

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 荒瀬 麻友

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加している。乳がんは他種がんに比べ予後は比較的良好ではあるが、病期の進行とともに5年生存率は低下し、再発率も高くなる。診断・治療法の進展、新規遺伝子および分子治療標的の発見を鑑みると、さらなる研究と病態理解が必要である。

生体を構成する各組織の細胞は、厳密な制御の下、必要に応じて分裂・増殖を引き起こす。この過程において、正しく機能をしていない細胞や欠損を持った細胞を除去する制御機能をアポトーシスという。アポトーシスは個体の健康と生存能力の維持において重要な役割を果たすため、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。また、がんの発生・進展において、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT; 上皮-間葉移行) も重要な現象である。EMT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、がん細胞の浸潤・転移の過程に関与することが知られている。同定されたEMT関連因子の発現制御により、*in vitro/ in vivo*において運動能や浸潤能の亢進が観察されている。そのため、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いる。

アポトーシスとEMTのプロセスに深く関わるサイトカインとして、Transforming Growth Factor (TGF)- β が知られる。TGF- β は、乳がんにおいて下流遺伝子DEC1を発現誘導することで抗アポトーシス作用を発揮する。また、TGF- β はEMTの主たる誘導因子であり、同じく乳がんにおいてRasシグナルと協調的に細胞を上皮型から間葉系型へ変化させる。このように、TGF- β は乳がんを始め種々のがんにおいて重要な役割を担っているが、その下流の制御機構は未解明な部分が多い。そのため本研究では、乳腺上皮細胞および乳がん細胞におけるTGF- β 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解析のモデル細胞を用い、RNA-sequencing (seq) と formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements coupled with high-throughput (FAIRE) -seqによる解析を行った。そして、TGF- β 誘導性 long non-coding (lnc) RNAの同定および機能解析、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。

i) TGF- β 誘導性 lincRNA の同定と機能解析

lincRNA は数十塩基から数十万塩基に及ぶ高分子の ncRNA であり、クロマチンの修飾制御などを介して多彩な生命現象を司ることが徐々に明らかになってきた。がんとの関連も示唆されており、lincRNA の機能解析を進めることは ncRNA の生物学的理解の進展および疾患の分子機序の解明、その先の治療への応用に繋がることが考えられる。

そこで、TGF- β により EMT が誘導されるマウス乳腺上皮細胞株において RNA-seq を行い、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。その結果、TGF- β により顕著な発現誘導をうける long intergenic non-coding (linc) RNA-Smad7 を同定した。定量的 RT-PCR の結果より、その他複数種のマウス乳腺上皮細胞株、マウス乳がん細胞株においても、lincRNA-Smad7 は TGF- β により顕著に発現が誘導されていた。次に、ノーザンブロットイングと RACE を用いてサイズと配列の同定を行った。その結果、いくつかのエクソンで構成されている lincRNA-Smad7 の転写産物を 3 種同定した。次に、lincRNA-Smad7 のがん細胞における機能を解析するために、lincRNA-Smad7 特異的な siRNA を乳がん細胞株に導入してノックダウンを行った。そのがん細胞を 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。その結果、コントロール群と比較すると、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た。また、乳がん細胞株において lincRNA-Smad7 をノックダウンすると、cleaved PARP の発現量が増加した。TUNEL assay によりアポトーシスの評価を行った結果、lincRNA-Smad7 をノックダウンすると 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。また、乳がん細胞株に lincRNA-Smad7 を高発現するアデノウイルスを感染させると、cleaved PARP の発現量が低下した。さらに lincRNA-Smad7 を過剰発現して TUNEL assay を行った。すると、SB431542 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。しかし、lincRNA-Smad7 をノックダウンしても、EMT 関連因子や代表的な細胞周期調節因子、また TGF- β シグナル自身への影響は観察されなかった。

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介して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た。しかしながら、lincRNA-Smad7 の保存性はヒト-マウス間では低く、ヒトにおいて発現・機能を発揮している可能性については、今後の検討が必要である。一方で、lincRNA-Smad7 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や制御法開発プロセスにおいて、十分な配慮が必要になる。一方で、乳腺上皮細胞における 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。本研究において 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。

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

細胞のがん化は、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、転写活性応答の破綻によりもたらされる。本研究は、その転写制御の一つであるクロマチンの構造変化に着目をした。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。そこで、クロマチン開閉の解析方法である FAIRE-seq を用いて、TGF- β による EMT 誘導時に生じるクロマチン構造変化の解析を試みた。

TGF- β により EMT が誘導されない乳腺上皮細胞株と、その派生株であり、EMT が誘導される Ras 恒常活性型乳腺上皮細胞に TGF- β 処理を行い、FAIRE-qPCR を行った。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調べた結果、一部の上皮系マーカーの遺伝子座では、Ras 活性化により FAIRE 産物量が減少し、TGF- β 処理によりさらに減少した。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。また、Ras 活性化により mRNA の発現量が上昇する一部の間葉系マーカーは、Ras 恒常活性型細胞株において FAIRE 産物量が増加し、TGF- β 処理による変化はなかった。さらに別の間葉系マーカーは、Ras 恒常活性型細胞株に TGF- β 処理を行うと mRNA の発現が顕著に誘導されるが、細胞間および TGF- β 処理による FAIRE 産物量の変化は観察されなかった。次に、FAIRE-seq を用い、細胞株における Ras 活性化および Ras 活性化状態における TGF- β 処理により変化する FAIRE 領域を同定した。その FAIRE 領域におけるモチーフ解析を行うと、各群特異的に頻度または濃縮が変化している複数の因子を同定した。RNA-seq と定量的 RT-PCR によりそれら因子の発現を調べると、そのモチーフ頻度または濃縮変化と同様の発現変動が観察された。

以上の結果より、EMT 誘導において、一部の間葉系マーカーは Ras 活性化によりクロマチン状態がオープンになることで転写を受けやすくなることや、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ことが推測される。一方で一部の上皮系マーカーは、TGF- β と Ras の協調作用によりクロマチンが閉じることが示唆される。また、FAIRE-seq と RNA-seq の解析のデータより、Ras 活性化および Ras 活性化状態の TGF- β による EMT 誘導前後において重要な役割を果たす候補因子群を見出した。これらのことから、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。