

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 荒瀬 麻友

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、同シグナルによるアポトーシス・Epithelial-Mesenchymal Transition (上皮-間葉移行; EMT) 解析のモデル細胞を用い、1. TGF- β 誘導性 long non-coding (lnc) RNA の同定および機能解析、2. formaldehyde-assisted isolation of regulatory elements coupled with high-throughput (FAIRE) -sequencing (seq)を用いた EMT 誘導時におけるクロマチン構造変化の解析を行った。結果は以下に記す。

1. TGF- β により EMT が誘導されるマウス乳腺上皮細胞において RNA-sequencing を行った結果、long intergenic non-coding (linc) RNA-Smad7 を同定した。定量的 RT-PCR の結果より、lincRNA-Smad7 は複数種の乳腺上皮細胞および乳がん細胞において TGF- β により顕著に発現が誘導・持続していることが示された。さらにノーザンブロットィングと RACE を用いて塩基長と配列の同定を行った結果、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。
2. siRNA を導入して lincRNA-Smad7 をノックダウンした乳がん細胞株を、BALB/c nude マウスの皮下に移植した。がん細胞の生着および増殖を経時的に観察した結果、コントロール群と比較して、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を示した。
3. siRNA を細胞に導入して lincRNA-Smad7 をノックダウンすると、コントロールと比較して生細胞が減少し、cleaved PARP の発現量が増加した。また、TUNEL assay において、TGF- β による TUNEL 陽性細胞の減少が抑制されていた。しかし、EMT 関連因子や細胞周期調節因子、TGF- β シグナル自身に対する影響は観察されなかった。逆に、アデノウイルスを細胞に感染させることで lincRNA-Smad7 を過剰発現すると、コントロールと比較して cleaved PARP の発現量が減少した。また TUNEL

assay において、TGF- β 受容体に対する阻害剤である SB431542 による TUNEL 陽性細胞の増加が抑制された。したがって、lincRNA-Smad7 は TGF- β の下流において抗アポトーシス作用を選択的に促進する可能性が示唆された。

4. TGF- β により EMT が誘導される前後において、オープンクロマチン領域のみを抽出する FAIRE を行った結果、一部の上皮系マーカーの遺伝子座では、Ras 活性化および TGF- β 処理において FAIRE 領域が減少した。また、一部の間葉系マーカーは、Ras 活性化により FAIRE 領域が増加した。一方で別の間葉系マーカーは、Ras 活性化および TGF- β 処理による FAIRE 領域の変化は観察されなかった。
5. 次世代シーケンサーで FAIRE-seq を行った結果、Ras 活性化、または Ras 活性化状態における TGF- β 処理によって変化する FAIRE 領域および各群特異的な FAIRE 領域において濃縮しているモチーフを同定した。さらに RNA-seq を用いた解析により、Ras 活性化または Ras 活性化状態における TGF- β 処理により発現変動を受け、EMT 誘導前後において重要な役割を果たす候補転写因子群を見出した。

以上、本論文は 1. 乳がん細胞において、TGF- β の抗アポトーシス作用を選択的に促進する TGF- β 誘導性 lincRNA-Smad7 の存在を明らかにした、2. EMT が誘導される過程において EMT 関連因子のクロマチンの構造変化を示し、EMT の誘導に関与する新たな候補因子を同定した。本研究は、これまで解析が不十分であった lincRNA が腫瘍形成において重要な役割を担うこと、また EMT 誘導時にもたらされるクロマチンの構造変化を明らかにしたことで、TGF- β の組織・細胞特異的な転写制御機構の解明や、今後のがん治療に向けての研究に貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。