

論文の内容の要旨

論文題目 The miR-199a/Brm/EGR1 axis is a determinant of anchorage-independent growth in epithelial tumor cell lines

(上皮がん由来の細胞株において、miR-199a/Brm/EGR1 axis は足場非依存性増殖に重要な役割を果たす)

氏名 小林 和善

SWI/SNF 複合体は約 10 個のサブユニットからなるクロマチン構造変換因子であり、触媒サブユニットとして Brm または BRG1 のいずれかを一分子持ち、その ATPase 活性によりクロマチン構造を変換する。SWI/SNF 複合体自身は固有の DNA 結合配列は持たないが、様々な転写因子と直接またはアダプター分子を介し間接的に結合することにより、特定のプロモーターに動員され、遺伝子発現をエピジェネティカルに制御する。Brm と BRG1 は 75% のアミノ酸の同一性を持つが、その標的は完全に一致しているわけではなく、その機能にも明らかな違いが認められていることが報告されている。SWI/SNF 複合体のサブユニットはしばしば多くのがんで変異が認められており、特に Brm は肺がん、胃がん、子宮頸がん等、がん全体の 30% で発現欠失が認められていて、がん抑制遺伝子として機能すると考えられている。しかしながら、一方でその発現抑制が抗腫瘍効果を示す報告もあり、がん活性との関わりは未だ不明な点が多い。

我々の研究室ではこれまで Brm の発現欠失は miRNA の miR-199a による転写後抑制であることを示し、さらに miR-199a は転写因子 EGR1 によって発現誘導されること、一方で Brm が EGR1 を負に制御することを示し、上皮がん由来の細胞株は Brm/miR-199a/EGR1 の double negative feedback loop を形成し、その多くは type 1: Brm(+), miR199a (-), EGR1(-) と type 2: Brm(-), miR199a(+), EGR1(+ ) の 2 種のいずれかの表現型を示すことを報告してきた (図 A)。

以上の背景をもとに、本研究では Brm のがん形質に果たす役割を解明することを目的と

して、以下の実験を行った。

まず上記の 2 群に分けた細胞株 (type 1: 8 種、type 2: 4 種)の種々の生物活性の差異を調べた。その結果、type 1 の細胞群は軟寒天中でのコロニー形成活性を有するが、type 2 の細胞群ではこの活性をもたないという明確な差異が観察された (図 B)。これは複数種の type 1 の細胞に Brm を knockdown する short hairpin (sh)RNA を導入した細胞においても軟寒天中でのコロニー形成能の低下がみられたことから Brm は軟寒天中でのコロニー形成に必須であることが示唆された。

上述の通り、Brm は遺伝子発現をエピジェネティカルに制御していることから、type 1 特異的に発現する遺伝子がこの活性に関与すると考え、両者で発現様式が異なる遺伝子のスクリーニングを miR-199a-5p, -3p, -214 の標的と知られる遺伝子を中心に行った。その結果、32 遺伝子(miR-199a-5p の標的 : 12 種、miR-199a-3p の標的 : 14 種、miR-214 の標的 : 6 種)中、*CAV1* (miR-199a-5p target), *CD44*, *MET*, *CAV2* (miR-199a-3p target)といった遺伝子が type 1 特異的な発現を示した(図 C)。これは、Western Blot 法によるタンパク質レベルの解析でも type 1 特異的な発現様式を示すことを確認した。実際にこれら type 1 特異的な遺伝子が軟寒天中でのコロニー形成能に必須であることを確認するため、それぞれの遺伝子に対して 2 種の shRNA を作製し、type 1 の細胞に導入し軟寒天中でのコロニー形成試験を行ったところ、すべての shRNA は解析したほぼすべての細胞に対して、軟寒天での腫瘍形成能を有意に低下させた。このことから、type 1 特異的な遺伝子は軟寒天中でのコロニー形成能に重要な役割を果たすことが明らかとなった。

次に実際に、これら遺伝子の多くがその発現に Brm を必要とすることを確認するために type 2 の細胞である SW13 細胞に Brm 発現 Vector を transient に導入し、transfection 48 時間で RNA を回収し、その後 quantitative RT-PCR (qPCR)法により type 1 特異的な遺伝子の発現を解析したところ、*CD44*, *MET*, *CAV1* の発現上昇がみられた。この発現上昇は、NFκB のサブユニットを同時に transfection した際に、*CD44* および *CAV1* においては Brm 単独より発現上昇が認められたので、type 1 の細胞では *CD44*、および *CAV1* の発現には SWI/SNF 複合体と NFκB の両者がそれぞれのプロモーター上に動員されることにより発現が正に制御されていることが示唆された。次に、複数種の type 1 の細胞株に Brm の shRNA をレトロウィルスベクターで stable に導入した細胞を準備し、RNA 回収後、qRT-PCR 法により解析したところ、Control に対して *CD44*, *MET* の発現抑制が有意にみられた。以上の結果から、*CD44* および *MET* は Brm および miR-199a の制御下にあることが示唆された(図 D 左)。

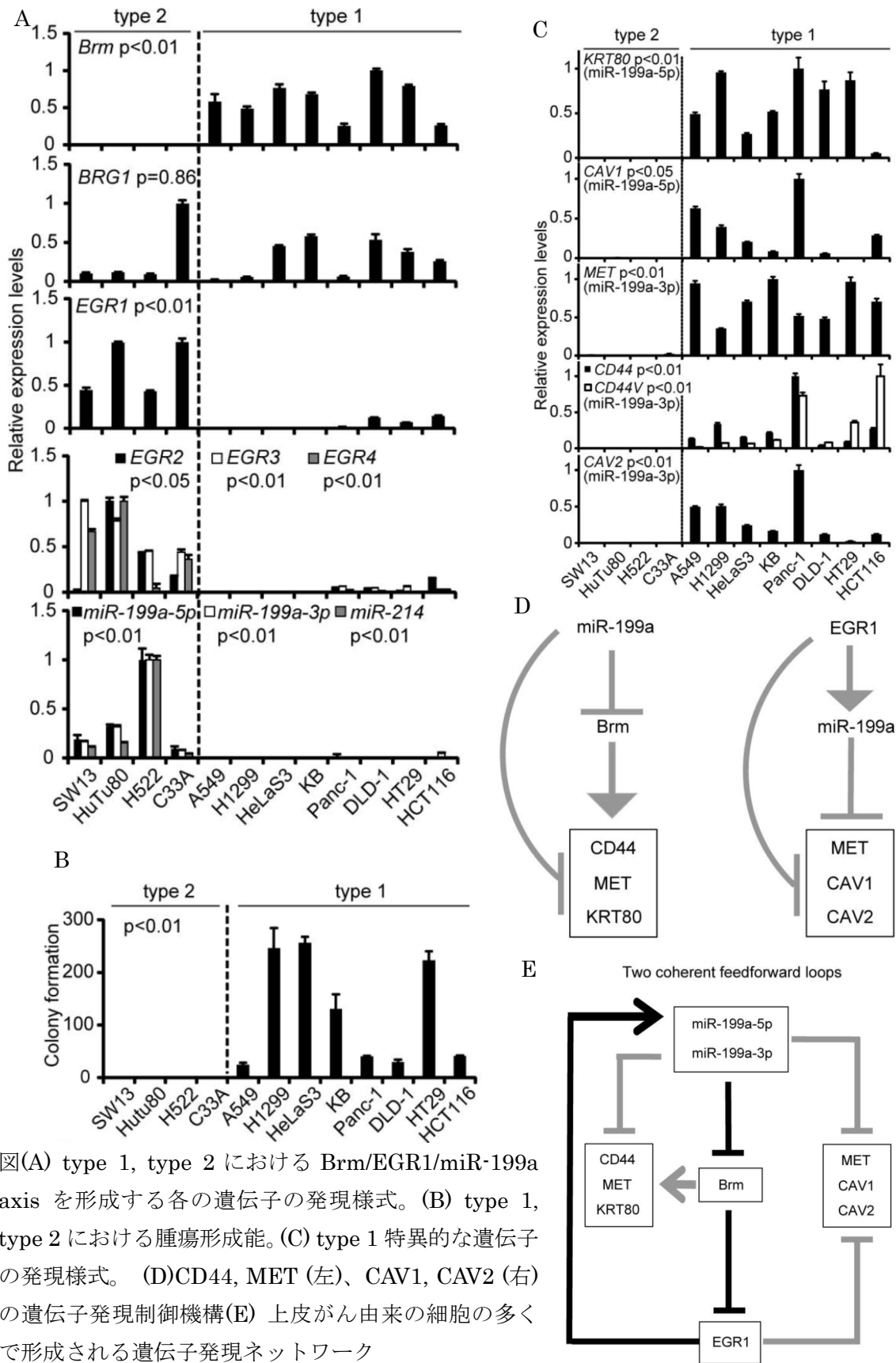
次に *CAV1*, *CAV2* の遺伝子発現制御機構を明らかにするために、それぞれのプロモーター解析を行った。その結果、*EGR1* の結合配列が *CAV1*, *CAV2*, *MET* のプロモーター上に存在することが確認された。そこで、*EGR1* がこれらの発現に抑制的に働くのではないかと考え、type 1 の細胞に *EGR1* 発現ベクターを retro virus vector で導入し、タンパクおよび RNA を回収し解析をおこなったところ、*CAV1*, *CAV2*, *MET* の抑制が認められた (図 D

右)。

以上の結果から、Brm, EGR1, miR-199a, これらの標的遺伝子群は coherent な feedforward loop により、安定した発現制御が形成されるが示唆され、軟寒天中でのコロニー形成能に重要な役割を持つことが示唆された(図 E)。

これまでの実験結果は 12 種の cell line で行われていたものであるため、この axis はこの細胞群特異的に形成されている可能性がある。そこで、Brm/EGR1/miR-199a-3p の axis が多様ながん種由来の cell line でも形成されるかを、すでに我々や他のグループで Brm の発現の有無が報告されている細胞を対象として解析を行った。その結果、細胞株 26 種中、23 種においてこの axis が成立していることが明らかとなった。特に CD44 や MET もこの axis との相関性は 23 種においても有意に認められた (CAV1 および CAV2 についてはいくつか例外的なものも認められた)。

最後に、本研究で見出された axis が *in vivo* でも成立するかを解析するために、藤田衛生保健大学医学部第一病理学教室の稲田健一准教授、塩竈和也助教との共同研究により、ヒト肺扁平上皮癌の病理サンプル(24 症例)を用いて免疫化学染色法 (Brm, CD44, MET, CAV1)および *in situ* Hybridization 法 (miR-199a-5p)を用いた解析を行った。症例によって、type 1 や type 2 に別れることはなく、ほぼすべての症例は type 1 様の染色性を示した。しかしながら、面白いことにその中で角化と呼ばれる終末分化が起きているサンプルが 4 症例あり、そのすべてで未分化な細胞が type 1 様の染色性を示し、角化 (分化)をおこした部位で type 2 様の染色性を示す結果が得られた。この結果は、より未分化で増殖能が高い部位で type 1 様の発現様式が認められ、分化すると type 1 から type 2 へ switching することが示唆された。さらに *in vitro* で認められた軟寒天中でのコロニー形成能の結果に相関性が認められ、*in vivo* でも上記の遺伝子制御ネットワークが成立することが明らかとなった。



図(A) type 1, type 2 における Brm/EGR1/miR-199a axis を形成する各の遺伝子の発現様式。(B) type 1, type 2 における腫瘍形成能。(C) type 1 特異的な遺伝子の発現様式。(D)CD44, MET (左)、CAV1, CAV2 (右)の遺伝子発現制御機構(E) 上皮がん由来の細胞の多くで形成される遺伝子発現ネットワーク