検定する際の条件を確立し、それら結合性の変化と細胞傷害との関係についての解析に着手した。

A. 研究目的

医薬品低分子化合物、とくに抗がん剤は薬効と毒性がしばしばオーバーラップする。さらに細胞のもつ遺伝型に薬効が左右されることが珍しくない。抗がん剤として開発される新規低分子化合物が正常細胞に対しては副作用を示さず、一方、がん細胞に対しては増殖に対し抑制的に作用するかどうか、簡便なアッセイで予測できれば未然に医薬品開発のコストを低減できるし、患者に対しても不要な侵襲を防止でき、国民の福祉に貢献可能である。

本研究では、転写因子E2F1とE2F4のゲノムワイドなプロモーター選択性と既知抗がん剤による細胞傷害とのパラメトリックな関係を基盤データとして整備し、医薬品候補化合物の安全性を細胞レベルで簡便に予測可能な実験基盤の確立を目指す。このためE2F1とE2F4の全標的遺伝子を同定する。そして既知抗がん剤投与後に標的遺伝子プロモーターに結合するE2F1ならびにE2F4の定性定量解析を実施する。

転写因子E2F1およびE2F4の標的遺伝子については、クロマチン免疫沈降法やDNAマイクロアレイを用いた報告が既にある (Ishida *et al.*, *Mol Cell Biol.* 21: 4684-4699, 2001)。しかし、近年充実度を増したゲノム情報をもとに作製されたDNAマイクロアレイを用いた解析から、これまでにないユニークなE2F1およびE2F4の標的遺伝子およびそれらのプロモーター配列が同定される可能性が高い。実際、我々のこれまでの研究から、まったくユニークなE2F1およびE2F4の標的遺伝子を多数同定できた。E2F1ならびにE2F4のプロモーター結合性に基づく医薬品候補化合物の安全性評価に関する報告はこれまでに見当たらない。また、DNAダメージによる細胞傷害（細胞死・細胞周期停止など）を予測する際、特定遺伝子の発

現解析ではしばしば困難を伴う。しかし、転写因子E2F1およびE2F4の特定遺伝子プロモーターへの結合パターンを指標にすることで、その後の細胞傷害をある程度予測できる可能性がある (Yoshida *et al.*, *Oncogene*23: 6250-6260, 2004)。転写因子E2F1ならびにE2F4が抗がん作用を示す化合物投与の結果、標的遺伝子プロモーターにどのような結合パターンを示すか、そして細胞はどのような表現型を示すかをゲノムワイドに解析することでより詳細な化合物の安全性評価系が確立できる可能性が高い。

B. 研究方法

1. 細胞

HeLa (RCB0007、RIKEN)、A549細胞 (TKG0184、東北大学加齢医学研究所) および正常肺線維芽細胞WI-38細胞 (IF050075、Health Science Research Resources Bank) は Earle's modified Eagle's medium (Invitrogen) に10%牛胎仔血清 (Japan-BioSerum)、1%非必須アミノ酸 (Invitrogen) と抗生物質 (Invitrogen) を添加した培地で、37℃、5% CO₂下で培養した。

2. 試薬

抗がん剤として、ピリミジンアナログでDNA合成阻害剤である5-フルオロウラシル (以下5-FU、068-01401、Wako) と植物アルカロイドでトポイソメラーゼII阻害剤であるエトポシド (以下VP-16、057-05853、Wako) を用いた。それぞれDMSOに溶解し0.5 mMおよび0.1 mM stock solutionとして-20℃保存し、適宜希釈して用いた。

3. 細胞機能アッセイ

3-1. 細胞生存率

細胞の生存率はWST-1 assay (Roche) およびCellTiter-Glo luminescent cell viability assay (Promega)

)で測定した。細胞 (2×10^5 cells) を 6-well plateで一晩培養後、試薬を添加し48時間後にアッセイに供した。コントロールとして、試薬と等量のDMSO (通常培地の1/1,000量) を添加した。

3-2. BrdU 取り込み活性

DNA複製能は5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU)の新生DNA鎖ラベルで定量化した (BrdU labeling and detection kit III, Roche)。細胞 (3×10^3 cells) を 96-well plateで一晩培養後、試薬を添加し、さらに一晩培養後10 μ MのBrdUで14時間ラベルした。冷PBSで2回洗浄後、70% ethanol/0.5M HClで30分、 -20°C で固定した。さらにPBSで3回洗浄後、ヌクレアーゼ処理を施した。37 $^\circ\text{C}$ で30分処置後、PBSで3回洗浄しペルオキシダーゼで化学修飾した抗BrdUモノクローナル抗体を含む1% BSA/PBSで37 $^\circ\text{C}$ 、30分反応させた。PBSで3回洗浄後、ペルオキシダーゼ基質でBrdUラベルを可視化し、405 nm (-490 nm) で活性をモニターした。

3-3. アポトーシス

アポトーシス活性はCaspase-Glo 3/7 assay kit (Promega)で測定した。細胞 (3×10^3 cells) を96-well plateで一晩培養後、試薬を添加し、24時間後にcaspase-3/7基質と30分間、室温で反応させた。活性はluminescence microplate reader (Wallac1420 ARVOsx Multilabel Counter, Perkin Elmer)で測定した。いずれの実験も最低3回実施し、平均土標準偏差で示した。Student's paired *t*-testで解析し、 $P < 0.05$ を統計学的有意差と判定した。

4. クロマチン免疫沈降法 (ChIP)

クロマチン免疫沈降法 (以下、ChIP) はEZ ChIP kit (Upstate)のプロトコールに従って実施した。 2×10^6 の細胞を一回のChIPに使用した。細胞は最終濃度1%になるようホルムアルデヒドを添加することでDNAとタンパク質を架橋し、プロテアーゼ阻害剤 (Sigma) を含むSDS lysis bufferで可溶化後、ソニケーションを実施した (Branson Sonifier II)。ソニケーションによりDNA切断鎖の平均長は500-1,000 bpとした。免疫沈降は2-5 μ gの抗E2F1抗体 (sc-193, Santa Cruz Biotechnology社)、抗E2F4抗体 (sc-866, Santa Cruz Biotechnology社)あるいはコントロール抗体として抗Flag抗体 (Sigma社)を用いた。4 $^\circ\text{C}$ で一晩反応後、protein G アガロースを添加し、さらに4 $^\circ\text{C}$ で一時間反応後、遠心回収した。4回の洗浄後、ペレットはTEバッファに溶解し、proteinase KとRNase Aを添加後加熱してDNA-タンパク質架橋を外した。フェノール/クロロホルムおよびエタノール沈殿後、50 μ lの蒸留水に溶解し、PCR増幅した。コントロールとして1/200量の免疫沈降前クロマチンもPCR増幅した。GAPDHプロモーター内に設定したプライマーをコントロールとした。PCR反応はKOD-Plus-DNAポリメラーゼ (東洋紡)を用い、以下の条件で実施した。94 $^\circ\text{C}$ で2分加熱後、94 $^\circ\text{C}$ (15秒)、55-60 $^\circ\text{C}$ (30秒)、68 $^\circ\text{C}$ (60秒)を27-35サイクル繰り返した。増幅後、PCR産物は1.2%アガロース電気泳動し、紫外線照射により可視化した。

遺伝子の選定は、初年度実施したマイクロアレイで発現変動を示した遺伝子群のリストをもとにした。とくに、ChIP後サブクローニングし塩基配列を決定した遺伝子プロモーター配列を参考にするとともに、E2F結合コンセンサス配列 (5'-TTT(G/C)GCGC-3')を転写因子結合予測ソフトTRANSFAC (<http://motif.genome.jp/>)で予測 (cutoff >85)した。また、文献情報やNCBI (NIH)に登録されているマイクロアレイデータから抽出した情報

、ならびにRT-PCRによりE2F1依存的な発現変動を示した遺伝子、またプロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子の5'上流に挿入しE2F反応性エレメントを決定するなどの実験結果を基に解析候補遺伝子を選定した。

PCRに使用したプライマー配列を以下に示す。

GMNN Sense: 5' -CGCACAGCCTCTAGACGACTCGCTTTCCT; Antisense: 5' -GCCTCGGAACTGCGCCAGCCAGCCAATAG

TOPBP1 Sense: 5' -GGAGTATTCCTGGCCTGTGGTCTACCTCT; Antisense: 5' -CCCATCTCCAGAAAAGGCTGGCTCTGGG

FANCC Sense: 5' -GAAGAAGCCAGCGCCCC TTC; Antisense: 5' -TGGAATTTTCCCGCGGT CGC

FANCI Sense: 5' -TGGATGCCGAAGTTCTC GCC; Antisense: 5' -GAAAGGGCAGCAGCCCTTCC

ASF1B Sense: 5' -TGGGCACCTGTAATCCC AGC; Antisense: 5' -GGAGACTCCAGGTCTCAGAG

EMI1 Sense: 5' -CAGAGCGCGCGTAAATCC; Antisense: 5' -CTATCAAGCAGGGTGGGTT

TOB2 Sense: 5' -GCTGCAAGGAAAGGAGC GCC; Antisense: 5' -TTGTGCGCGTCTGTGAGCT

(倫理面への配慮)

本研究では該当せず。

C. 研究結果

1. 標的遺伝子の選定

RNAi阻害によるE2F1およびE2F4発現の抑制をHeLa細胞で実施し、回収したRNAをもとに高密度DNAマイクロアレイ(約44,000遺伝子)による網羅的発現解析を実施した。発現変動差を2.5倍以上・以下でみた場合、E2F1およびE2F4に共通して発現上昇した遺伝指数は17個、共通して発現減少した遺伝指数は51個であった(図1

)。さらにE2F1に対する抗体でChIPを実施し、回収したDNA断片をベクターにクローン化し塩基配列を決定した(図1)。以上より得られた情報に基づいて、以降の解析に供する遺伝子とした。

2. 5-FUおよびVP-16による細胞機能の変化

5-FUおよびVP-16をHeLaおよびWI-38細胞に投与しWST-1アッセイにより細胞生存率を評価した。細胞の生存率はコントロールを100としたときの相対値(%)で表した。HeLa細胞において、5-FUでは5 pMで細胞生存率は低下を示し、VP-16では10 pMで細胞生存率は低下を示した(図2A)。同等の濃度においてWI-38細胞では細胞生存率に影響はなかった(図2A)。さらに、HeLa細胞においては5-FU(5 pM)、VP-16(10 pM)添加で細胞死が検出されたが、WI-38細胞では細胞死は検出されなかった(図2B)。一段階低い希釈濃度における5-FU(0.5 pM)、VP-16(1 pM)添加で細胞死は検出されなかった(図2B)。一方、BedU取り込み活性を指標とした細胞周期G1期停止は、HeLa細胞において5-FU(5 pM)、VP-16(10 pM)添加で検出され、WI-38細胞でも検出されたものの比較的弱ものであった(図2C)。以上より、5-FU(5 pM)、VP-16(10 pM)はがん細胞であるHeLa細胞に対してのみ薬効を示し、正常細胞であるWI-38に対してはほとんど副作用を示さなかった。一方、一段階低い希釈濃度においてはHeLa細胞に対してもほとんど作用を示さず、以降の実験においては5-FU(0.5 pMおよび5 pM)、VP-16(1 pMおよび10 pM)について検討することとした。

3. ChIP

選定した7遺伝子について、HeLa細胞およびWI-38細胞のそれぞれに、5-FU(0、0.5 pMおよび5 pM)、VP-16(0、1 pMおよび10 pM)を添加しChIPを実施し

た。WI-38細胞に影響を及ぼさなかった5-FU (0.5 pM)、VP-16 (1 pM) 濃度で、影響を及ぼした 5-FU (5 pM)、VP-16 (10 pM) 濃度のChIPパターンと一致する遺伝子の探索を目指した。いずれのChIPにおいてもGAPDHプライマーでPCR産物は検出されなかつた (data not shown)。7 遺伝子のうち、HeLa細胞ではE2F1によるGMNNおよびTOPBP1のChIPが、一方、WI-38細胞ではE2F4によるTOPBP1およびTOB2 のChIPが当初の目的にかなった遺伝子セットとして抽出された (図 3)。すなわち、HeLa細胞では細胞死が誘発される前段階である細胞周期G1停止状態において、GMNNおよびTOPBP1のプロモーターにE2F1が高度集積する可能性が高い。また、WI-38細胞では細胞周期G1停止状態に至らない5-FU濃度においてすでにE2F4がTOPBP1およびTOB2プロモーターに会合を開始する可能性が示唆された (図 4)。

D. 考察

5-FUをがん細胞に暴露した際には細胞死が、正常細胞に暴露した場合にはG1停止 (修復可能なDNA障害) が惹起される濃度、あるいはそういった状態に細胞に至らない濃度におけるE2F結合パターンを探索・収集し、検討した7 遺伝子の中から、今後有益と考えられる情報を得ることができた。今回、検討を加えた7 遺伝子はいずれも細胞周期の制御、DNA複製・修復などに関与することが知られており、機能的な側面からもE2F下流遺伝子として興味深く、これまでになく抗がん剤の副作用検出系と成りうる可能性の端緒が示された。個々の薬剤に特化した遺伝子セットの存在も否定できず、未知の化合物の薬効・副作用を予測するためには、さらなる網羅的解析が必要であると考えられる。とくに重点的に実施すべき項目としては、遺伝子の増加 (~30遺伝子)、抗がん剤 (アルキル化剤など) の追加、定量的な解析精度の向上などがあげられる。

これらの追加検討項目を実施することで、より再現性の高い、普遍的な遺伝子セットが抽出可能と思われる。

E. 結論

細胞に抗がん剤を投与し、細胞機能に影響を与えない濃度においても、影響を与える濃度と同等のE2F1あるいはE2F4と各遺伝子プロモーターとの結合性パターンの抽出が可能であった。これは我々が予想したように、プロモーター近傍に存在するE2F結合コンセンサス配列でE2F1とE2F4が競合的に作用しあうことで特定の遺伝子発現を制御する事実を示唆する。従って、抗がん剤によるDNAダメージや細胞環境の変化を鋭敏に感知したE2F1およびE2F4とクロマチンとの結合性に立脚した本研究計画はこれまでになく抗がん剤の副作用検出系と成りうる可能性が高いと言える。今回得られた検討結果を基盤として、さらに多数の遺伝子、抗がん剤について情報を蓄積する必要性が高い。

F. 健康危険情報

本研究において健康危険情報に該当する知見は得られていない。

G. 論文発表

1. Hayashi R, Goto Y, Haga A, Kobayashi D, Ikeda R, Yoshida K*. Comparative genomics of MCM8 orthologous genes reveals transcriptional regulation by transcription factor E2F, *Gene* 367, 126-134 (2006). (*Corresponding author)
2. Goto Y, Hayashi R, Kang D, Yoshida K*. Acute loss of transcription factor E2F1 induces mitochondrial biogenesis in HeLa

cells. *Journal of Cellular Physiology* 209: 923-934 (2006).

(*Corresponding author)

3. Hayashi R, Goto Y, Tanaka R, Onogi K, Hisasue M, Yoshida K
*. Transcriptional regulation of human chromatin assembly factor ASF1. *DNA and Cell Biology* 26(2): 91-99 (2007). (*Corresponding author)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

吉田健一「転写因子E2F1活性抑制剤」(明治大学、2005年10月24日出願、特願2005-308444)

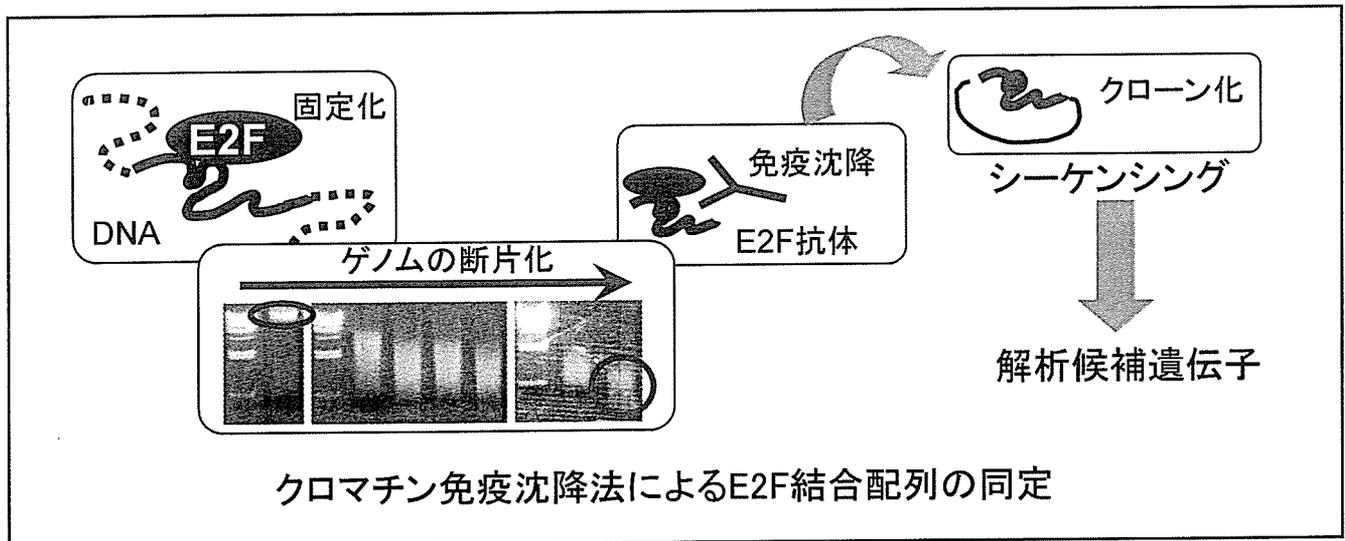
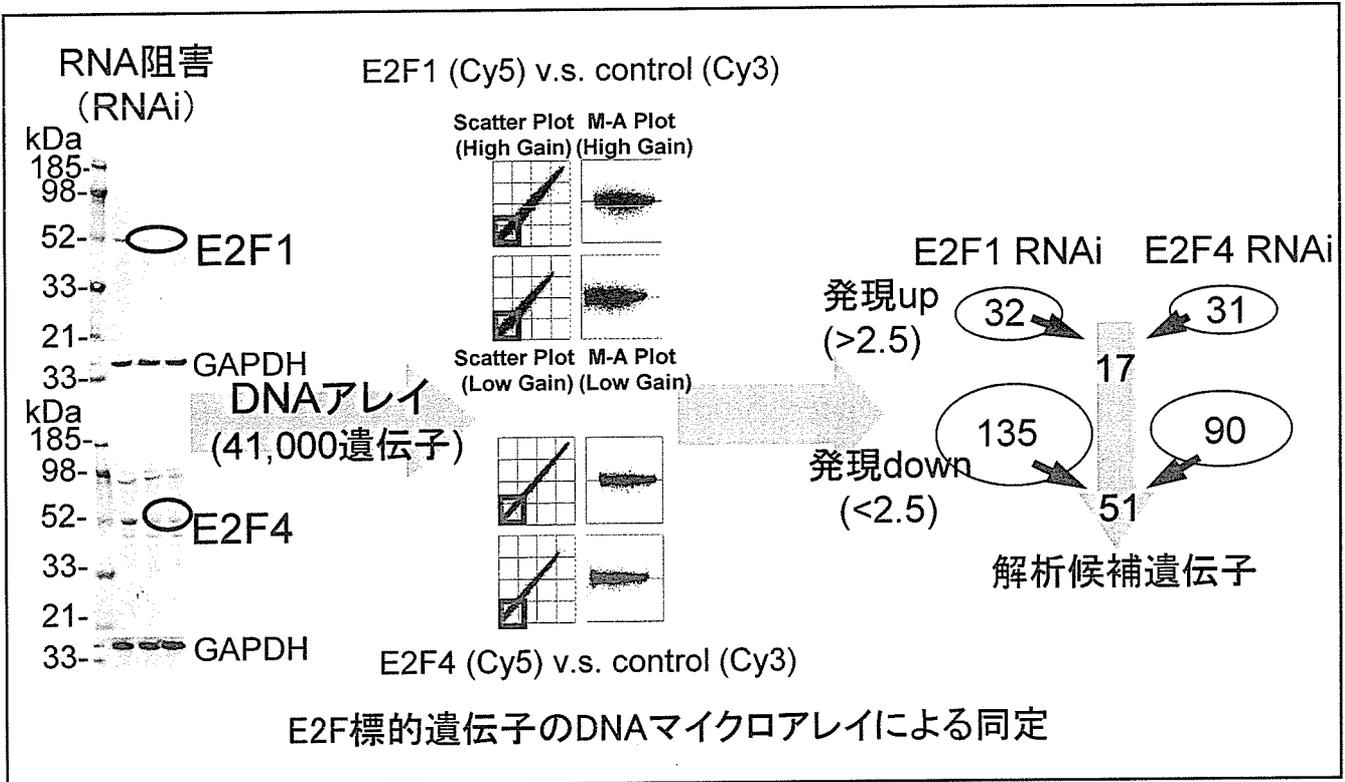
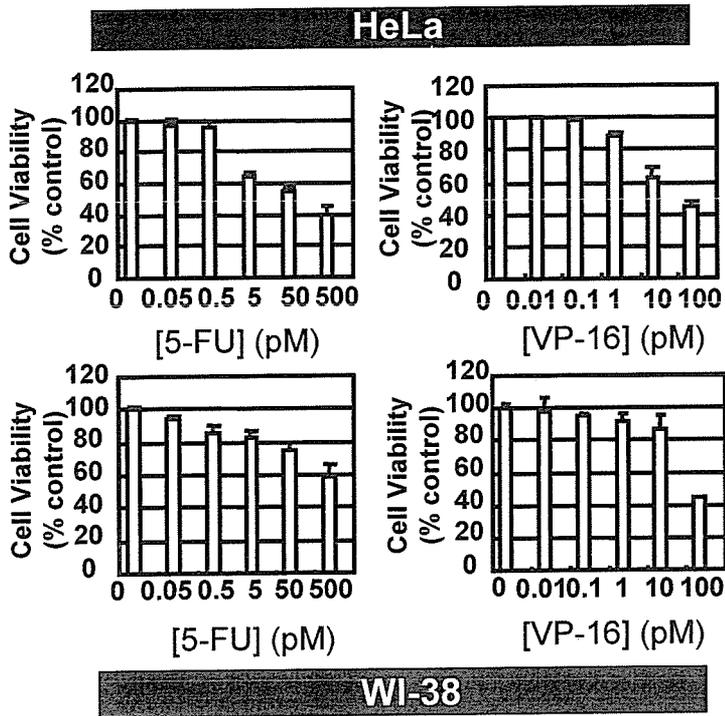
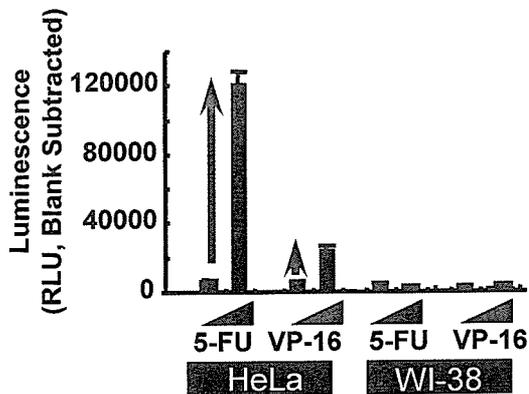


図1. 標的遺伝子選定に至る2つの戦略ー

A



B



C

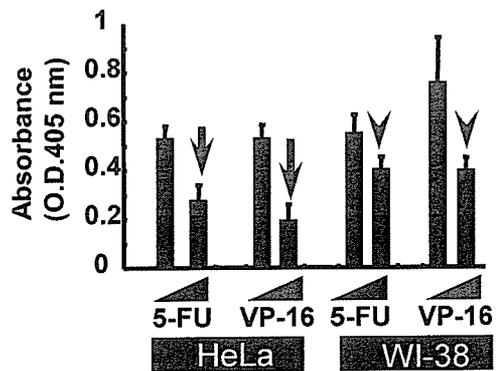


図2. 正常およびがん細胞に対して5-FUならびにVP-16が示す作用の解析。A)細胞生存率、B)アポトーシス活性、C) BrdU取り込み活性。

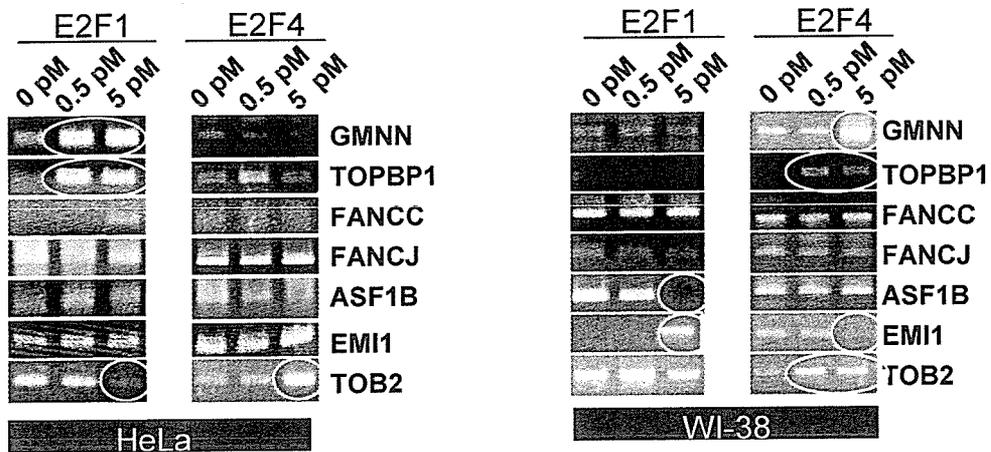


図3. クロマチン免疫沈降によるE2F1およびE2F4と標的遺伝子プロモーターとの結合性変化の検出。5-FUをHeLaおよびWI-38細胞に投与後、7遺伝子についてアッセイを実施した。変化の認められたものは白丸で示した。

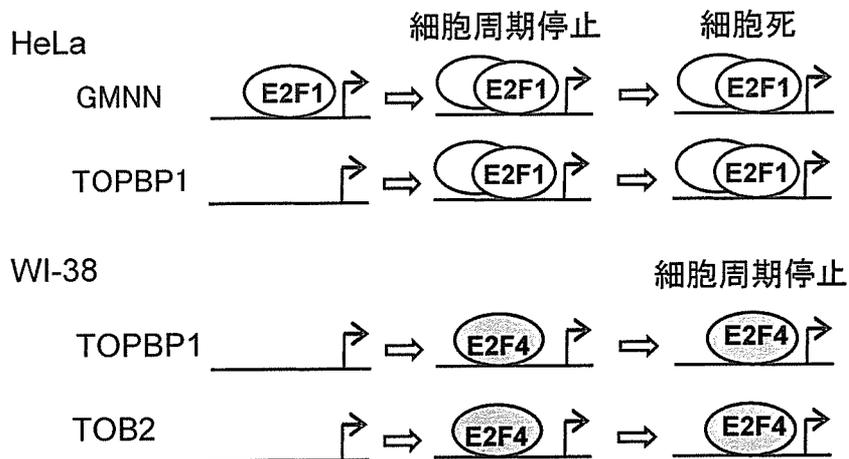


図4. GMNNおよびTOPBP1遺伝子についてクロマチン免疫沈降の結果を模式的に図示した。

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hayashi R, Goto Y, Haga A, Kobayashi D, Ikeda R, <u>Yoshida K*</u> (*Corresponding author)	Comparative genomics of MCM8 orthologous genes reveals transcriptional regulation by transcription factor E2F	<i>Gene</i>	367	126-134	2006
Goto Y, Hayashi R, Kang D, <u>Yoshida K*</u> (*Corresponding author)	Acute loss of transcription factor E2F1 induces mitochondrial biogenesis in HeLa cells	<i>Journal of Cellular Physiology</i>	209	923-934	2006
Hayashi R, Goto Y, Tanaka R, Oonogi K, Hisasue M, <u>Yoshida K*</u> (*Corresponding author)	Transcriptional regulation of human chromatin assembly] factor ASF1	<i>DNA and Cell Biology</i>	26	91-99	2007