

博士論文

次世代シーケンサーを用いた乳腺上皮細胞における

TGF- β シグナルの解析

荒瀬 麻友

目次

要旨	3
序論	4 - 20
1. 乳がんおよびその治療の現状	
2. がん細胞におけるアポトーシス	
3. EMT (上皮-間葉移行)	
4. TGF- β シグナル伝達機構	
5. long non-coding RNA と TGF- β シグナル・がん	
6. がん細胞のエピゲノム異常と転写制御機構	
実験手法と材料	21 - 31
実験結果	32 - 81
i) TGF- β 誘導性新規 lincRNA の同定と機能解析	
1. lincRNA は乳腺上皮細胞および乳がん細胞株において TGF- β により発現 が誘導される	
2. lincRNA-Smad7 のサイズおよび配列の同定と各 variants の発現	
3. lincRNA-Smad7 が乳がん細胞の腫瘍形成能に与える影響	

4. lincRNA-Smad7 によるアポトーシス制御	
5. lincRNA-Smad7 によるアポトーシス関連因子の制御	
6. EMT およびその他のシグナルへの lincRNA-Smad7 の関与	
ii) FAIRE-sequencing を用いた EMT 獲得前後のクロマチンの状態変化	
7. TGF- β シグナルによる EMT の獲得	
8. TGF- β および Ras 活性化によるクロマチンの状態変化	
9. FAIRE 領域の解析	
10. EMT 獲得における関連転写因子の網羅的解析	
考察	82 - 98
結論	99
引用文献	100 - 112
謝辞	113

要旨

本研究は、乳腺上皮細胞および乳がん細胞における TGF- β の組織・細胞特異的な転写制御機構を解明することを目的とした。前半部では、乳がん細胞での TGF- β 誘導性 lincRNA-Smad7 の同定・機能解析を行い、lincRNA-Smad7 が TGF- β の下流において抗アポトーシス作用を促進することを明らかにした。後半部では、FAIRE-sequencing を用いて乳腺上皮細胞における TGF- β 誘導性 EMT に伴う FAIRE 領域を解析し、TGF- β シグナルおよび Ras シグナルの活性化によるクロマチン構造変化を明らかにした。

序論

1. 乳がんおよびその治療の現状

日本では近年の高齢化や生活の変化に伴い、悪性腫瘍による死亡が年々増えている。現在では死因の約 3 割を占めており、今後もその増加が懸念されている。中でも乳がんは、近年女性がんにおいて急激に増加しており、部位別罹患率が高いがんである。2007 年の乳がん罹患数はおよそ 5 万 6000 人と推計され、2011 年の乳がんによる死亡数はおよそ 1 万 3000 人と報告されており、全がん罹患の約 2 割、全がん死亡の 1 割を占めている。

乳房には、乳腺と呼ばれる腺組織、脂肪組織、血管、神経などが存在している。乳がんは乳腺を構成する乳管や小葉の内腔に形成される悪性腫瘍であり、乳がんの約 90%が乳管に、5%が小葉内腔に発生する。その罹患率の増加は、年齢と生活様式の欧米化が関与していると予想されている。乳がんの発生は、25 歳から徐々に増え始め 30 歳代ではさらに増加し、40 歳代後半から 50 歳代にピークを迎えることから、日本人乳がんも高齢化を反映しつつある。また、日本

人女性の場合、乳がんの罹患率は 16 人に 1 人であるが、欧米人女性では 8～10 人に 1 人である。加えて、日本から欧米に移住した日本移民の罹患率が増加した報告からも、乳がんの発生は遺伝よりも環境や食生活の影響を強く受けることがわかっている。その一方で、乳がんの最も重要なリスク因子の一つとして家族歴が挙げられる。家族性乳がんは全体の 20%近くを占めており、中でも BRCA1 と BRCA2 の遺伝子座の変異は、優性遺伝する遺伝性乳がんのおよそ半分に見られる^[1]。しかしその他の原因遺伝子や感受性遺伝子の多くは同定されていない。

現在乳がんの治療は外科的切除が一般的であり、併用して化学療法、ホルモン療法、放射線療法が用いられる。ホルモン療法として、閉経前後に適した抗エストロゲン剤であるタモキシフェンやアロマターゼ阻害薬であるアナストロゾールが使用されている。また化学療法として、抗がん剤であるシクロホスファミドやフルオロウラシルなどが用いられる。さらに近年、分子標的薬の開発が進んだことから、他種がんに比べ乳がんの予後は比較的良好であり、5 年生存率は病期 II までで 90%を越える。しかし病期が進行するとともに 5 年生存率は低下し、病期 IV では 31%に至る。さらに再発率も高くなるため、早期発見・

早期治療が最重要であり、画像診断や細胞診断、遺伝子診断の技術が急速に進歩している。しかし、進行した病期では予後不良であることや、個別診断・治療法の進展、新規の素因遺伝子および分子治療標的の発見などを鑑みると、その研究・開発が必要とされている。

2. がん細胞におけるアポトーシス

生体を構成する各組織の細胞は通常細胞数を一定に保つため、厳密な制御下にあり、必要に応じて分裂・増殖を引き起こす^{[2][3][4]}。しかしがん細胞は、正常の制御機構を逸脱した分裂・増殖を繰り返し、その過程でがん細胞自身の生存に有利なゲノム異常を蓄積することで、その悪性度が高まっていくと考えられている。この過程において欠損をもった細胞、あるいは正しく機能をしていない細胞を除去する制御機構がアポトーシスである。アポトーシスは 1842 年に Vogt により初めて報告された、細胞内での代謝の異常や遺伝子の変異・損傷を受けると、個体を正常に保つため、それらの細胞の自殺、すなわちプログラムされた細胞死が引き起こされる現象である^{[5][6]}。また、アポトーシスは正常の発生過程において、指間膜やオタマジャクシの尾部の除去により組織を形作ると

いう機能を果たし、B細胞やT細胞集団の選択・排除も担っている^{[7][8]}。以上のようにアポトーシスは個体の健康と生存能力の維持において大きな役割を担うため、腫瘍や病原体もまた、自身の生存のためにアポトーシスの作用を無力化する機構を進化させてきた。p53の野生型アレルは細胞増殖抑制機能やアポトーシス誘導能を有するが、点突然変異が生じた場合は細胞増殖促進機能を獲得する^[9]。また、Rbの損失やc-mycの活性化による細胞分裂促進、BCL2の機能獲得によるアポトーシス経路の抑制は、結果としてがん細胞の無秩序な細胞増殖をもたらす^{[10][11][12]}。

3. EMT (上皮-間葉移行)

がん化した細胞は、EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition、上皮-間葉移行) を誘導することで、周囲の線維芽細胞などと相互作用しながら血管やリンパ管に浸潤し、遠隔臓器へと転移していく。EMTとは、上皮細胞が形態的・機能的に間葉系細胞へと変化する現象であり、胚発生や組織形成における重要性が議論されてきた^[13]。しかし近年では、炎症や組織損傷により生じる組織の線維化や、上述のがん細胞の浸潤・転移の過程においても同様の現象が関与することが知

られるようになった^[14]。EMT を起こした細胞は、E-cadherin などの上皮細胞接着分子の発現が抑制されることで細胞間の接着が低下し、一方で Fibronectin や N-cadherin などの間葉系のマーカーの発現が上昇する (図 1)^{[15][16]}。また、それら EMT マーカーの発現制御因子として、zinc-finger 型転写因子である Snail や Slug (Snai2)、 δ EF1/ZEB1 や SIP1/ZEB2、basic helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子である Twist や E12/E47 などが同定されている^[17]。さらに、これらの転写因子をがん細胞で過剰に発現させると、in vitro ならびに in vivo において運動能や浸潤能の亢進というがんの悪性度の促進が認められる^{[15][18]}。そのため発生学の分野のみならず、線維化やがんに対する治療への応用や病理診断という側面からも、EMT 制御機構の解明は重要となってきた。

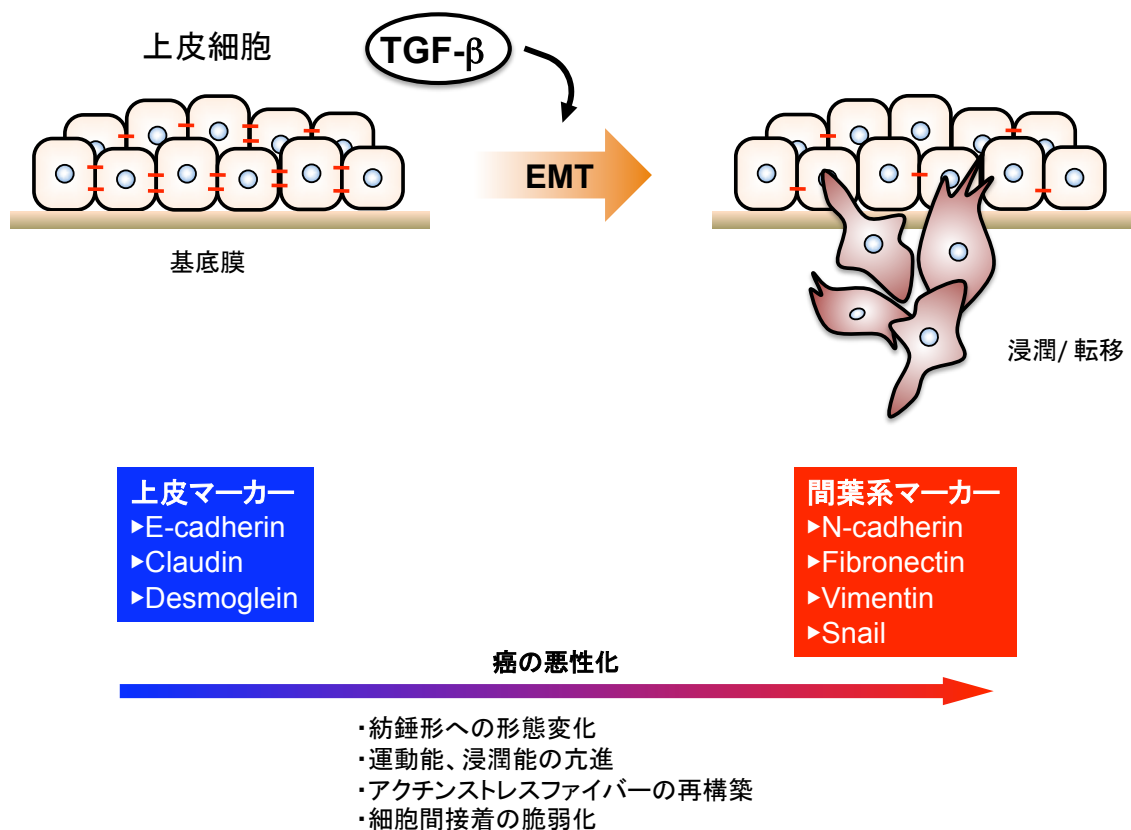


図 1. EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition; 上皮-間葉移行)

EMT は器官形成や創傷治癒、癌転移などにおいて認められる現象であり、上皮細胞が機能的、形態的に間葉系様に変化する。EMT を起こしたがん細胞は細胞間の接着や極性を失い、運動能や浸潤能を獲得する。これらのがん細胞は血管やリンパ管に浸潤し、転移巣を形成する。

4. TGF- β シグナル伝達機構

がん細胞において上述のアポトーシス、EMTのプロセスに深く関わるサイトカインとして TGF (Transforming Growth Factor) - β が知られる。TGF- β は、乳がん細胞において TGF- β シグナルの下流遺伝子である DEC1 を発現誘導することで抗アポトーシス作用を発揮し、がん細胞の生存を促進する^[19]。また、TGF- β は EMT の主たる誘導因子であり、乳がん細胞において Ras シグナルと協調的に Snail の発現を誘導したり、ESRP の発現制御により RNA のスプライシングを制御したりすることで、細胞を上皮型から間葉系型へ変化させる^{[20][21]}。

TGF- β は、TGF- β ファミリーと呼ばれる一群のサイトカインの代表的な因子である。その機能は多彩であり、細胞増殖や分化、アポトーシスなどの細胞応答、細胞運動、細胞外マトリックスの産生などを制御する^[22]。そのため、TGF- β シグナル経路の破綻により、様々な疾患が発生することが知られている^{[23][24]}。TGF- β ファミリーは、哺乳類では 30 種類以上の類似したタンパク質で構成されており、TGF- β の他に骨形成因子 (BMP: Bone Morphogenetic Protein)、Activin、Nodal などが存在する。これらの因子は、細胞膜上にある I 型、II 型の 2 種からなるセリン/スレオニンキナーゼ型受容体システムにより細胞内にシグナルを伝達する。

TGF- β ファミリー因子と II 型受容体 (T β RII) が結合すると、I 型受容体 (T β RI) とヘテロ 4 量体を形成する。これにより II 型受容体の恒常活性型キナーゼによって、I 型受容体のキナーゼドメインのアミノ末端側にある GS 領域がリン酸化を受け、活性化される。哺乳類においては 7 種類の I 型受容体が存在し、Activin receptor-like kinase (ALK) 1~7 という名称で呼ばれ、各種異なる TGF- β ファミリー因子と結合する。具体的に、TGF- β と activin はそれぞれ ALK-5 と ALK-4 に結合し、nodal は ALK-4 と ALK-7 に結合する。BMP は ALK-2、ALK-3、ALK-6 を活性化する。血管内皮細胞では ALK-1 が高発現しており、TGF- β と BMP が結合する。活性化した I 型受容体を含む受容体複合体は、主に Smad と呼ばれるタンパク質群にシグナルを伝達している。Smad は哺乳類で 8 種類が知られ、それぞれ機能の異なる特異型 R-Smad (receptor-regulated Smad)、共有型 Co-Smad (common-mediator Smad)、抑制型 I-Smad (inhibitory Smad) の 3 つに分類される。

R-Smad として、TGF- β や activin、Nodal のシグナルを担う Smad2、3 と BMP シグナルを担う Smad1、5、8 が知られている。R-Smad はそのカルボキシ末端にあるセリン残基がリン酸化を受け、Co-Smad である Smad4 とヘテロ 3 量体 (Smad 複合体) を形成し核内へと移行する。その複合体は種々の転写因子や転写共役因

子と結合して、標的遺伝子の転写を調節する (図2) ^{[25][26]}。I-Smad である Smad6、7 は、TGF- β ファミリーを負に制御する代表的な標的遺伝子である。Smad6、7 は TGF- β 依存的に発現が誘導され、I型受容体に結合することにより R-Smad のリン酸化を阻害し、ネガティブフィードバック機構を形成する。Smad6 は BMP シグナルを、Smad7 は TGF- β 、BMP シグナル両者のシグナルを制御する。

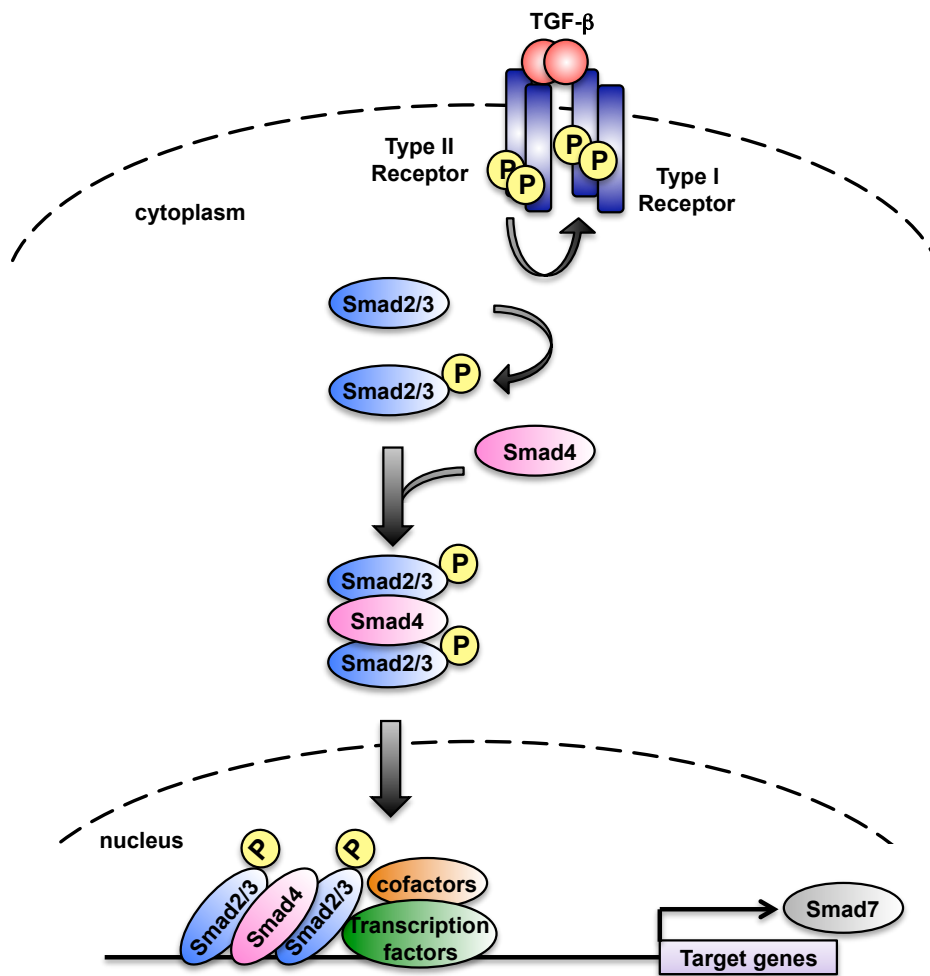


図 2. TGF-βシグナル伝達機構

TGF-βシグナルは、細胞表面に存在する I 型受容体 (TβRI) および II 型受容体 (TβRII) に TGF-βが結合することでリン酸化を受け、複合体を形成することで伝達される。II 型受容体により活性化された I 型受容体は、R-Smad である Smad2/3 をリン酸化し、Co-Smad である Smad4 と複合体を形成する。その複合体は核内へと移行し、様々な転写因子や転写共役因子とともに、TGF-βシグナルの標的遺伝子の転写を制御する。

5. long non-coding RNA と TGF- β シグナル・がん

一般的に真核生物では、DNA から mRNA が転写され、リボソームによってタンパク質に翻訳される。ゲノムの半数以上が RNA に転写されるにも関わらず、タンパク質をコードしていない領域はゲノムの 98%をも占める。それらはジャンク DNA と呼ばれ、生物学的には不必要だと考えられてきた。しかし近年、ジャンク DNA から転写され、さらにタンパク質をコードせずに機能する nc (non-coding) RNA の存在が明らかとなってきた。最もその機能が明らかにされているのは転移 RNA とリボソーム RNA であり、翻訳過程において足場となり、ポリペプチド鎖にアミノ酸を転移する重要な機能を有する。また、1990 年代に mi (micro) RNA が発見され、20 ヌクレオチド程度の低分子量のものから 100 kbp にも至るような様々な non-coding RNA の多彩な機能が明らかになってきた。20 塩基程度の短い miRNA は、Drosha や Dicer により切断され一本鎖になり、タンパク質翻訳阻害を行うことで遺伝子の発現を調節する^{[27][28]}。miRNA は細胞増殖や分化、種々の疾患に関与する他に、細胞株でも臨床検体においてもがんとの強い関連が報告されている^[29]。miRNA にはがんを促進的および抑制的に制御する 2 種類に大別され、乳がんにおいては miR-21、miR-155 は高悪性度乳がん

過剰発現しており、逆に let-7 や miR-125a は発現低下が認められる^{[30][31][32]}。また、TGF- β は miR-200 ファミリーを介して EMT の誘導を調節することが報告されており、TGF- β シグナルの下流で細胞応答を行う ncRNA も見出されている^[33]。それゆえ特に悪性腫瘍の研究領域では、がん組織で発現が異常となる miRNA の同定、診断・予後解析への応用に関して急速に研究が進められている^[34]。

短い ncRNA の研究が進む一方で、それ以外の長鎖 ncRNA は単なるノイズだと考えられ続けてきたが、近年その機能が注目されている^[35]。長鎖 ncRNA は、数十塩基から数十万塩基に及ぶ高分子量の ncRNA であり、i) クロマチン修飾酵素群と相互作用するもの、ii) 核内構造体を形成するもの、iii) 個別の複合体に含まれるものといった、大きな3つのグループに分類される。i) について、X 性染色体の不活性化をする Xist や乳がんにおいて浸潤を促進する HOTAIR は、クロマチン領域のヒストンのメチル化やアセチル化修飾を制御することでその機能を発揮する^{[36][37][38]}。HOTAIR は、3 分の 1 の乳がん患者にて高発現していることも報告されている^[38]。ii) については、MEN ϵ / β ncRNA (もしくは NEAT1 ncRNA と呼ぶ) が核内構造体パラスペックルの形成・維持に骨格成分として必須であることや、核スペックルに存在する Malat-1/ NEAT2 が SR ファミリー

タンパク質のスプライシング因子の局在や修飾を制御しているという報告がある^{[39][40][41]}。iii) については、遺伝子間領域から転写される linc (long/ large intergenic non-coding) RNA である lincRNA-p21 が hnRNPK と結合してがん細胞の増殖を抑制することや、細胞質において 1/2-sbsRNA は Staufen の標的 mRNA の 3' 非翻訳領域にある相補的な配列と二本鎖 RNA を形成し、Staufen によって認識される高次構造を形成していることが明らかとなっている^{[42][43]}。

以上のように長鎖 ncRNA の機能は徐々に明かされており、長鎖 ncRNA は生物の複雑さや多様性の制御、種々の疾患への寄与などが大いに期待される^[44]。その同定・機能解析を進めれば、ncRNA の生物学的理解の進展および疾患の基礎的知見や分子機序の解明、その先の治療への応用に繋がることが考えられ、開拓を進めるべき重要な研究領域だと言える。

6. がん細胞のエピゲノム異常と転写制御機構

細胞のがん化は、ゲノム異常に伴う様々なレベルの転写ネットワーク制御の破綻により生じる。がん化のプロセスの理解には、組織・細胞種特異的に多重に存在する転写ネットワークの制御において、種々の転写因子や結合領域の同

定、エピゲノム、転写活性応答の解析が不可欠である。しかしヒトゲノムのサイズは約 30 億塩基対であり、近年まではゲノムを標的とした網羅的解析はほぼ不可能であった。しかし次世代シーケンサーの登場により、解読可能な総塩基数は飛躍的に増大し、がん研究を含め、医学生物学の研究の進展を可能にした。所属研究室においても、ChIP-sequencing を用いて肝がん細胞株と皮膚角化上皮細胞株において Smad の結合部位が細胞種によって異なることが見出されている^{[45][46]}。

上述のように転写ネットワークは様々な調節により成立しているが、クロマチンの構造変化による転写調節もなされている。クロマチンが開いている部位ではより転写因子が作用しやすく、効率的な転写調節がされやすい。一方で、クロマチンが閉じている部位では転写抑制的な作用が生じる。しかしクロマチン開閉の調節メカニズムやもたらされる結果などは報告数が少なく、未解明な部分が多く残されている。そのクロマチン開閉の解析方法として、FAIRE (formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements) –sequencing がある^[47]。ホルムアルデヒドによりヒストン-DNA 間に架橋を形成し、その後フェノールクロロホルム処理により架橋をしていない DNA を抽出し、その DNA を次世代シーケ

ンサーにて解読をする^[48]。それにより、開いているオープンクロマチン領域の同定や活性化転写制御エレメントの同定が可能となる (図 3)^[49]。この手法を用いて、II 型糖尿病に関連のある TCF7L2 のイントロン多型である rs7903146 が膵臓特異的にオープンクロマチン領域に位置し、その多型がエンハンサーの活性を調節することが報告されている^[49]。その他にも、脂肪細胞特異的にヒストン修飾を受け遠位エンハンサーとして働く領域の同定がなされている^[50]。そのため、FAIRE-sequencing を始め、DNaseI-sequencing などは組織・細胞特異的な転写調節機構の解析においては、有用な手段になってきている。

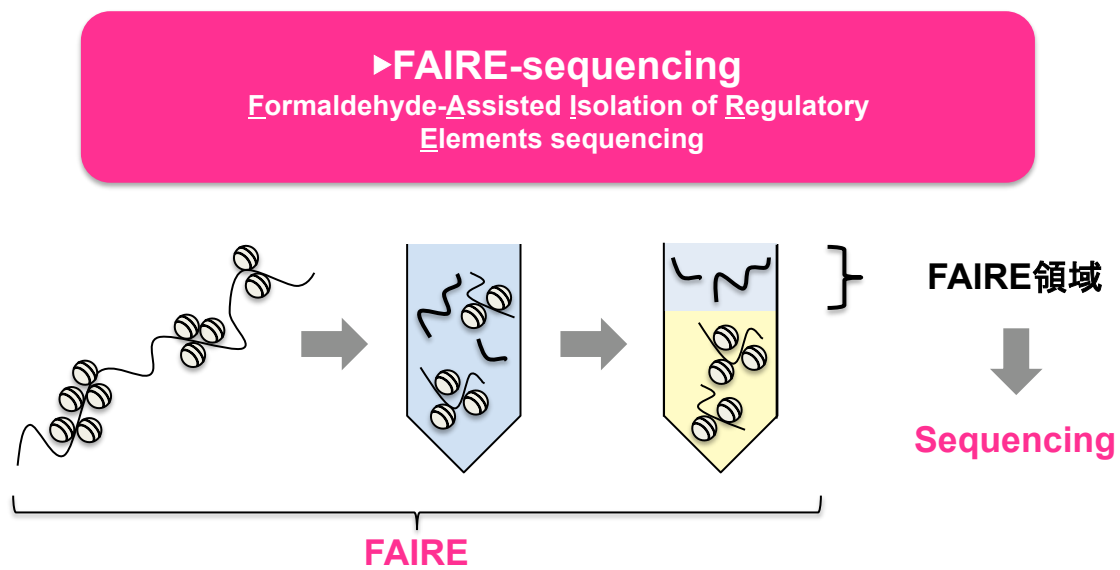


図 3. FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) -sequencing
 ホルムアルデヒドによりヒストン-DNA 間に架橋を形成し、その後フェノールクロロホルム処理により架橋をしていない DNA を抽出し、その DNA を次世代シーケンサーにて解読をする。それにより、開いているオープンクロマチン領域の同定や活性化転写制御エレメントの同定が可能となる。

以上の背景から本研究では、乳腺上皮細胞および乳がん細胞における TGF- β シグナルの組織・細胞特異的な転写制御の解析のため、同シグナルによるアポトーシス・EMT 解析のモデル細胞として確立しているマウス乳腺上皮細胞・乳がん細胞を用いて RNA-sequencing と FAIRE-sequencing による解析を行った。そして、TGF- β 誘導性 lincRNA-Smad7 の同定および EMT・アポトーシスを介したがんに対する作用、また TGF- β により EMT が誘導された細胞におけるクロマチン構造変化の 2 点の解析を行い、その役割とメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

実験手法と材料

細胞培養

本研究に使用した細胞株および細胞培養液を下記に記す (表 1)。全ての細胞株は 37°C、CO₂ 濃度 5% の環境下において維持した。

表 1. 使用した細胞株と細胞培養液

細胞株	培養液
4T1細胞 (マウス乳がん細胞) JygMC(A)細胞 (マウス乳がん細胞)	10% fetal bovine serum (FBS)、50 U/ml penicillin、50 µg/ml streptomycinを含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GIBCO)
NMuMG細胞 (マウス乳腺上皮細胞)	10% FBS、50 U/ml penicillin、50 µg/ml streptomycin 10 ug/ml insulin (細胞科学研究所) を含むDMEM (GIBCO)
* EpH4細胞 (マウス乳腺上皮細胞)	10% FBS、50 U/ml penicillin、50 µg/ml streptomycinを含むF12;DMEM (GIBCO)
* EpRas細胞 (マウス乳腺上皮Eph4細胞に RasG12Vを導入した細胞株)	4% FBS、50 U/ml penicillin、50 µg/ml streptomycinを含むF12;DMEM

*, Sabine M. 博士 (Institute of Mplecular Pathology、オーストリア) より供与

増殖因子と阻害剤

TGF-β3 (R&D Systems) は、1 mg/ml bovine serum albumin (BSA; Sigma-Aldrich) を含む 4 mM HCl に溶解して使用した。TGF-β受容体キナーゼ阻害剤 SB431542 (Sigma-Aldrich) は、dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解して使用した。

RNA 干渉

NMuMG 細胞と EpRas 細胞への small interfering RNA (siRNA) の導入には、Hiperfect reagent (QIAGEN) を、JygMC(A)と 4T1 細胞への siRNA の導入には Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を用い、推奨プロトコルに従って 6-well プレート (costar) または 12-well プレート (costar) にて行った。siRNA 導入後 12 時間後に培地中に TGF- β 3 を添加した。ネガティブコントロールには、StealthTM RNAi Negative Control (Invitrogen) を用いた。使用した siRNA は、lincRNA-Smad7-1 ; AAGAGUUGGAGUCCGCCAAACUAGG、lincRNA-Smad7-2; GGGGAAGAAGACAGCAGUCAAGAAGA (Invitrogen) である。

ノーザンブロッティング

lincRNA-Smad7 特異的なプローブの作成には DIG RNA Labeling Kit (Roche) 、ノーザンブロッティングには、DIG Northern Starter Kit (Roche) を使用した。プローブは、lincRNA-Smad7 の 5'末端から約 700bp の EST 配列 (CX239377) を挿入した pSPT19 vector をテンプレートにし、T7 ポリメラーゼにより転写した。NMuMG 細胞からポリ A 付加 RNA を回収し、1.2% ホルムアルデヒドゲル (ア

ガロース、1×MOPS、37%ホルムアルデヒド) に泳動した。泳動後のゲルを 20×SSC (ナカライテスク) で 15 分間 2 回洗浄し、Hybond N+ (whatman) を 20×SSC に浸したキムタオル、filter paper にはさみ、ガラス板で重しをして、一晩トランスファーした。翌日転写されたメンブレンを 2×SSC で手短に 2 回洗浄し、UV クロスリンクを行った後、あらかじめ 68°C に温めておいた DIG Easy Hyb (Roche) に浸して 68°C にて 30 分振とうしてプレハイブリダイゼーションを行った。あらかじめ 68°C に温めた DIG Easy Hyb に、98°C にて 5 分間ボイルして変性させた RNA プローブを加えたハイブリダイス混合液にメンブレンを浸透させ、68°C にて一晩振とうした。翌朝、メンブレンを 2×SSC、0.1% SDS 中で室温にて 5 分間 2 回洗浄した後、0.1×SSC、0.1% SDS 中で 68°C にて 15 分間 2 回洗浄した。その後、ブロッキング溶液で室温にて 30 分間インキュベートし、抗ジゴキシゲニン抗体を含むブロッキング溶液で室温にて 30 分間抗体反応を行った。洗浄用バッファーにて室温にて 15 分間 2 回洗浄後、検出用バッファーで室温にて 5 分間インキュベートした。メンブレンに CDP-Star をアプライした後、LAS-4000 (富士フイルム株式会社) でデジタル画像としてデータ取得した。

アデノウイルスベクターの作成

全ての過剰発現の実験において、最長の転写産物である lincRNA-Smad7-variant1 を過剰発現させた。lincRNA-Smad7-V1 を発現させるアデノウイルスを作製するため、6-well プレート (costar) に 5×10^5 個の 293A 細胞を播種し、翌日、PacI 処理した発現ベクターを Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。コントロールウイルスとして LacZ を発現するアデノウイルスベクターも同様に作成した。翌日に培養液を交換し、cytopathic effect (CPE) を観察するまで培養した。細胞のほとんどが CPE をおこしたことを確認後、細胞を含む培養液を回収し、凍結融解を 3 度繰り返した。その後 4°C 、3,000 rpm で 30 分間遠心し、ウイルス上清を回収した。そのウイルス上清の一部を 10 cm ディッシュに播種した 293A 細胞に感染させ、再び細胞が CPE を起こすまで数日間放置し、ウイルス量の増幅を行った。その後、回収したウイルス液の一部を 20 枚の 10 cm ディッシュに播種した 293A 細胞に感染させ、同じ作業を繰り返した。得られたウイルス液は ViraKit Adeno 4 (VIRAPUR) を用いて精製した後、ウイルス力価を Adeno-X Rapid Titer Kit (BD Bioscience) を用いて測定した。

TUNEL assay

TUNEL assay には、In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche) を使用し、2-well Camber Slide (Lab-Tek) に細胞を播種した。細胞上清を除去して PBS (-) で 3 回洗浄後、3.7%ホルムアルデヒドにて 15 分間室温で固定した。その後 PBS (-) にて 3 回洗浄し、0.2% Triton X-100 により 5 分間室温で細胞膜の透過処理を行い、ターミナルトランスフェラーゼとヌクレオチドの混合液を用いて 37°C で 1 時間インキュベートし、DNA 断片を標識した。PBS (-) で 3 回洗浄後、4', 6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) を用いて核を染色した。観察には、Leica DMI6000 B with AFC (Leica) を使用した。

SDS-PAGE とウエスタンブロッティング

培養細胞の上清を除去して PBS (-) で洗浄後、1% NP-40 lysis buffer (1% Nonidet P-40、20 mM Tris-HCl [pH7.5]、150 mM NaCl、1 mM PMSF、1% aprotinin、1% phosphatase inhibitor cocktail (ナカライテスク)) により細胞を溶解してタンパク質を回収した。回収したタンパク質は BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) で定量し、SDS sample buffer (170 mM Tris-HCl [pH8.8]、44% glycerol、

8.7% SDS、22 mM 1,4-dithiothreitol、0.05% Bromophenol Blue) にて溶解後、98°C で 2 分間煮沸して調製した。タンパク質量をそろえたサンプルを SDS-PAGE で分離後、セミドライ法にて Fluoro Trans W Membrane (Pall) に転写した。メンブレンを blocking buffer (5% skim milk (森永)) にて 30 分間室温でインキュベーションした後、各種の一次抗体を加えて室温で 1 時間あるいは 4°C で一晩インキュベーションした。その後 HRP-標識された二次抗体にて室温で 1 時間のインキュベーションを行った。その後 TBS-T にて 15 分間 4 回洗浄または 5 分間 3 回洗浄した。タンパク質の検出には、Enhanced chemiluminescence detection system (Amersham) を使用した。使用した抗体を以下に示す。

マウスモノクローナル抗 α -tubulin 抗体 (Sigma-Aldrich)

マウスモノクローナル抗 Smad2/3 抗体 (BD Transduction)

ラビットポリクローナル抗リン酸化 Smad2 抗体 (Cell Signaling Technology)

ラビットポリクローナル抗 PARP 抗体 (Cell signaling Technology)

FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements)

10 cm dish に播種した細胞を、終濃度 1% になるようにホルムアルデヒドにて

5 分間室温にてインキュベートした。その後、終濃度 125 mM となるようにグリシン水溶液を添加し、5 分間室温にてインキュベートすることで固定反応を停止させた。氷冷した PBS (-) にて細胞を 2 回洗浄した後、氷冷した PBS (-) 1ml を添加し、スクレイパーで細胞を回収し、4°C、2,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除去した細胞ペレットに、800 μ l の MC lysis buffer (10 mM Tris-HCl [pH 7.5]、10 mM NaCl、3 mM MgCl₂、0.5 % NP-40) を添加、再懸濁し、10 分間 4°Cにてインキュベートした。4°C、8,000 rpm で 4 分間遠心後、細胞ペレットに 400 μ l の SDS lysis buffer (1% SDS、50 mM Tris-HCl [pH8.0]、10 mM EDTA、protease inhibitor (P8340; Sigma-Aldrich)) を添加し、10 分間 4°Cにてインキュベートした。その後 Bioruptor UCW-201 (コスモ・バイオ) を用いてこの上清にソニケーションを行った。ソニケーションの条件は、出力 ”High” で 30 秒を 15 回、インターバルは 30 秒とした。得られたサンプルを 4°C、14,000 rpm で 10 分間遠心し、200 μ l の ChIP dilution buffer (20 mM Tris-HCl [pH8.0] 、150 mM NaCl、2 mM EDTA、1% TritonX-100、Complete EDTA-free protease inhibitors (Roche)) を添加し、4°C、8,000rpm で 4 分間遠心した。回収した上清にフェノール・クロロホルム処理を行った。翌朝エタノール沈殿を行い、TE 100 μ l で溶出後、PCR purification kit

(Qiagen) を用いて精製し、RNase-free 水で溶出した。溶出した FAIRE サンプルは定量的 PCR を用いて、各遺伝子の転写開始点近傍に設計したプライマーを用いて定量した (プライマー配列は後述の表に記す)。

RNA 抽出と RT-PCR

RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用して、プロトコルに従い RNA を抽出した。1~5 mg の total RNA と Oligo (dT)₂₀ プライマーを用いて、Prime Script II 1st strand cDNA synthesis kit (Takara) により first-strand cDNA を合成した。

定量的 RT-PCR 解析では、以下の表に示すプライマーを用いた。ABI PRISM 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) にて Fast Universal SYBR Green Master (Roche Applied Science) を用いて mRNA の定量化を行った。GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) と TBP (TATA-box binding protein) を内因性コントロール遺伝子として使用した。

半定量的 RT-PCR 解析は、Mighty Amp DNA polymerase (Takara) を用いて行った。内因性コントロール遺伝子として GAPDH (表) を使用した。PCR 産物は agarose gel を用いて泳動し、ethidium bromide にて増幅産物の検出を行った。

表 2. PCR プライマー配列

定量的 RT-PCR			
遺伝子名		5'→3'配列	5'→3'配列
m *lincRNA-Smad7	Fw	GAACTGGCTCCAATCCAAAC	Rv ACCAGACGTGCATCAACAAC
m **lincRNA-Smad7-V1	Fw	GCCACTTATTGGAATGGTGTG	Rv ATCCCTCCTCCATTTCTTC
m ***lincRNA-Smad7-V2, 3	Fw	GCAGGTGACAGGAAGAATTG	Rv TTGTCCACATAGCCACGAAG
m p21	Fw	GCAGATCCACAGCGATATCC	Rv CAACTGCTCACTGTCCACGG
m p15	Fw	AGAGCAGAGCTAAATCCGGC	Rv GCCACATGCTAGACACGCTA
m C/EBPβ	Fw	AAGATGCGCAACCTGGAGAC	Rv TTGAACAAGTTCCGCAGGGT
m C/EBPδ	Fw	CAGCGCTACATTGACTCCA	Rv GTTGAAGAGGTCGGCGAAGA
m E-cadherin	Fw	GCTGCTGACCTTCAAGGTGAA	Rv TTGACCCTGATACGTGCTTGG
m N-cadherin	Fw	TTCTTGCTTCTGACAATGG	Rv ATGTCATAATCAAGTGCTG
m Fibronectin	Fw	GACAGGAGGAAATAGCCC	Rv CATCGTGCAAGGCAACCAC
m Vimentin	Fw	CAGCATGTCCAGATCGATGTG	Rv AGCCTCAGAGAGGTCAGCAAAC
m δEF1	Fw	TTCTGCAGCAACAAGACACC	Rv TCATCATGACTGCTGGCTTC
m SIP1	Fw	CGACACGGCCATTATTTACC	Rv GGCAAAAGCATCTGGAGTTC
m Snail	Fw	TTCTTGCTTGGCTCTCTTGGT	Rv TATGGCTCGAAGCAGCTGTGT
m Twist	Fw	CCGGAGACCTAGATGTCATTGTT	Rv CGCCCTGATTCTTGTGAATTTG
m Bim	Fw	CGACAGTCTCAGGAGGAACC	Rv CCTTCTCCATACCAGACGGA
m DEC1	Fw	GAAGCACGTGAAAGCATTGACA	Rv CCCGACAAATCACCAGCTTG
m TBP	Fw	GCGATTGCTGCAGTCATCA	Rv GCTGCTAGTCTGGATTGTCTTCA
m GAPDH	Fw	TGCAGTGGCAAAGTGGAGATT	Rv TGCCGTGAATTTGCCGT
m ESRP2	Fw	GGACTAGAAACAGATGCTACCGAAGA	Rv CTTCGAGAAACAACCTGACCAATGG
m Smad7	Fw	TTGCCTCGGACAGCTCAATT	Rv TAAACCCACACGCCATCCA
半定量的 RT-PCR			
遺伝子名		5'→3'配列	5'→3'配列
m ****lincRNA-Smad7	Fw	AGTTTGACGCGGAATGAGC	Rv ACCAGACGTGCATCAACAAC
m C/EBPa	Fw	GCCGGGAGAACTCTAACTCC	Rv ACGTTGCGTTGTTTGGCTTT
m C/EBPβ	Fw	CGCCTTTAGACCCATGGAAGT	Rv TACTCGTTCGCTCAGCTTGTG
m C/EBPδ	Fw	CAGCGCTACATTGACTCCA	Rv GCTGATGCAGCTTCTCGTTC
m C/EBPε	Fw	TCTCCGCTACATCGAGTCT	Rv GAGGTTGCGCAGAGTGTCTA
m C/EBPγ	Fw	GTTTGTGCACAGCTCCAGTG	Rv TGATTCCCCCTCTATGCCCA
m C/EBPζ	Fw	CCTTCTGTGGCCCTTTTTC	Rv AGATGGCCAAACTCCTCAGC
m NFIC1	Fw	CACGGAGCTGATCCAAGTGT	Rv ATCCCTCCGTCCTAATCCCA
m NFIC2	Fw	TAACGCTGGACACCACAGAC	Rv GGAAGGCAACCTCGGCTAC
m GAPDH	Fw	TGCAGTGGCAAAGTGGAGATT	Rv TTGAAGTTCGAGGAGACAACCT
FAIRE 定量的RT-PCR			
遺伝子名		5'→3'配列	5'→3'配列
m N-cadherin	Fw	CCCCAGCTCCTTGATCTCCCGT	Rv ACAAATAGCGGGCCTCGGAGT
m HPRT1	Fw	TGGCCGGCAGCGTTTCTGAG	Rv GTCGGCTCGCGGCAAAAAGC
m Fibronectin	Fw	GTGAACAAGTTGTCCTGAGAGG	Rv GAAACACCCATTCCACTTGGG
m E-cadherin	Fw	GCGCACTACTGAGTTCCCAA	Rv GACGCCGAGCAAAACTGAG
m ESRP2	Fw	GTCTCTGCAGCTCCCACTAC	Rv CAGCAGACAGACGAGCTTGG
*, 全lincRNA-Smad7を検出可能なCF領域に設計 **, lincRNA-Smad7-V1のみを検出可能なCX領域に設計 ***, lincRNA-Smad7-V2およびlincRNA-Smad7-V3を検出可能なCF領域に設計 ****, FwはCX領域、RvはCF領域の全lincRNA-Smad7共通配列に設計した lincRNA-Smad7-Variantsをそれぞれ異なるPCR産物長として検出可能			

Tumor xenograft assay

前処理として、JygMC(A)細胞において上述の RNA 干渉を推奨プロトコルに沿って 10 cm dish (costar) にて行った。24 時間後に細胞を回収し、BALB/c ヌー

ドマウス (三協ラボサービス) の皮下に 1.0×10^7 個/ 100 μl の細胞を移植した。

移植後は 2 日に 1 度腫瘍体積を測定し、経時変化を観察した。腫瘍体積の測定

方法は、 $\{(長径) \times (短径)^2\} / 2$ の計算式で求めた。

FAIRE-sequencing とデータ解析

FAIRE によって得た TGF- β 刺激 8 日のサンプルおよそ 1 $\mu\text{g/ml}$ を、東京大学先端技術研究センターゲノムサイエンス分野 (油谷浩幸教授) に依頼して行った。

メーカーのプロトコルに従いライブラリーを作成後、Genome analyzer IIx

(Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてシーケンスを行った。得られたシーケン

スは、Illumina 社のプロトコルに従い、ELAND アルゴリズムを用いてゲノムに

マッピングした。上記データ処理により得られたマッピングデータからの

FAIRE 領域の同定は、CisGenome (version 2.0) を用い、FDR < 1%で行った。パ

ラメーターはデフォルト値、もしくはピークから前後 150bp に設定した。ontology

の算出には、DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis を用

いた。

RNA-sequencing とデータ解析

NMuMG 細胞に TGF- β 1 ng/ml で 24 時間刺激後、RNA を抽出した。およそ 1 μ g/ml のサンプルを、東京大学先端技術研究センターゲノムサイエンス分野 (油谷浩幸教授) に依頼して行った。得られたシーケンスは、tophat2/ bowtie2 を用いて known transcript にマッピングした。発現量比較と定量は、cuffdiff プロトコルを用いて行った。

EpH4 細胞および EpRas 細胞に TGF- β 1 ng/ml で 48 時間刺激後、RNA を抽出し、Ion Total RNA-Seq Kit v2 (Life Technologies) の推奨プロトコルに従ってサンプルを得た。得られたサンプルは Qubit (Life Technologies) で RNA 量を測定し、およそ 5 ng 用いてライブラリーを作成後、Ion Proton シーケンサーを用いてシーケンスを行った。得られたシーケンスは、tophat2/ bowtie2 を用いて known transcript にマッピングした。発現量比較と定量は、cuffdiff プロトコルを用いて行った。

統計処理

Student の t-test を用いて、2 グループ間の比較検定を行った。

結果

i) TGF- β 誘導性新規 lincRNA の同定と機能解析

1. lincRNA は乳腺上皮細胞および乳がん細胞株において、TGF- β により発現が誘導される

TGF- β は EMT を誘導する代表的な因子であり、EMT を起こした細胞はアポトーシス耐性となる。そのため、本研究ではそのシグナル伝達機構に着目をし、TGF- β による EMT 獲得の分子機序を説明しうる転写産物の網羅的解析を試みた。NMuMG 細胞は、TGF- β により Snail の上昇や E-cadherin の減少により EMT が誘導される乳腺上皮細胞である^{[51][52][53]}。はじめに、NMuMG 細胞を TGF- β で処理したところ、過去の報告と同様に細胞形態の劇的な変化が認められた (図 4A)。さらに、カドヘリンスイッチと呼ばれる E-cadherin の低下と N-cadherin の上昇および Fibronectin の上昇を定量的 RT-PCR にて確認した (図 4B)。この NMuMG 細胞において、TGF- β 処理の有無において RNA-sequencing を行った。RNA-sequencing は、TGF- β 処理 48 時間後に細胞を回収し、ポリ A が付加されて

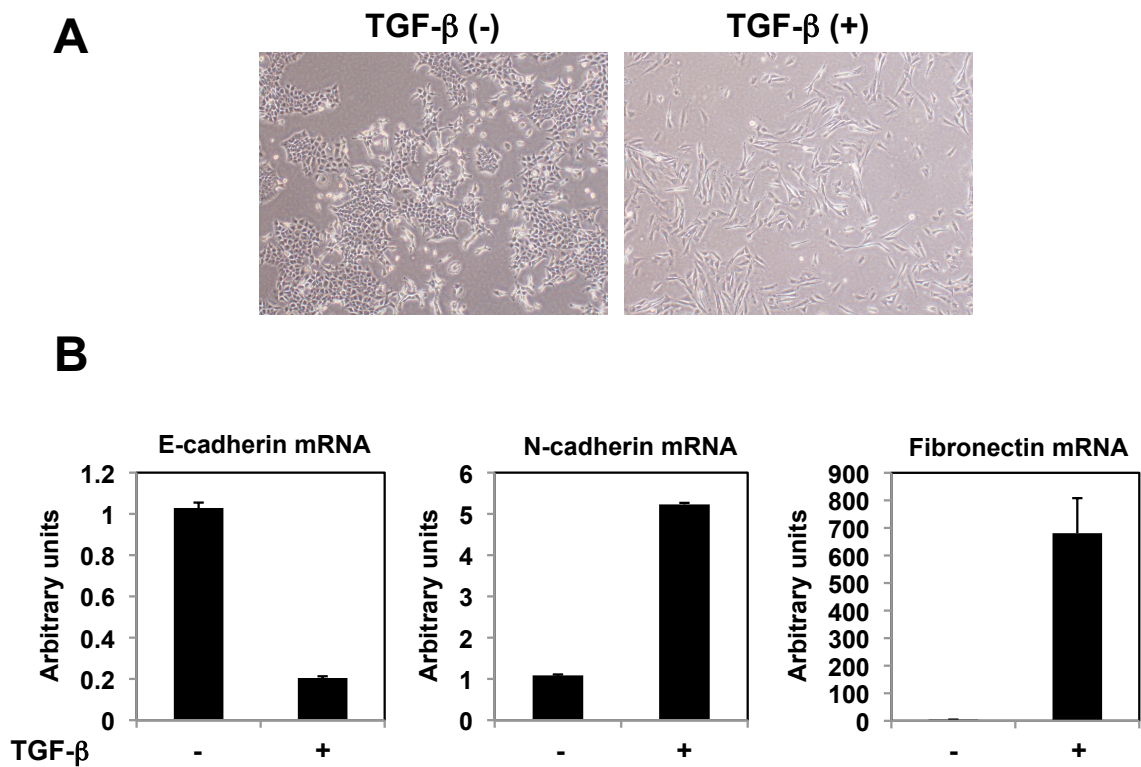


図 4. NMuMG 細胞での TGF- β による EMT の誘導

(A) 1 ng/ml の TGF- β で 24 時間刺激した時の NMuMG 細胞の形態変化を光学顕微鏡にて撮影した。

(B) 1 ng/ml の TGF- β で NMuMG 細胞を 24 時間刺激し、E-cadherin、N-cadherin、Fibronectin の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR にて解析した。補正には TBP を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。

いる RNA を抽出し、Illumina 社の Genome analyzer IIX シーケンサーを用いた。その結果と、既報の ES 細胞において発現している lincRNA のリストと照合した結果、リード数も多く、かつ TGF- β 処理により強く発現が誘導されている新規転写産物群を同定した^[54]。このうちゲノム上にて、TGF- β シグナル伝達分子である Smad7 の上流に位置しているものを見出した (図 5)。以降この強く発現誘導される転写産物 lincRNA-Smad7 に絞って解析を行った。この lincRNA-Smad7 の発現を検討するため、NMuMG 細胞に加え、同様に乳腺上皮細胞である EpH4 および EpH4 に RasG12V を導入した細胞株 EpRas において定量的 RT-PCR を行った。その結果、lincRNA-Smad7 は、どの細胞株においても早期に TGF- β により顕著に発現誘導され、かつ持続した (図 6A)。さらにがん細胞における lincRNA-Smad7 の発現を検討するため、乳がん細胞株である JygMC(A)細胞と 4T1 細胞における定量的 RT-PCR を行った。これら乳がん細胞株は、自己分泌により TGF- β を産生し、TGF- β 応答性を有している細胞株である^[55]。その結果、乳腺上皮細胞と同様に、lincRNA-Smad7 は TGF- β 処理により発現が顕著に誘導され、さらに SB431542 処理にて TGF- β シグナルを阻害することで非刺激時の発現量の低下が認められた (図 6B)。また、両乳がん細胞において、TGF- β 処理後早

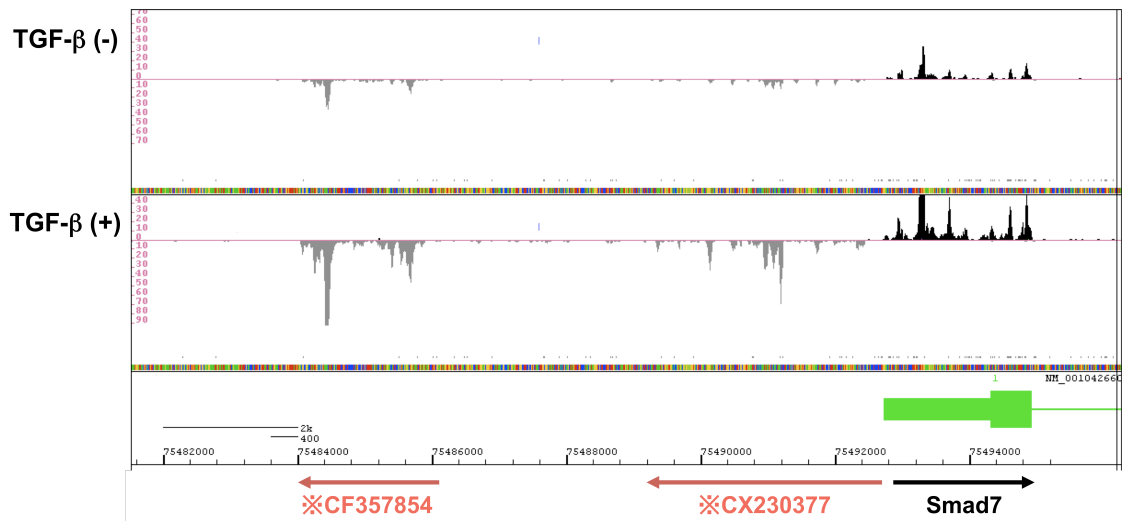


図 5. RNA-sequencing を用いた新規 TGF- β 標的転写産物の同定
 NMuMG 細胞における Smad7 遺伝子座近傍の RNA-sequencing のデータ。上段: TGF- β 刺激なし、下段: TGF- β 刺激 24 時間。縦軸は read count。センス鎖にマップされたリードは黒、アンチセンス鎖にマップされたリードは灰色で表示。矢印の向きは、転写の方向を示す。*: 当該領域に存在する EST クローン。

期に発現が誘導・持続することが明らかとなった (図 6C)。

2. lincRNA-Smad7 のサイズおよび配列の同定と各 variants の発現

lincRNA-Smad7 は、上述の lincRNA の網羅的発現解析のデータの一部として報告があるのみで、転写産物の配列やサイズは未同定であった^[54]。そのため、まず lincRNA-Smad7 のサイズを同定するために、ノーザンブロットィングを行った。ノーザンブロットィングに使用したプローブは、EST に登録された lincRNA-Smad7 の最上流からの約 700bp の配列を元に作成した。まず RNA を泳動したゲルのエチジウムブロマイド染色を行い、28s リボソーマル RNA と 18s リボソーマル RNA の泳動度を確認した (図 7A)。並行して同量の RNA を同時間泳動し、作成したプローブを用いて目的の RNA の発現を検出した結果、TGF- β 処理をすることで顕著に発現が誘導されている目的 RNA を確認した (図 7A)。先のエチジウムブロマイド染色により検出した 2 つのリボソーマル RNA のサイズとゲルの泳動開始点からの距離により lincRNA-Smad7 のサイズを予測した結果、約 3000bp の転写産物であることが明らかとなった (図 7B)。さらに lincRNA-Smad7 の全配列を同定するために、RACE を行った (図 8A)。EST に登

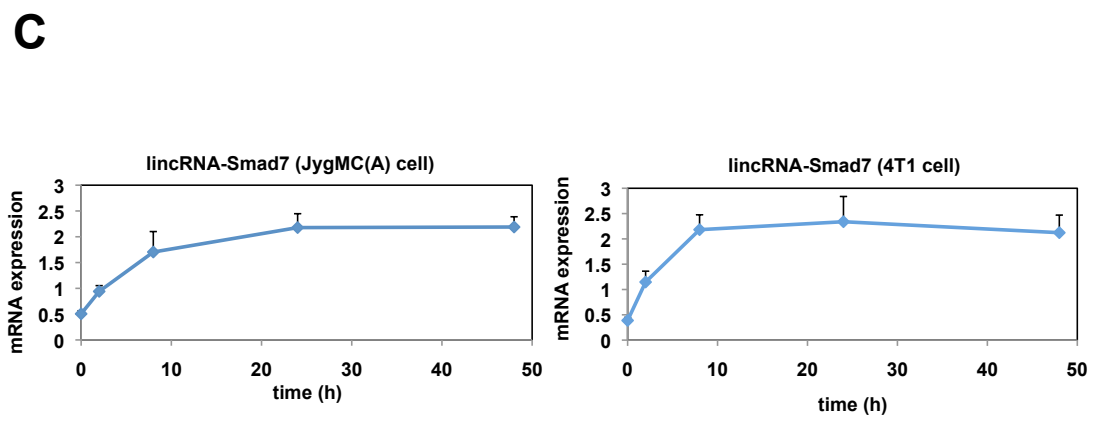
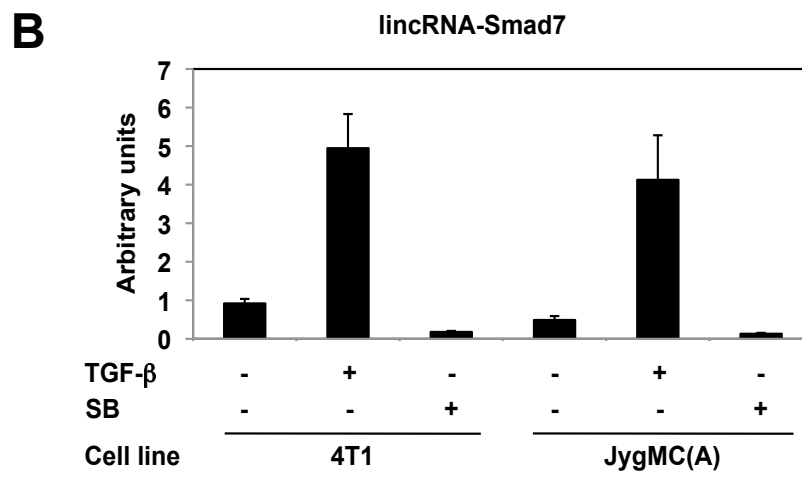
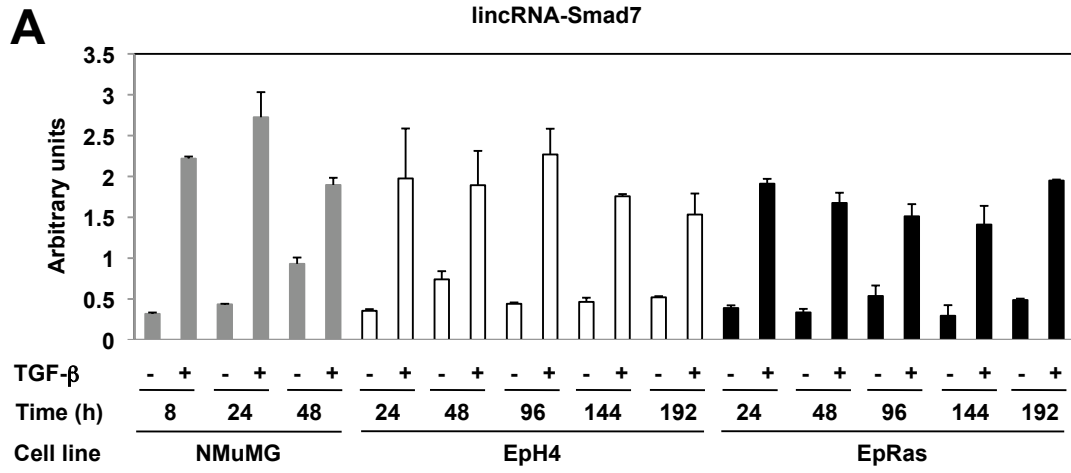


図 6. TGF- β による lincRNA-Smad7 の発現誘導

- (A) NMuMG 細胞、EpH4 細胞、EpRas 細胞を 1 ng/ml TGF- β で刺激し、lincRNA-Smad7 の mRNA 発現量の経時変化を定量的 RT-PCR にて解析した。補正には TBP を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。
- (B) JygMC(A)細胞と 4T1 細胞を 1 ng/ml TGF- β または 10 μ M TGF- β 受容体のキナーゼインヒビター (SB; SB431542) で処理した。48 時間後に RNA を回収し、lincRNA-Smad7 の mRNA 発現量を定量的 RT-PCR にて解析した。補正には TBP を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。
- (C) JygMC(A)細胞と 4T1 細胞を 1 ng/ml の TGF- β 刺激し、lincRNA-Smad7 の RNA 発現量の経時変化を定量的 RT-PCR にて解析した。左図: JygMC(A)細胞、右図: 4T1 細胞。補正には TBP を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。

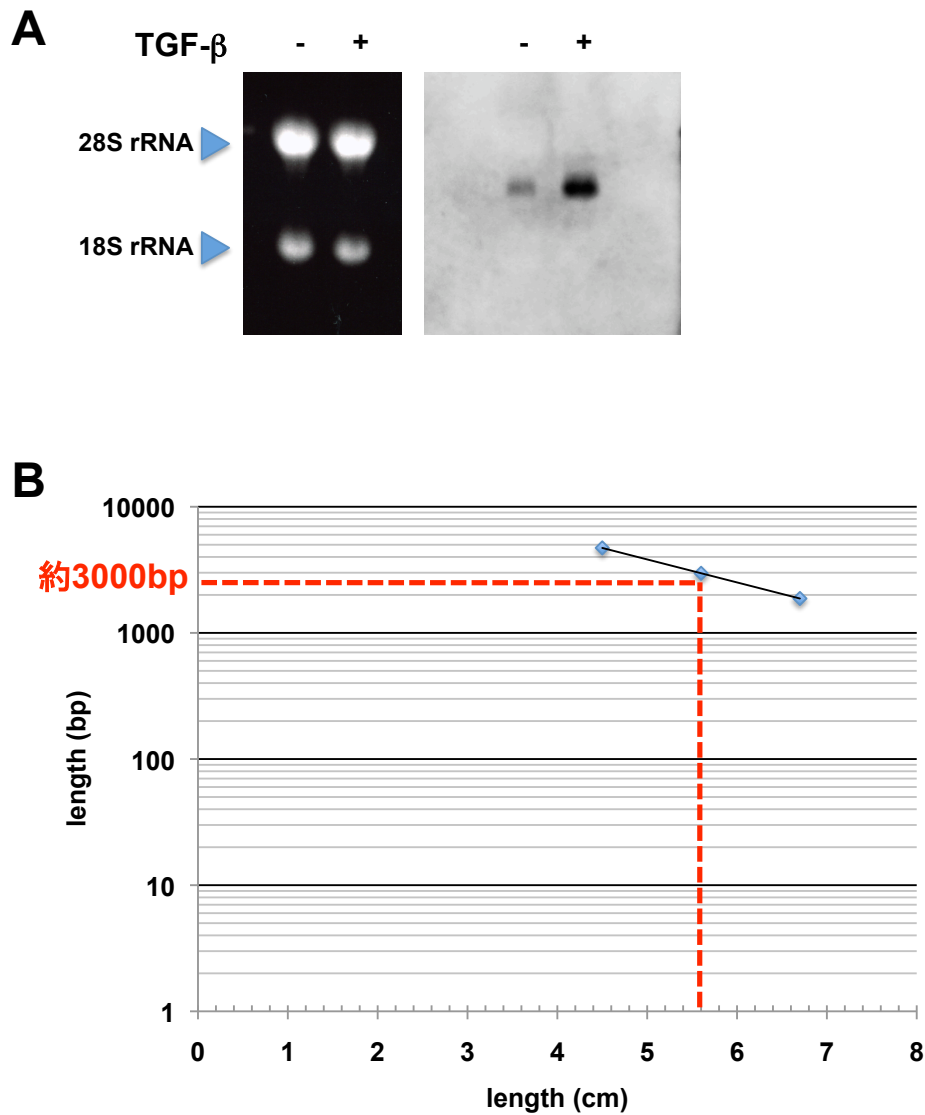


図 7. ノーザンブロッティングによる lincRNA-Smad7 の塩基長の同定

(A) 1 ng/ml の TGF- β で刺激した NMuMG 細胞より Poly-A(+)RNA を抽出し、1 μ g を 1.2% ホルムアルデヒドゲルに泳動した。左図: RNA を泳動したゲルをエチジウムブロマイドにて染色し、28s rRNA と 18s rRNA を検出した。右図: RNA を泳動したゲルに、lincRNA-Smad7 特異的なプローブをハイブリダイズさせ、LAS-4000 にて目的の転写産物を検出した。

(B) 28s rRNA と 18s rRNA のサイズと 1.2% ホルムアルデヒドゲルの泳動開始点からの距離により、lincRNA-Smad7 のサイズを算出した。

録された既知の配列を元に両 cDNA 末端までの未知領域をクローニングしたところ、様々な転写産物が存在することが明らかになった。それらの転写産物の傾向として、最上流のエクソン、または最下流のエクソンを有しているものが多く存在した。その結果、それら 2 つのエクソンを有している転写産物を指標とし、ノーザンブロットィングの結果により得られた転写産物のサイズと照らし合わせた結果、最も長い転写産物を 2 種類同定した。それらを lincRNA-Smad7-variant1 (V1) および lincRNA-Smad7-variant2 (V2) とした。lincRNA-Smad7-V1 は最上流と最下流を含む大きなエクソンから転写され、また lincRNA-Smad7-V2 は最上流と最下流のエクソンを含め複数の短いエクソンから転写されていることが明らかとなった (図 8B)。この 2 つの variants において、典型的なコザック配列 (gccRccAUGG) を有する最大で 100 アミノ酸を越える Open Reading Frame (ORF) は存在しなかった。また、その後種々の細胞における lincRNA-Smad7-V1 と lincRNA-Smad7-V2 の発現量を検討した結果、lincRNA-Smad7-V2 の 2 つ目のエクソンが約 40bp 長く、3 つ目のエクソンが約 20bp 短い転写産物 (lincRNA-Smad7-variant3, V3) も同定した (図 8B)。これら variants の発現を調べるため、lincRNA-Smad7-V1 および lincRNA-Smad7-V2, 3 を

検出するプライマーを用いて、定量的 RT-PCR を行った。その結果、4T1 細胞と JygMC(A)細胞において、lincRNA-Smad7-V1 と lincRNA-Smad7-V2, 3 は両者ともに TGF- β により顕著に発現誘導を受けていることがわかった (図 8C)。さらに各 variants の発現の絶対量を調べるため、全 lincRNA-Smad7 を検出し、かつ各 variants の PCR 産物長が異なるように設計したプライマーを用いて半定量的 RT-PCR を行った。その結果、NMuMG 細胞、EpRas 細胞、4T1 細胞、JygMC(A)細胞において各 variants の発現を確認した (図 8D)。

3. lincRNA-Smad7 が乳がん細胞の腫瘍形成能に与える影響

がんの発生・進展において、抑制的および促進的に作用する lncRNA がそれぞれ報告されている。本研究において同定した lincRNA-Smad7 ががんの発生・進展において、抑制もしくは促進のどちらの作用を示すかを明らかにするため、lincRNA-Smad7 特異的な siRNA を細胞に導入してノックダウンを行った。ノックダウンには siRNA を 2 種類使い、si lincRNA-1 は最下流のエクソンの配列に設計し全 lincRNA-Smad7 を標的としており、si lincRNA-Smad7-2 は lincRNA-Smad7-V1 特異的な配列を標的としている (図 9A)。マウス乳がん細胞

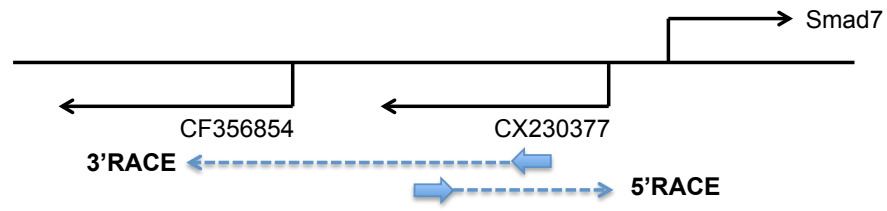
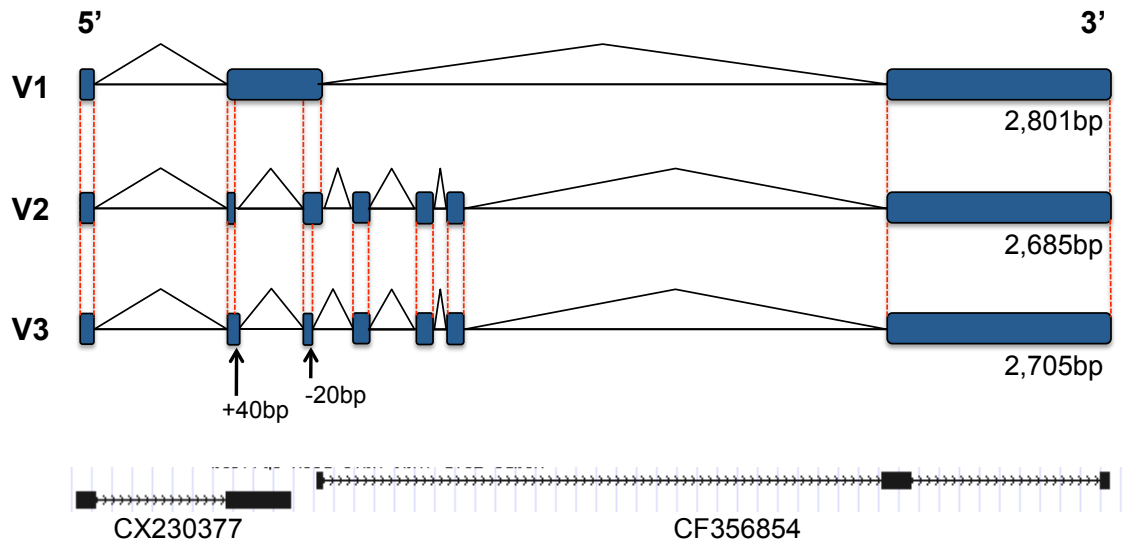
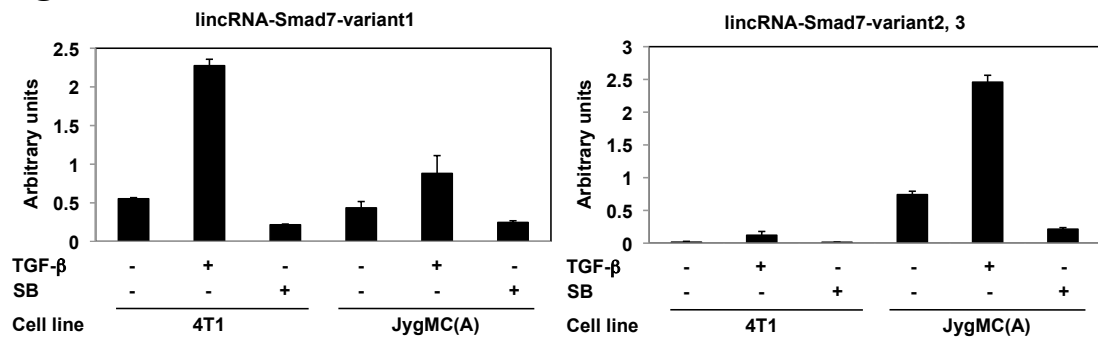
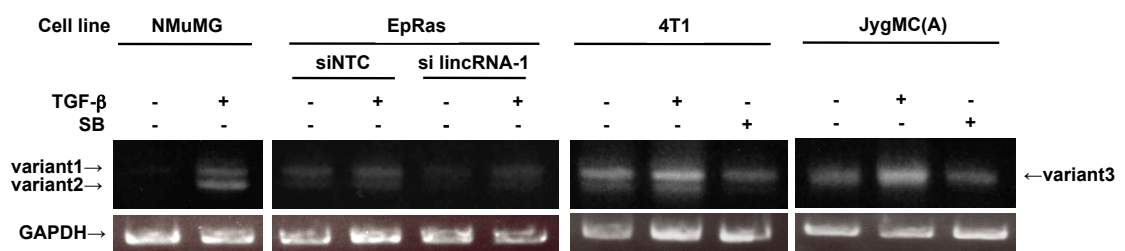
A**B****C****D**

図 8. RACE 法による lincRNA-Smad7 の配列の決定と各 variants の発現

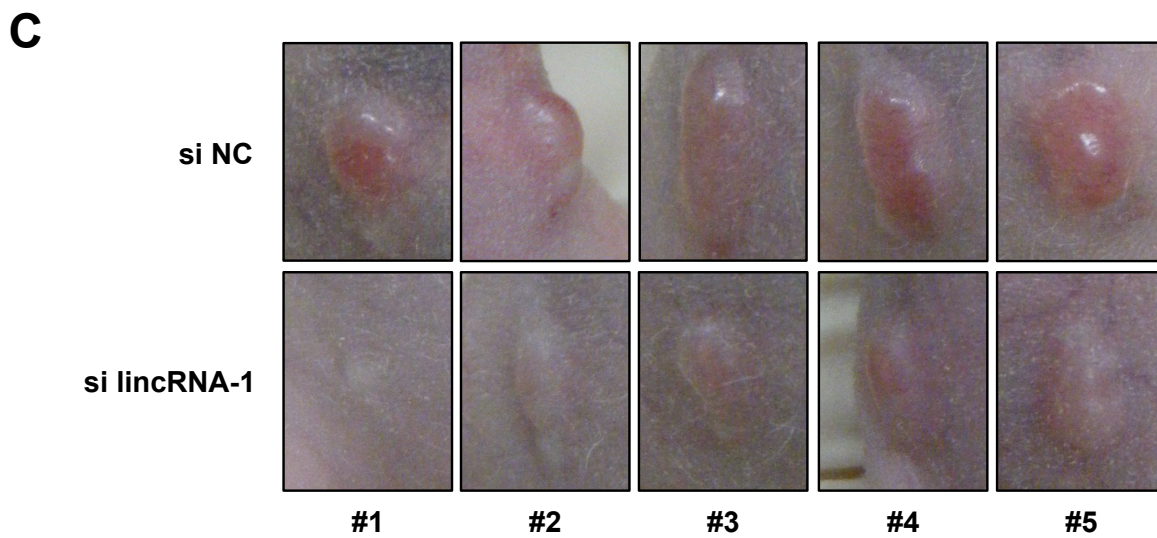
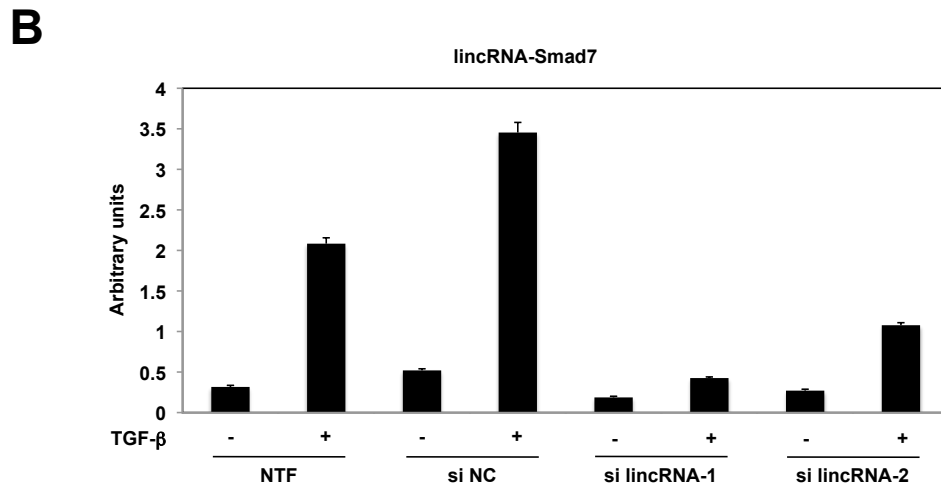
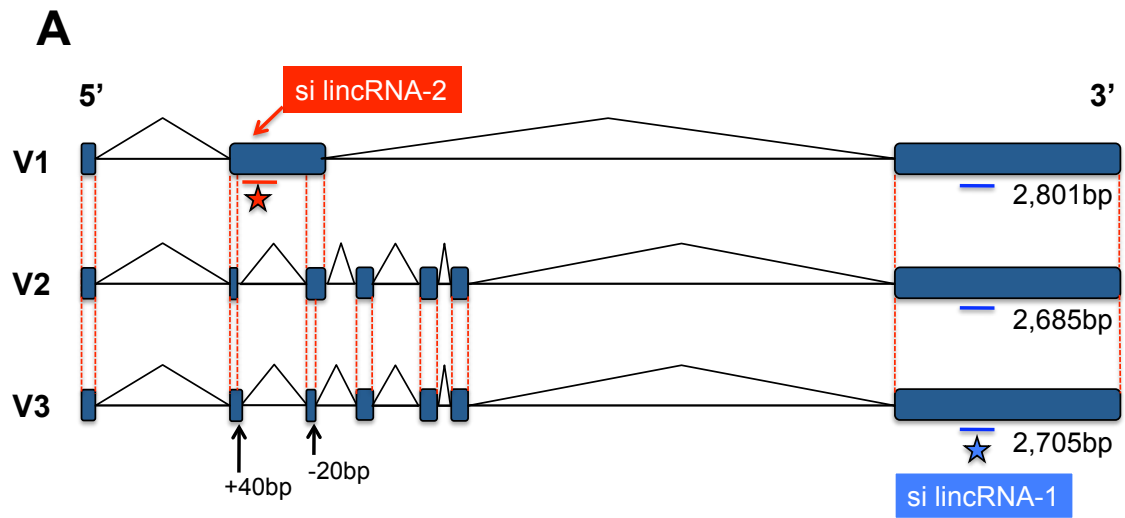
- (A) EST クローン CX230377 配列内に遺伝子特異的プライマーを設計し、両 cDNA 末端までの未知領域をクローニングした。
- (B) V1、V2: RACE 法によりクローニングした 2 種の転写産物のエクソン-イントロン構造。様々な転写産物が存在したが、最上流のエクソンおよび最下流のエクソンがほとんどのクローンに存在した。これら 2 つのエクソンを有していることを指標に、さらにノーザンブロットィングから得た転写産物長と照らし合わせた結果、主たる転写産物として lincRNA-Smad7-variant 1 (V1) および lincRNA-Smad7-variant 2 (V2) を同定した。V3 : 後述のように lincRNA-Smad7-variant 2 の第 2、第 3 エクソン長が異なる lincRNA-Smad7-variant3 を合わせて同定した。
- (C) JygMC(A)細胞と 4T1 細胞を 1 ng/ml TGF- β または 10 μ M TGF- β 受容体のキナーゼインヒビター (SB; SB431542) で処理した。48 時間後に RNA を回収し、lincRNA-Smad7-V1 と lincRNA-Smad7-V2, 3 の発現量を定量的 RT-PCR にて解析した。lincRNA-Smad7-V1 と lincRNA-Smad7-V2, 3 を検出可能なプライマーを用いた。補正には TBP を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。
- (D) 各細胞を 1 ng/ml TGF- β または 10 μ M TGF- β 受容体のキナーゼインヒビター (SB; SB431542) で処理した。NMuMG 細胞は 24 時間後、4T1 細胞と JygMC(A) 細胞は 48 時間後に RNA を回収した。EpRas 細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、12 時間後に 1 ng/ml TGF- β で処理し、24 時間後に RNA を回収した。半定量的 RT-PCR にて lincRNA-Smad7 の各 variants の発現を調べた。各 variants の PCR 産物長が異なるように設計したプライマーを使用した。

JygMC(A)において、lincRNA-Smad7 は高いノックダウン効率で siRNA により抑制された (図 9B)。そこで lincRNA-Smad7 をノックダウンした細胞を BALB/c nude マウスの皮下に移植し、がん細胞の生着および増殖を経時的に観察した。すると、コントロールと比較すると lincRNA-Smad7 をノックダウンしたがん細胞は腫瘍形成能が低下していることが明らかとなった (図 9C, D)。腫瘍における lincRNA-Smad7 の発現を調べるために、無処理の JygMC(A)細胞を BALB/c nude マウスの皮下に移植し、移植して 14 日経過後に形成された腫瘍から RNA を抽出した。その結果、形成された腫瘍において、lincRNA-Smad7 は高発現していることが明らかとなった。一方で腫瘍における Smad7 の発現量は、in vitro における TGF- β 誘導時と同程度であることがわかった (図 9E)。

以上の結果より、lincRNA-Smad7 はがん細胞の腫瘍形成能を促進している可能性が示唆された。

4. lincRNA-Smad7 によるアポトーシス制御

マウス乳がん JygMC(A)細胞において、TGF- β は DEC1 の発現誘導や BH-3 ドメインを有する Bim の発現抑制などを介してアポトーシスを制御している^[19]。



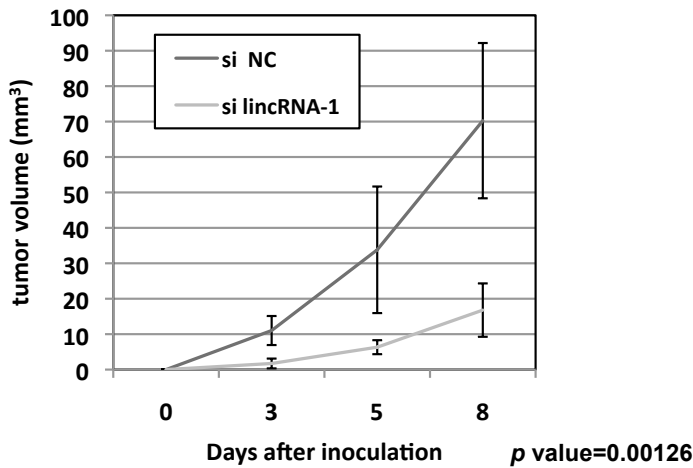
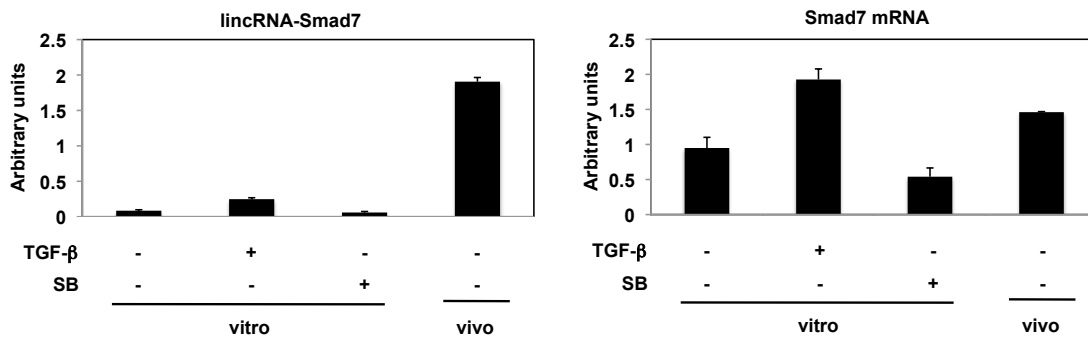
D**E**

図 9. マウス腫瘍移植モデルにおける lincRNA-Smad7 のノックダウンの影響

(A) lincRNA-Smad7 特異的な 2 種の siRNA の標的部位を示す。si lincRNA-1 は最下流のエクソンの配列に設計し、全 lincRNA-Smad7 を標的とする。silincRNA-2 は lincRNA-Smad7-variant1 特異的なエクソンに設計し、lincRNA-Smad7-variant1 を標的とする。

(B) JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、12 時間後に血清を含まない DMEM 培地に変更し、1 ng/ml TGF- β 刺激を行った。その 48 時間後に RNA を回収して定量的 RT-PCR にて lincRNA-Smad7 の発現量を調べた。補正には TBP を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。NTF; no transfection, si NC; negative control siRNA。

(C) JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、24 時間後に細胞を回収した。回収した細胞を 1.0×10^7 個ずつ BALB/c nude マウスの皮下に移植し、移植後 3 日、5 日、8 日と経過観察をした。経過後 8 日目のマウス皮下に形

成された腫瘍を撮影した。

(D) JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、24 時間後に細胞を回収した。回収した細胞を 1.0×10^7 個ずつ BALB/c ノードマウスの皮下に移植し、移植後 3 日、5 日、8 日に経過観察をし、腫瘍体積を測定した。腫瘍体積の測定方法は、 $\{(\text{長径}) \times (\text{短径})^2\} / 2$ の計算式で求めた。エラーバーは標準偏差を示す。($p = 0.00126$)

(E) JygMC(A)細胞を 1 ng/ml TGF- β または 10 μ M TGF- β 受容体のキナーゼインヒビター (SB; SB431542) で処理した。48 時間後に RNA を回収し、定量的 RT-PCR にて lincRNA-Smad7 (左図)および Smad7 (右図)の発現量を調べた。また、JygMC(A)細胞を、 1.0×10^7 個ずつ BALB/c nude マウスの皮下に移植した。移植後 14 日目に形成された腫瘍から RNA を回収し、定量的 RT-PCR にて lincRNA-Smad7 (左図)および Smad7 (右図)の発現量を調べた。

そこで、lincRNA-Smad7 によるがん細胞の腫瘍形成能の促進が細胞死を介しているか lincRNA-Smad7 のノックダウンにより検討した。siRNA を JygMC(A)細胞に導入し、12 時間後に TGF- β 刺激をした。細胞数をカウントすると、lincRNA-Smad7 のノックダウン条件下において細胞の形態変化は認められなかったものの、顕著な細胞数の減少が認められた (図 10A, B)。

次に、lincRNA-Smad7 をノックダウンした時の cleaved PARP の発現をウェスタンブロットティングにより解析した。PARP はカスパースのターゲットであり、PARP の分解によりアポトーシスが誘導されることが知られている^[56]。lincRNA-Smad7 をノックダウンすると、cleaved PARP の発現量が増加した (図 11A)。また、TGF- β による抗アポトーシス作用に伴う cleaved PARP の発現低下が若干抑制されていた (図 11A)。Total PARP の発現量に関しては、cleaved PARP の発現量の増減と逆相関していた (図 11A)。さらにアポトーシスへの関与を調べるため、lincRNA-Smad7 のノックダウンを行い TUNEL assay にてアポトーシスの評価をした。すると、lincRNA-Smad7 のノックダウンのみで TUNEL 陽性細胞が相対的に増加し、さらに TGF- β による TUNEL 陽性細胞の減少が抑制されていた (図 11B, C)。si lincRNA-2 においては、SB による TUNEL 陽性細胞の増加

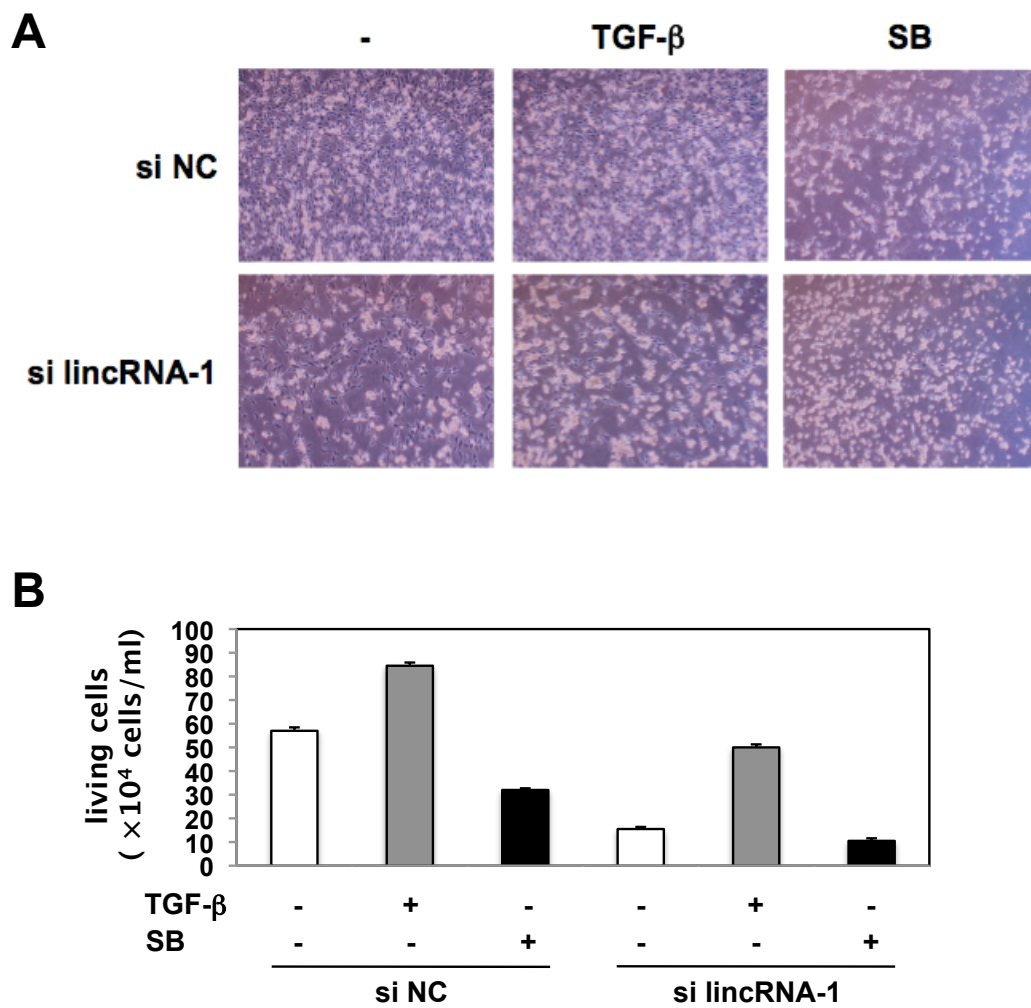


図 10. lincRNA-Smad7 のノックダウンによる細胞数の変化

(A) JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、12 時間後に血清を含まない DMEM 培地に変更し、1 ng/ml TGF- β 刺激または TGF- β 受容体のキナーゼインヒビター (SB; SB431542) 10 μ M で処理を行った。48 時間後の細胞を光学顕微鏡にて撮影した。

(B) JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、12 時間後に血清を含まない DMEM 培地に変更し、1 ng/ml TGF- β 刺激および 10 μ M SB431542 処理を行った。48 時間後に細胞を回収し、生細胞数を数えた。

が観察できなかった。si lincRNA-2 は lincRNA-Smad7-V1 のみを標的としている siRNA であるため、全 lincRNA-Smad7 のノックダウンがなされていない。この結果には、ノックダウンされずに発現している lincRNA-Smad7 の他種 variant が影響していると考えられる。

次に、ノックダウン実験結果を裏付けするため、lincRNA-Smad7 の過剰発現を行った。全ての過剰発現の実験には、最長の転写産物である lincRNA-Smad7-V1 を過剰発現した。JygMC(A)細胞にアデノウイルスを感染させ、lincRNA-Smad7 の発現量を確認した (図 12A)。また、lincRNA-Smad7 を過剰発現させても、Smad7 への影響がないことを明らかにした (図 12A)。cleaved PARP の発現量を調べた結果、lincRNA-Smad7 を高発現させると、その発現量が低下する傾向になることがわかった (図 12B)。さらに lincRNA-Smad7 を過剰発現して TUNEL assay を行った。すると、SB 処理によって TGF- β シグナルを抑制したときに、TUNEL 陽性細胞の上昇が抑制された (図 12C, D)。

以上の結果より、lincRNA-Smad7 は TGF- β の下流において抗アポトーシス作用を促進する可能性が示唆された。

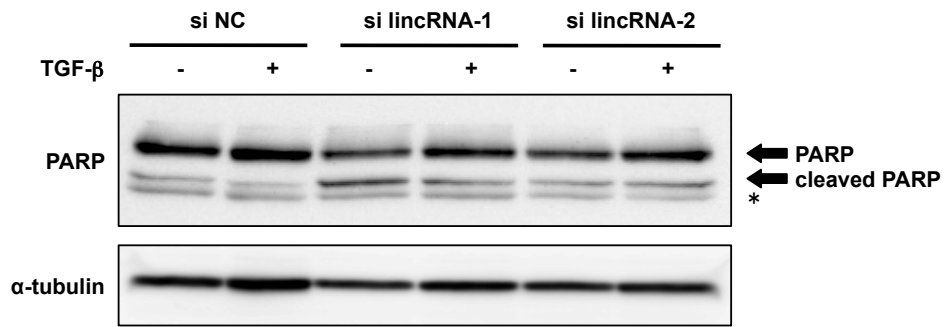
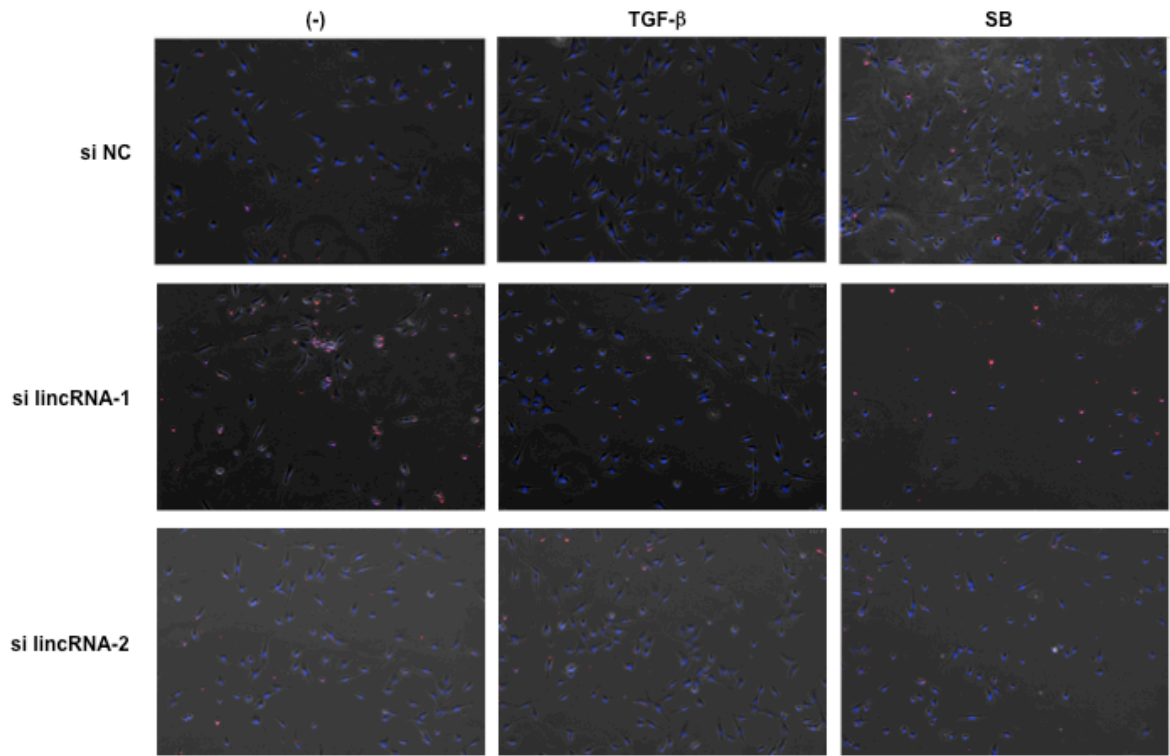
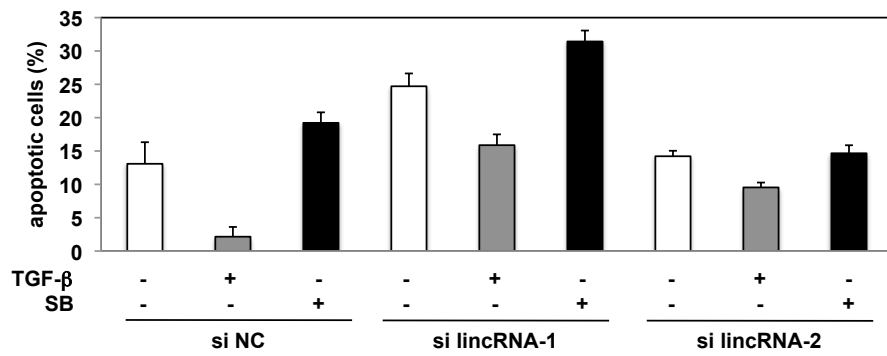
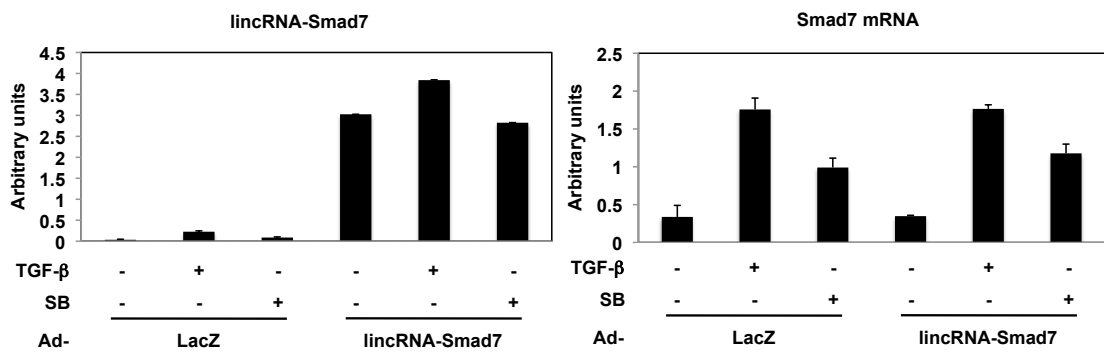
A**B****C**

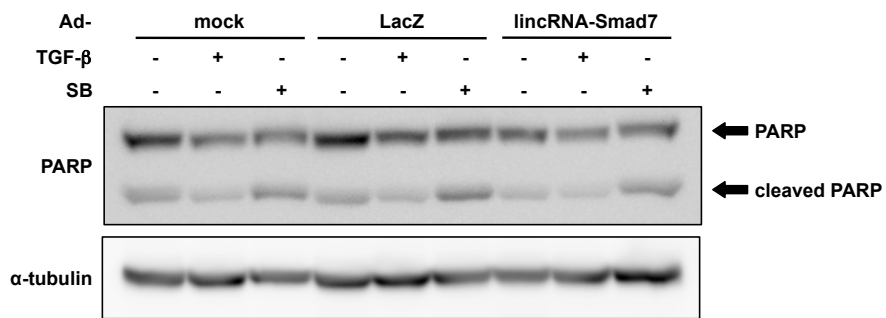
図 11. lincRNA-Smad7 のノックダウンによるアポトーシスへの影響

- (A) JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、12 時間後に血清を含まない DMEM 培地に変更し、1 ng/ml TGF- β 刺激を行った。48 時間後にタンパク質を回収して、ウエスタンブロットにて cleaved PARP のタンパク量を調べた。si NC; negative control siRNA, *; non-specific bands。
- (B) JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、12 時間後に血清を含まない DMEM 培地に変更し、1 ng/ml TGF- β 刺激および 10 μ M SB431542 (SB) 処理を行った。48 時間後に TUNEL 染色を行い、アポトーシス細胞を検出した。9 視野を撮影し、代表的な細胞写真を掲載した。青; DAPI (核染色)、赤; TUNEL 染色。
- (C) (B)において、9 視野における細胞数と TUNEL 陽性細胞を数え、アポトーシスを起こしている細胞の割合を算出した。si NC; negative control siRNA、si lincRNA-1 は全 lincRNA-Smad7 を標的とし、si lincRNA-2 は、lincRNA-Smad7-V1 のみを標的とした siRNA。エラーバーは標準偏差を示す。

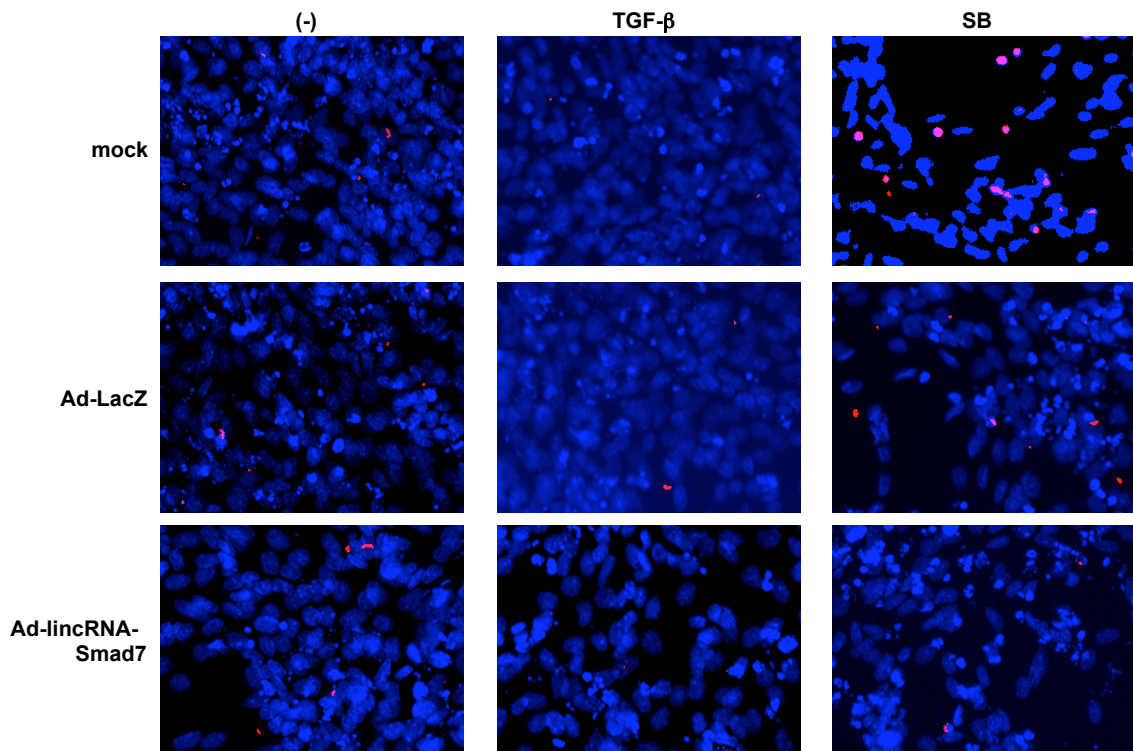
A



B



C



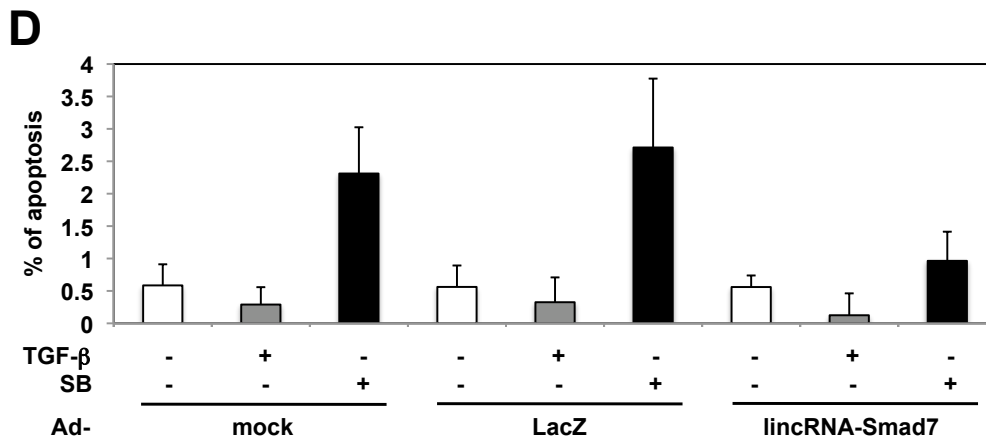


図 12. lincRNA-Smad7 の過剰発現によるアポトーシスへの影響

- (A) JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 を発現するアデノウイルスベクターを感染させ、定量的 RT-PCR にて lincRNA-Smad7 (左図)および Smad7 (右図)の発現を調べた。Negative control として、LacZ を発現するアデノウイルスを用いた。エラーバーは標準偏差を示す。mock; no infection。
- (B) JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 を発現するアデノウイルスを感染させ、24 時間後に血清を含まない DMEM 培地に変更し、1 ng/ml TGF-β刺激および 10 μM SB431542 (SB) 処理を行った。48 時間後にタンパク質を回収して、ウェスタンブロットにて cleaved PARP のタンパク量を調べた。α-tubulin はコントロールとして用いた。mock; no infection。
- (C) JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 を発現するアデノウイルスを感染させ、24 時間後に血清を含まない DMEM 培地に変更し、1 ng/ml TGF-β刺激および 10 μM SB431542 (SB) 処理を行った。48 時間後に TUNEL 染色を行いアポトーシス細胞を検出した。9 視野を撮影し、代表的な細胞写真を掲載した。青; DAPI (核染色)、赤; TUNEL 染色。
- (D) (C)において、9 視野における細胞数と TUNEL 陽性細胞を数え、9 視野における細胞数と TUNEL 陽性細胞を数え、アポトーシスを起こしている細胞の割合を算出した。エラーバーは標準偏差を示す。

5. lincRNA-Smad7 によるアポトーシス関連因子の制御

lincRNA-Smad7 は TGF- β の下流にてアポトーシスを抑制することが示唆された (図 11, 12)。そこで、TGF- β 、lincRNA-Smad7 の下流においてアポトーシスを制御する因子の同定を試みた。当研究室における JygMC(A)細胞のマイクロアレイデータより、TGF- β の下流として発現変動を受けている代表的なアポトーシス制御因子である DEC1 と Bim の発現変動を調べた^[19]。しかし、lincRNA-Smad7 をノックダウンしても DEC1、Bim 共に発現変動への影響は観察できなかった (図 13A, B)。さらに、その他の BH3 ドメインを有する代表的なアポトーシス制御因子に対する影響を網羅的に調べたが、lincRNA-Smad7 のノックダウンにより影響を受けている因子は同定できなかった (data not shown)。

6. EMT およびその他のシグナルへの lincRNA-Smad7 の関与

NMuMG 細胞において lincRNA-Smad7 をノックダウンしても、コントロールと同様に、TGF- β 処理により敷石状の細胞が線維芽細胞様の形態に変化した (図 14A)。さらに EMT マーカーである E-cadherin、N-cadherin、Fibronectin、Snail、 δ EF1、SIP1 の発現量も、コントロールと同様の発現変動を示した (図 14B)。ま

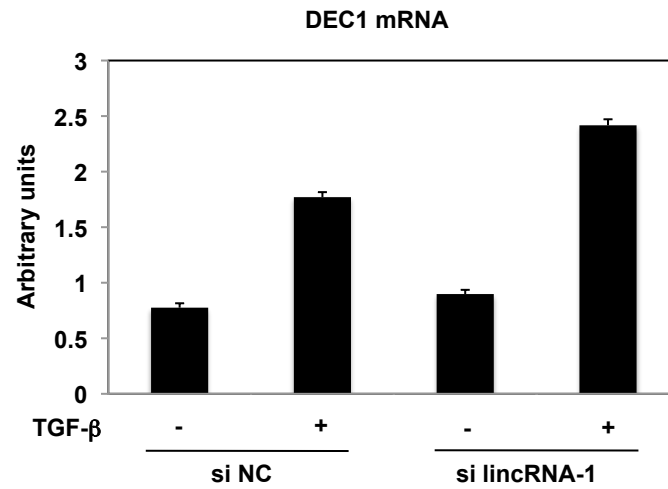
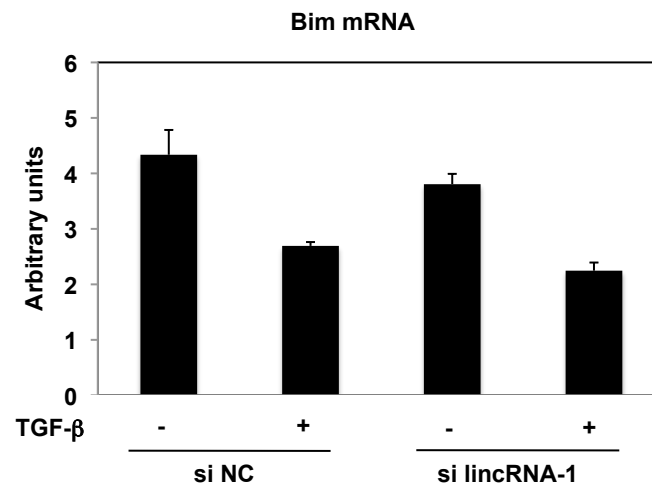
A**B**

図 13. lincRNA-Smad7 のノックダウンによる TGF- β 下流アポトーシス制御因子への影響

JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、12 時間後に血清を含まない DMEM 培地に変更し、1 ng/ml TGF- β 刺激を行った。その 48 時間後に RNA を回収して定量的 RT-PCR にて mRNA の発現量を調べた。(A) DEC1 mRNA 発現量、(B) Bim mRNA 発現量。補正には TBP を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。si NC; negative control siRNA。

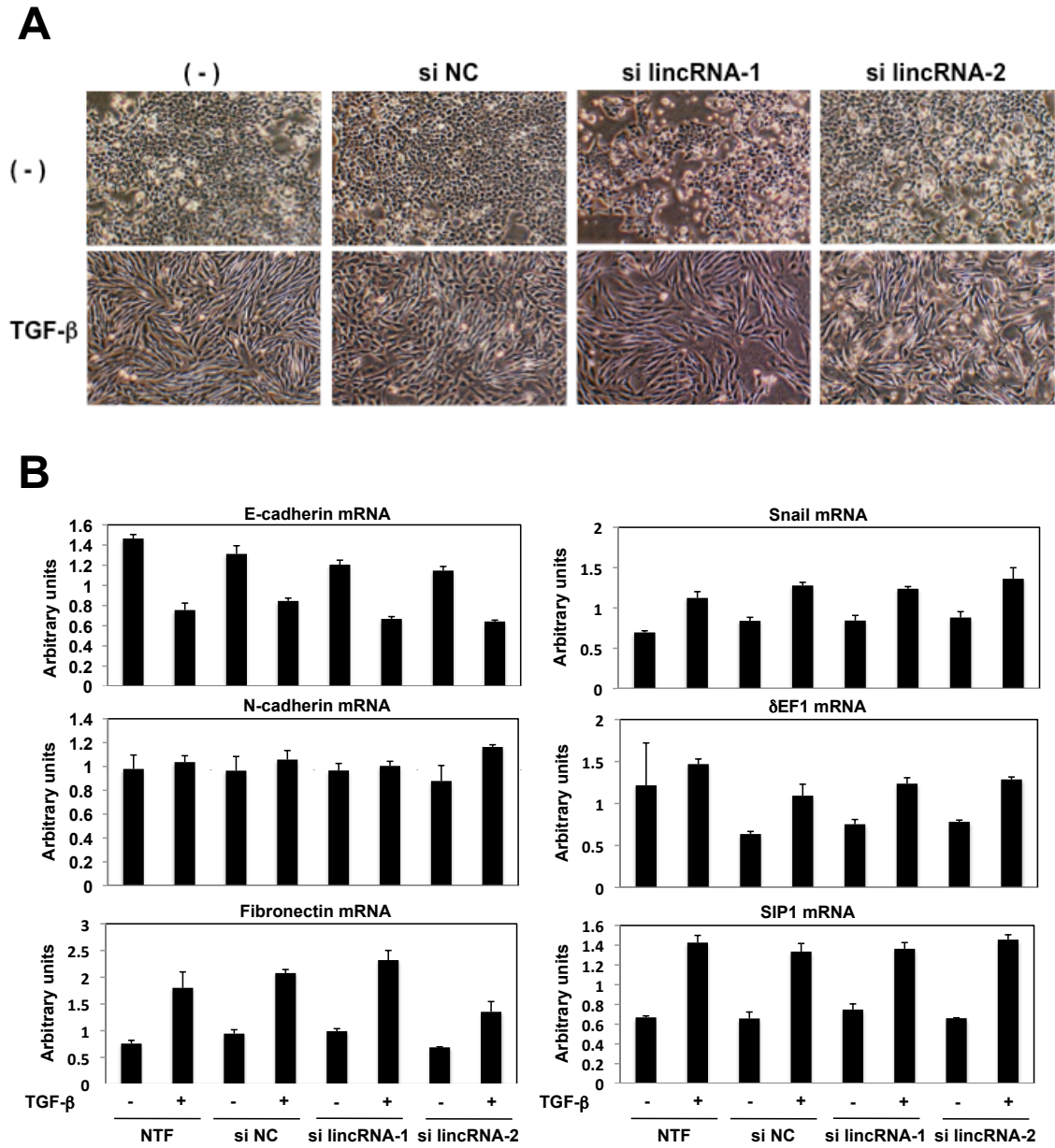


図 14. lincRNA-Smad7 のノックダウンによる EMT に対する影響

(A) NMuMG 細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、12 時間後に 1 ng/ml TGF- β 刺激を行った。その 48 時間後の細胞を光学顕微鏡にて撮影した。

(B) NMuMG 細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、12 時間後に 1 ng/ml TGF- β 刺激を行った。その 48 時間後に mRNA を回収して定量的 RT-PCR にて EMT 関連因子の発現量を調べた。補正には TBP を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。NTF; no transfection, si NC; negative control siRNA。

た、lincRNA-Smad7 が TGF- β シグナルに与える影響を調べるため、lincRNA-Smad7 のノックダウンを行い、リン酸化 Smad2 および Smad7 の発現を確認した。すると、Smad2 のリン酸化レベルは lincRNA-Smad7 をノックダウンしても変化はなく、Smad7 mRNA の発現量の変動の差もなかった (図 15A, B)。さらに、lincRNA-Smad7 による細胞死に対する細胞周期調節因子の関与を調べた。JygMC(A)細胞において lincRNA-Smad7 をノックダウンし、TGF- β の標的として代表的な細胞周期調節因子である p21 と p15 の mRNA の発現を確認した。しかし、lincRNA-Smad7 をノックダウンしても p21 および p15 両者における発現量の変化に影響はなかった (図 16)。

以上の結果から、lincRNA-Smad7 は乳腺上皮細胞および乳がん細胞において TGF- β によって強く誘導され抗アポトーシス作用を発揮することが明らかになった。一方で、NMuMG 細胞における TGF- β 誘導性 EMT やがん細胞における TGF- β シグナルと細胞周期調節因子に対して、lincRNA-Smad7 の関与は低く、TGF- β の作用の一部を選択的に増強していることが示唆された。

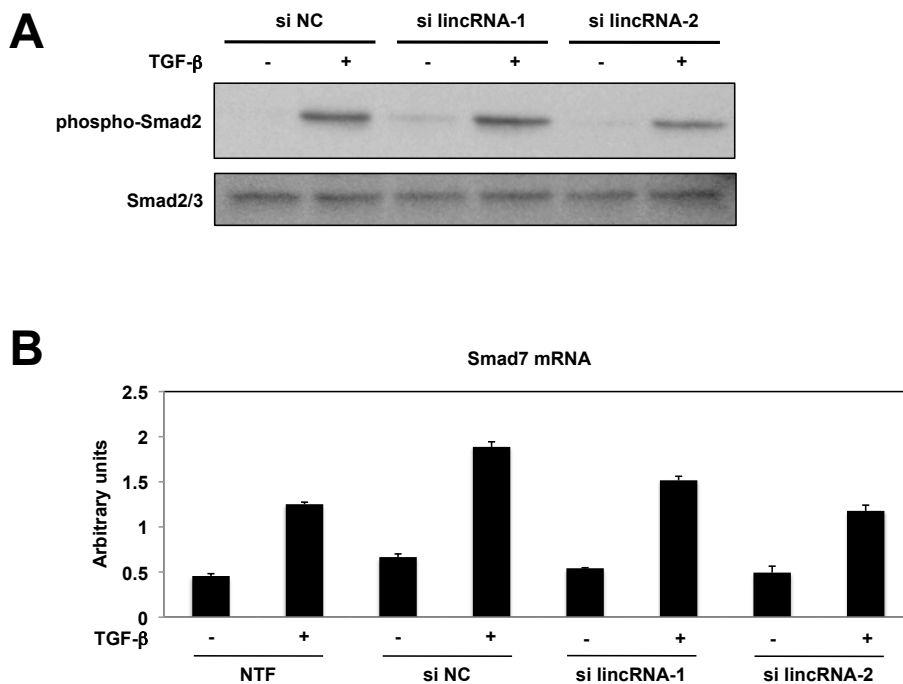


図 15. lincRNA-Smad7 のノックダウンによる TGF- β シグナルに対する影響

(A) JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、12 時間後に血清を含まない DMEM 培地に変更し、1 ng/ml TGF- β 刺激を行った。48 時間後にタンパク質を回収して、ウエスタンブロッティングにてリン酸化 Smad2 およびトータル Smad2/3 の発現を調べた。si NC; negative control siRNA。

(B) JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、12 時間後に血清を含まない DMEM 培地に変更し、1 ng/ml TGF- β 刺激を行った。48 時間後に mRNA を回収して定量的 RT-PCR にて Smad7 の発現量を調べた。補正には TBP を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。NTF; no transfection, si NC; negative control siRNA)。

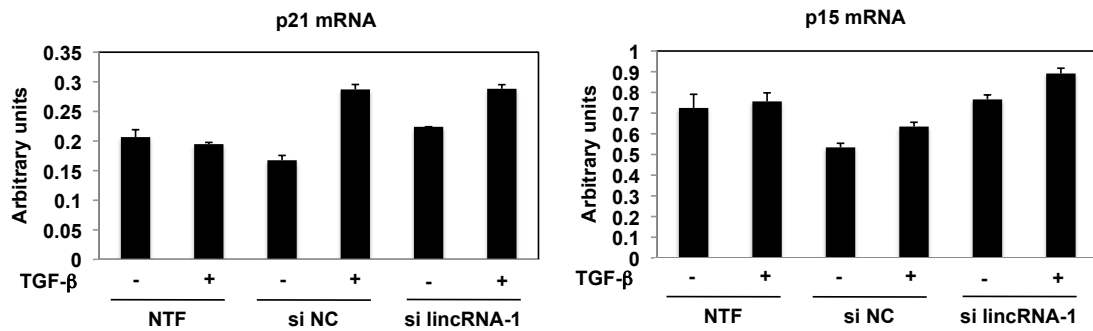


図 16. lincRNA-Smad7 のノックダウンによる細胞周期調節因子に対する影響
 JygMC(A)細胞に lincRNA-Smad7 の siRNA を導入し、12 時間後に血清を含まない DMEM 培地に変更し、1 ng/ml TGF-β刺激を行った。48 時間後に mRNA を回収して定量的 RT-PCR にての発現量を調べた。補正には TBP を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。NTF; no transfection, si NC; negative control siRNA。

ii) FAIRE-sequencing を用いた EMT 獲得前後のクロマチンの状態変化

7. TGF- β シグナルによる EMT の獲得

がんの発生と悪性化は、さまざまなゲノム構造異常とその結果としての転写産物の量的・質的異常によりなされている。ゲノム DNA は、ヒストンコアタンパクによってクロマチン構造をとっており、このクロマチン構造のクロマチンリモデリング因子、ヒストンテイル修飾酵素、転写因子などによる調節をとおりして遺伝子の発現が調節されている。TGF- β により EMT が誘導される際には種々の EMT 関連因子の発現変動が起きるが、必ずしもすべての上皮細胞がそのような変化をきたすわけではない。本検討では、EMT 能獲得のモデル細胞を用い、クロマチンの開閉状態を調べてその制御機構の関与を探るため、FAIRE-sequencing を行った。

マウス乳腺上皮細胞の EpH4 は、TGF- β によって EMT が誘導されない。一方で、Eph4 に RasG12V を安定的に導入した細胞株である EpRas 細胞は、TGF- β により EMT が誘導されることが知られている。はじめに、これら 2 種の細胞に TGF- β 処理をすると、過去の報告と同様に、EpRas においてのみ EMT 様の形態変化が認められた (図 17A)。

EpRas 細胞においては、初期において TGF- β により細胞間が疎になる scattering が誘導される^[57]。続いて間葉系マーカーである Vimentin などの発現上昇が生じ、E-cadherin の発現低下を伴う EMT が誘導されるまでは、4 日から 6 日程度必要であることが知られている^[58]。そしてこのプロセスの途中で TGF- β 処理を停止すると、上皮系様の性質に戻る可逆性がある。そこで、EpH4 と EpRas において上皮系および間葉系マーカーの発現を経時的に調べた。E-cadherin、N-cadherin、Fibronectin、Vimentin、 δ EF1、SIP1、Snail、Twist の発現変動を調べた結果、上皮系マーカーの発現減少および間葉系マーカーの発現上昇が顕著であったのは、TGF- β 処理 8 日目であった (図 17B)。

以上の結果より、TGF- β 処理 8 日目の細胞で FAIRE-sequencing を行うこととした。

8. TGF- β および Ras 活性化によるクロマチンの状態変化

上述の条件において FAIRE を行い、各遺伝子の転写開始点近傍に設計したプライマーを用いて、上皮系および間葉系マーカーをコードしている遺伝子座でのクロマチン開閉状態を推定するため FAIRE-qPCR を行った。その結果、間葉

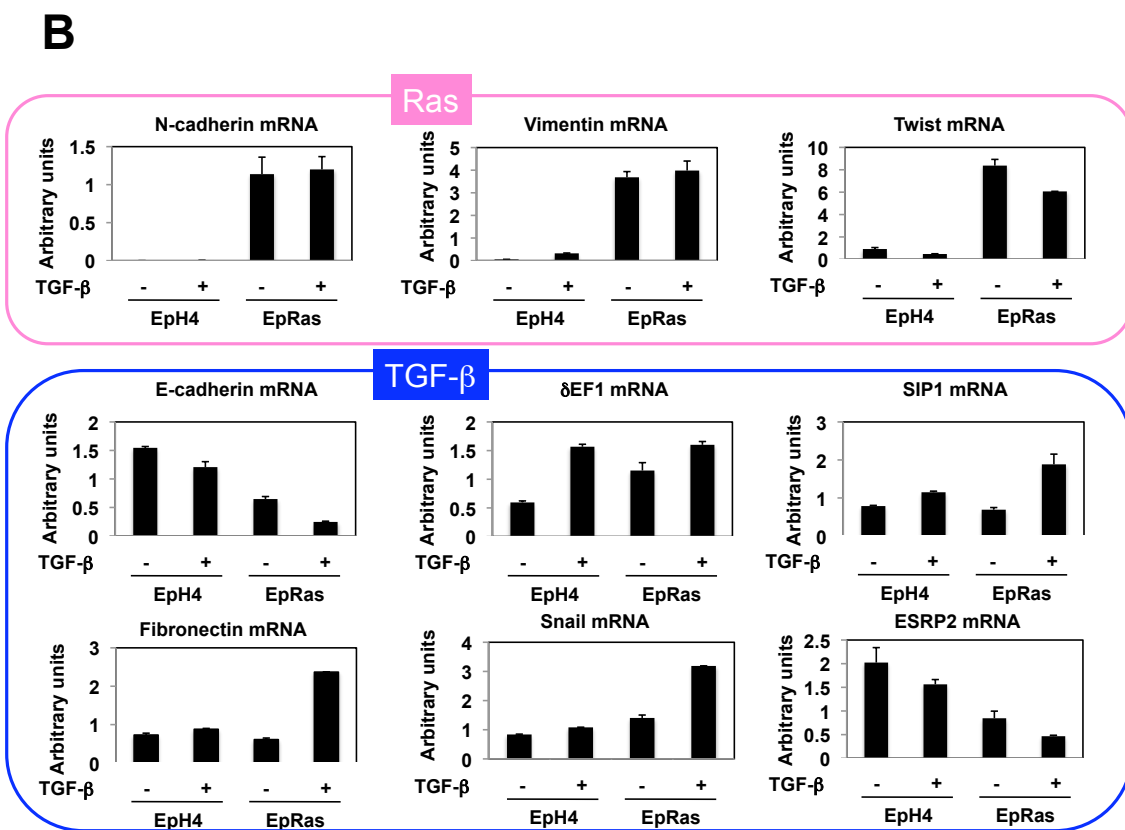
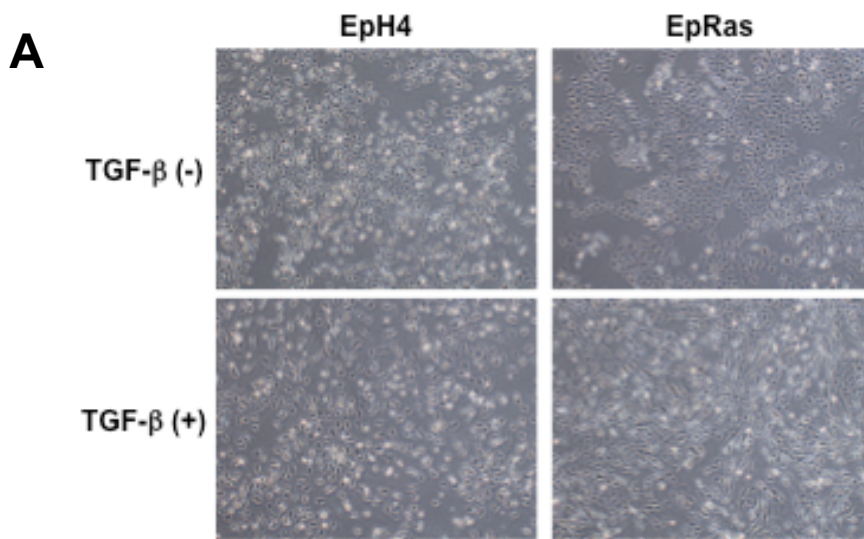


図 17. TGF- β による EMT 関連因子の発現変化

(A) EpH4 細胞と EpRas 細胞に 1 ng/ml TGF- β 刺激を行った。その 8 日後の細胞を光学顕微鏡にて撮影した。

(B) EpH4 細胞と EpRas 細胞に 1 ng/ml TGF- β 刺激を行った。その 8 日後の細胞から mRNA を回収して、定量的 RT-PCR にて EMT 関連因子の発現量を調べた。上図は Ras シグナルの活性化にて発現変動する N-cadherin、Vimentin、Twist、下図は TGF- β シグナルの活性化により発現変動する E-cadherin、 δ EF1、SIP1、Fibronectin、Snail、ESRP2 の発現量を示す。補正には TBP を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。

系マーカーである N-cadherin は、mRNA の発現が EpRas において顕著に誘導されている中で、EpRas において FAIRE 産物量が増加し、TGF- β 処理による変化はなかった (図 18A, 左図)。一方同様に間葉系マーカーである Fibronectin は、EpRas に TGF- β 処理を行うと mRNA の発現が顕著に誘導されるが、細胞間においても TGF- β 処理の有無においても、FAIRE 産物量の変化は観察されなかった (図 18A, 右図)。また、上皮系マーカーである E-cadherin と ESRP2 遺伝子座では、EpH4 と比較して EpRas において FAIRE 産物量が減少し、TGF- β 処理によりさらに減少した (図 18B)。この FAIRE 産物量の減少は、それぞれの mRNA の発現量の減少に反映されていた。

以上の結果より、E-cadherin と ESRP2 など一部の上皮系マーカーをコードする遺伝子は、Ras シグナルの活性化によりクロマチンが閉じ、TGF- β シグナルの活性化によってさらにクロマチンが閉じることで mRNA の発現を減少させ、間葉系に傾けることで EMT を誘導することが示唆された。また間葉系マーカーである Fibronectin は当初よりクロマチンのオープンの状態が維持され、Ras 活性化および TGF- β シグナルの活性化により mRNA の発現上昇を伴う EMT が誘導されることが示唆された。一方で同様に間葉系マーカーである N-cadherin は、Ras

シグナルの活性化に伴いクロマチンが開くが、TGF- β シグナルによる発現誘導についてはクロマチン変化以外の転写調節等によりその発現が制御されていることが示唆された。

9. FAIRE 領域の解析

上記の結果より、EMT の獲得には、Ras シグナルおよび TGF- β シグナルの活性化によるクロマチンの状態変化を伴っていることが強く示唆された。そこで、FAIRE-sequencing を用いて、EMT の獲得前後における FAIRE 領域を解析し、その配列や濃縮しているモチーフの同定を網羅的に行った。FAIRE-sequencing は既報のプロトコルに準じて、Illumina 社の GAIIX シーケンサーを用いて行った。その結果、Ras が活性化することで、N-cadherin をコードする遺伝子の転写開始点近傍またはその他の領域においてリード数が増えており、前述の FAIRE-qPCR と同様の結果を得ることができた (図 18C)。さらに、FDR 1%において TGF- β 無処理の EpH4 サンプルでは 47,423 箇所、TGF- β 処理をした EpH4 サンプルでは 29,016 箇所、TGF- β 無処理の EpRas サンプルでは 42,613 箇所、TGF- β 処理をした EpRas サンプルでは 39,921 箇所の FAIRE 領域が同定された (図 19A, B)。次に、

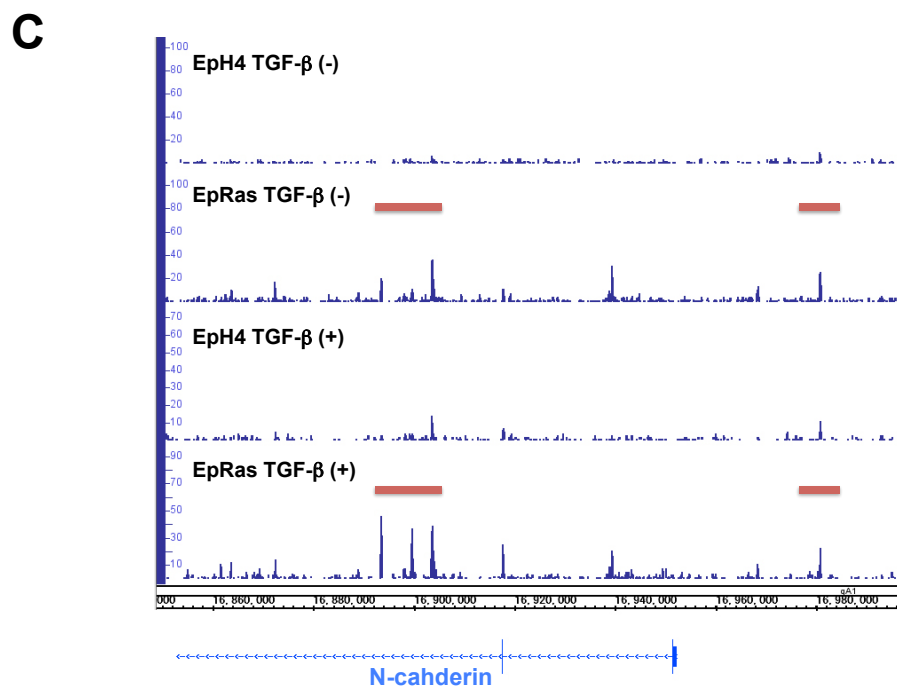
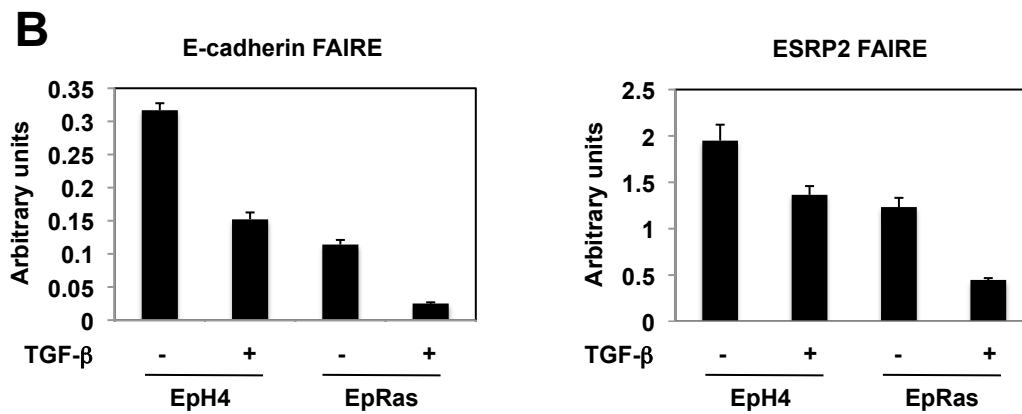
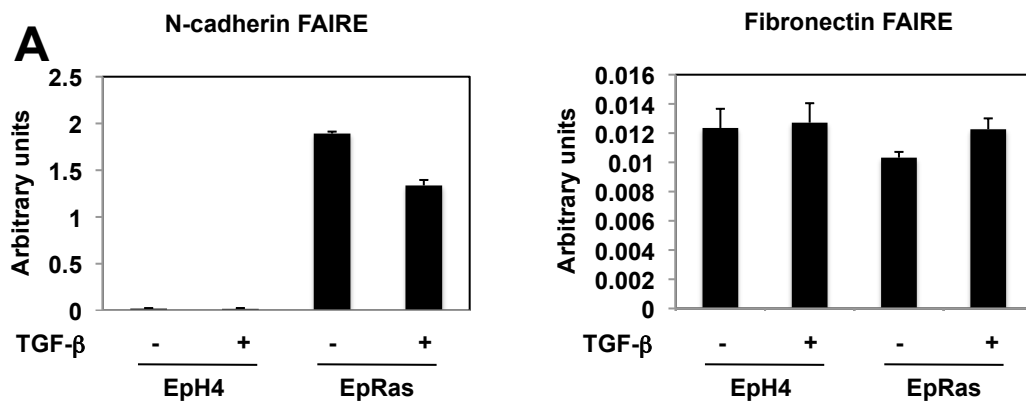
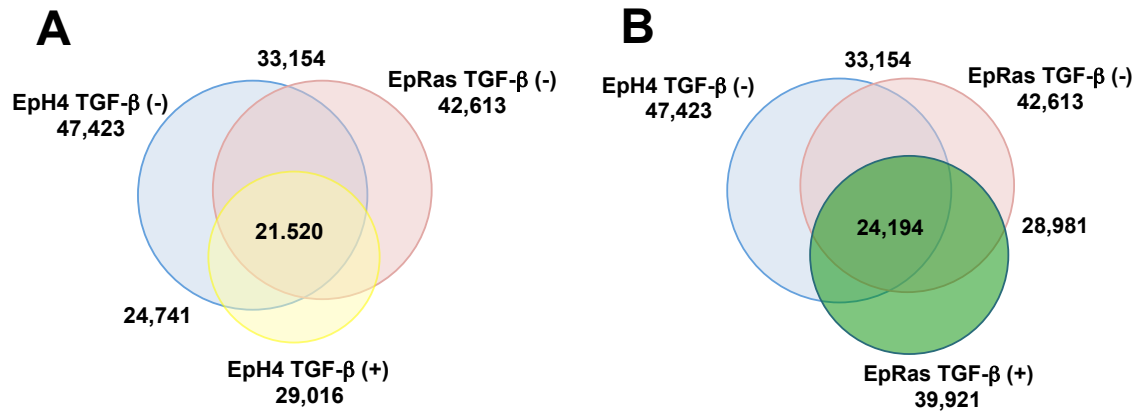


図 18. Ras シグナルおよび TGF- β シグナルによる FAIRE 領域の変化

EpH4 細胞と EpRas 細胞に 1 ng/ml TGF- β 刺激を行った。その 8 日後の細胞に FAIRE を行い、転写開始点近傍に設計した特異的なプライマーを用い、定量的 RT-PCR にて FAIRE DNA の相対量を調べた。(A) 間葉系マーカーである N-cadherin (左図)、Fibronectin (右図)、(B) 上皮系マーカーである E-cadherin (左図)、ESRP2 (右図)での FAIRE DNA 相対量。補正には、FAIRE 処理を行う前の input DNA を用いた。(C) Cisgenome により作成した TGF- β 無刺激/刺激を行った EpH4 細胞および EpRas 細胞の FAIRE-sequencing データを Integrated genome browser を用いて表示した。N-cadherin 部位を表示した。縦軸はタグ数。赤線: Ras 活性化によりピークが変化している部位を示す。

同データを各 FAIRE 領域のピークから前後 150 bp の長さに設定し、さらにプロモーター領域および simple sequence repeat (SSR) 領域を除き、それぞれの細胞における特異的な FAIRE 領域の重複を算出した (図 19C)。これらの処理は、種々のモチーフが高頻度に保存されているプロモーターと、ゲノムにおける保存性の高い SSR を除くことで、各種のエンハンサーに特徴的な配列を見出すために行った。以後のモチーフ解析には、この条件において見出した各群特異的な FAIRE 領域を用いた。以上の結果より、それぞれ Ras 活性化単独による FAIRE 領域の変化、また Ras 活性化状態で TGF- β により増加する FAIRE 領域の変化を見出した。

次に、まず Ras 活性化による FAIRE 領域の変化を検討するため、TGF- β 無処理の EpH4 特異的および TGF- β 無処理の EpRas 特異的な FAIRE 領域中において、どのようなモチーフが濃縮しているかを算出した。その結果、NF1c、C/EBP ファミリーに結合するモチーフを同定した。各モチーフの FAIRE 領域における頻度を解析した結果、NF1c と C/EBP ファミリーに結合するモチーフは EpRas において減少し、AP-1 ファミリーに結合するモチーフはやや増加していた (図 20A)。次に、ゲノムからランダムに算出した配列をコントロールとして用いて、これ



C

	EpH4 TGF- β (-) specific	common	EpH4 TGF- β (+) specific
EpH4 TGF- β (-) vs EpH4 TGF- β (+)	22,682	24,755	3,788
(Promoter and SSR removed)	14,572		3,221
	EpH4 TGF- β (-) specific	common	EpRas TGF- β (-) specific
EpH4 TGF- β (-) vs EpRas TGF- β (-)	14,269	33,181	9,148
(Promoter and SSR removed)	10,237		7,264
	EpRas TGF- β (-) specific	common	EpRas TGF- β (+) specific
EpRas TGF- β (-) vs EpRas TGF- β (+)	13,632	29,011	11,102
(Promoter and SSR removed)	8,145		9,784

図 19. EpH4 細胞 TGF- β (-/+)と EpRas 細胞 TGF- β (-/+)における FAIRE 領域の関係

EpH4 細胞と EpRas 細胞における FAIRE 領域の重複を算出し、Venn 図で表した。数字は領域数を示す。FDR は 1%未満とした。

(A) 無処理の EpH4 細胞および EpRas 細胞、1 ng/ml TGF- β 刺激を行った EpH4 細胞における FAIRE 領域の重複。(B) 無処理の EpH4 細胞および EpRas 細胞、1 ng/ml TGF- β 刺激を行った EpRas 細胞における FAIRE 領域の重複。(C) 各領域のピーク前後 150bp の長さに設定し、さらにプロモーター領域および simple sequence repeat (SSR) 領域を除き、それぞれの細胞における FAIRE 領域の重複を算出した。

らモチーフの fold enrichment を算出した。その結果、NF1c と C/EBP ファミリーに結合するモチーフは、頻度の増加と同様に濃縮率も EpRas において上昇していた (図 20B)。しかし、AP-1 ファミリーに結合するモチーフに関しては、頻度の結果とは異なり、細胞間での濃縮の差は見られなかった (図 20B)。

次に、Ras 活性化状態における TGF- β による FAIRE 領域の影響を検討するため、TGF- β 無処理および処理を行った EpRas サンプルを用いた Cisgenome によるモチーフ解析を行った。その結果、TGF- β 処理を行った EpRas サンプルにおいて、Runx1 に結合するモチーフを同定した。そのモチーフの頻度を算出すると、TGF- β 処理を行った EpRas 細胞において顕著に増加していることが明らかとなった (図 20C)。

以上の結果より、EMT 獲得の前後において、Ras シグナルまたは TGF- β シグナルの活性化に伴う変化として、FAIRE 領域におけるモチーフの頻度や濃縮が変化している転写因子結合配列群があることが示唆された。

10. EMT 獲得における関連転写因子の網羅的解析

上述のように、FAIRE-sequencing におけるモチーフ解析により、EMT の獲得

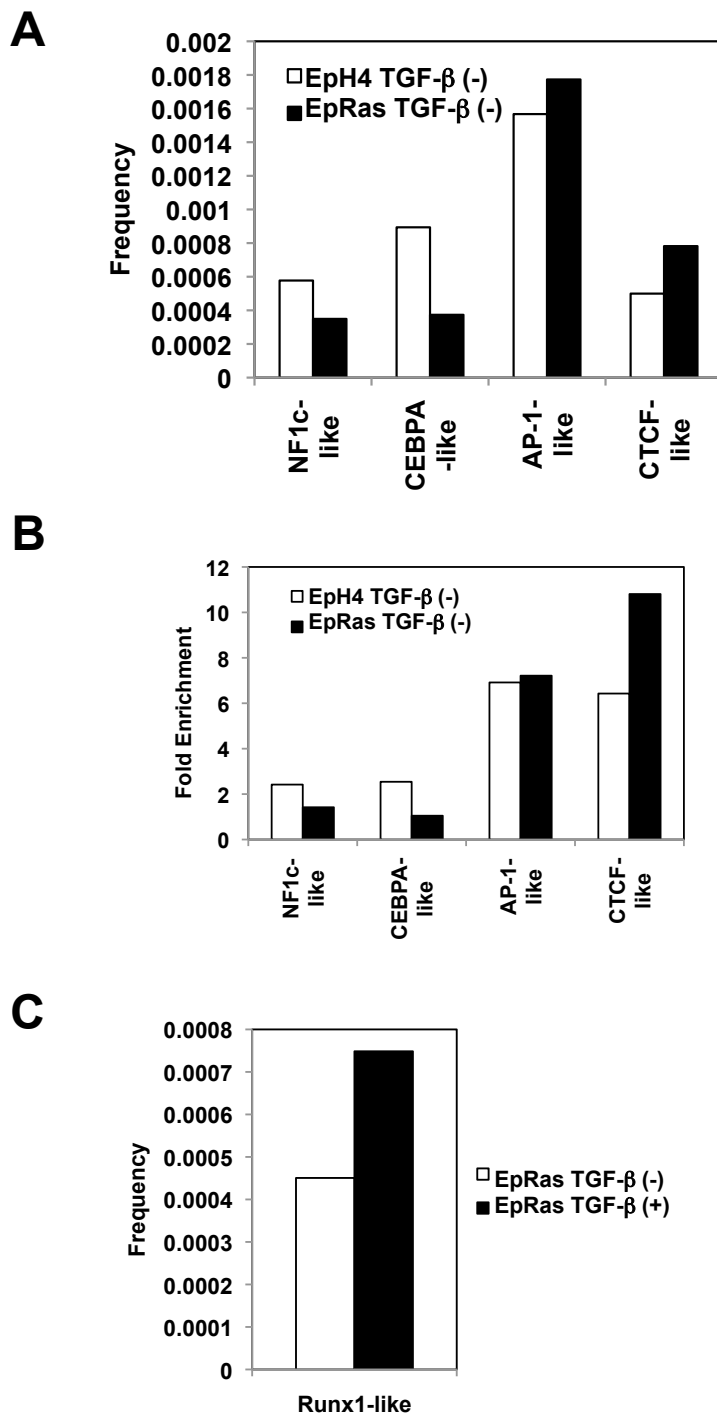


図 20. FAIRE-sequencing データより算出した FAIRE 領域内のモチーフ
 EpH4 細胞と EpRas 細胞において同定した FAIRE 領域について、シグナルのピーク部位の前後 150bp のゲノム配列を取得し、CisGenome の Gibbs motif sampler を用いて濃縮するモチーフの de novo motif prediction を行った。

- (A) EpH4 細胞 TGF- β (-) と EpRas 細胞 TGF- β (-) における FAIRE 領域内のモチーフの頻度を示した。CTCF はポジティブコントロールとして用いた。
- (B) EpH4 細胞 TGF- β (-) と EpRas 細胞 TGF- β (-) における FAIRE 領域内の頻度の倍率を示した。CTCF はポジティブコントロールとして用いた。
- (C) CisGenome の Gibbs motif sampler を用いて同定した Runx1-like モチーフの FAIRE 領域内の頻度を示した。

において、Ras シグナルおよび TGF- β シグナルの活性化に伴い頻度や濃縮が変化
する特定のモチーフ群を見出した (図 20)。そこで、それらモチーフに結合する
転写因子群のクロマチン構造の開閉メカニズムへの関与を検討するため、まず
どのような転写因子が発現しているか RNA-sequencing を行い mRNA の発現量の
変化を解析した。先述の FAIRE-sequencing は TGF- β 処理 8 日目におけるクロマ
チン開閉状態を解析しているが、RNA-sequencing は TGF- β 処理 48 時間後におけ
る mRNA の発現量を解析した。これは、長時間を経て EMT が完了している際
のクロマチン構造の変化の過程において、関連する転写因子の発現はそれに先
んじてより早期に起こることが考えられたためである。

まず、Ras 活性化による転写因子の発現変動を検討した。Ras の活性化により
モチーフ頻度が減少していた C/EBP 結合モチーフに結合する C/EBP β および
C/EBP δ は、EpH4 において顕著に発現しており、EpRas において著しく発現が低
下していた (図 21A)。さらに定量的 RT-PCR にて C/EBP β および C/EBP δ の発現
量を解析すると、RNA-sequencing の結果と同様に、EpH4 では発現量が高く、
EpRas において発現量が低下した (図 21B)。また、興味深いことに、EpH4 の
FAIRE 領域でより濃縮しているモチーフに結合するその他の転写因子群の発現

量を EpH4 および EpRas において半定量的 RT-PCR を用いて解析した結果、C/EBP ϵ を除くすべての転写因子の発現が EpH4 と比較して EpRas において低下していた (図 21C)。また、Ras 活性化によりモチーフ頻度が上昇している AP-1 ファミリーのクロマチン開閉への関与の可能性を検討した。AP-1 ファミリーは、ATF ファミリーや jun ファミリー、Fos ファミリーに属するタンパク質で構成されているヘテロ二量体タンパク質であることが知られている^[59]。そこで、RNA-sequencing の結果を検討したところ、ATF ファミリー、Jun ファミリー、Fos ファミリーに属する種々の転写因子のうち、ATF4 の発現が EpRas において上昇していた (図 22A, B, C)。

次に Ras 活性化状態での TGF- β による転写因子の発現変動を検討した。Ras 活性化状態において TGF- β 処理によりモチーフの頻度が増加する Runx ファミリーに関しては、TGF- β 処理を行った EpRas において RUNX1 の発現量が上昇していることが明らかとなった (図 22D)。

次に、FAIRE-sequencing により得られたデータから、DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis を用いて遺伝子オントロジーを算出した。その結果、TGF- β 無処理の EpRas に対して TGF- β 処理を行った EpRas と

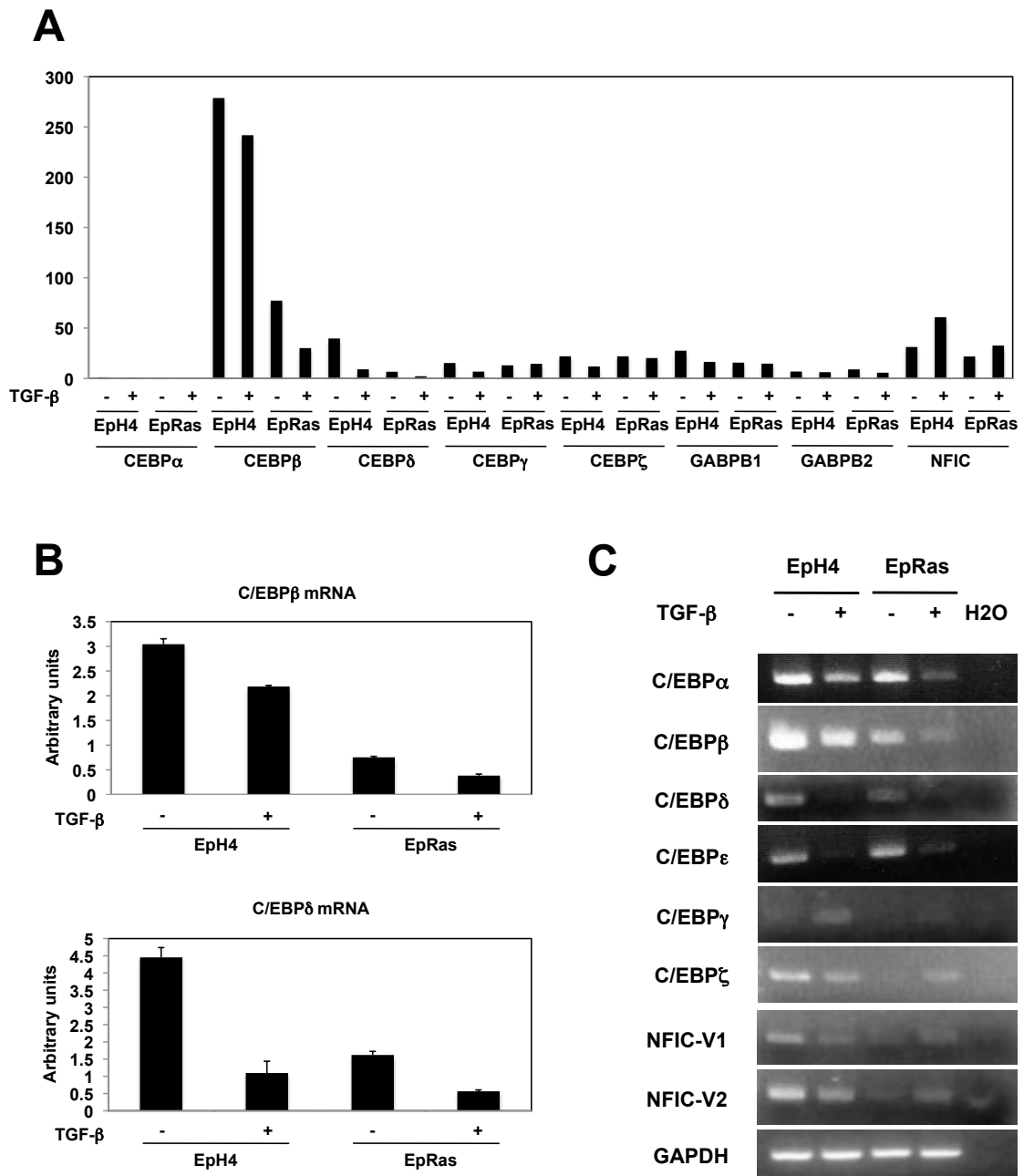
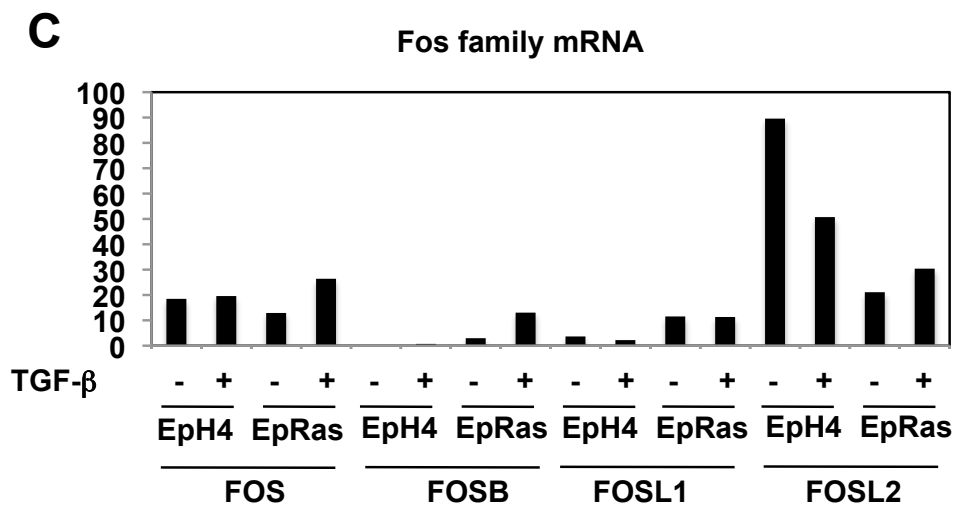
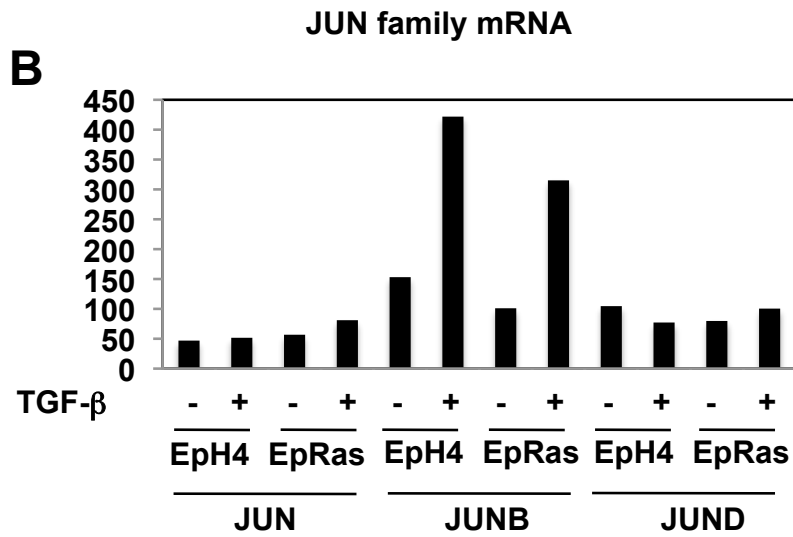
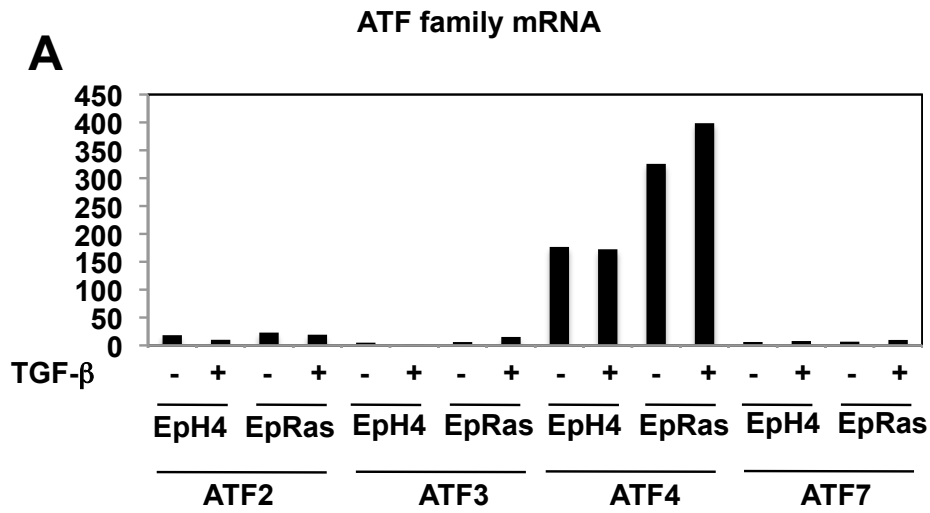


図 21. FAIRE-sequencing データより算出したモチーフに結合する転写因子の発現変化

- (A) EpH4 細胞と EpRas 細胞に 1 ng/ml TGF- β 刺激を行い、48 時間後の細胞から RNA を回収して、RNA-sequencing を行った。縦軸は fold enrichment を示す。
- (B) EpH4 細胞と EpRas 細胞に 1 ng/ml TGF- β 刺激を行い、48 時間後の細胞から mRNA を回収して、定量的 RT-PCR にて C/EBP β と C/EBP δ の発現量を調べた。補正には TBP を用いた。エラーバーは標準偏差を示す。

(C) EpH4 細胞と EpRas 細胞に 1 ng/ml TGF- β 刺激を行い、48 時間後の細胞から mRNA を回収して、半定量的 RT-PCR にてモチーフに結合する転写因子の発現を調べた。GAPDH はコントロールとして用いた。



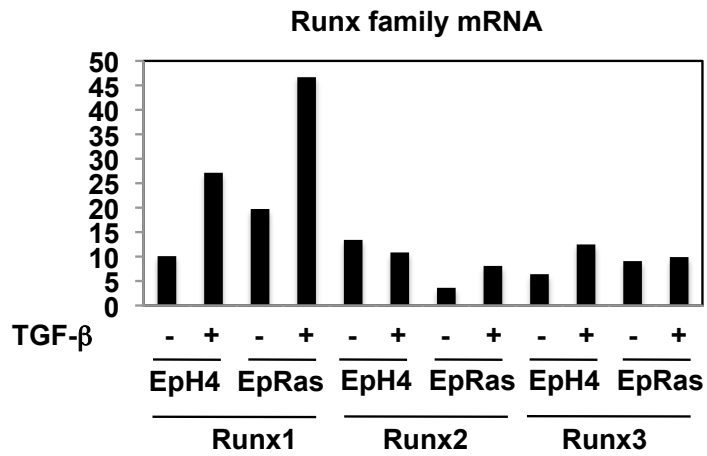
D

図 22. FAIRE-sequencing データより算出したモチーフに結合する転写因子の発現変化 (AP-1 ファミリー)

EpH4 細胞と EpRas 細胞に 1 ng/ml TGF- β 刺激を行い、48 時間後の細胞から RNA を回収して、RNA-sequencing を行った。(A) ATF ファミリー、(B) Jun ファミリー、(C) Fos ファミリー (D) Runx1 ファミリーの発現量を調べた。縦軸は fold enrichment を示す。

TGF- β 無処理の EpH4 に対して TGF- β 処理を行った EpH4 においては、extracellular matrix や、cell adhesion 関連因子が増加していた (図 23)。また、TGF- β 無処理の EpH4 に対して TGF- β 無処理の EpRas では secreted、signal または cell migration 関連因子が増加しており、TGF- β 処理を行った EpH4 に対して TGF- β 処理を行った EpRas では blood vessel development や cell migration、cell motility、MAPK phosphatase 関連因子が増加していた (図 23)。

以上の結果より、EMT 能獲得前後において、FAIRE-sequencing により見出した種々のモチーフに結合する転写因子群の多くは、Ras シグナルおよび TGF- β シグナルの活性化に伴うモチーフ頻度の増減に相関して mRNA の発現量が増減していることが明らかになった。

	EpRas TGF- β (+) /EpRas TGF- β (-)	Eph4 TGF- β (+) /Eph4 TGF- β (-)	EpRas TGF- β (-) /Eph4 TGF- β (-)	EpRas TGF- β (+) /Eph4 TGF- β (+)
extracellular matrix	9.56	2.68	0	0
cell adhesion	7.77	8.85	0	0
secreted, signal, glycoprotein	6.85	7.1	1.02	0
ECM-receptor interaction	4.58	1.71	0	0
heparin binding	3.9	2.17	0	0
mitogen	2.71	0	0	0
blood vessel development	0	2.7	0	2.08
cell migration, cell motility	0	0	1.48	1.55
MAPK phosphatase	0	0	0	2.46

図 23 遺伝子オントロジー

FAIRE-sequencing により得られたデータから、DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis を用いて遺伝子オントロジーを算出した。

考察

本研究の前半部では、乳腺上皮細胞において TGF- β 誘導性 lincRNA を新たに同定し、lincRNA-Smad7 がマウス乳がん細胞における細胞死において重要な役割を果たしていることを明らかにした。後半部では FAIRE-sequencing を用いて、EMT 獲得前後において TGF- β シグナルおよび Ras シグナルの活性化に伴うクロマチンの構造変化の可能性を示した。さらに、クロマチン構造変化に重要な役割を果たす可能性のある転写因子群の発現変化の存在を同定した。

lincRNA-Smad7 の発現・細胞生存の制御機構と TGF- β シグナルとの関係

TGF- β はがんの発生・進展において、初期ではがん抑制因子として、後期ではがん促進因子として作用する。本研究において用いたマウス乳がん JygMC(A)細胞は、TGF- β によりアポトーシスが阻害され、TGF- β 受容体のキナーゼインヒビターSB431542によりアポトーシスが促進される。つまり、この JygMC(A)細胞において、TGF- β は oncogenic な作用を有している。その環境下において

lincRNA-Smad7 をノックダウンすると、細胞数の減少が確認された(図 10A, B)。

RT-PCR の結果からも、lincRNA-Smad7 は TGF- β を遮断した条件でも、TGF- β 以外の何らかの制御因子によってある程度発現しており、上記の結果と合わせ、この発現量でも細胞の生存を正に制御していることが示唆される。マウス腫瘍移植モデルでの検討からも、lincRNA-Smad7 は細胞の生存を制御し、その結果としてがんの進展においてがん促進因子として作用する可能性が示唆される(図 9C, D)。ただし、本研究のマウス腫瘍移植実験系で用いたのは siRNA による lincRNA-Smad7 のノックダウンであり、siRNA の効果が期待できる 1 週間程度までの経時変化しか追うことができない。一過性の発現抑制のみで顕著な腫瘍形成能の抑制効果を観察したことはこの遺伝子の役割の重要性を十分に示すものと考えられる。しかし、将来の研究において、転移に与える影響や持続的な腫瘍形成能の低下について評価するためには、lincRNA-Smad7 を恒常的に発現低下した株を樹立し、その細胞を用いる必要がある。

ヒト乳がんは、Luminal A タイプ、Luminal B タイプ (HER2 陰性/ 陽性)、HER2 陽性タイプ、トリプルネガティブタイプの 4 種類のサブタイプに分類される。その分類は、ER (estrogen receptor) や PgR (progesterone receptor)、HER2 (ERBB2)

などの関連遺伝子の発現に基づいて定義される^[60]。現在マウス乳がん細胞がヒト乳がんにおけるどのサブタイプに相当するか詳細な定義は確立されていないが、本研究で用いたマウス乳がん JygMC(A) 細胞は、ホルモン受容体陰性および HER2 陽性細胞である^[19]。このことから、JygMC(A)細胞は、ヒト乳がんにおいては HER2 陽性タイプに相当すると予測される。ヒトでの lincRNA-Smad7 の役割の普遍性を調べるため、当研究室で行われたヒト皮膚ケラチノサイトや脳腫瘍細胞、スキルス胃がんの RNA-sequencing (未発表)のデータを参照した。しかしこれらのデータには、Smad7の上流に転写産物はほとんど存在しなかった。ヒトでは、同染色体上の Smad7 近傍にマウス lincRNA-Smad7 に類似する配列が約 400bp 存在するのみで、lincRNA-Smad7 の保存性はヒトマウス間において低かった。long non-coding RNA はしばしばマウスとヒトで保存されていないことが本研究遂行中のその後の報告で明らかになってきたように、ヒトにおいて lincRNA-Smad7 が発現・機能していない可能性と同時に、この保存されている約 400bp が細胞種によっては発現し、マウス lincRNA-Smad7 と同様の機能を發揮している可能性も考えられる。ヒトマウス間で保存されている約 400bp のみをクローニングして、gain of function でその機能を検討することは今後の課題と

考えられる。一方で、TGF- β シグナルの下流因子として関わる抗アポトーシス作用を発揮する転写産物が、マウスのみで発現・機能しているとすれば、今後のTGF- β シグナルのがん細胞におけるアポトーシス研究、さらには他の多くのTGF- β シグナル経路の制御によるがん進展の制御法開発プロセスにおいて、マウスモデルやマウス細胞を用いる際に十分な配慮が必要になると考えられる。

lincRNA-Smad7 によるアポトーシスの制御

本検討により lincRNA-Smad7 が細胞生存を制御し腫瘍形成能に影響する機構として抗アポトーシス作用によるものが考えられた (図 11, 12)。

一方で TGF- β は上皮細胞の増殖抑制作用を有し、腫瘍抑制のメカニズムの一つとして考えられている。lincRNA-Smad7 は、この作用に対しては主たる TGF- β 下流の細胞周期調節因子である p21 と p15 の発現変動には影響がなかったことから、細胞周期制御機構への明らかなシグナル作用の増強効果は有さないと考えられる (図 16)。

TGF- β による EMT への影響も明らかではなかったこと、Smad2 のリン酸化に影響を与えなかったことと合わせると、lincRNA-Smad7 は TGF- β シグナル作用

の普遍的な増強因子ではなく、抗アポトーシス作用を通じて単独で **oncogenic** な作用を有する TGF- β の標的遺伝子であることが示唆された(図 14, 15)。lincRNA を含む lincRNA は、がんに対する抑制的または促進的に作用する機能がそれぞれ報告されている。TGF- β のがんに対する二面性のスイッチング制御機構に関しては未だ解明されていないが、今回 TGF- β -lincRNA-Smad7 によるがんに対する悪性化の側面の一部が示唆され、TGF- β の二面性スイッチング制御機構にがん抑制およびがん促進 lincRNA の存在が重要である可能性も考えられる。

本研究において lincRNA-Smad7 の標的アポトーシス誘導因子を見出すことはできなかった。JygMC(A)細胞では、BH3 ドメインを有した BH3-only タンパク質などを介してアポトーシスが誘導される。当研究室においても、DEC1 や Bim を介した TGF- β によるアポトーシスの制御機構が報告されている^{[19][55]}。BH3 ドメインを有しているアポトーシス誘導因子、また当研究室のマイクロアレイのデータから得た TGF- β の標的アポトーシス関連因子の発現変動を定量的 RT-PCR にて調べたが、lincRNA-Smad7 をノックダウンしても影響はなかった(図 13A, B)。しかしながら、lincRNA は核内ではスプライシング制御、また細胞質において直接結合による mRNA の保護、mRNA decoyなどを介した転写後調節機

能が報告されている^[61]。今回アポトーシス関連因子の mRNA の発現変動に lincRNA-Smad7 の関与は見られなかったが、報告されている lncRNA のように、転写後調節によりアポトーシス誘導因子の制御を行っている可能性も考えられる。また、今回発現変動を調べたアポトーシス誘導因子は BH3 ドメインを有した、アポトーシスの過程においては上流の因子である。cleaved PARP によりカスプーアの活性が確認されているが、lincRNA-Smad7 が前駆体であるプロカスプーアから活性体のカスプーアへの制御機構に関与している可能性など、アポトーシスの下流の effector としての関与の可能性も否定できない。

lincRNA-Smad7 と TGF- β シグナル

TGF- β シグナルの強力な抑制因子である Smad7 と lincRNA-Smad7 は、同染色体上の近傍に存在している (図 5)。また、当研究室における NMuMG 細胞における Smad2/3 の CHIP-sequencing (未発表) のデータを参照したところ、lincRNA-Smad7 のプロモーター領域に Smad2/3 との有意な結合部位が確認できた。このことから、TGF- β により両者ともに発現が誘導されていると考えられる。実際に JygMC(A)細胞において、TGF- β 刺激により Smad7 および lincRNA-Smad7

の発現が顕著に誘導されている (図 6B)。しかし、JygMC(A)細胞において lincRNA-Smad7 をノックダウンしても、または過剰発現をしても、mRNA レベルで Smad7 の発現変動に影響はなかった (図 15B)。JygMC(A)細胞において lincRNA-Smad7 は恒常的にある程度発現しているが、TGF- β による発現誘導以上にさらに発現をさせても影響がないと考えられる。また、lincRNA-Smad7 の Smad2 のリン酸化に対する影響は見られなかった (図 15A)。このように抗アポトーシス作用への選択性と合わせ、lincRNA-Smad7 は TGF- β シグナル伝達経路自体の制御は行っていない可能性が高い。lncRNA の作用機構として、HOTAIR はトランス領域に、一方で Xist や ANRIL はシス領域に作用することが報告されている^{[36][62][63]}。これらのことから、lincRNA-Smad7 は Smad7 と同染色体上の近傍にあるにも関わらず、シスには作用していないことが示唆される。しかし siRNA による loss of function 実験では、核内の lncRNA の作用については検討が困難だとも言われている。したがって、真に Smad7 の発現に影響を及ぼすかどうかの検討には、急速に普及しつつある TALEN や CRISPR/Cas9 などのゲノム編集技術などを用いることが必要になると考えられる^{[64][65][66]}。その上で lincRNA-Smad7 が TGF- β シグナル以外のシグナル伝達経路も含めた、細胞の転

写応答全体に対してどのような作用を持つかを RNA-sequencing を用いて網羅的解析を行うことで、lincRNA-Smad7 の働きの全体像を把握することができるかもしれない。

lincRNA-Smad7 は、oncogenic な TGF- β の作用を増強することが明らかになった。しかし、TGF- β はがん促進因子およびがん抑制因子としての二面性を有している。そのため、TGF- β ががん抑制因子として作用した場合の lincRNA-Smad7 の作用を明らかにすることは、大変興味深いものである。しかし本研究においては、TGF- β が細胞増殖抑制などを介して腫瘍悪性化抑制作用を示すマウス細胞を用いた lincRNA-Smad7 の機能は未検討である。しかしながら、TGF- β が細胞増殖抑制作用を示す細胞の一例として、マウス NMuMG 細胞が挙げられる。NMuMG 細胞において lincRNA-Smad7 をノックダウンしても EMT への影響は見られなかったことから、TGF- β が細胞増殖抑制作用を有する NMuMG 細胞においても、TGF- β が細胞増殖に影響していない JygMC(A) 細胞においても、lincRNA-Smad7 の EMT への関与は低いと考えられる。そのため、lincRNA-Smad7 が TGF- β の作用を選択的に制御していることを示唆するものであると考えられる。

次世代シーケンサーの技術の向上

lncRNA の発見と機能解析には、次世代シーケンサーの技術向上が必須であった。近年の大規模遺伝子解析により発見されたタンパク質をコードしない non-coding RNA は、動植物を問わず生物界に広く存在すると考えられている。線虫における RNAi の発見以降、小分子 RNA による細胞内遺伝子発現変動と病態との深い関与が示され、non-coding RNA の重要性が知られるようになった。例えば microRNA は、動物内から植物内に至るまでの様々な機能解析が進み、がんや神経疾患、心臓病などの疾患において極めて重要な遺伝子発現制御を司っていることが明らかとなり、miRNA を標的とした創薬や病理診断、予後予測に応用可能な研究が急速に進歩している。しかし一方で、ゲノムの至る箇所から転写されると考えられる lncRNA は、その生物学的意義がごく最近になり着目され始めた。lncRNA は、多くが mRNA と同様に 3'末端に polyA 鎖を有し、スプライシングを受けて複数のエクソン部位から構成されている。本研究で同定した lincRNA-Smad7 も polyA 鎖を有し、複数のエクソンから構成されていることが明かされている (図 8B)。そのため mRNA と見分けが困難であり、さらにその種類も膨大であった理由から、生物学的機能を持たず、単なるノイズと考

えられてきた。しかし近年、マイクロアレイを用いた遺伝子解析に加え、次世代シーケンサーの急速な技術の向上により、個々の研究室レベルでゲノムワイドな解析が可能となった。そのため、lncRNA がエピジェネティックな制御からスプライシング、転写後調節などを介し、発生や免疫、分化、疾患などに深く関与していることが明らかになった。このように多彩な生命現象を司る lncRNA の発見と機能解析は、次世代シーケンサーの技術向上がもたらした大きな知見であると言える。さらに、がんゲノミクス・エピゲノミクスという次世代のがん研究においても大きな貢献を果たしている。核内のゲノム DNA および染色体は様々なレベルで複雑な制御を受けており、その破綻ががんという疾患を発症させる。その制御メカニズムおよび制御されている状態をエピゲノムと呼ぶ^[67]。エピゲノムによりゲノム DNA の情報が的確に使われ、細胞特異的かつ正常な状態を維持できると言われている。いわばがんは、ゲノム・エピゲノムの後天的変異がもたらす疾患である。がん細胞におけるゲノム異常は塩基置換、挿入、欠失、遺伝子の部分的な増幅、欠失、染色体数の異常や再構成などがあり、エピゲノム異常としてはゲノム DNA のメチル化やヒストン修飾の異常、染色体レベルでの修飾異常などが挙げられる^[68]。その異常の詳細は、前述のように技術

が急速に進展した次世代シーケンサーの登場により解析可能となった。その結果、肺腺がんにおける体細胞性コピー数の変化や、肝細胞がんの塩基置換や新規融合遺伝子の発見に至り、種々のがんの詳細な分子機構の理解と、明確な原因因子を標的とした新たな診断・治療の開発が期待されている^{[69][70]}。本研究では、lincRNA-Smad7 の同定と機能解析に加えて、次世代シーケンサーを用いた発がん機構におけるクロマチンの構造変化とそのメカニズムの解析を目的とし、FAIRE-sequencing を用いて試みた。その詳細については、次項に記す。

クロマチン開閉による EMT 誘導感受性の制御

がんの悪性化促進機構において、EMT は重要な現象の一つである。これまで EMT は、TGF- β や FGF を始めとした EMT 誘導因子、関連タンパク質および関連転写因子を中心に、幅広く研究されてきた^{[15][71]}。しかし、これら転写因子による E-cadherin の直接的な転写抑制機構は明らかにされているものの、間葉系細胞への分化や運動能・浸潤能の亢進と言った EMT 誘導の際に認められる他の細胞応答に、これらの転写因子がどのように関与しているのかは未解明である^[72]。本研究では、EMT 関連転写因子と作用するオープンクロマチンの視点から、EMT

の作用機構の解析を試みた。

FAIRE 用いた検討により、間葉系マーカーの N-cadherin は、EpRas 細胞において FAIRE 領域の相対量が増加していた (図 18A)。このことは、Ras 活性化により N-cadherin をコードする遺伝子のクロマチンがクローズからオープンの状態になることで転写因子が作用しやすくなり、その結果として N-cadherin mRNA の発現が増加したと考えられる。同じ間葉系マーカーである Fibronectin をコードする遺伝子のクロマチンには、TGF- β および Ras による状態変化は起きていなかった (図 18A)。したがって Fibronectin に関しては、当初よりクロマチンは開いており、TGF- β シグナル刺激感受性を有する状態であったと推測できる。これは、Fibronectin mRNA は、EpRas 細胞に TGF- β 刺激した状態でのみ発現上昇が認められることから、その仮説を支持できる。一方で上皮系マーカーの E-cadherin と ESPR2 は、EpH4 細胞に TGF- β 刺激すると FAIRE 領域の相対量が減少し、EpRas 細胞に TGF- β 刺激をするとさらに減少することが明らかになった (図 18B)。このことから、TGF- β および Ras 活性化単独でクロマチンをオープンからクローズの状態にする作用があり、TGF- β と Ras の協調作用によりさらにクロマチンがクローズの状態に傾くことが示唆される。EpRas 細胞における

EMT の誘導には、Ras と TGF- β 両者が必須であることから、EMT 誘導における妥当なクロマチンの状態変化だと言える。以上のことから、上皮系・間葉系のそれぞれの遺伝子の EMT に伴う発現変化は、クロマチン開閉状態の変化の有無を含め、遺伝子ごとに多彩な制御を受けていることが示唆される (図 24)。

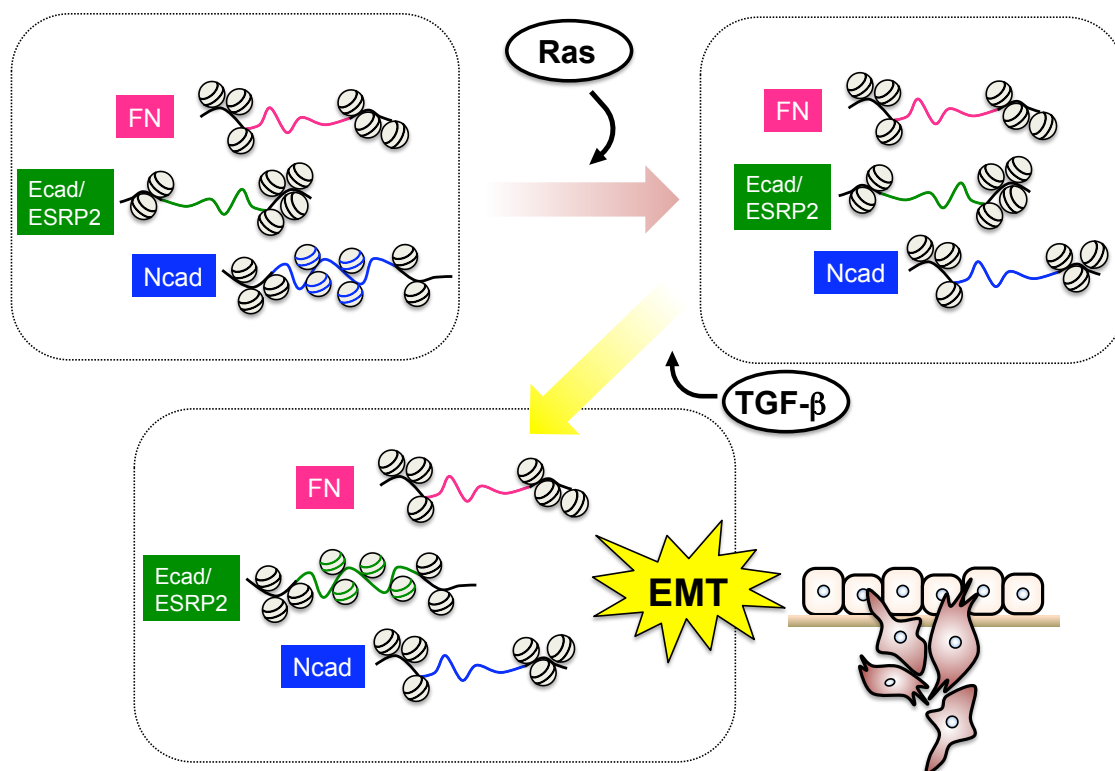


図 24 TGF-βおよび Ras シグナル活性化によるクロマチン構造変化

TGF-β誘導性 EMT の過程において、TGF-βと Ras シグナル単独もしくはそれらシグナルの協調作用により、クロマチン開閉が行われる。上皮系マーカーである E-cadherin と ESRP2 は、TGF-βと Ras 両者のシグナル活性化によりクロマチンが閉じる。一方で間葉系マーカーである Fibronectin は、当初からクロマチンは開いており、TGF-β感受性を有した状態である。同じく間葉系マーカーである N-cadherin は、Ras シグナル活性化に伴いクロマチンが開く。

EMT 誘導に伴うクロマチンの開閉のメカニズム

EMT に伴う一部のクロマチンの構造変化は、TGF- β および Ras 活性化により引き起こされていることが示唆された (図 18A, B)。では、このクロマチン構造変化はどのような作用機序によりもたらされているか。そこで次世代シーケンサーを用いた FAIRE-sequencing の結果から、EpH4 細胞と EpRas 細胞間での FAIRE 領域の変化を解析し、クロマチン構造変化を制御する新規因子の存在が示唆された。そして実際に、それら細胞特異的な FAIRE 領域中において、TGF- β 無処理の EpH4 細胞と TGF- β 無処理の EpRas 細胞においては、NF1c や C/EBP ファミリーに結合するモチーフの濃縮率の変化が観察された (図 20)。C/EBP β と C/EBP δ は、RNA-sequencing や定量的 RT-PCR においてもモチーフの濃縮率とその mRNA の発現変動は相関している (図 20, 21)。ヒト乳がんにおいて oncomiRNA である miRNA-155 を介した C/EBP β の減少は、TGF- β 誘導性 EMT の増強、浸潤や転移を促進することが知られている^[73]。このような報告と合わせると、C/EBP β は Ras 活性化に伴うクロマチン制御を介した TGF- β 誘導性 EMT に関与している可能性が示唆される。

一方で、AP-1 は EpRas 細胞においてモチーフ頻度の上昇が見られたが、濃縮

率の変化はなかった (図 20)。AP-1 ファミリーは、ATF ファミリー、Jun ファミリー、Fos ファミリーに属するタンパク質で構成されているヘテロ 2 量体タンパク質である。モチーフの頻度と濃縮率の増減が反映されていないことから、AP-1 ファミリーは EpH4 と EpRas においてそれぞれ別のコンポーネントを形成しており、その結合パートナーの変化が EMT 誘導に寄与している可能性が示唆される。RNA-sequencing の解析により、Eph4 細胞と比較して EpRas 細胞において ATF4 の発現量の上昇が確認されたことは、ATF4 が有望な候補因子であることを示唆するものである (図 22A, B, C)。ATF4 は neural crest において Sox9 と協調し、細胞-細胞および細胞-細胞外マトリックスの接着分子の発現を制御し、EMT を誘導することが報告されている。このことから、EMT を伴うがんの悪性化に関して重要な役割を担っているかもしれない^[74]。

Ras 活性化状態で TGF- β により新たに増加する FAIRE 領域として、Runx ファミリーを同定した (図 20C)。乳がんにおいて Runx ファミリーは、Runx1, 3 はがん抑制として、Runx2 はがん促進因子として作用することが知られている^[75]。甲状腺腫瘍細胞における Runx2 のサイレンシングは、EMT 関連因子である Slug や Twist の発現量を減少させ、がん細胞の浸潤を抑制する報告があることから、

Runx ファミリーも TGF- β 誘導性 EMT の獲得過程において、なんらかの機能を担っていることが示唆される^[76]。

今後 TGF- β および Ras 活性化に伴って FAIRE 領域でのモチーフの存在頻度が増減する転写因子と EMT との関係を詳細に追うことで、EMT 誘導機構を解明し、その機構を標的とした新規治療戦略の開発につながる可能性が期待できる。

結論

- lincRNA-Smad7 は、乳腺上皮細胞および乳がん細胞株において TGF- β により強く発現が誘導される。
- lincRNA-Smad7 をノックダウンした細胞は、マウス腫瘍移植モデルにおいて腫瘍形成能が低下した。
- JygMC(A)細胞において lincRNA-Smad7 は、TGF- β の下流において抗アポトーシス作用を促進する可能性が示唆された。
- lincRNA-Smad7 の NMuMG 細胞における TGF- β 誘導性 EMT や JygMC(A)細胞における TGF- β シグナルと細胞周期調節因子に対する関与は低く、TGF- β の作用の一部を選択的に増強している可能性が示唆された。
- 乳腺上皮細胞における EMT 誘導時に、Ras シグナルの活性化による FAIRE 領域の変化、Ras 活性化状態における TGF- β によるその領域の変化を示した。
- 乳腺上皮細胞における EMT 獲得前後において、クロマチン構造変化に重要な役割を果たす可能性のある転写因子群を見出した。

引用文献

- [1] Foulkes, W. D. Inherited susceptibility to common cancers. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2143–53 (2008).
- [2] Kanno, S.-I. *et al.* Inhibitory effects of naringenin on tumor growth in human cancer cell lines and sarcoma S-180-implanted mice. *Biol. Pharm. Bull.* **28**, 527–30 (2005).
- [3] Bortner, C. D. & Cidlowski, J. A. Apoptotic volume decrease and the incredible shrinking cell. *Cell Death Differ.* **9**, 1307–10 (2002).
- [4] Wright, S. C., Wei, Q. S., Kinder, D. H. & Larrick, J. W. Biochemical pathways of apoptosis: nicotinamide adenine dinucleotide-deficient cells are resistant to tumor necrosis factor or ultraviolet light activation of the 24-kD apoptotic protease and DNA fragmentation. *J. Exp. Med.* **183**, 463–71 (1996).

- [5] Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* **26**, 239–57 (1972).
- [6] Andersen, J. L. & Kornbluth, S. The tangled circuitry of metabolism and apoptosis. *Mol. Cell* **49**, 399–410 (2013).
- [7] Hao, Z. *et al.* Fas receptor expression in germinal-center B cells is essential for T and B lymphocyte homeostasis. *Immunity* **29**, 615–27 (2008).
- [8] Fukuyama, H. *et al.* Transgenic expression of Fas in T cells blocks lymphoproliferation but not autoimmune disease in MRL-lpr mice. *J. Immunol.* **160**, 3805–11 (1998).
- [9] Levine, A. J. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* **88**, 323–331 (1997).
- [10] Morgenbesser, S. D., Williams, B. O., Jacks, T. & DePinho, R. A. p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency in the developing mouse lens. *Nature* **371**, 72–4 (1994).

- [11] Fanidi, A., Harrington, E. A. & Evan, G. I. Cooperative interaction between c-myc and bcl-2 proto-oncogenes. *Nature* **359**, 554–6 (1992).
- [12] Evan, G. I. *et al.* Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**, 119–28 (1992).
- [13] Greenburg, G. & Hay, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* **95**, 333–9 (1982).
- [14] Thiery, J. P., Acloque, H., Huang, R. Y. J. & Nieto, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**, 871–90 (2009).
- [15] Thiery, J. P. & Sleeman, J. P. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 131–42 (2006).
- [16] Xu, J., Lamouille, S. & Derynck, R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* **19**, 156–72 (2009).

- [17] Peinado, H., Olmeda, D. & Cano, A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat. Rev. Cancer* **7**, 415–28 (2007).
- [18] Barrallo-Gimeno, A. & Nieto, M. A. The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* **132**, 3151–61 (2005).
- [19] Ehata, S. *et al.* Transforming growth factor-beta promotes survival of mammary carcinoma cells through induction of antiapoptotic transcription factor DEC1. *Cancer Res.* **67**, 9694–703 (2007).
- [20] Horiguchi, K. *et al.* Role of Ras signaling in the induction of snail by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **284**, 245–53 (2009).
- [21] Horiguchi, K. *et al.* TGF- β drives epithelial-mesenchymal transition through δ EF1-mediated downregulation of ESRP. *Oncogene* **31**, 3190–201 (2012).
- [22] Bierie, B. & Moses, H. L. Tumour microenvironment: TGFbeta: the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 506–20 (2006).

- [23] Blobe, G. C., Schiemann, W. P. & Lodish, H. F. Role of transforming growth factor beta in human disease. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1350–8 (2000).
- [24] Ikushima, H. & Miyazono, K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **10**, 415–24 (2010).
- [25] Miyazono, K., Suzuki, H. & Imamura, T. Regulation of TGF-beta signaling and its roles in progression of tumors. *Cancer Sci.* **94**, 230–4 (2003).
- [26] Shi, Y. & Massagué, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685–700 (2003).
- [27] Ambros, V. & Chen, X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development* **134**, 1635–41 (2007).
- [28] Reinhart, B. J. *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901–6 (2000).
- [29] Esquela-Kerscher, A. & Slack, F. J. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 259–69 (2006).
- [30] Camps, C. *et al.* hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **14**, 1340–8 (2008).

- [31] Foekens, J. A. *et al.* Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13021–6 (2008).
- [32] Iorio, M. V, Casalini, P., Tagliabue, E., Ménard, S. & Croce, C. M. MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer. *Eur. J. Cancer* **44**, 2753–9 (2008).
- [33] Gregory, P. A. *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* **10**, 593–601 (2008).
- [34] Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–8 (2005).
- [35] Chen, L.-L. & Carmichael, G. G. Decoding the function of nuclear long non-coding RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 357–64 (2010).
- [36] Zhao, J., Sun, B. K., Erwin, J. A., Song, J.-J. & Lee, J. T. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science* **322**, 750–6 (2008).

- [37] Rinn, J. L. *et al.* Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **129**, 1311–23 (2007).
- [38] Gupta, R. A. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* **464**, 1071–6 (2010).
- [39] Chen, L.-L. & Carmichael, G. G. Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA. *Mol. Cell* **35**, 467–78 (2009).
- [40] Clemson, C. M. *et al.* An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol. Cell* **33**, 717–26 (2009).
- [41] Tripathi, V. *et al.* The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol. Cell* **39**, 925–38 (2010).
- [42] Huarte, M. *et al.* A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* **142**, 409–19 (2010).

- [43] Gong, C. & Maquat, L. E. lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* **470**, 284–8 (2011).
- [44] Batista, P. J. & Chang, H. Y. Long Noncoding RNAs: Cellular Address Codes in Development and Disease. *Cell* **152**, 1298–1307 (2013).
- [45] Koinuma, D. *et al.* Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor beta signaling. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 172–86 (2009).
- [46] Mizutani, A. *et al.* Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4alpha in HepG2 cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 29848–60 (2011).
- [47] Giresi, P. G. & Lieb, J. D. Isolation of active regulatory elements from eukaryotic chromatin using FAIRE (Formaldehyde Assisted Isolation of Regulatory Elements). *Methods* **48**, 233–9 (2009).
- [48] Simon, J. M., Giresi, P. G., Davis, I. J. & Lieb, J. D. Using formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements (FAIRE) to isolate active regulatory DNA. *Nat. Protoc.* **7**, 256–67 (2012).

- [49] Gaulton, K. J. *et al.* A map of open chromatin in human pancreatic islets. *Nat. Genet.* **42**, 255–9 (2010).
- [50] Waki, H. *et al.* Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet.* **7**, e1002311 (2011).
- [51] Miettinen, P. J., Ebner, R., Lopez, A. R. & Derynck, R. TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J. Cell Biol.* **127**, 2021–36 (1994).
- [52] Piek, E., Moustakas, A., Kurisaki, A., Heldin, C. H. & ten Dijke, P. TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J. Cell Sci.* **112** (Pt 2, 4557–68 (1999).
- [53] Kondo, M. *et al.* A role for Id in the regulation of TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cell Death Differ.* **11**, 1092–101 (2004).

- [54] Guttman, M. *et al.* lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* **477**, 295–300 (2011).
- [55] Hoshino, Y., Katsuno, Y., Ehata, S. & Miyazono, K. Autocrine TGF- β protects breast cancer cells from apoptosis through reduction of BH3-only protein, Bim. *J. Biochem.* **149**, 55–65 (2011).
- [56] Ivana Scovassi, A. & Diederich, M. Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1041–7 (2004).
- [57] Janda, E. *et al.* Ras and TGF[β] cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J. Cell Biol.* **156**, 299–313 (2002).
- [58] Grünert, S., Jechlinger, M. & Beug, H. Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 657–65 (2003).
- [59] Hess, J., Angel, P. & Schorpp-Kistner, M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J. Cell Sci.* **117**, 5965–73 (2004).

- [60] Goldhirsch, A. *et al.* Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann. Oncol.* **22**, 1736–47 (2011).
- [61] Yoon, J.-H., Abdelmohsen, K. & Gorospe, M. Posttranscriptional gene regulation by long noncoding RNA. *J. Mol. Biol.* **425**, 3723–30 (2013).
- [62] Tsai, M.-C. *et al.* Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* **329**, 689–93 (2010).
- [63] Aguilo, F., Zhou, M.-M. & Walsh, M. J. Long noncoding RNA, polycomb, and the ghosts haunting INK4b-ARF-INK4a expression. *Cancer Res.* **71**, 5365–9 (2011).
- [64] Christian, M. *et al.* Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757–61 (2010).
- [65] Li, T., Liu, B., Spalding, M. H., Weeks, D. P. & Yang, B. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nat. Biotechnol.* **30**, 390–2 (2012).

- [66] Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819–23 (2013).
- [67] Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457–63 (2004).
- [68] Futreal, P. A. *et al.* A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 177–83 (2004).
- [69] Weir, B. A. *et al.* Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature* **450**, 893–8 (2007).
- [70] Totoki, Y. *et al.* High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat. Genet.* **43**, 464–9 (2011).
- [71] Moustakas, A. & Heldin, C.-H. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci.* **98**, 1512–20 (2007).
- [72] Peinado, H., Portillo, F. & Cano, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 365–75 (2004).

- [73] Johansson, J. *et al.* MiR-155-mediated loss of C/EBP β shifts the TGF- β response from growth inhibition to epithelial-mesenchymal transition, invasion and metastasis in breast cancer. *Oncogene* (2013). doi:10.1038/onc.2013.322
- [74] Suzuki, T., Osumi, N. & Wakamatsu, Y. Stabilization of ATF4 protein is required for the regulation of epithelial-mesenchymal transition of the avian neural crest. *Dev. Biol.* **344**, 658–68 (2010).
- [75] Chimge, N.-O. & Frenkel, B. The RUNX family in breast cancer: relationships with estrogen signaling. *Oncogene* **32**, 2121–30 (2013).
- [76] Niu, D.-F. *et al.* Transcription factor Runx2 is a regulator of epithelial-mesenchymal transition and invasion in thyroid carcinomas. *Lab. Invest.* **92**, 1181–90 (2012).

謝辞

本研究を行うにあたり、その機会と多大なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院 医学系研究科 病因・病理学専攻 分子病理学分野の宮園浩平教授に心より御礼申し上げます。また、本研究の立案、遂行から細部の実験、解析に至るまで終始多大なる御指導を賜りました鯉沼代造准教授に厚く御礼申し上げます。また、研究遂行にあたりデータ解析の御指導や研究内容への貴重な御助言を頂きました磯谷一暢特任研究員に心より感謝申し上げます。また、研究遂行にあたり実験に御協力、御助言頂きました東京大学先端科学技術研究センター ゲノムサイエンス分野の油谷浩幸教授に深く感謝申し上げます。また、日々研究を進めていく中で多くの御指導、御支援を頂きました鯉沼グループの皆様、分子病理学分野の皆様に心より感謝申し上げます。

最後に、博士課程進学より現在に至るまで、様々な面において常に支えてくれた家族に心より感謝致します。