

腫瘍微小環境におけるEndMT制御機構の解明

著者	永井 直
学位授与年月日	2017-09-15
URL	http://doi.org/10.15083/00077643

内皮間葉転換 (EndMT) は、内皮細胞が間葉系細胞に分化転換する現象である。本来は発生期の心臓形成過程でのみ生理的に誘導される現象であるが、がんや線維症といった疾患においても血管内皮細胞の EndMT が誘導され、病態の進行に寄与していることが近年報告されている。「腫瘍微小環境における EndMT 制御機構の解明」と題する本論文は、特に固形がんで病的に誘導される EndMT に注目し、その誘導原理や腫瘍進展への寄与を解析した論文である。

本論文は、序論 (第 1 章)、総論 (第 8 章)、結語 (第 9 章)、および研究内容 (第 2 章～第 7 章) で構成される。

第 2 章では、「血管内皮細胞系譜を規定する転写因子の発現低下によって血管内皮細胞の EndMT が誘導される」という先行研究で得たコンセプトの下、近年血管内皮細胞における機能の重要性が急速に明らかになっている 2 つの ETS ファミリー転写因子 ERG および FLI1 を同時にノックダウンすることによって、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の EndMT を誘導できることを見出した。この変化は mRNA レベル、蛋白質レベルにおける内皮マーカーと間葉マーカーの発現変化に留まらず、機能的な内皮形質の喪失と、形態的な間葉系細胞様への変化を伴うことも示した。

第 3 章～第 5 章では、ERG および FLI1 をダブルノックダウンすることによって EndMT が誘導されるメカニズムの解析を行った。

まず第 3 章では、HUVEC における ERG、FLI1 の質の高い ChIP-seq データの取得に成功した。ピークの分布解析やモチーフ解析など必要なインフォマティクス解析を一通り行ったことに加え、ピークの最近接遺伝子の機能を Gene ontology 解析することにより、やはりこれらの転写因子が血管内皮細胞の機能に深く関連する可能性を見出した。

さらに第 4 章では、H3K4me3、H3K27Ac (siControl vs siERG+siFLI1) の ChIP-seq データを取得した。血管内皮細胞の機能に関連が深い遺伝子の近傍で ChIP-seq データを確認すると、転写開始点上流で ERG/FLI1 および H3K27Ac のピークがよくオーバーラップしており、この H3K27Ac のピークは siERG+siFLI1 処理によって大きく低下することが観察された。これは、ERG、FLI1 が広範な血管内皮細胞特異的遺伝子群を直接転写活性化できることを表していた。これを以て、ERG および FLI1 の発現低下によって内皮形質が喪失されるメカニズムが説明された。一方、ERG および FLI1 の発現によって発現が上昇する遺伝子群で H3K4me3 あるいは H3K27Ac の上昇が見られたこと、これらヒストンマークのピークには必ずしも ERG/FLI1 のピークのオーバーラップが見られなかったことは興味深い知見であった。つまり、ERG および FLI1 の発現低下は、両転写因子が直接結合する領域以外にも劇的なエピゲノム変化を与え、EndMT 現象を導くものであった。

第 5 章では、これまでの遺伝子発現マイクロアレイおよび ChIP-seq のデータを統合し、EndMT によって発現が上昇する遺伝子群よりも低下する遺伝子群の方が ERG/FLI1 の直接の制御を受けている傾向を見出した。そこで、「ERG および FLI1 が抗 EndMT 因子の発現を促進することによって EndMT を抑制している」という仮説の下、過去に EndMT を抑制することが報告されていた microRNA-126 (miR-126) の重要性を示した。miR-126 は血管内皮細胞特異的な microRNA であることから予想されたように、やはり ERG/FLI1 が直接発現を促進していることが ChIP-seq データから明確に示されており、実際に siERG+siFLI1 処理によって発現の低下が見られた。そこで、

siERG+siFLI1 処理した HUVEC に miR-126 をトランスフェクションした結果、EndMT の誘導が部分的にキャンセルできることを示した。以上から、ERG および FLI1 の発現低下を介した EndMT の誘導機構として、これら転写因子が発現を促進する miR-126 の発現低下があることを示した。

第 6 章では、腫瘍組織において、血管内皮細胞における ERG および FLI1 の発現が低下していることを免疫染色の手法で見出した。これにより、前章までに示した EndMT が *in vivo* のがん病態においても誘導されていることが強く示唆された。腫瘍微小環境下で ERG および FLI1 の発現が低下する要因としては、ひとつには液性因子の作用があることを提案した。

第 7 章では、EndMT ががん病態に与える影響について可能性を模索した。siERG+siFLI1 処理により EndMT を経た HUVEC ががん細胞株を強く誘引する能力を獲得することを見出した。これは、EndMT を経た血管内皮細胞ががん細胞を血管に誘引し、がんの血行性転移を促進するメカニズムとなり得ることを提案した。さらに、EndMT ががん病態に与える実際の影響を個体レベルで解析するツールとして、血管内皮細胞特異的な Erg ノックインマウスを作製するという試みが見られた。

以上のように本研究は、EndMT の全く新しい誘導機構を解明し、さらにその過程で ERG および FLI1 の血管内皮細胞における機能を網羅的に明らかにした。また、EndMT の腫瘍進展への寄与については、これまで世界的にも詳細な報告が為されていなかった中で、ひとつの仮説を提案し、実際に個体レベルで解析する準備も整えた。よって本研究は、腫瘍生物学および血管生物学の双方に新規性の高い基礎的知見を与えるのみならず、EndMT を標的としたがんやその他の疾患の新しい治療法の開発につながるものであり、医学・薬学分野に資するところが大きい。よって本論文は博士（薬科学）の学位請求論文として合格と認められる。