

論文の内容の要旨

論文題目 **ChIP-Sequencing** を用いた **TGF- β** シグナルの解析

氏名 大上 智弘

TGF- β は骨形成因子(BMP)などとともに TGF- β ファミリーとよばれるサイトカインの代表的因子である。この TGF- β は 3 種類のアイソフォームが存在し、これらは同じレセプターを介してシグナルを細胞内に伝達する。細胞内では主として Smad と呼ばれるたんぱく質群がシグナルを核内へと伝達している。この TGF- β の機能は細胞分化や増殖抑制、アポトーシスの制御などきわめて多彩である。TGF- β は一般的に上皮細胞に対しては増殖抑制的に働きがん抑制遺伝子として知られているが、上皮間葉転換(EMT)の誘導作用などによりがんの進展を促進する因子としてもふるまう。また、間葉系細胞に対しては増殖促進的に働き、線維化への関与が考えられている。このような多彩な働きを持つ TGF- β であるが、表皮細胞の分化や上皮間葉転換(EMT)において重要な役割をはたしているものの具体的メカニズムについては未だ不明の点も多い。

そこで、今回 TGF- β シグナルが①表皮角化細胞分化と②上皮間葉転換(EMT)に与える影響を調べるためクロマチン免疫沈降法(ChIP)と次世代シーケンサーを用いて ChIP-sequencing を行い、網羅的な解析を行った。

①まず、TGF- β の表皮角化細胞の分化への影響を見るため、培地を変えることで分化と未分化の状態をコントロールできる HPEK 細胞と、株化された表皮角化細胞である HaCaT 細胞を TGF- β 刺激有無の状況で固定、DNA を断片化した後 HPEK 細胞は Smad3 抗体、HaCaT 細胞は Smad2/3 抗体を用いて ChIP-sequencing を行った。その結果、HPEK 細胞では Smad3 の結合領域は FDR 0.1%で 67,515 箇所同定され、HaCaT 細胞では Smad2/3 の結合部位は 37,452 箇所あり、共通の結合領域は 21,167 箇所であった。続いて、遺伝子の発現変動をみるため RNA-sequencing を行い、転写産物コード領域におけるリード数を転写産物の長さで補正した (FPKM)を用いて比較した。遺伝子の発現があると考えられる FPKM が 1 以上である遺伝子について HPEK 細胞と HaCaT 細胞の両細胞で遺伝子発現が 2 倍以上に上昇するものを絞り込んだところ 110 個の遺伝子がリストアップされ、さらに分化における TGF- β の役割を確認するため未分化状態の HPEK 細胞では発現していない遺伝子を除外したとこ

ろ 7 個の遺伝子がリストアップされた。つまり、未分化状態の HPEK 細胞では発現しておらず、分化した HPEK 細胞、HaCaT 細胞で Smad の直接の制御下にあり、TGF- β で 2 倍以上に発現する遺伝子が抽出された。

絞り込まれた 7 種類の遺伝子の中で、今まで報告がない C2orf54 という遺伝子に着目しその機能を解析した。まず、分化の過程でどのように発現するかを確認するため HPEK 細胞を分化させてその時系列に沿って RNA を回収し発現変動を確認した。皮膚は基底層から有棘層、顆粒層、角化層と分化し、最終的に脱落する。2 次元培養条件下に HPEK 細胞を分化培地に切り替えておおよそ 48 時間で基底層で発現されるとされているケラチン 5, 14 と p63 が発現のピークを認め、その後減少していくことから HPEK 細胞は同条件で分化開始から 48 時間程度で基底層から有棘層の特徴を有する細胞へとその主体がシフトしていくことが示唆された。有棘層ではケラチン 1, 10 の発現が知られているが HPEK 細胞では分化開始後 96 時間でケラチン 1 の発現上昇を認め、ケラチン 10 も 96 時間で発現のピークを認めたため 96 時間前後を境に有棘層から顆粒層へとさらに分化していくことが示唆された。そして顆粒層での発現が知られているインボルクリン、ロリクリンについては 48 時間経過後より上昇を始め、96 時間、144 時間と発現が上昇し続けていくことが観察された。そこで今回同定した C2orf54 の発現を mRNA レベルで確認したところ未分化状態では発現が認められず、96 時間経過後に著明に上昇していく傾向が確認された。このことより C2orf54 皮膚の分化の後期、顆粒層付近で発現していることが考えられた。また、TGF- β による発現誘導を分化した状態にある HaCaT 細胞で確認したところ TGF- β 1 ng/ml の刺激後 1.5 時間で mRNA の発現上昇を認め、その後 4 時間、8 時間と時間の経過とともに減少し 24 時間後には元の発現レベル付近まで低下することが確認された。また、新たに抗体を作成し HaCaT 細胞において内在性タンパクの検出を行ったところ、TGF- β 刺激前から検出されるタンパクが刺激後おおよそ 4 時間で増加し 8 時間、24 時間で減少することがわかった。以上のことから、C2orf54 は HPEK 細胞の結果から未分化状態で発現せず、分化の後期で発現上昇し、また分化した角化細胞である HaCaT 細胞の結果より TGF- β 刺激により早期に mRNA、タンパクレベル双方で一過性に発現が増強することが明らかになった。

続いて C2orf54 の細胞内局在について免疫蛍光染色による同定を試みた。FC2orf54 プラスミドを作成し強制発現して確認したところ細胞質を中心に局在していることが示唆された。また、C2orf54 がどのような役割を果たしているのかを確認するため、siRNA を用いて C2orf54 をノックダウンして表皮角化細胞の分化関連遺伝子の発現への影響を検討した。HaCaT 細胞に siRNA をトランスフェクションし、TGF- β 刺激後 24 時間で RNA を回収し逆転写の後 real time PCR で確認したところ、基底層で発現しているとされるケラチン 5, 14 と p63 は C2orf54 をノックダウンすることによりやや発現が抑えられる傾向にあった。また、有棘層で発現しているとされるケラチン 1, 10 は C2orf54 をノックダウンしても明らかな変動を認めなかった。そして顆粒層で発現しているインボルクリンを確認したところ著明な発現の減少を認めた。そこで、タンパクレベルでもインボルクリンの発現が減少するかを

確認したところ、ネガティブコントロールの siRNA では TGF- β 刺激後 24 時間でインボルクリンのタンパクの発現誘導が明瞭に確認できるのに対し、C2orf54 をノックダウンした細胞ではインボルクリンの発現誘導は認められず、mRNA と一致する結果となった。

また、TGF- β で誘導される C2orf54 が Smad シグナルへ影響を与えるかを確認したところ C2orf54 をノックダウンすると Smad2/3 の直接の標的遺伝子である PAI1 の発現が減少していることが示され、また結合実験でも Smad3 と C2orf54 の結合が確認された。このことから TGF- β シグナルで誘導される C2orf54 が Smad3 と協調して TGF- β シグナルを feed-forward に制御している可能性も示唆された。

②発生やがんの浸潤、転移に重要な役割を果たしている上皮間葉転換 (EMT) における TGF- β シグナルの役割を解析した。今回乳腺上皮細胞を TGF- β 刺激後 1.5 時間及び 24 時間で細胞を固定した後、DNA を断片化し、Smad2/3 抗体にてクロマチン免疫沈降 (ChIP) したサンプルを次世代シーケンサーで解析したところ、刺激後 1.5 時間で回収したサンプルに Smad2/3 の結合箇所は 5,793 箇所 (FDR 5%) みとめ、刺激後 24 時間のサンプルは有意な結合を認めなかった。

EMT に重要な因子として Snai1, Snai2, Zeb1, Zeb2, Twist などが知られ、また EMT の指標として上皮系マーカーである E-cadherin の減少と、間葉系マーカーである N-cadherin や Fibronectin、 α -SMA の上昇が知られている。これまで TGF- β によって発現誘導され EMT において重要な役割を果たしているとして報告のある Snai1, Snai2 には Smad2/3 有意な結合は認められなかった。このことから EMT において Snai1, Snai2 は重要な役割を果たしているが、Smad2/3 の直接の標的遺伝子ではなく間に他の要素が関与している可能性が示唆された。また、興味深いことに、Zeb1, Zeb2, Twist における主たる Smad の結合領域はこれまでに示唆されていたプロモーター領域や転写開始点とは異なり、イントロン領域に存在した。E-cadherin についてはこれまで TGF- β による Zeb1, Zeb2 の発現誘導を介した間接的な転写抑制機構が知られていたが、ChIP-seq の結果から Smad の有意な結合が intragenic region に存在し、Smad2/3 もこの遺伝子の発現抑制に直接何らかの役割を果たしていることが示唆された。

続いて、RNA-sequencing の結果からこれらの Smad2/3 の結合が遺伝子発現にどの程度影響を及ぼすかを検討した。その結果、TGF- β 24 時間の刺激により発現が 2 倍以上上昇あるいは減少する遺伝子のうち、Smad2/3 結合領域が転写開始点近傍に存在する遺伝子群を抽出して、TGF- β による遺伝子の発現変動への影響について検討した。その結果 Smad2/3 の結合がある遺伝子においても、必ずしも TGF- β 刺激により顕著な発現変動をきたすとは限らないことが示唆された。

Gene ontology 解析では TGF- β により発現が上昇する遺伝子の中には細胞接着、シグナルペプチド、血管新生などの働きを持つ遺伝子が上位に挙がり、発現が減少する遺伝子として

細胞接着、DNA 複製などが上位に挙がった。この結果はこの細胞の TGF- β に対する主たる細胞応答として知られる EMT 促進作用と細胞増殖抑制作用を強く反映しているものと考えられた。

また、Smad2/3 結合部位における DNA 配列の特徴について解析を行った。遺伝子の発現変動が 2 倍以上の遺伝子のうち、転写開始点から 10 kbp 以内にある Smad2/3 結合領域は全部で 800 存在した。これらの結合領域に共通のモチーフと類似する既知の転写因子結合モチーフを探索したところ、モチーフ 0 は TEAD の結合モチーフと類似しており、モチーフ 1 は MEF2A, モチーフ 3 は Hox, モチーフ 4 は FOXA1, モチーフ 6 は AP1, モチーフ 9 は Smad3 の結合配列と類似していた。モチーフ 1 (MEF2A 類似)を除いて今回新たに同定したモチーフはいずれもより高頻度に Smad2/3 結合領域に存在することがわかった。次に Smad2/3 結合領域を遺伝子発現変動があるものとそうでないものに分けて、同定したモチーフの頻度の違いを検討した。その結果、発現上昇する遺伝子群の Smad2/3 結合部位においてモチーフ 0 (TEAD 類似) の頻度が相対的に高いことが明らかになった。

以上、多彩な機能を持つ TGF- β の表皮角化細胞分化と上皮間葉転換 (EMT) への影響を調べるため ChIP-sequecig を行い、表皮角化細胞では新たな TGF- β シグナルの下流因子 C2orf54 を同定し、その役割は皮膚のバリア機能に重要なインボルクリンへの制御が明らかとなった。また、上皮間葉転換 (EMT) において TGF- β の下流因子の Smad2/3 の結合が遺伝子発現において必ずしも十分条件ではなく、結合領域には TEAD 類似モチーフが見られ mad2/3 の標的遺伝子のサブセットの発現誘導が TEAD 依存的に新たな synexpression group を形成していることを示す結果となった。