

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究

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19年度 総括研究報告書

主任研究者 吉田 健一

平成20(2008)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

----- 9

### III. 研究成果の刊行物・別刷

----- 10

(創薬基盤推進研究事業：トキシコゲノミクス研究)

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 准教授

研究要旨

転写因子E2Fファミリー (E2F1～E2F6) は細胞周期G1からS期への進行を調節するだけでなくM期をも制御することが最近の研究から明らかになっている。さらに、細胞や個体レベルでの発生分化からがん化・老化といった広範な生理・病理現象において主要な役割を果たしている。特に、細胞がダメージを受けた際の遺伝子レベルでの反応における関与は重要であり、E2F1はp53依存性・非依存性の経路で細胞死を引き起こす。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、これまでに転写因子E2F1およびE2F4のsiRNAによる発現抑制細胞での網羅的発現解析を実施し多数のユニークな標的候補遺伝子を同定することに成功した。当該年度では特に選定した18遺伝子について、抗がん剤である5-FUおよびVP-16によりE2F1・E2F4が標的遺伝子プロモーターに対して示す結合パターンの解析を実施した。具体的には、初年度同定したE2F1・E2F4標的遺伝子についてヒト培養細胞を抗がん剤で処理した際、プロモーター上に特異的に結合するE2F1・E2F4をクロマチン免疫沈降により定性・定量解析した。同時に細胞の表現型も観察した。以上より、特定の遺伝子セットの抽出が可能となり、新規化合物の副作用を予測可能なアッセイ系確立に近づいた。

## A. 研究目的

本研究では、転写因子E2F1・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障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的とする。医薬品候補化合物の早期安全性評価は重要であり、ゲノム科学を応用することで得られる新技術はRegulatory Scienceに大きく貢献する。このためE2F1・E2F4の全標的遺伝子を同定するとともに、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・E2F4の定性定量解析を実施した。また、代表的な抗がん剤の薬効および副作用を予測可能とする研究基盤の確立を目指す。当該年度では、これまでに得られた遺伝子情報を基盤として、抗がん剤に曝露されたヒト培養細胞でのE2F1・E2F4と標的プロモーターとの結合性および細胞表現型とのパラメトリックな関係の解明に向けた解析を続行する。このような取り組みを通して、Regulatory Scienceへ貢献すると共に、未然に患者の副作用を軽減することを目的とする。

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・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障害（細胞死・細胞周期停止）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、その後の細胞障害をある程度予測できる可能性がある (Yoshida et al., Oncogene23: 6250-6260, 2004)。転写因子E2F1・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) 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°C、5% CO<sub>2</sub>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 miliMおよび0.1 miliM stock solutionとして-20°C保存し、適宜希釈して用いた。細胞への最終添加濃度は、5-FU (0あるいは5 microM)、VP-16 (0あるいは10 microM) とし、48時間後に以降の実験に供した。

### 3. 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<sup>6</sup>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 μg 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℃で一晩反応後、protein Gアガロースを添加し、さらに4℃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/クロロフォルムおよびエタノール沈殿後、50 μl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℃で2分加熱後、94℃（15秒）、55-60℃（30秒）、68℃（60秒）を~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（cut-off >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

、またプロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入し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表1に示す。

（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

標的遺伝子は、RNAi阻害によりE2F1あるいはE2F4の発現を抑制したHeLa細胞において高密度DNAマイクロアレイにより得られた網羅的発現変化の解析結果、および、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決定した塩基配列情報から選定した。

### 2. 5-FUおよびVP-16による細胞機能の変化とChIP解析

WST-1アッセイによる細胞生存率の評価から、HeLa細胞では、5 microMの5-FUで、一方、10 microMのVP-16で細胞生存率は低下を示した。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。さらに、HeLa細胞においては5-FU（5 microM）、VP-16（10 microM）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。BedU取り込み活性の低下も、HeLa細胞においては、5-FU（5 microM）、VP-16（10 microM）添加で検出され、WI-38細胞では比較的弱いものであった。以上より、以降の実験においては5-FU（0および5 microM）、VP-16（0および10 microM）について検討することとした。今回選定した18遺伝子（FANCA、FANCB、FANCD1、FANCF、FANCG、FANCI、FANCM、ZNF367、PSF1、PSF3、HBO1、FOXM1B、CDCA1、CDCA3、CDT2、PLK1、PLK4およびSIM2）について、HeLa細胞およびWI-38細胞のそれぞれに、5-FU（0および5

microM)、VP-16 (0および10 microM) を添加しChIPを実施した。ChIPで増幅したゲノム領域と5-FU添加細胞におけるChIP結果を図1に示す。いずれのChIPにおいてもコントロール (GAPDH) プライマーでPCR産物は検出されなかつた。5-FUおよびVP-16添加細胞におけるChIP結果をパターン化したスコアを表2に示す。18遺伝子のうち、5-FU添加によってHeLa細胞でChIPパターンの変化を示した遺伝子はFOXM1B (E2F4結合の消失) とSIM2 (E2F1結合の消失) であった。一方、5-FU添加によってWI-38細胞でChIPパターンの変化を示した遺伝子はZNF367 (E2F4結合の検出) のみであった。さらに、VP-16添加によってHeLa細胞でChIPパターンの変化を示した遺伝子はSIM2 (E2F1結合の消失) のみであった。一方、VP-16添加によってWI-38細胞でChIPパターンの変化を示した遺伝子はZNF367 (E2F1およびE2F4結合の検出) であった。

#### D. 考察

転写因子E2F1・E2F4の全標的遺伝子同定を目指した前年度までの取り組みとして、siRNAによりE2F1あるいはE2F4の発現を抑制した細胞を調整しDNAマイクロアレイなどによる網羅的発現解析から多くの標的候補遺伝子を同定した (Journal of Cellular Physiology, 209: 923-934, 2006; Gene 367, 126-134, 2006)。さらにE2F1あるいはE2F4の抗体によるクロマチン免疫沈降法で回収したDNA断片を解析し、多くの既知E2F標的遺伝子プロモーター配列を含む事を確認した。今回、これら遺伝子情報を基に、いくつかの解析候補遺伝子を選定し、抗がん剤として5-FUあるいはVP-16をHeLaならびにWI-38細胞に投与し、E2F1あるいはE2F4のプロモーターへの結合パターンがどのように変化するか解析した。

検討した18遺伝子における解析から、今後有益と考えられる情報を得ることが

できた。しかしながら、ChIP法ではPCRによる検出を含むためartifactなPCRバンドを検出している可能性も高い。また、再現性をさらに詳しく検討する必要も高い。いずれにしても、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。より定量的な解析精度の向上が達成できれば、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

本研究から、当初予想したように、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が見出された。抗がん剤として5-FUおよびVP-16、細胞としてHeLaおよびWI-38を用い、選定した18遺伝子プロモーター近傍配列を標的としたChIP解析から、E2F1・E2F4のプロモーター選択性と抗がん剤による細胞障害とのパラメトリックな関係を抽出する系の構築に一步前進した。今後より詳細な検討を加えることで、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抗がん剤の副作用検出系が完成す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、抗がん剤について再現性の高い情報を蓄積する必要性が示唆された。

#### 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, Tanaka R, Oonogi K, Hisasue M, Yoshida K\*. Transcriptional regulation of human

chromatin assembly factor ASF1.  
*DNA and Cell Biology* 26: 91-99  
(2007). (\*Corresponding author)

2. Tategu M, Arauchi T, Tanaka R, Nakagawa H, Yoshida K\*. Systems biology-based identification of crosstalk between E2F transcription factors and the Fanconi anemia pathway, *Gene Regulation and Systems Biology* 1: 1-8 (2007). (\*Corresponding author)

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

1. 吉田健一「転写因子 E2F1 活性抑制剤」(明治大学、2007年5月10日、特開 2007-112772)

表1. プライマー配列

Gene	UniGene #	Mapping	Genomic clone #	Forward primer sequence	Reverse primer sequence
FANCA	Hs.567267	16q24.3	AC005565	5'-GCTTGGTTGGCCAGGTGGT-3'	5'-ATGGCCTTGGCGCCTACAG-3'
FANCB	Hs.554740	Xp22.2	AC140846	5'-AGGCCCTCAGCCTAGGTCC-3'	5'-CAGCGGCAACATACCGGAG-3'
FANCC	Hs.494529	9q22.3	AL157384	5'-AAGAAGCCAGCGCCCTTC-3'	5'-TGGAAATTTCCCGCGGTCCG-3'
FANCD1	Hs.34012	13q12.3	AL445212	5'-CCACCCAAACATGAGCTGG-3'	5'-CTCTGCCGCCTAGTTTCAG-3'
FANCF	Hs.632151	11p15	AC103801	5'-AAGCGCGGAGACGTTTCATG-3'	5'-GCGATCCAGGTGCTGCAGA-3'
FANCG	Hs.591084	9p13	AC004472	5'-GTTAGTTAGGCTGCTTTAC-3'	5'-TGGGTTCCCGCTTCCACCGA-3'
FANCJ	Hs.532799	17q22-q24	AC060798	5'-TGGATGCCGAAGTTCTCGCC-3'	5'-GAAAGGGCACGAGCCCTTCC-3'
FANCM	Hs.509229	14q21.3	AL121809	5'-GAATGAGGCACGTTAGACGC-3'	5'-AGCTCAACCGCTACGGTTC-3'
ZNF367	Hs.494557	9q22	NT_008470	5'-CGCCGGGTGCCCATCAGGAC-3'	5'-GTGCCTGCCCCGGCTTTCC-3'
PSF1	Hs.658464	20p11.21	AL353812	5'-GCAGTCCCTACCAGCCTAG-3'	5'-CGGCCTTGCCAACCACCA-3'
PSF3	Hs.47125	16q21	AC009118	5'-TCCTGTCTGATCGTCCC-3'	5'-TGCCTCCGCTCCAGGAA-3'
HBO1	Hs.21907	17q21.32	AC015795	5'-CAGGCTTCTGCCCAAAC-3'	5'-GCCTCTCAGCGTCTGGAG-3'
FOXMB	Hs.239	12p13	AC005911	5'-AAGGCTTGGCTTCGGGAGGG-3'	5'-TCAGTTTGTTCGCTGTTTG-3'
CDCA1	-	1q23.3	AL592435	5'-CAGCTCCGCGAGCAATGTT-3'	5'-TTCCTCCGCTCTCGCGC-3'
CDCA3	Hs.524216	12p13	U47924	5'-GCCACTCGTTAGGGGCATGC-3'	5'-GCTCAACTCCCGAAGTTACC-3'
CDT2	Hs.656473	1q32.1-q32.2	NT_021877	5'-GTTTGACGCCATGACCCG-3'	5'-GCCTCCAACCTCCCGCCACT-3'
PLK1	Hs.592049	16p12.1	AC008870	5'-GAGGCCAGACGCTTCGTTG-3'	5'-CAGACCTCGATCCGAGCAGA-3'
PLK4	Hs.172052	4q28	AC107053	5'-AAGGAAGGTCTGCCGCGCAT-3'	5'-TCGAGGCAGCGCTCCAAGCA-3'
SIM2	Hs.146186	21q22.2	AP001726	5'-CGGAGCCGAGGCGCGATGAA-3'	5'-CTCACCCAGCCCTGGACCAG-3'



表2. 18遺伝子プロモーターにおけるE2F1・E2F4のChIP結果

5-FU (microM)	HeLa				WI-38			
	E2F1		E2F4		E2F1		E2F4	
	0	5	0	5	0	5	0	5
FANCA	-	-	-	-	-	-	-	-
FANCB	-	-	-	-	-	-	+	+
FANCD1	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCF	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCG	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCI	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCD1	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCM	+	+	+	+	-	-	-	-
ZNF367	-	-	-	-	-	-	-	+
PSF1	+	+	+	+	-	-	-	-
PSF3	+	+	+	+	-	-	-	-
HBO1	+	+	+	+	+	+	+	+
FOXM1B	+	+	+	-	-	-	-	-
CDCA1	+	+	+	+	-	-	-	-
CDCA3	-	-	-	-	+	+	+	+
CDT2	+	+	+	+	+	+	+	+
PLK1	+	+	+	+	-	-	-	-
PLK4	+	+	+	+	-	-	-	-
SIM2	+	-	+	+	-	-	-	-
Control	-	-	-	-	-	-	-	-

VP-16 (microM)	HeLa				WI-38			
	E2F1		E2F4		E2F1		E2F4	
	0	5	0	5	0	5	0	5
FANCA	-	-	-	-	-	-	-	-
FANCB	-	-	-	-	-	-	+	+
FANCD1	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCF	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCG	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCI	+	+	+	+	-	-	-	-
FANCD1	+	+	+	+	-	-	+	+
FANCM	+	+	+	+	-	-	-	-
ZNF367	-	-	-	-	-	+	-	+
PSF1	+	+	+	+	-	-	-	-
PSF3	+	+	+	+	-	-	-	-
HBO1	+	+	+	+	+	+	+	+
FOXM1B	+	+	+	+	-	-	-	-
CDCA1	+	+	+	+	-	-	-	-
CDCA3	-	-	-	-	+	+	+	+
CDT2	+	+	+	+	+	+	+	+
PLK1	+	+	+	+	-	-	-	-
PLK4	+	+	+	+	-	-	-	-
SIM2	+	-	+	+	-	-	-	-
Control	-	-	-	-	-	-	-	-

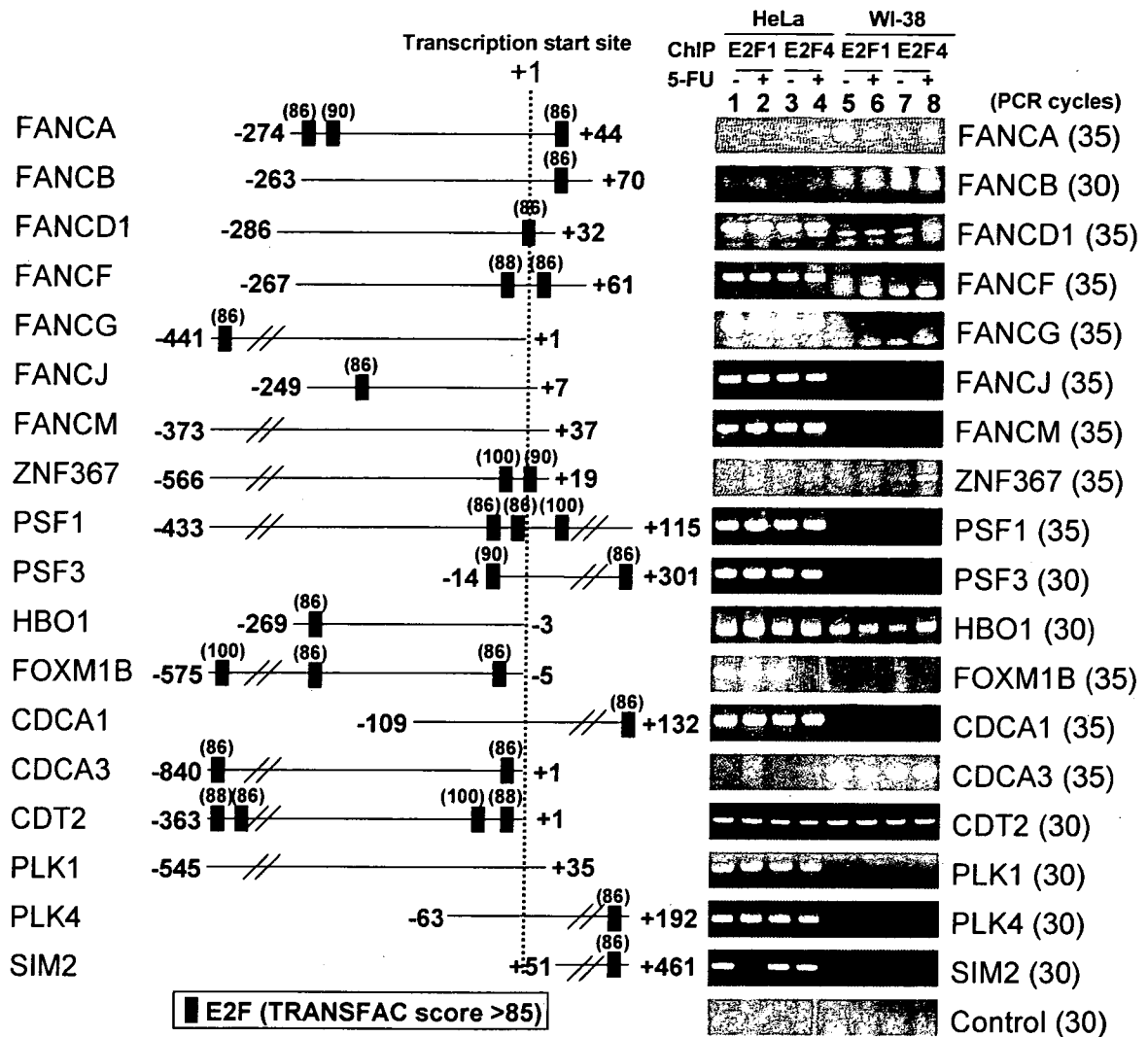


図1. 18遺伝子のプロモーター内E2F結合予測配列とChIP結果  
 選定した18遺伝子の転写開始点 (+1) を基準とした相対的なPCRフラグメントとTRANSFAC予測されたE2F結合配列 (左側)。HeLaおよびWI-38細胞に5-FU (0あるいは5 microM、24時間) を投与し、E2F1およびE2F4抗体でChIP解析した結果 (右側)。PCRサイクル数は遺伝子名の横側に示した。

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, 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
Tategu M, Arauchi T, Tanaka R, Nakagawa H, <u>Yoshida K*</u> (*Corresponding author)	Systems biology-based identification of cross-talk between E2F transcription factors and the Fanconi anemia pathway	<i>Gene Regulation and Systems Biology</i>	1	1-8	2007