

新たな転写因子の検索法についての研究 — BRAK 遺伝子の発現上昇に関与する転写因子の検索 —

吉 田 羊 子 生 駒 丈 晴 小 澤 重 幸
近 藤 忠 稚 鈴 木 健 司 久 保 田 英 朗

神奈川歯科大学大学院顎顔面外科学講座
(受付：2014年9月10日)

A study on a search for the new transcription factor
—Detection of transcription factors that enhance expression of BRAK gene—
Youko YOSHIDA, Takeharu IKOMA, Shigeyuki OZAWA, Tadanori KONDO,
Kenji SUZUKI and Eiro KUBOTA

Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Kanagawa Dental University, Graduate School of Dentistry

Abstract

Chemokine BRAK/CXCL14 (BRAK) is expressed in normal squamous epithelium but not expressed or expressed only negligible level in head and neck squamous cell carcinoma. We have previously demonstrated that expression of BRAK mRNA showed cell-density-dependent up-regulation by cell contact. However, subcellular mechanisms of cell-density-dependent BRAK expression are still unknown. In this study, we tried to determine transcription factors that affect BRAK expression by comprehensively analyzing the gene expression using a cDNA microarray. After culturing HSC-3 cells (a head and neck squamous cell carcinoma derived cell line) in high density culture conditions, we extracted total RNA and analyzed genes that associated with BRAK expression. We found 1883 genes that upregulated with BRAK expression. Then we applied the information extraction system provided by Nalapro Technologies Inc., Tokyo. This information extraction system uses natural language processing and text mining technology. This system analyzes the sentences and titles from abstracts stored in the PubMed database, and can automatically extract binary relations that consist of interactions between genes/proteins, chemicals and diseases/functions. We could extract 5 transcription factors, SP1, BACH2, PAX5, JUN, NFκB, which could affect BRAK expression by the text mining. We constructed Sh-RNAs against these factors and transfected them into HSC3 cells. Among these Sh-RNAs, SP1 could only attenuated the stimulation of BRAK mRNA expression in high-density cultures, and thus considered to be a transcription factor for BRAK gene. From these results, the text mining technology would be helpful for analyzing target transcription factors for BRAK regulation.

緒 言

BRAK/CXCL14 (BRAK) はアミノ末端にグルタミン酸、ロイシン、アルギニン残基からなるトリペプチド配列を含まない (non-ELR motif) 抗腫瘍性ケモカイン¹⁾に分類され、頭頸部扁平上皮癌に対して抗腫

瘍効果を有する分子である^{2,3)}。BRAKの機能としてはB細胞、単球、樹状細胞の遊走性の増加^{4,5,6)}や血管新生抑制作用^{4,7)}が知られており、また、上皮の分化との関連性についても報告されている⁸⁾。

現在明らかとなっているBRAKの発現調節機構は、上皮増殖因子 (EGF) とその受容体 (EGFR) との

結合により活性化される EGFR-MEK-ERK シグナルによって発現が低下すること^{9,10}、さらには高密度培養法によってカルシウム-カルモジュリンシグナルを介して発現が上昇することが報告されており⁸、転写開始領域より上流に存在する API 結合配列、TATA like 配列、及び GC box が遺伝子発現を制御するプロモーターの活性に重要であることが明らかとなっている¹¹。

一般的に BRAK は、すべての正常組織で発現しているが頭頸部扁平上皮癌をはじめとした多くの悪性腫瘍で発現の低下もしくは消失する遺伝子であり^{12,13}、頭頸部扁平上皮癌では約 56% で遺伝子発現が確認されなかった¹⁰。事実、Tessemara の報告においても、約 59% の肺癌細胞が BRAK のプロモーター領域のメチル化により、発現消失していることが報告されており、GC Box の重要性についても示唆されている¹⁴。しかしながら、BRAK の転写因子結合配列として遺伝子発現に寄与している API 結合配列、TATA Like 配列、及び GC Box に結合する転写因子は多数報告されており、未だ BRAK の発現のカギとなる転写因子の同定は困難を伴っている。

転写因子は、対象となる遺伝子の転写開始領域の主に上流に存在する特定の転写制御配列に結合することで遺伝子発現を制御する分子で、一般的に遺伝子発現のカギとなる転写因子の検索は、多くの文献を検索した後に、プロモーターアッセイ、ChIP アッセイ、及びゲルシフトアッセイ等の手法を用いて同定するが^{15,16,17}、実際にはその実験手技に習熟するには時間を要し、特殊な設備を必要とするなどの問題点が挙げられる。転写因子を検索する第一歩は、標的とする分子の遺伝子発現を変動させる刺激の検索である。これまでに我々は、上皮分化誘導刺激の一つである高密度培養法で細胞密度依存的に BRAK の遺伝子発現が上昇することを明らかにした⁸。

そこで、本研究ではナラプロテクノロジーのデータマイニングを使用し、専門的な手技を必要としない簡易的な転写因子検索法を利用し、その手技を用いて BRAK の発現上昇に関与する転写因子を同定することを目的に本研究を行った。

材料および方法

細胞及び試薬

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) は SIGMA-ALDRICH (USA) より購入した。牛胎児血清 (FBS)、硫酸ゲンタマイシン、EDTA は和光純薬 (Japan) で購入した。ファンギゾン、SuperScript II 逆転写酵素、TRIzol[®] は Invitrogen (USA) より購入し

た。Mg²⁺-Ca²⁺-free phosphate-buffered saline tablets PBS (-)、ExTaqDNA ポリメラーゼは Takara (Japan) より購入した。Brilliant[®] SYBR[®] Green qPCR Master Mix は Stratagene (USA) より購入した。Sh-RNA は Qiagen より購入した。siLentFect[™] Lipid は BIO RAD (USA) より購入した。ヒト舌癌細胞由来 HSC-3 細胞は JCRB 細胞バンクより購入した。培地は DMEM に硫酸ゲンタマイシン (50 µg/ml)、ファンギゾン (250 ng/ml) と FBS (10%) を添加したものを使用し、インキュベーター (37°C, 95% air / 5% CO₂) で培養した。細胞数はコールターカウンター (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) を用いて計測した。

細胞の高密度培養

BRAK の遺伝子発現を上昇させる刺激として HSC-3 細胞を高密度で培養した。プレコンフルエントになった HSC-3 を 0.38, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 × 10⁵ cells/cm² の濃度で播種した。播種後 1 日後に細胞を回収し、解析に用いた。マイクロアレイに用いたサンプルは、細胞を 0.38 × 10⁵ cells/cm² と 6.0 × 10⁵ cells/cm² 濃度で播種して得られた試料を比較検討した。

RT-PCR 法

TRIzol[®] を用いてトータル RNA を回収後、SuperScript II 逆転写酵素で cDNA を作製した。PCR 反応は ExTaqDNA ポリメラーゼ及び SYBR[®] Green qPCR Master Mix (qPCR) を用いて行った。ExTaqDNA ポリメラーゼで増幅したサンプルは、1.5% アガロースゲルを用いて電気泳動後、エチジウムブロマイド染色で可視化した。

マイクロアレイ及びデータマイニング

HSC-3 細胞を 0.38 × 10⁵ cells/cm² と 6.0 × 10⁵ cells/cm² の濃度で播種し、1 日後、TRIzol[®] を用いてトータル RNA を回収した。回収したサンプルは凍結し、マイクロアレイ解析を、ドラゴンジェノミクス (タカラバイオ株式会社) に委託した。マイクロアレイ解析の結果をもとに、ナラプロテクノロジーにてデータマイニングを行った。ナラプロテクノロジーはこれまでに報告されている論文などより分子名などのキーワードを抽出・保管している企業である。方法としては、まず、BRAK の転写開始領域の上流より、転写因子結合配列を検索した。その後、高密度培養で BRAK と同時に遺伝子発現変動を示す遺伝子群を選択、選択した遺伝子名と共に記載されている転写因子名を抽出した。抽出した転写因子の結合配列が BRAK の転写開始領域上流に存在するかどうかを検討することで、BRAK の発現上昇に寄与する転写因子のスクリーニングを行った。

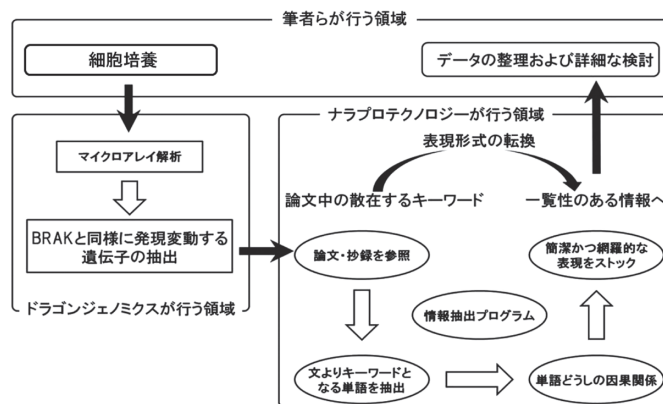


Fig.1 本研究のスキーム

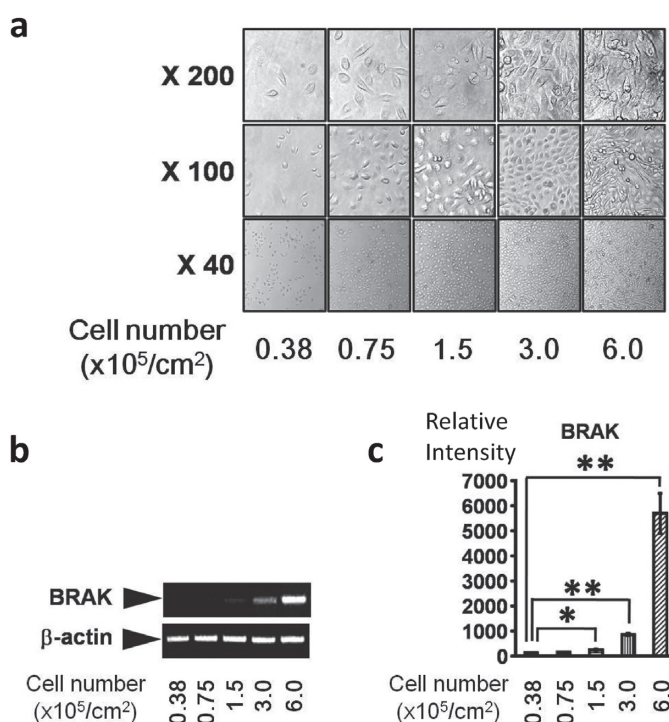


Fig.2 高密度細胞培養によりBRAKの遺伝子発現は上昇する

プレコンフルエントになったHSC-3を0.38, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0 $\times 10^5$ cells/cm²の濃度で播種し, 1日後の顕微鏡像を示した (a)。細胞を播種後1日目で回収し, TRIzol[®]を用いてトータルRNAを回収後, SuperScript II 逆転写酵素でcDNAを作製した。PCR反応はExTaqDNA ポリメラーゼ及びSYBR[®] Green qPCR Master Mix (qPCR)を用いて行い, BRAKの遺伝子発現を検出した。BRAK cDNAの寒天ゲル電気泳動図を (b) に, その相対発現量を (c) に示した。*, **とも0.38 $\times 10^5$ /cm²の細胞濃度と比較し, 有意にBRAK発現量の上昇を認めることを示している。

Sh-RNAの導入

Sh-RNA導入によるBRAKの遺伝子発現についてRT-PCR及びqPCRで検討を行った。プレコンフルエントになったHSC-3細胞を0.38 $\times 10^5$ cells/cm²で播種し, 1日後, siLentFect[™] Lipidを用いて導入した。使用したSh-RNAはQiagen社から購入した。Sh-RNAを導入し, 2日後, TRIzol[®]を用いてトータルRNA

を回収した。BRAKの遺伝子発現についてRT-PCRで検討した。また, コントロールとの発現量の比較はqPCR法を用いて解析した。

細胞密度によるBRAK遺伝子発現上昇とSP1との関係についての検討

プレコンフルエントになったHSC-3細胞を0.38 $\times 10^5$ cells/cm²で播種し, 1日後, SP1に対するSh-RNA

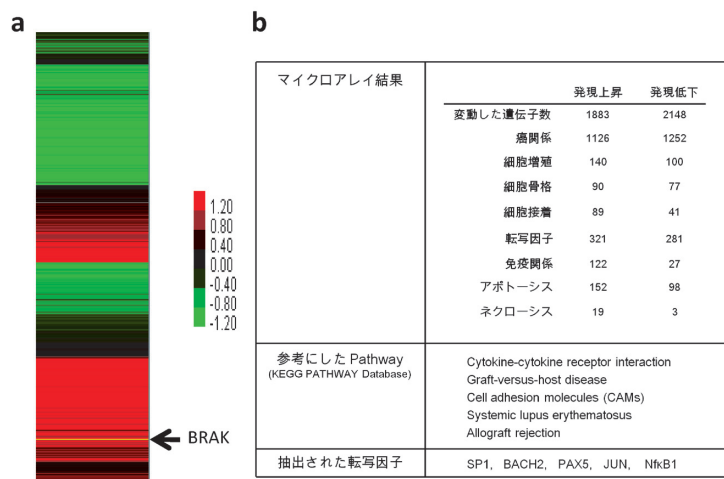


Fig.3 DNAマイクロアレイ法により検出された遺伝子とデータマイニングで抽出されたBRAK転写因子候補
マイクロアレイ図をaに、その解析結果をbに示した。高密度培養で発現上昇を示す遺伝子（緑色）は1883個、発現が低下する遺伝子（赤色）は2148個存在した（a）、矢印はBRAK遺伝子を示す。高密度培養刺激で遺伝子発現が変動した遺伝子群を癌関係、細胞増殖、細胞骨格、細胞接着、転写因子、免疫関係、アポトーシス誘導因子、ネクローシス誘導因子に群分けし、それぞれの遺伝子の発現制御に関わるシグナル伝達経路を、KEGG PATHWAY等を参考にしたところ、SP1、BACH2、PAX5、JUN、NFκBがBRAKの発現上昇に関与する可能性が示された（b）。

をsiLentFect™ Lipidを用いて導入した。さらに1日後、細胞を 0.38×10^5 cells/cm²と 6.0×10^5 cells/cm²の濃度で播種し、2日後にTRIzol®を用いてトータルRNAを回収した。BRAKの遺伝子発現についてRT-PCRで検討した。また、コントロールとの発現量の比較はqPCR法を用いて解析した。

統計学的解析：2群間の比較にはStudent's T testを用い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

Fig.1に実験方法の概要を示した。HSC-3を0.38, 0.75, 1.5, 3.0, 6.0×10^5 cells/cm²の濃度で播種した時の細胞の形態をFig.2aで示した。1.5 $\times 10^5$ cells/cm²以上の密度で明らかな細胞間接着が確認された。また、高密度で培養しても細胞間接着は存在し、細胞死を示す所見は確認されなかった。BRAKの遺伝子発現に関しても細胞接着がみられるようになる1.5 $\times 10^5$ cells/cm²の密度になるとBRAKの遺伝子発現が確認されるようになった（Fig.2b,c）。また、BRAKの遺伝子発現は密度依存的に上昇することがqPCRにて確認された。明らかなBRAKの遺伝子発現量の差が確認された0.38 cells/cm²と 6.0×10^5 cells/cm²の密度間で、マイクロアレイ解析及びBRAKの遺伝子発現上昇に関与する転写因子を同定するためのデータマイニングを行うこととした。

マイクロアレイの解析結果としては、高密度培養で発現上昇を示す遺伝子は1883個、発現が低下する遺

伝子は2148個存在した（Fig.3）。高密度培養刺激で遺伝子発現が変動した遺伝子群を癌関係、細胞増殖、細胞骨格、細胞接着、転写因子、免疫関係、アポトーシス誘導因子、ネクローシス誘導因子に群分けした。

それぞれの遺伝子の発現制御に関わるシグナル伝達経路を、KEGG (Kyoto Encyclopedia Genes and Genomes) PATHWAY等を参考にしたところ、SP1、BACH2、PAX5、JUN、NFκBがBRAKの発現上昇に関与する可能性が示された（Fig.3）。その後、BRAKの転写開始領域上流に存在する転写因子結合配列を検索すると21の転写因子が結合しうることが明らかとなり、前述した5つの転写因子でBRAKの上流に結合するものはSP1のみであった。

ナラプロテクノロジーのデータマイニングで抽出されたSP1がBRAKの発現上昇に寄与する転写因子として正しいかどうかを検討するため、SP1特異的Sh-RNAをHSC-3細胞に導入し確認した。SP1に対するSh-RNAを細胞に導入すると、SP1の遺伝子発現低下に伴い著しいBRAKの遺伝子発現の低下が確認された（Fig.4a, b）。本研究結果より、SP1はBRAKの発現上昇に関与する転写因子であることが明らかとなった。そこで、細胞密度刺激によるBRAKの発現上昇機構はSP1の活性化を介して生じると判断し、BRAKの遺伝子配列に非特異的なSh-scramble遺伝子を導入したHSC-3細胞とSh-RNAを用いて一過的にSP1の発現が低下しているHSC-3細胞を作製し、細胞密度刺激を行ったところ、Sh-RNA導入HSC-3細胞の

SP1はBRAK発現上昇に関与する

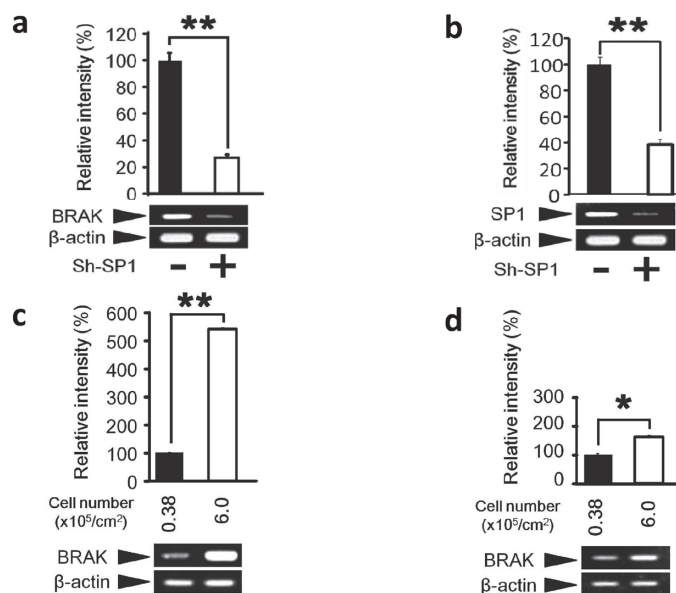


Fig.4 Sh-RNAによるBRAKの発現抑制

プレコンフルエントになったHSC-3細胞を 0.38×10^5 cells/cm²で播種し、1日後、SP1に対するSh-RNAをsiLentFect™ Lipidを用いて導入した。さらに1日後、細胞を 0.38×10^5 cells/cm²と 6.0×10^5 cells/cm²の濃度で播種し、2日後にTRIzol®を用いてトータルRNAを回収した。BRAKの遺伝子発現についてはRT-PCR法で検出した。また、コントロールとの発現量の比較はqPCR法を用いて解析した。SP1に対するSh-RNAを細胞に導入すると、BRAK遺伝子の発現低下が認められた (a)。また、当然のこととしてSP1の遺伝子発現低下も認められた (b)。一方、BRAKの遺伝子配列に非特異的なSh-scramble遺伝子を導入したHSC-3細胞 (c) では、高密度培養 (6.0×10^5 cells/cm²) 刺激でコントロールに比べ5倍以上のBRAK遺伝子の発現上昇を認めたが、BRAK遺伝子に特異的なSh-RNAを導入したHSC-3細胞では、ほとんど発現上昇を認めなかった (d)。*、**はコントロールと比較し統計学的に有意差ありを示す。

高密度培養によるBRAKの発現上昇が、抑制される結果を得た (Fig.4c, d)。

考 察

転写因子を同定するためには、標的とする遺伝子に対して、その遺伝子発現を変化させる刺激、プロモーター領域に存在する転写因子結合配列、そしてその配列に結合しうる転写因子を文献的に検索した後、プロモーターアッセイ、ChIPアッセイ、ゲルシフトアッセイ等を行わなければならない^{15,16,17}、専門的知識と手技を必要とし、多くの時間と費用を要する。

今回、我々が使用した手法としては、細胞培養技術と細胞への遺伝子導入技術のみで、非常に簡便なものである。文献の検索においては、ナラプロテクノロジーがさまざまな文献のキーワードを保管しており、そのデータから関連性がある因子を統計学的に抽出することで、依頼者の求めている遺伝子をスクリーニングすることが可能となった。このスクリーニングは情報量が多ければ多いほど信頼性が増す。このことから分子生物学のなかで最も情報量を多く獲得できる手法の一

つであるマイクロアレイ解析を使用し、BRAKと同様の刺激で変動する遺伝子をキーワードとすることで、関連性のある転写因子の検索を行うことができた。

今回使用したマイクロアレイのチップとして、ヒトの約1万遺伝子を1枚のスライドガラス上に搭載したものを使用した。細胞を高密度培養することによって、BRAKと共に変動した遺伝子のうちで、発現が上昇した遺伝子が1883個、発現低下した遺伝子2148個が明らかになり、その遺伝子の発現パターンを解析したところ、BRAKの遺伝子発現パターンと類似した転写因子が群分けされた。マイクロアレイを使用しない場合には、データの収集方法は、主に文献を研究者自身で検索するが、マイクロアレイ解析は、一つの実験を行うことで、同時に4031個の遺伝子をキーワードとすることが出来た。このことから、データマイニングに必要な情報を収集する手法として、マイクロアレイ解析は理想的であると考えられた。

現在、ヒトのゲノム上には転写因子としてコードされている遺伝子は約1800個存在すると報告されている。今回使用した手法を用いることにより、その中

から BRAK の発現上昇に關与する転写因子の候補遺伝子を 5 つまで絞ることが可能となり、SP1 の同定までの道のりは非常に容易であった。それぞれの転写因子に対する Sh-RNA の使用に併せて文献的にも検索を行ったところ、高密度培養法によって細胞間接着が E カドヘリンを活性化させ、PI3K にシグナルを伝達することで小胞体からのカルシウムイオン放出を促すことが報告されている¹⁸⁾。放出されたカルシウムはカルモジュリンと結合し、下流に存在する SP1 を活性化することが知られていることから、高密度培養による BRAK の遺伝子発現上昇に SP1 が關与している可能性の裏付けとなった。またさらに、肺癌では BRAK のプロモーター領域がメチル化していることにより BRAK の遺伝子発現が消失していることが明らかとなっているが、メチル化部位に結合する転写因子については現在のところ報告されていない。今回、抽出された SP1 はメチル化の影響を受ける GC Box に結合する転写因子であり、肺癌の発現消失はメチル化によって SP1 が GCBox に結合できないことによる可能性が考えられた。

本研究で我々は、データマイニングを利用した分子の検索方法が、BRAK の遺伝子発現上昇に關与する転写因子の同定に非常に有効であることを確認した。

結 語

マイクロアレイ解析及びナラプロテクノロジーによるデータマイニングを利用した未知なる分子の検索方法で、BRAK の遺伝子発現上昇に關与する転写因子が SP1 であることを同定することができた。この検索方法は転写因子のみならず細胞内シグナル伝達に關与する分子や受容体の検索など幅広いものに应用することができると考えられる。

参 考 文 献

- Hromas R, Broxmeyer HE, Kim C, Nakshatri H, Christopherson K 2nd, Azam M, Hou YH. Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **255**(3): 703-6, 1999.
- Ozawa S, Kato Y, Komori R, Maehata Y, Kubota E, Hata R. BRAK/CXCL14 expression suppresses tumor growth in vivo in human oral carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **348**(2): 406-12, 2006.
- Ozawa S, Kato Y, Kubota E, Hata R. BRAK/CXCL14 expression in oral carcinoma cells completely suppresses tumor cell xenografts in SCID mouse. *Biomed Res* **30**(5): 315-8, 2009.
- Shellenberger TD, Wang M, Gujrati M, Jayakumar A, Strieter RM, Burdick MD, Ioannides CG, Efferson CL, El-Naggar AK, Roberts D, Clayman GL, Frederick MJ. BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. *Cancer Res.* **64**(22): 8262-70, 2004.
- Sleeman MA, Fraser JK, Murison JG, Kelly SL, Prestidge RL, Palmer DJ, Watson JD, Kumble KD. B cell- and monocyte-activating chemokine (BMAC), a novel non-ELR alpha-chemokine. *Int Immunol.* **12**(5): 677-89, 2000.
- Shurin GV, Ferris RL, Tourkova IL, Perez L, Lokshin A, Balkir L, Collins B, Chatta GS, Shurin MR. Loss of new chemokine CXCL14 in tumor tissue is associated with low infiltration by dendritic cells (DC), while restoration of human CXCL14 expression in tumor cells causes attraction of DC both in vitro and in vivo. *J Immunol.* **174**(9): 5490-8, 2005.
- Izukuri K, Suzuki K, Yajima N, Ozawa S, Ito S, Kubota E, Hata R. Chemokine CXCL14/BRAK transgenic mice suppress growth of carcinoma cell transplants. *Transgenic Res* **19**: 1109-1117, 2010.
- Ikoma T, Ozawa S, Suzuki K, Kondo T, Maehata Y, Lee MC, Hata R, Kubota E. Calcium-calmodulin signaling induced by epithelial cell differentiation upregulates BRAK/CXCL14 expression via the binding of SP1 to the BRAK promoter region. *Biochem Biophys Res Commun.* **420**(2): 217-22, 2012.
- Ozawa S, Kato Y, Komori R, Maehata Y, Kubota E, Hata R. BRAK/CXCL14 expression suppresses tumor growth in vivo in human oral carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **348**(2): 406-12, 2006.
- Ozawa S, Kato Y, Ito S, Komori R, Shiiki N, Tsukinoki K, Ozono S, Maehata Y, Taguchi T, Imagawa-Ishiguro Y, Tsukuda M, Kubota E, Hata R. Restoration of BRAK/CXCL14 gene expression by gefitinib is associated with antitumor efficacy of the drug in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* **100**(11): 2202-9, 2009.
- Komori R, Ozawa S, Kato Y, Shinji H, Kimoto S, Hata R. Functional characterization of proximal promoter of gene for human BRAK/CXCL14, a tumor-suppressing chemokine. *Biomed. Res* **31**: 123-131, 2010.
- Frederick MJ, Henderson Y, Xu X, Deavers MT, Sahin AA, Wu H, Lewis DE, El-Naggar AK, Clayman GL. In vivo expression of the novel CXC chemokine BRAK in normal and cancerous human tissue. *Am J Pathol.* **156**(6): 1937-50, 2000.
- Sleeman MA, Fraser JK, Murison JG, Kelly SL, Prestidge RL, Palmer DJ, Watson JD, Kumble KD. Cloning of BRAK, a novel divergent CXC chemokine preferentially expressed in normal versus malignant cells. *Biochem Biophys Res Commun.* **255**(3): 703-6, 2000.

14. Tessema M, Klinge DM, Yingling CM, Do K, Van Neste L, Belinsky SA. Re-expression of CXCL14, a common target for epigenetic silencing in lung cancer, induces tumor necrosis. *Oncogene*. **29**(37): 5159-70, 2010.
 15. Zhu LH, Qiu LZ, Ren W, Zhou GP. Upregulation of a spliced variant of human interferon regulatory factor 3 through binding of the transcription factor Sp1 to the promoter. *Biomed Rep* **2**(1): 142-146, 2014.
 16. Govindaraju S, Lee BS. Krüppel-Like Factor 8 is a Stress-Responsive Transcription Factor that Regulates Expression of HuR. *Cell Physiol Biochem*. **34**(2): 519-32, 2014.
 17. Wobus M, Wandel E, Prohaska S, Findeiss S, Tschöp K, Aust G. Transcriptional regulation of the human CD97 promoter by Sp1/Sp3 in smooth muscle cells. *Gene*. **413**(1-2): 67-75, 2008.
 18. Xie Z, Bikle DD. The recruitment of phosphatidylinositol 3-kinase to the E-cadherin-catenin complex at the plasma membrane is required for calcium-induced phospholipase C-gamma1 activation and human keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* **282**(12): 8695-703, 2007.
-