

博士論文

論文題目 頭頸部がん細胞株の網羅的ゲノム解析による
新規がん関連遺伝子の発見とその機能解析

氏 名 安藤 瑞生

目 次

| | |
|-----------------------------|----|
| 要旨 | 3 |
| 序文 | 4 |
| 方法 | 7 |
| 結果 | |
| T3M-1 Cl-10 細胞株における非同義変異の発見 | 23 |
| ELF4 変異体の機能解析 | 29 |
| <i>ELF</i> 遺伝子群の機能解析 | 36 |
| ヒト悪性腫瘍における ELF ファミリー変異の機能解析 | 40 |
| ELF4 の DNA 結合部位の網羅的探索 | 45 |
| ELF4 により発現制御される遺伝子の探索 | 53 |
| 考察 | 70 |
| 引用文献 | 78 |
| 謝辞 | 81 |

要旨

頭頸部がんは5年生存率が50%以下の予後不良な疾患であり、分子レベルの発がん機構解明が求められている。本研究では次世代シーケンサーを用い、がん関連遺伝子の新規配列異常や融合遺伝子の同定を目指した。その結果、頭頸部がん細胞株で *ELF4* 遺伝子の L211M 変異を発見し、野生型 *ELF4* が有する細胞増殖抑制作用の機能失活型変異であることを突き止めた。広く *ELF* ファミリーが固形腫瘍においてがん抑制遺伝子として機能することも明らかにした。本研究によって野生型 *ELF4* が細胞増殖を抑制する分子メカニズムも明らかになり、これら分子を標的とした治療薬が変異 *ELF4* 陽性がん種に対して有効であると期待される。

序文

頭頸部がんは全世界で年間 50 万人以上の罹患数（全がん中 6 位）があり、5 年生存率が未だに 50%以下の予後不良な疾患である[1,2]。大多数の症例において早期診断・治療が未だ困難であり、単剤で奏功率に寄与することのできる薬剤も極めて限られている。従来型の細胞傷害性抗がん剤による治療効果はほぼ限界に達していると言わざるを得ない。頭頸部がんが早期に発見され根治手術が可能とならない限り、現行の治療法ではこれ以上の治療効果を得ることは困難と予想される。

悪性腫瘍の発生には遺伝子の点突然変異・挿入・欠失さらには遺伝子融合が深く関わっていることが知られており、薬剤による予後改善のためには、発がんに関連する機能分子を特異的にターゲットする分子標的療法が有効であると考えられる。実際、上皮成長因子受容体遺伝子（*EGFR*）の活性型変異陽性非小細胞肺癌に対する *EGFR* キナーゼ阻害薬ゲフィチニブ[3]や *BCR-ABL* 陽性慢性骨髄性白血病に対する *ABL* キナーゼ阻害薬イマチニブ[4]などの治療がこれらの疾患の予後を著明に改善したことから、がん細胞特異的な遺伝子異常を同定し、それをターゲットとした分子標的療法を開発することが予後改善に直結すると証明された。

がん細胞のゲノム安定性は低いため、がんの染色体中には様々なゲノム変化が数多く

存在すると予想される。このなかから発がん関連異常を同定するためには、近年急速に進歩しつつあるゲノミクス技術が有効である。次世代シーケンサーの登場により旧来の DNA シーケンサーに比べて等比級数的なサイズの塩基配列情報が得られるようになったため、がん細胞の全ゲノムをリシーケンスすることも不可能ではなくなった。実際、がんゲノムの体細胞変異を大規模にスクリーニングする国際的な International Cancer Genome Consortium (ICGC) が 2008 年に発足し、50 種類のがん種からそれぞれ 500 検体の全エクソン配列をリシーケンスするプロジェクトが行われている。また同様のプロジェクトとして米国の The Cancer Genome Atlas (TCGA) がある。また、次世代シーケンサーはがんゲノムのリシーケンス以外にも様々な目的で使用されており、例えば、遺伝子発現解析や選択的スプライシングの定量化のための transcriptome sequencing、microRNA のプロファイリングのための small RNA sequencing、タンパクと DNA の相互作用のゲノムワイドマッピングのための網羅的クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq; chromatin immunoprecipitation-sequencing) などがあり、多くの研究で利用されている[5,6]。

本研究では、次世代シーケンサーシステムを用いて頭頸部がん細胞株 T3M-1 Cl-10[7] を対象としてがん関連遺伝子となりうる新規の配列異常や融合遺伝子などの同定を目指した。その結果、新規に見出された非同義変異のなかで *ELF4* (E74-like factor 4) 遺伝子の L211M 変異に注目し、同変異体が野生型 *ELF4* の有する細胞増殖抑制作用の機能失活型変

異であることを突き止めた。さらに、野生型 ELF4 の細胞増殖抑制作用がヒト骨肉腫由来細胞株 HT1080[8]やヒト正常乳腺上皮由来細胞株 MCF10A[9]においても観察されること、ひいては ELF ファミリーが広くヒトの固形腫瘍における新たながん抑制遺伝子である可能性を指摘した。

方法

細胞株と培養

ヒト口腔扁平上皮がん細胞株 T3M-1 Cl-10 は理研細胞バンクより入手し、10% ウシ胎児血清添加 DMEM-F12 メディウム (Invitrogen) にて継代培養した。ヒト胎児腎細胞由来の細胞株 293T (HEK293T)、ヒト乳がん細胞株 HTB26 (MDA-MB-231)、ヒト骨肉腫細胞株 HT1080、パッケージング細胞株 BOSC23 は American Type Culture Collection (ATCC) より入手し、同様に継代培養した。ヒト正常乳腺細胞由来の細胞株 MCF10A は ATCC より入手し、5% ウマ血清 (Biowest) 添加 DMEM/F12 メディウムに 20 ng/mL ヒトリコンビナント上皮成長因子 (Peprotech)、10 μ g/mL ウシインスリン (Sigma-Aldrich)、0.5 μ g/mL ハイドロコルチゾン (Sigma-Aldrich)、100 ng/mL コレラ毒素 (Sigma-Aldrich) を加えて継代培養した。

cDNA-capture と大規模塩基配列解析

RLT バッファー (QIAGEN) により上記細胞を可溶化した後、RNeasy Mini キット (QIAGEN) にて全 RNA 分画を純化した。得られた RNA はオリゴ dT プライマーにアニールした後、PrimeScript 逆転写酵素 (TaKaRa) 存在下で 42°C、1 時間反応させ一本鎖 cDNA を

合成した。さらに SMART 法 (Clontech) による PCR 反応で二本鎖 cDNA とした。

cDNA を基質とした exon capture 法で大規模に塩基配列解析を行う目的で、SureSelect システム (Agilent Technologies) カスタムキットを利用した。発がんに関連すると推測されるセリンスレオニンキナーゼ、チロシンキナーゼ、デュアルキナーゼ、白血病関連転写因子およびその他の計 906 遺伝子[10]について 100bp 程度の cDNA 純化用 SureSelect プローブをデザインし、さらにそこからヒトゲノム中の繰り返し配列を Repeat Masker (<http://ftp.genome.washington.edu/index.html>)により取り除いてカスタムキットを作成した。各検体から合成した二本鎖 cDNA はアコースティックソルバイザー (Covaris) によって平均鎖長 100 bp に断片化した後、カスタム合成した SureSelect システムのビオチン化 RNA プローブと 65°C、24 時間ハイブリダイズした。さらに RNA プローブに結合した cDNA 断片はストレプトアビジン結合磁気ビーズにより回収した。

上述の形で純化された標的遺伝子由来 cDNA 断片は Illumina 社の Genome Analyzer IIx (GAIIx) を用いて 76 塩基×2 のペアエンドシーケンス反応を実施した。得られたデータから各塩基における Q 値が 20 以上のリードのみを用い、2 塩基までの変異を高速に検出できる Bowtie アルゴリズムや、より詳細なマッピングが可能な BLAST アルゴリズムを利用して、cDNA キャプチャーに用いた 906 種類の遺伝子の cDNA 配列にマップさせ変異を同定した。同定した変異の中で同義変異 (synonymous mutations) や dbSNP Build 132

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/index.html>) に登録されている既報の一塩基多型 (SNP: single nucleotide polymorphism) は削除し、非同義変異 (non-synonymous mutations) のみを選び出した。また、遺伝子融合を同定する目的で、得られた塩基配列の両端から 20 塩基対ずつをそれぞれ cDNA キャプチャーに用いた 906 種類の遺伝子の cDNA 配列および RefSeq mRNA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 配列にマップさせた。両端の遺伝子が同じ遺伝子か異なる遺伝子かを検証し、両端が異なる遺伝子にマップされるリードを遺伝子融合の候補リードとして選び出した。

プラスミド

ヒト *ELF1*、*ELF2*、*ELF3*、*ELF4*、*ELF5*、*DLX3*、*HRK* の野生型 cDNA、および *BCORL1* 遺伝子 exon1-11 の cDNA は表 1 に示すプライマーセットにより増幅した。作成した cDNA をレトロウイルスベクター pMXS (東京大学医科学研究所 北村俊雄教授より供与)、あるいは EGFP (Clontech) を同時に発現するレトロウイルスベクター pMXS-ires-EGFP に挿入した。ELF4-C-FLAG 発現プラスミドは、本来の終止コドンを除くして CTCGAGGGGGACTATAAGGACGATGATGACAAATAA の塩基配列を付加することによって作成した(下線部が FLAG エピトープタグ)。ELF1(P225A)、ELF1(G265R)、ELF2(E140X)、ELF2(W238X)、ELF4(V382I)、ELF4(L80fs)、ELF4(K230fs)、ELF4(W231L)、ELF4(T232S)、

ELF4(F239L)、ELF4(V247L)、ELF4(R267Q)、ELF4(L269P)、ELF4(E282K)の各変異体は、
上記で得られたプラスミドより site-directed mutagenesis にて作成した（表 2）。

表1 RT-PCRに使用したプライマー

| Gene | Forward primer sequence | Reverse primer sequence |
|-----------------------|--------------------------|---------------------------|
| ELF1 full-length cDNA | TTGCTGCCTGATACGTGAATCTTC | GTTCTTCACGATTGAATTCTGAAAC |
| ELF2 full-length cDNA | ATAGCGTTTGAAGCTTCCTCAGGG | AGTACTGCCACTAACAGCCTGAAG |
| ELF3 full-length cDNA | CTACCTGGCGGAAGTGGATTCTC | GGTATAGTTCCAACCCTCAGTTCC |
| ELF4 full-length cDNA | AATGCAGCCTTGAGCCTGGCTTAG | GTGCTACTGAAGTCGGTCCCTATG |
| ELF5 full-length cDNA | GGACCTCAGCTTCCATGCCATCTC | GCCTGGAGCAGATCATAGCTTGTC |
| DLX3 full-length cDNA | TCCCTTCGCCTTCTGGACACACAC | CGATGATTCCTGAGTGGCTAGGAC |
| HRK full-length cDNA | GGGAGCGAGGCCAGCGGTCATG | ATTGGGGTGTCTGTTTCTGCAGCTG |
| BCORL1 exon1-11 cDNA | CAGCAGGTCCTATCTGGTGGTGAG | CCGCGGGACACTGACACTTGGAGG |

表2 Site-directed mutagenesisに使用したプライマー

| Mutation | Forward primer sequence | Reverse primer sequence |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------|
| ELF1(P225A) | CAAGGCTACTTGTGCTAAATACATCAAG | CTTGATGTATTTAGCACAAAGTAGCCTTG |
| ELF1(G265R) | GAATTATGAGACCATGAGAAGAGCACTC | GAGTGCTCTTCTCATGGTCTCATAATTC |
| ELF2(E140X) | GGTGTCAACTGAATAGTCTGAACCC | GGGTTCAGACTATTTCAGTTGACACC |
| ELF2(W238X) | GTCTCTAAGCTTTGAGGAAAGCATAAG | CTTATGCTTTCCTCAAAGCTTAGAGAC |
| ELF4(V382I) | CTCCACCATGCTCATCTCTCCAGCAGAG | CTCTGCTGGAGAGATGAGCATGGTGGAG |
| ELF4(L80fs) | GGAAGGCAGTTTTTTTGCTGACAGATGAC | GTCATCTGTCAGCAAAAAAACTGCCTTCC |
| ELF4(K230fs) | GTCCCAAGTACATAAGTGGACCCAGCG | CGCTGGGTCCACTTATGTACTTGGGAC |
| ELF4(W231L) | CAAGTACATCAAGTTGACCCAGCGAGAG | CTCTCGCTGGGTCAACTTGATGTACTTG |
| ELF4(T232S) | GTACATCAAGTGGTCCCAGCGAGAGAAAG | CTTTCTCTCGCTGGGACCACTTGATGTAC |
| ELF4(F239L) | GAGAAAGGCATCTTGAAACTGGTGGAC | GTCCACCAGTTTCAAGATGCCTTTCTC |
| ELF4(V247L) | GGACTCCAAAGCTTTGTCCAAGCTGTGG | CCACAGCTTGGACAAAGCTTTGGAGTCC |
| ELF4(R267Q) | GAGACAATGGGGCAGGCACTAAGATAC | GTATCTTAGTGCCTGCCCCATTGTCTC |
| ELF4(L269P) | CAATGGGGCGGGCACCAAGATACTACTAC | GTAGTAGTATCTTGGTGCCCGCCCCATTG |
| ELF4(E282K) | CTGGCCAAAGTGAAAGGGCAGAGGCTG | CAGCCTCTGCCCTTTCACCTTTGGCCAG |

ルシフェラーゼアッセイ

cDNA 発現プラスミドを、*IL3* 遺伝子のプロモーター活性を利用した ELF4 レポータープラスミドである pGL4/APET あるいはその変異体 pGL4/mAPET [11] とともに Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いたリポフェクション法により 293T 細胞株に導入し、48 時間後に Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。また同じ細胞に同時にウミシイタケルシフェラーゼ発現プラスミド pGL-TK (Promega) を導入し、ホタルルシフェラーゼ活性値をウミシイタケルシフェラーゼ活性値で正規化した。測定機器には Plate Reader ARVO X3 (PerkinElmer) を使用した。

細胞増殖アッセイ、細胞周期アッセイ、アポトーシスアッセイ

pMXS-ires-EGFP を用いた cDNA 発現プラスミドをパッケージング細胞株 BOSC23 に Lipofectamine (Invitrogen) を用いたリポフェクション法により導入し、培養上清に組み換えレトロウィルスを得た。細胞増殖アッセイでは、同組み換えウィルスを T3M-1 Cl-10、HT1080、MCF10A の各細胞株に感染させた後、FACSCanto II (BD Biosciences) を用いて経時的に EGFP 陽性細胞数を計測した。データは CellQuest Pro software (Becton Dickinson) を用いて分析した。細胞周期アッセイでは、同組み換えウィルスを T3M-1 Cl-10 細胞株に感染させ、40 時間後に APC BrdU Flow Kit (BD Biosciences) により BrdU 染色を行い、

FACSCanto II を用いて EGFP 陽性細胞における細胞周期解析を実施した。アポトーシスアッセイでは、同組み換えウイルスを T3M-1 Cl-10 細胞株に感染させ、48 時間後に Caspase-Glo 3/7 (Promega) により caspase-3 および caspase-7 の活性を測定した。

定量的リアルタイムRT-PCR

各種の細胞株における *ELF* 遺伝子群、*DLX3*、*HRK* 遺伝子の発現量の検定には、細胞株より cDNA を合成した後、各遺伝子およびコントロールとして *GAPDH* 遺伝子を表 3 に示すプライマーセットにより増幅した。リアルタイム PCR 法には、QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) と ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) を用いて Ct 値 (threshold cycle) を決定し、それぞれのコントロール cDNA を用いて算出した検量線により初期 cDNA 量を求めた。

表3 定量的リアルタイムRT-PCRに使用したプライマー

| Gene symbol | Forward primer sequence | Reverse primer sequence |
|--------------|--------------------------|---------------------------|
| <i>ELF1</i> | GTCCCAGAGGGAGAAGCAGCTAGA | GAGACACAACCACTGGAACCTTGGG |
| <i>ELF2</i> | CGATGCTTCATCCAGGTCTCCTAC | GCCACAGTTGAAATTTTCTGACCC |
| <i>ELF3</i> | GGGCCAAAAGAAAAAGAACAG | GAGTTTTTGCCAACTTGTAGACG |
| <i>ELF4</i> | ACTACCTCCACCATGCTCGTCT | CACTCCTAGGTGGATGTTGCTG |
| <i>ELF5</i> | GGGACAAAGGAAGAAAAATGACAG | CCAAATTTGTACACTAACCTTCGG |
| <i>DLX3</i> | AAAGCCGCGTACGATCTACTCCAG | GCACCTCCCCGTTCTTGTAGAGTT |
| <i>HRK</i> | GGCAGGCGGAACTTGTAGGAAC | TTCTCCAAGGACACAGGGTTTTTC |
| <i>GAPDH</i> | GTCAGTGGTGGACCTGACCT | TGAGCTTGACAAAGTGGTCG |

網羅的クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) およびChIP-PCR

ELF4-C-FLAG を発現するpMXS-ires-EGFPプラスミドをパッケージング細胞株BOSC23にLipofectamineを用いたリポフェクション法により導入し、培養上清に組み換えレトロウィルスを得た。同組み換えウィルスを感染させて48時経過したT3M-1 Cl-10細胞株(1×10^6 個) を1%ホルマリンにより架橋した後に回収し、Bioruptor UCD-300 (Cosmo Bio)を用いて250Wで4分間の処理によりクロマチン断片化を行った。続いて、抗FLAG M2抗体 (Sigma-Aldrich) とDynabeads M-280 Sheep anti-mouse IgG (Life Technologies) を用いて4°Cで24時間インキュベートしてクロマチン免疫沈降を行った。得られたChIP産物をNEBNext ChIP-Seq Library Prep Reagent Set (Illumina) のプロトコールに従ってサンプル調製し、GAIIxを用いて51塩基×2のペアエンドシーケンス反応を実施した。得られたデータから各塩基におけるQ値が30以上のリードのみを選別し、Bowtieアルゴリズムを用いてヒトゲノム配列にマップさせた。次にCisGenome peak caller version 2.0 [12]を使用し、inputサンプルをコントロールとしてChIPにより濃縮された領域を算出した。ChIP-seqで得られたデータの検証のため、表4に示すプライマーを用いてInhibitor of growth family, member 4 (ING4) 遺伝子のプロモーター領域におけるChIP-PCRを行った。また、false discovery rate (FDR) が10%以下のデータのみを用い、ChIP産物がゲノム上で遺伝子間領域、プロモーター領域、エクソン、イントロン、5'非翻訳領域 (5'UTR)、3'非翻訳領域 (3'UTR)、noncoding RNAのい

ずれにマップされるかを決定した。ChIP産物に対するコントロールとして、ヒトゲノム配列から100塩基長のランダム断片を作成し ($n = 100,000$)、それらの分布も同様に決定した。さらに、FDRが10%以下のデータのみを用い、CisGenomeのnovel motif discoveryアルゴリズムによってDNA結合配列モチーフを新たに探索した。ELF4標的遺伝子のgene ontology解析には、Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID v6.7; <http://david.abcc.ncifcrf.gov>)を使用した。

表4 ChIP-PCRに使用したプライマー

| Gene symbol | Forward primer sequence | Reverse primer sequence |
|-------------|--------------------------|--------------------------|
| <i>ING4</i> | CCTTTCCGCCCTTAAAAGGAGAAC | AAAGGAAAAGTTTCAGTGTCGGGC |

DNAマイクロアレイによる網羅的発現解析

同様にELF4-C-FLAG を発現する組み換えレトロウィルスを感染させて48時経過した T3M-1 Cl-10細胞株を用い、FACS AriaII cell sorter (BD Biosciences) によりEGFP陽性細胞をソーティングして平均 5×10^5 個の細胞を回収した。SurePrint G3 Human Gene Expression 8x60K v2 Microarray (Agilent Technologies) のプロトコールに従って遺伝子発現解析を行い、GeneSpring 12.5 (Tomy Digital Biology) を用いて解析した。Triplicateのデータを正規化した後、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) Version 2.0 (www.broad.mit.edu/gsea/)[13]による解析を行った。

RNA interference

DLX3 の short hairpin RNA (shRNA) の標的配列は、sh#5 : 5'-GGAGCACAGUCCCAAUAAC-3'および sh#8 : 5'-GGAAUAUACCUACGGAGCC-3'とした。 *HRK* の shRNA の標的配列は、sh#7 : 5'-GGCGCUAGGCGACGAGCUG-3'および sh#9 : 5'-GGGAAGCCCUUUGGAAAUC-3'とした。発現プラスミドには pLKO.1 puro または pLKO.1 neo プラスミド (Addgene) を使用した。shRNA によるノックダウン効率の評価には、表 3 に示すプライマーを使用してそれぞれの shRNA を定常発現する T3M-1 Cl-10 細胞株における定量的リアルタイム RT-PCR を実施し、*DLX3* および *HRK* のメッセンジャ

一RNA レベル変化を検討した。これに加え、shRNA 標的配列を含む遺伝子断片、すなわち *DLX3* cDNA (NM_005220.2) の塩基番号 420-1110、および *HRK* cDNA (NM_003806.1) の塩基番号 173-658 を pMXS-ires-EGFP へ挿入したプラスミドを作成し、shRNA を定常発現する T3M-1 Cl-10 細胞株においてこの組み換えレトロウィルスを感染させた場合に EGFP シグナルが減弱することを利用して、FACSCanto II を用いて EGFP シグナルのピーク値を算出した。また、shRNA 耐性の cDNA を発現するプラスミド pMXS-ires-EGFP を作成するため、shRNA が標的とする塩基配列をアミノ酸配列が変化しないように変更した (表 5)。*HRK* の shRNA#9 の標的配列は 3'UTR であるため、表 6 に示すプライマーを用いて PCR 増幅することにより、3'UTR を欠損する *HRK* cDNA を作成した。

表 5 shRNA 耐性 cDNA の塩基配列

| cDNA | Target sequence for shRNA | Sequence of resistant cDNA |
|-------------------------|---------------------------|----------------------------|
| shRNA #5-resistant DLX3 | GGAGCACAGTCCCAATAAC | GGAACATAGCCCGAACAAT |
| shRNA #8-resistant DLX3 | GGAATATACCTACGGAGCC | GGAGTACACGTATGGTGCG |
| shRNA #7-resistant HRK | GGCGCTAGGCGACGAGCTG | GGCCCTTGGGGATGAACTC |

表 6 shRNA #9 耐性 HRK cDNA 作成に使用した PCR プライマー

| cDNA | Forward primer sequence | Reverse primer sequence |
|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| shRNA #9-resistant HRK | GGGAGCGAGGCCAGCGGTCATG | AGCCCCGCGTTCCTACAAGTTCCG |

結果

T3M-1 Cl-10 細胞株における非同義変異の発見

頭頸部扁平上皮がんにおけるがん関連遺伝子を探索する目的で、発がんに関連すると予想される遺伝子群 ($n=906$) の cDNA 断片を選択的にキャプチャーする技術 (図 1) [10] を使用し、これを用いて日本人男性の口腔底扁平上皮がん由来の細胞株 T3M-1 Cl-10 の網羅的変異解析を実施した。同細胞株由来の cDNA 断片を次世代シーケンサーGAIIxにより解析した結果、91,961,299 個のユニークリードが得られ、累計 850 個の cDNA にマッピングされた。1 塩基対あたりの平均カバレッジは $1,202\times$ であった。単塩基置換、挿入または欠失 (indels)、融合遺伝子を独自のパイプラインにてスクリーニングした結果、12 種類の非同義変異を見出し (表 7)、これらは同一検体のゲノム DNA を用いた Sanger 法によるシーケンスにて、ゲノムレベルでも確認された。しかし挿入または欠失、融合遺伝子では、sanger 法でも確認できたものはなかった。

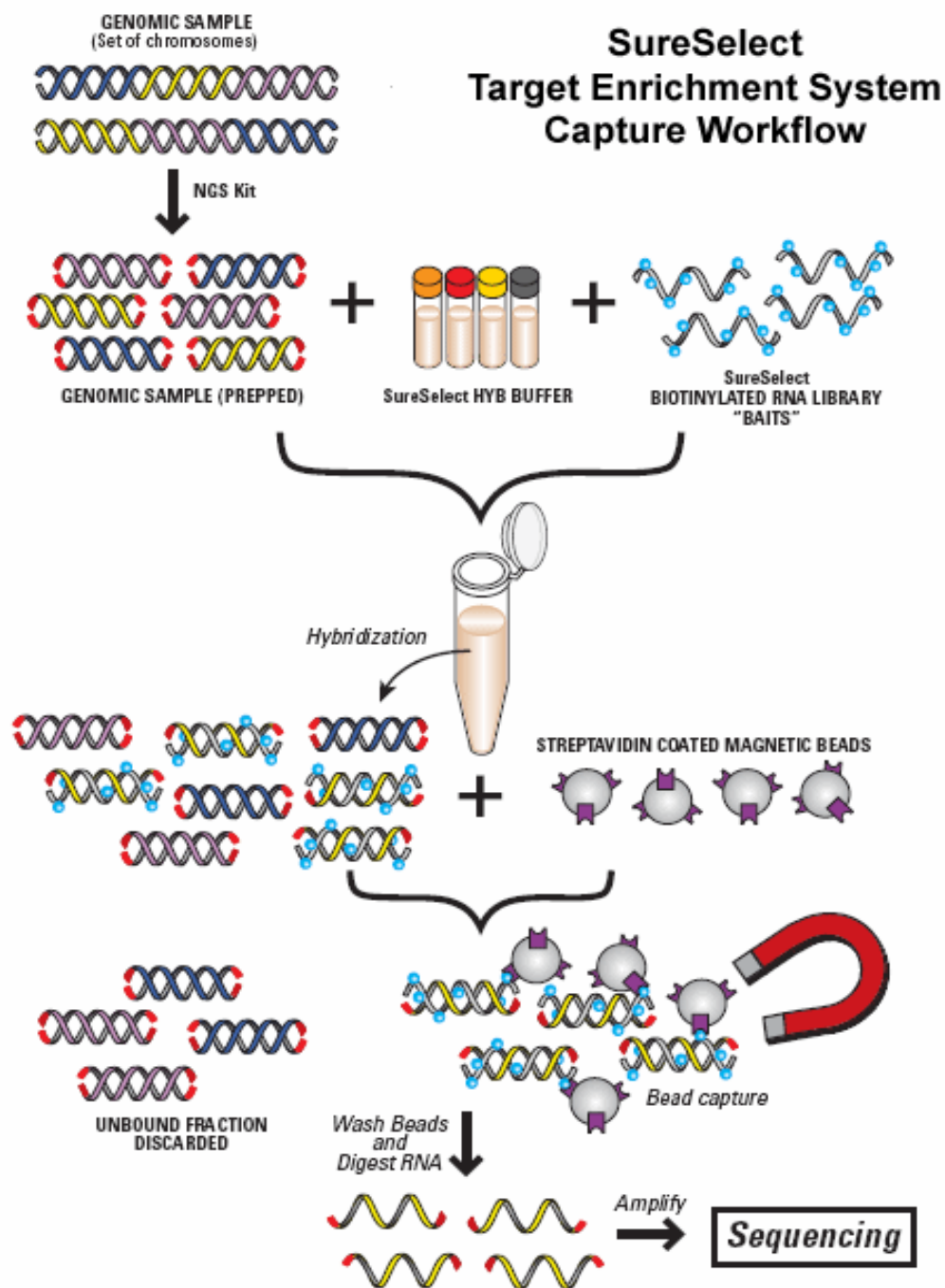


図 1 SureSelect によるシーケンスキャプチャー (<http://www.chem-agilent.com/>より引用)

あらかじめキャプチャーしたい配列に対応する RNA プロブをビオチン化した状態で用意しておく。cDNA を断片化した後、熱変性し、上記 RNA プロブとハイブリダイズさせる。その後ストレプトアビジン結合磁気ビーズで RNA プロブ・cDNA 断片複合体を純化する。

表 7 T3M-1 Cl-10 細胞株の網羅的 cDNA 解析による非同義変異の発見

| Gene | GenBank accession no. | Read coverage | Mismatch ratio (%) | Nucleotide change | Amino acid change |
|--------------|--------------------------|------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| <i>CASP8</i> | NM_033355 | ×469 | 98.5 | 1183G>C | G325A |
| <i>ELF4</i> | NM_001421 | ×188 | 39.8 | 1016C>A | L211M |
| <i>GSG2</i> | NM_031965 | ×119 | 100 | 1238T>C | V402A |
| <i>HRAS</i> | NM_005343 | ×613 | 25.1 | 370A>T | Q61L |
| <i>IRAK2</i> | NM_001570 | ×155 | 49.0 | 591C>T | S172L |
| <i>NUAK2</i> | NM_030952 | ×162 | 51.2 | 1427G>A | A434T |
| <i>PDPK1</i> | NM_002613 | ×226 | 37.6 | 1663G>C | E507Q |
| <i>PRKCZ</i> | NM_002744 | ×61 | 49.1 | 306C>T | R49C |
| <i>PXK</i> | NM_017771 | ×82 | 57.3 | 364A>G | I89V |
| <i>RHOA</i> | NM_001664 | ×1127 | 52.9 | 394G>C | E40Q |
| <i>TP53</i> | NM_000546 | ×234 | 97.8 | 1035A>G | R280G |
| <i>TTBK2</i> | NM_173500 | ×100 | 51.0 | 1402G>C | L321F |

表 7にある 12 種類の非同義変異のなかには、*TP53* や *HRAS* のように頭頸部扁平上皮がんにおいて高頻度に生じることが既に知られている遺伝子変異に加えて、*ELF4* cDNA (NM_001421.3) の塩基番号 1016 が C から A に変異し、結果としてコドン 211 がロイシンからメチオニンに置換する新規変異 *ELF4*(L211M)が含まれていた (図 2)。

ELF4 遺伝子は myeloid Elf-1 like factor (MEF)の名称でも知られる遺伝子で、ETS (E-twenty six) ファミリーに属する転写因子である。ETS ファミリーは多様な細胞種において細胞増殖、分化、悪性形質転化に関わることが知られている[14]。図 2 に示すような 5 つのサブドメインのうち、新たに発見された L211M 変異は DNA 結合作用を有する ETS ドメイン内に位置するため、*ELF4* の転写誘導活性に変化をもたらす可能性が示唆される。そこで、L211M 変異体が頭頸部扁平上皮の発がんに関与する可能性について詳細な機能解析を行うこととした。また、同様の方法でヒトがん細胞に由来する複数の細胞株 cDNA を網羅的に配列解析する中で、乳がん細胞株 MDA-MB-231 (HTB26) から *ELF4*(V382I)を見出したので、合わせて解析することとした。

これに加えて、公開されている COSMIC : Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (<http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic/>)、および CCLE : Cancer Cell Line Encyclopedia (<http://www.broadinstitute.org/ccle/home>)、および TCGA : The Cancer Genome Atlas (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaHome2.jsp>)の各データベースを探索することによ

り、様々なヒト悪性腫瘍において ELF4 の変異箇所がタンパクの全域にわたって分布していることが明らかになった（図 2）。

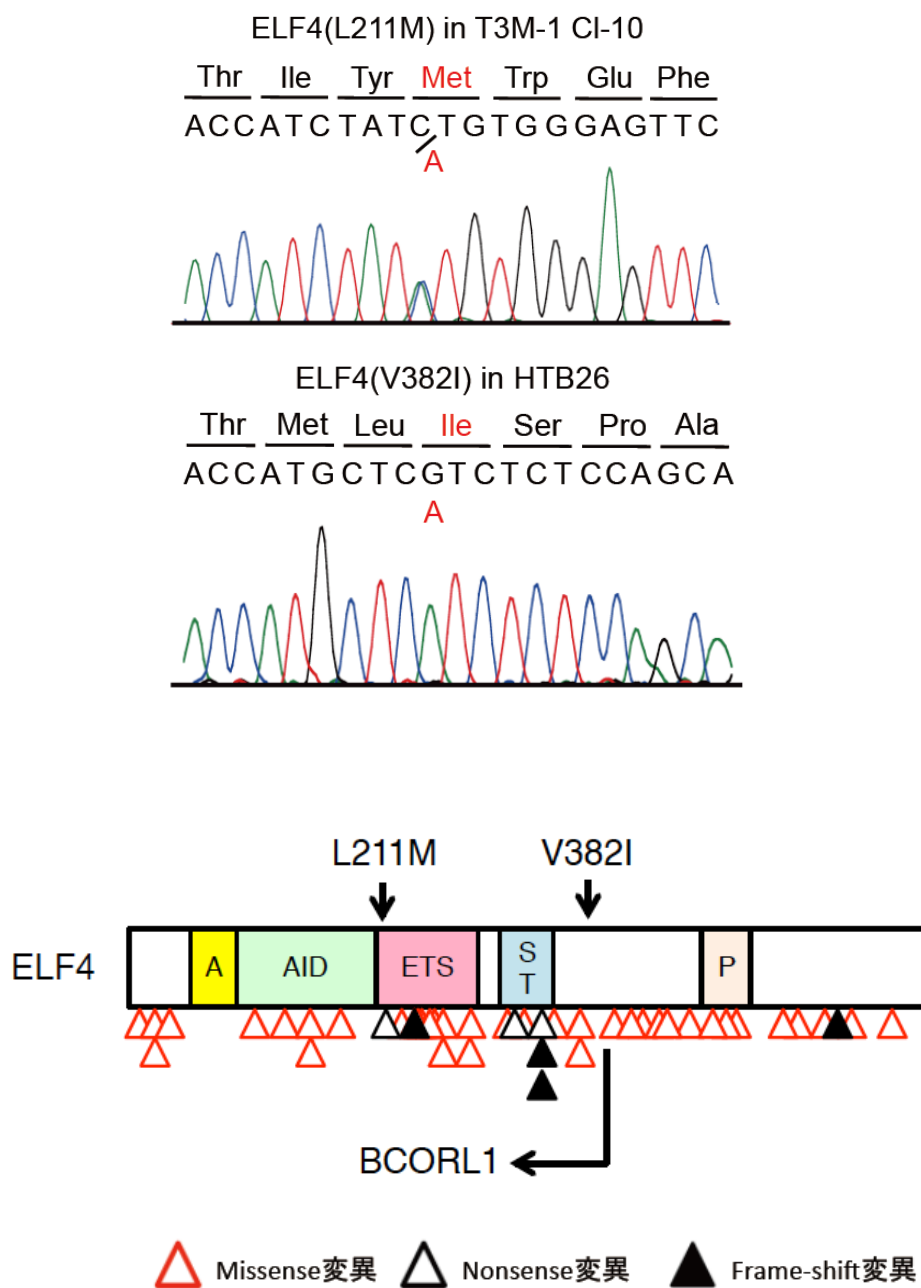


図2 ELF4 タンパクの構造と変異箇所

細胞株の cDNA を GAIIX でシーケンスしたことによって同定された ELF4 の L211M 変異および V382I 変異は、同一検体のゲノム DNA をキャピラリーシーケンスにかけることでゲノムレベルでも確認された（上段、中段）。他に COSMIC、CCLE、TCGA の各データベースに既に登録されている変異体を示す（下段）。A, Acidic domain; AID, AML1 interaction domain; ETS, ETS domain; ST, Serine/threonine-rich domain; P, Proline-rich domain

ELF4 変異体の機能解析

ELF4 変異体の転写誘導活性を評価する目的で、*IL3* 遺伝子のプロモーター活性を利用した ELF4 レポータープラスミド pGL4/APET を用い、L211M 変異体 や V382I 変異体を強制発現させた 293T 細胞株におけるルシフェラーゼ活性を野生型 ELF4 のそれと比較した。また、日本人由来の肝細胞がんを対象としたゲノムシーケンスにより発見された *BCORL1-ELF4* 融合遺伝子についても検討した。図 3 に示すように、野生型 ELF4 に比べて L211M 変異体は転写誘導活性が約 1/3 に低下していたが、V382I 変異体は野生型と同等の活性を示した。一方 *BCORL1-ELF4* では活性がほぼ消失していた。ETS ドメインの結合配列に変異を導入したレポータープラスミド pGL4/mAPET では全てのルシフェラーゼ活性が消失していることから、これらの転写誘導活性は ETS 結合配列を介した作用であることが明らかになった。すなわち、L211M 変異体および *BCORL1-ELF4* は ELF4 の機能失活型変異であることが示された。

次に、ELF4 の機能失活型変異が細胞増殖に及ぼす影響について検証した。L211M 変異体を有する T3M-1 Cl-10 細胞株に対して機能失活型変異である ELF4(L211M)あるいは *BCORL1-ELF4* を導入しても細胞数はほとんど変化しなかったのに対し、正常の転写誘導活性を持つ野生型 ELF4 および ELF4(V382I)では細胞増殖が強く抑制されることが明らかになった (図 4)。すなわち、野生型の ELF4 は頭頸部扁平上皮がんにおいて細胞増殖抑制作用を有することが示唆され、ELF4 の変異体や融合遺伝子は、その活性を無効化するこ

とによって発がんに関与している可能性が考えられた。

ELF4 が有する細胞増殖抑制作用をさらに評価するため、扁平上皮がん以外のヒト細胞株に対しても同様のアッセイを実施したところ、驚くべきことに、ヒト骨肉腫由来の細胞株 HT1080 においても同様の結果が得られた (図 4)。なお同細胞株の *ELF1*、*ELF2*、*ELF4* 遺伝子群には変異は存在していない[15]。さらに興味深いことに、ヒト正常乳腺上皮由来の細胞株である MCF10A においても増殖抑制作用が見られ、ELF4 はがん細胞に留まらない広範囲の細胞に対して増殖抑制能を有していることが示唆された。

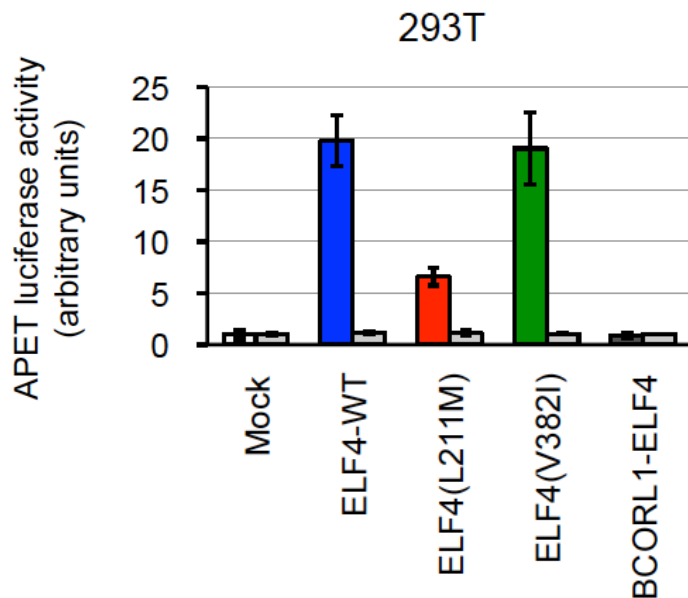


図3 野生型 ELF4 および変異体、融合遺伝子の転写誘導活性

野生型 ELF4 (ELF4-WT) や変異体の cDNA 発現プラスミドを pGL4/APET あるいは pGL4/mAPET プラスミドおよびコントロールプラスミド pGL-TK と共に 293T 細胞株へ導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。左の棒グラフが pGL4/APET、右の棒グラフが pGL4/mAPET を表す。グラフは、レポータープラスミド由来ホタルルシフェラーゼ活性値を pGL-TK 由来レニラルシフェラーゼ活性値で正規化した値の、対照 (Mock) に対する比 (平均値±標準偏差) で示す。

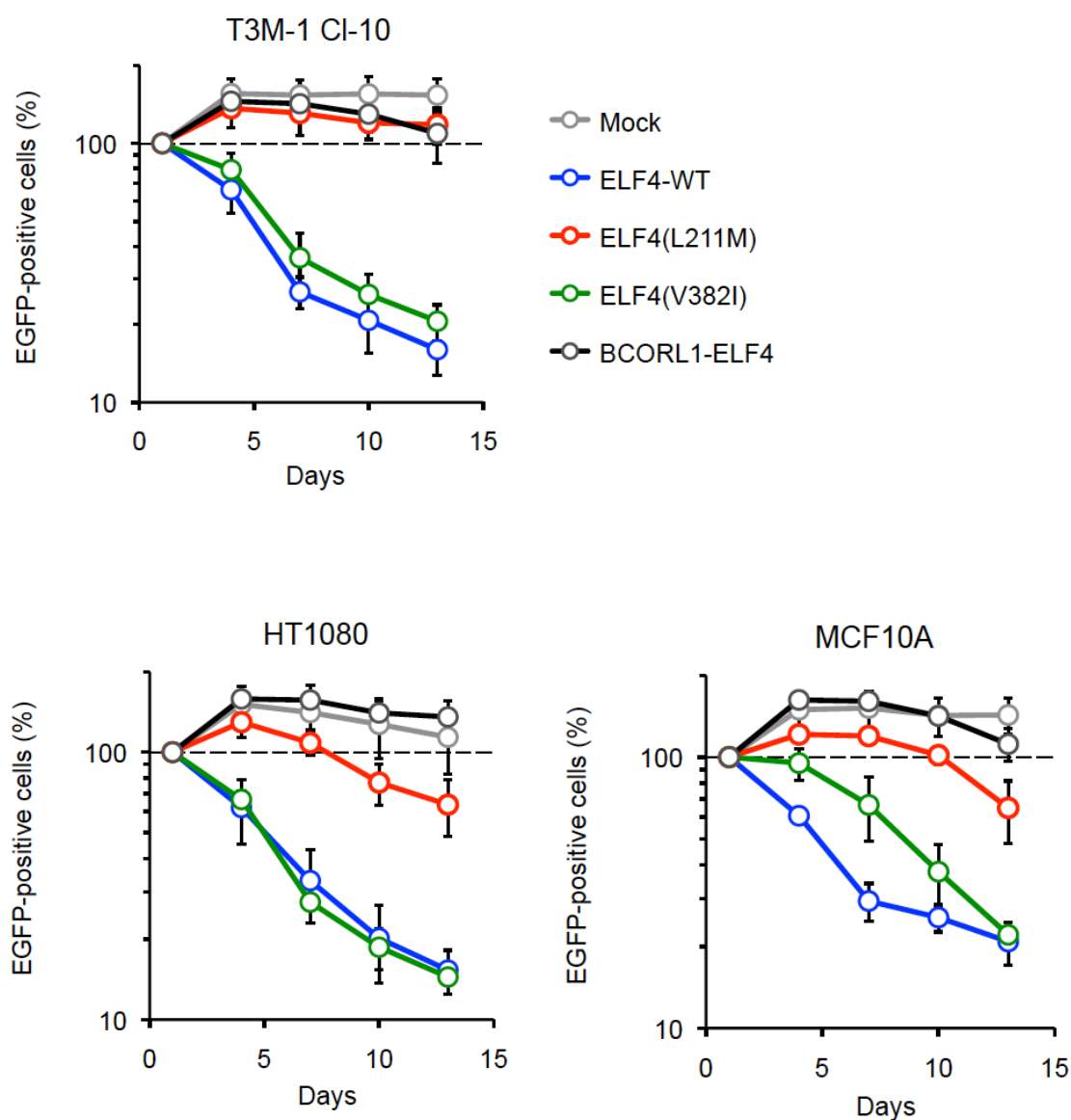


図4 様々な細胞株における ELF4 の細胞増殖抑制作用

各細胞株に対して目的の cDNA と EGFP とを同時に発現するプラスミドをレトロウイルスにより導入した。感染 24 時間後より開始して 3 日毎に、FACSCanto II を使用し EGFP 陽性細胞の割合すなわち ELF4 を発現している細胞の割合を調べた。グラフは、感染 24 時間後の細胞割合を 100 として、それに対する比（平均値±標準偏差）で示す。

続いて、ELF4 がどのようなメカニズムで細胞増殖を抑制するのかを検証した。T3M-1 Cl-10 細胞株を BrdU 染色し、細胞周期を解析した結果、野生型 ELF4 および V382I 変異体では G₀/G₁ 期の細胞数が増加し、代わりに S 期の細胞数が減少していた。これに対し、機能失活型変異である L211M 変異体および BCORL1-ELF4 ではそのような変化は見られなかった (図 5)。また、caspase 3/7 活性を指標としたアポトーシスアッセイにおいても、野生型 ELF4 および V382I 変異体では caspase 3/7 活性が上昇していたのに対し、L211M 変異体および BCORL1-ELF4 では変化が見られなかった (図 6)。これらの結果より、ELF4 の細胞増殖抑制作用は、細胞周期の停止およびアポトーシスの誘導という二面的なメカニズムによりもたらされることが明らかになった。

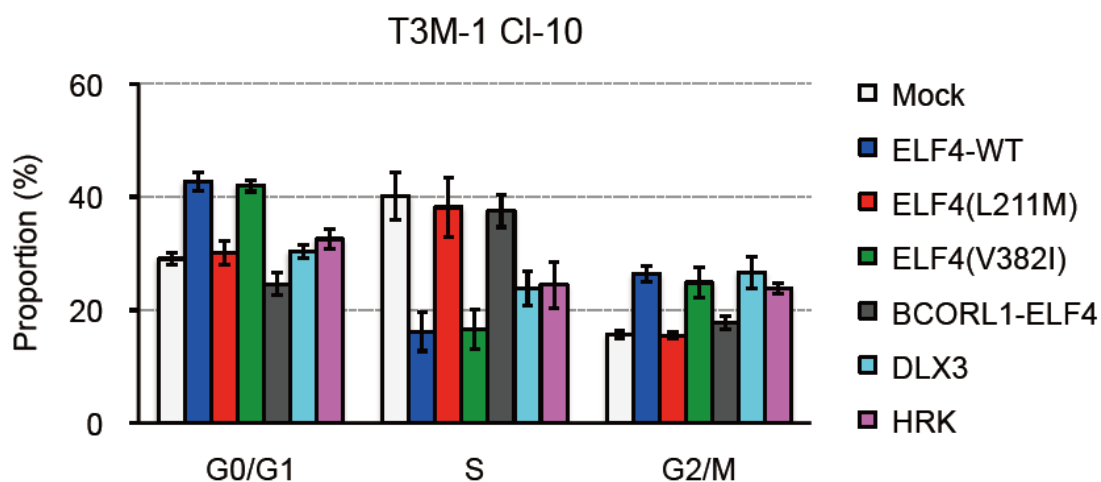


図 5 野生型 **ELF4** および変異体の細胞周期アッセイ

T3M-1 Cl-10 細胞株に対して目的とする遺伝子の cDNA と EGFP を同時に発現するプラスミドをレトロウイルスにより導入した。感染 40 時間後に BrdU 染色を行い、FACSCanto II を使用して EGFP 陽性細胞における細胞周期解析を実施した。グラフは、各細胞周期にある細胞が全体に占める割合（平均値±標準偏差）で示す。

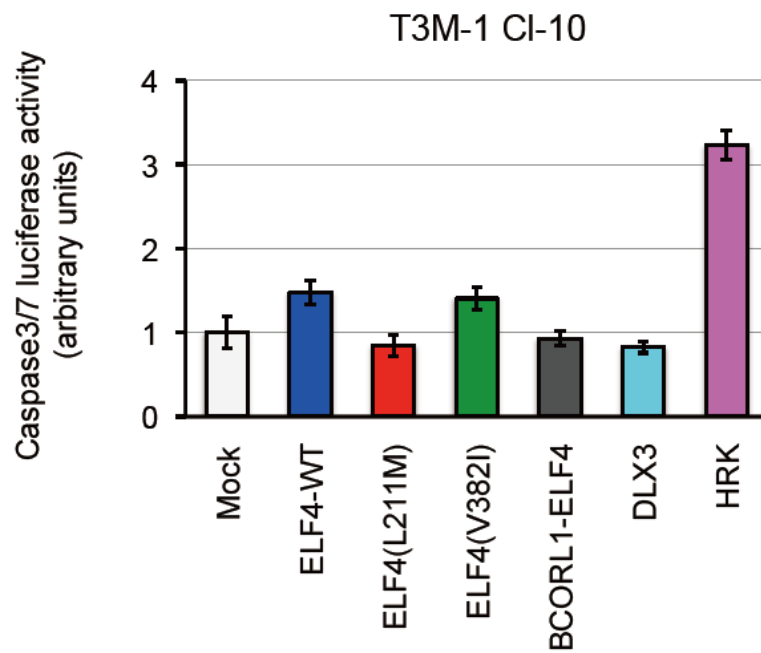


図 6 野生型 ELF4 および変異体のアポトーシスアッセイ

T3M-1 CI-10 細胞株に対して目的とする遺伝子の cDNA 発現プラスミドをレトロウイルスにより導入し、感染 48 時間後に caspase 3/7 活性を測定した。グラフは、対照 (Mock) に対する比 (平均値±標準偏差) で示す。

ELF 遺伝子群の機能解析

ヒトの *ELF* 遺伝子群は *ELF1* から *ELF5* まで存在する。*ELF4* のレポータープラスミド pGL4/APET を用いて、*ELF* 遺伝子群を構成する他の遺伝子が *ELF4* 結合配列を転写誘導活性化させるか調べたところ、野生型 *ELF1* および野生型 *ELF2* は弱いながらも活性を持つことが分かった (図 7)。野生型 *ELF5* もわずかに活性を示すが、野生型 *ELF3* はほとんど活性を持たなかった。

ELF 遺伝子群が DNA 結合配列をある程度共有していることが示されたので、図 4 で用いた 3 細胞株において、*ELF4* と同様の細胞増殖抑制作用が現れるかどうかを検証した (図 8)。その結果、T3M-1 Cl-10 細胞株においては、野生型 *ELF2* は野生型 *ELF4* と同等の増殖抑制作用を示した。野生型 *ELF1* および野生型 *ELF3* もわずかに増殖抑制作用を示したが、野生型 *ELF5* では変化がなかった。野生型 *ELF2* は HT1080 細胞株および MCF10A 細胞株においても同様の増殖抑制作用を示したが、他は一定した結果が得られなかった。それぞれの細胞株における内因性 *ELF* 遺伝子群の発現量を定量的リアルタイム RT-PCR により測定したが、観察された増殖抑制作用との関連は明らかではなかった (図 9)。

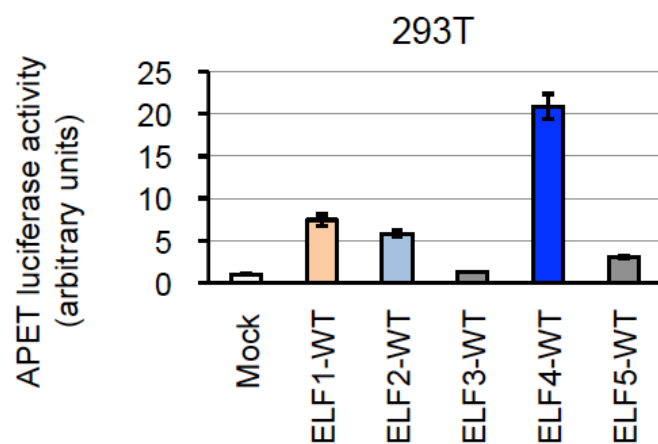


図7 *ELF* 遺伝子群の転写誘導活性

各 *ELF* 遺伝子の野生型 cDNA (ELF1, 2, 3, 4, 5-WT) を発現するプラスミドを pGL4/APET とともに 293T 細胞株へ導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。グラフは、レポータープラスミド由来ホタルルシフェラーゼ活性値を pGL-TK 由来レニラルルシフェラーゼ活性値で正規化した後、対照 (Mock) に対する比 (平均値±標準偏差) で示す。

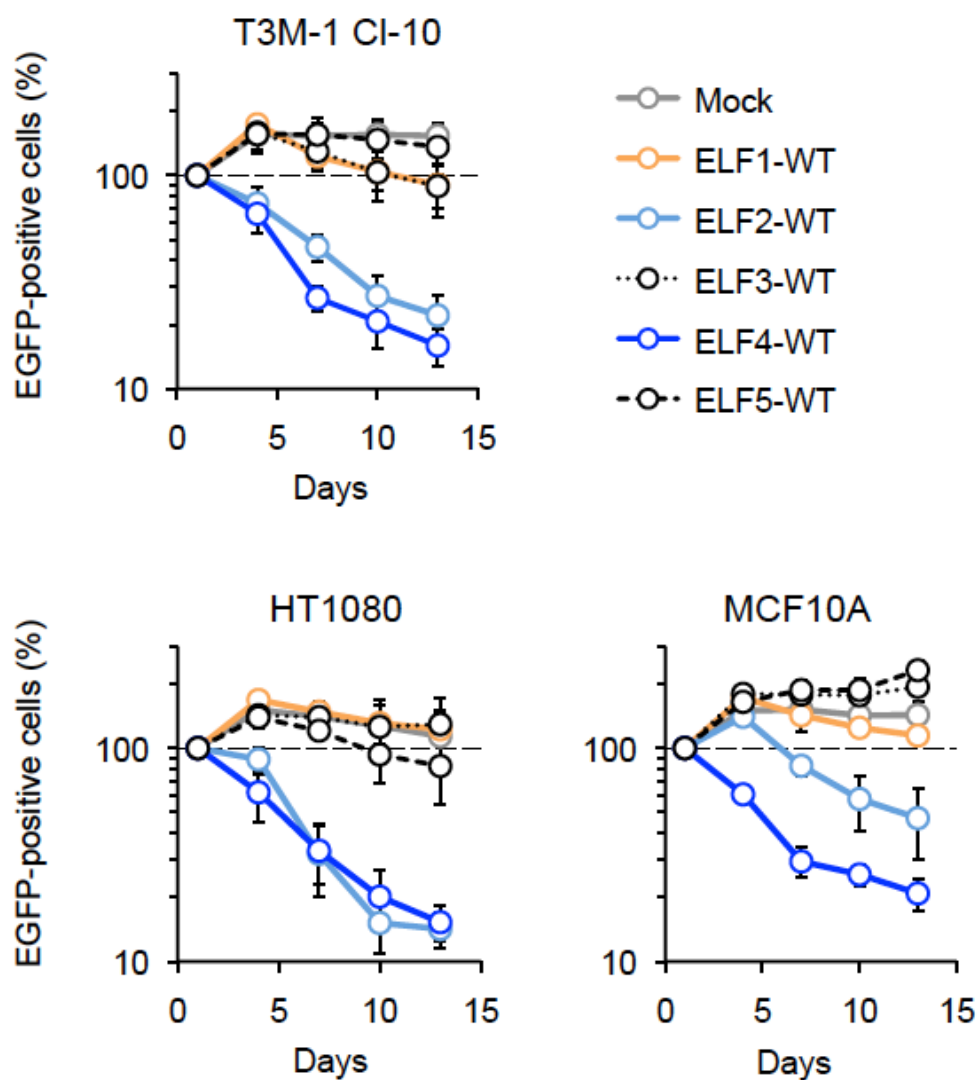


図8 *ELF* 遺伝子群の細胞増殖抑制作用

各細胞株に対して目的の cDNA と EGFP とを同時に発現するプラスミドをレトロウィルスにより導入した。感染 24 時間後より開始して 3 日毎に、FACSCanto II を使用し EGFP 陽性細胞の割合を調べた。グラフは、感染 24 時間後の細胞割合を 100 として、それに対する比（平均値±標準偏差）で示す。

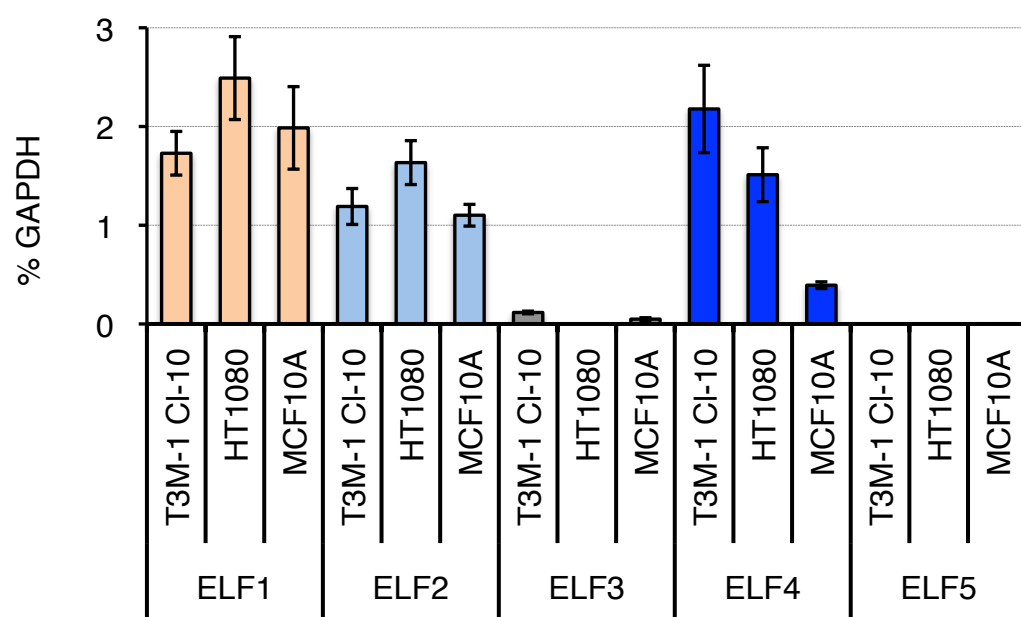


図 9 アッセイに用いた 3 細胞株における *ELF* 遺伝子群の発現量

各細胞株から cDNA を合成し、QuantiTect SYBR Green PCR Kit を用いた定量的 RT-qPCR によって内因性 *ELF* 遺伝子群の発現量を決定した。グラフは、対照 (*GAPDH*) に対する比 (平均値±標準偏差) で示す。

ヒト悪性腫瘍における ELF ファミリー変異の機能解析

ELF 遺伝子群のなかで狭義の「*ELF* ファミリー」に分類されるものは、*ELF1*、*ELF2*、*ELF4* の 3 遺伝子である[14]。これらが *ELF4* の DNA 結合配列を基盤とした細胞増殖抑制作用を持ち、その変異が実際の発がんに寄与しているならば、ヒトのがんにおける *ELF* ファミリーの変異は相互排他的であることが予想される。この仮説を検証するため、COSMIC、CCLE、TCGA の各データベースを検索し、2012 年 9 月 28 日までに公開されている *ELF* ファミリーの変異データを取得した。驚くべきことに、*ELF1*、*ELF2*、*ELF4* は固形腫瘍を主とする極めて広範囲のがんにおいて変異をきたし、ほぼすべての例で変異の相互排他性が証明された (図 10)。

次に、これら *ELF* ファミリーの ETS ドメインにおける変異が転写誘導活性にどのような影響を及ぼすか検討したところ、変異体の多くは転写誘導活性を完全あるいは部分的に失活していることが明らかになった (図 11)。しかしながら *ELF4* の T232S 変異や V247L 変異のようにアミノ酸側鎖の性質が大きく変化しない変異体や、L211M 変異や E282K 変異のように ETS ドメインの辺縁部分に位置する変異体では、転写誘導活性が比較的保存されと考えられた。

さらに、*ELF* ファミリーの ETS ドメイン変異体を用いて、T3M-1 Cl-10 細胞株の細胞増殖への影響を検討した (図 12)。予想通り、野生型 *ELF2* の増殖抑制作用が *ELF2* 変異体

では消失していた。野生型 ELF1 の増殖抑制作用は軽度であるが、やはり ELF1 変異体ではこれが消失していた。ELF4 変異体の細胞増殖抑制作用は様々な値を示したが、ELF4 の転写誘導活性とよく相関しており、転写誘導活性を基盤とした細胞増殖抑制作用を持つという仮説が確かめられた。以上の結果より、ELF ファミリーががん抑制遺伝子として機能し、ヒトのがん検体で発見されている各変異体が機能失活型変異として発がんに寄与している可能性が高いと考えられた。

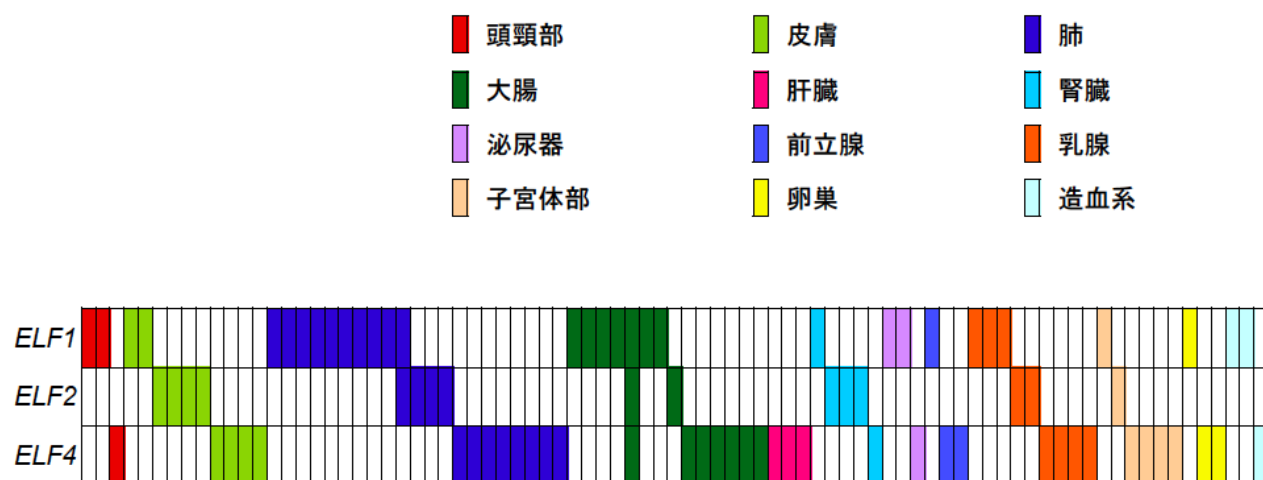


図 10 ヒト悪性腫瘍における ELF ファミリーの非同義変異の分布

本研究および COSMIC、CCLE、TCGA のデータベースを検索して得た *ELF1*、*ELF2*、*ELF4* の変異分布を示す。肺がんの 1 症例と大腸がんの 1 症例を除き、変異は相互排他的であった。

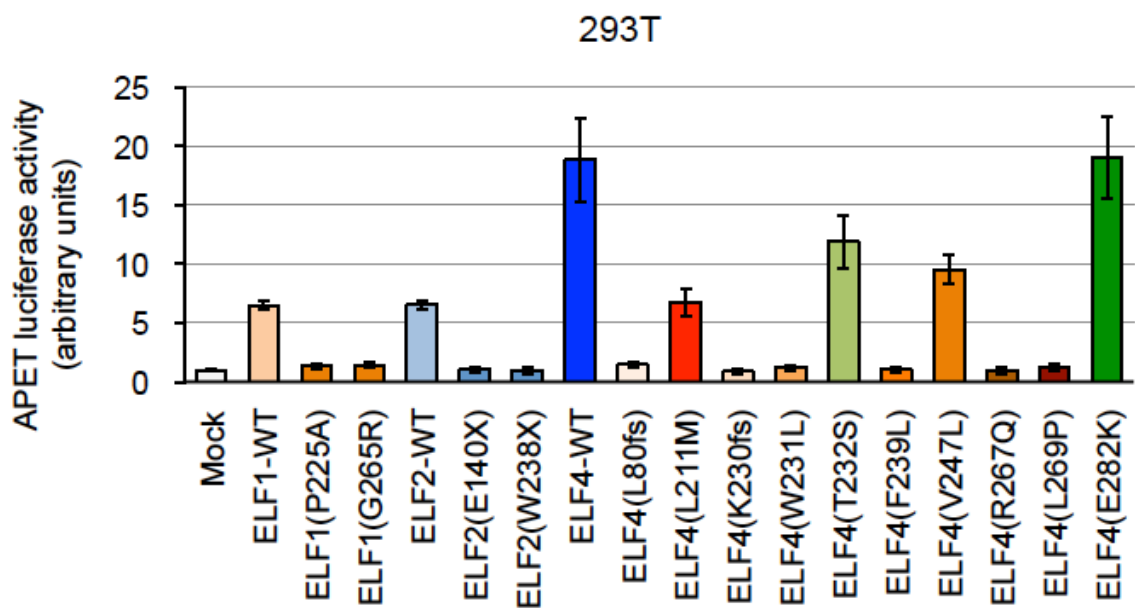


図 11 ELF ファミリーの野生型と変異体の転写誘導活性

野生型 ELF1、ELF2、ELF4 や各変異体の cDNA 発現プラスミドを pGL4/APET と共に 293T 細胞株へ導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。グラフは、レポータープラスミド由来ホタルルシフェラーゼ活性値を pGL-TK 由来レニラルシフェラーゼ活性値で正規化した後、対照 (Mock) に対する比 (平均値±標準偏差) で示す。

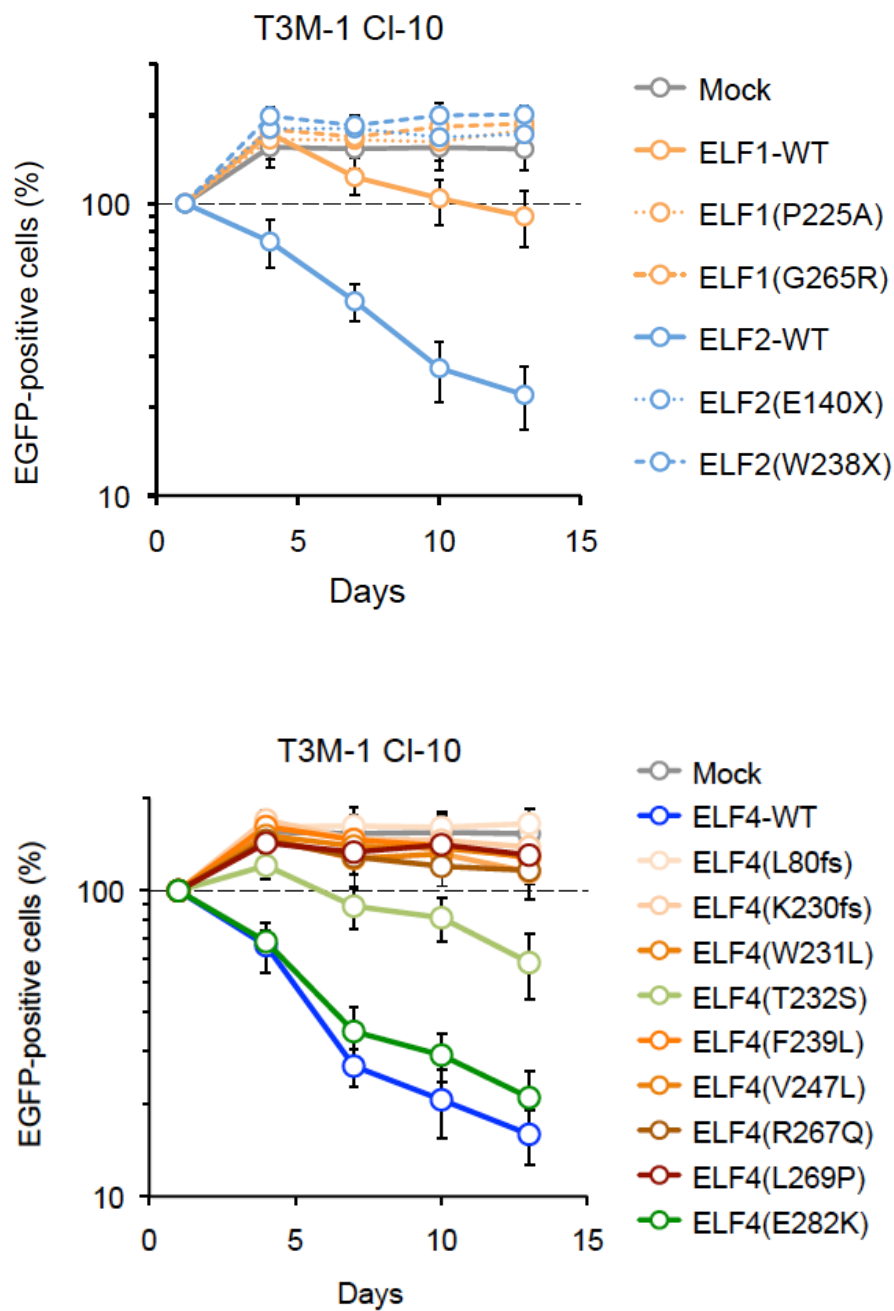


図 12 代表的な ELF ファミリー変異体の細胞増殖抑制作用

各細胞株に対して目的の cDNA と EGFP とを同時に発現するプラスミドをレトロウィルスにより導入した。感染 24 時間後より 3 日毎に、FACSCanto II を使用し EGFP 陽性細胞の割合を調べた。グラフは、感染 24 時間後の細胞割合を 100 として、それに対する比（平均値 ± 標準偏差）で示す。

ELF4 の DNA 結合部位の網羅的探索

転写因子である ELF4 は、標的遺伝子のプロモーターあるいはエンハンサーなどの発現制御領域に結合することによって標的遺伝子の発現を制御し、最終的に細胞の表現型に変化を及ぼすと考えられる。これまでの実験により、DNA 結合作用を有する ETS ドメイン内の変異である L211M 変異体が野生型 ELF4 の有する細胞増殖抑制作用を失活させることが明らかになった。すなわち、野生型 ELF4 と L211M 変異体の DNA 結合特性の相違を明らかにすることにより、ELF4 の標的遺伝子が解明されることが考えられる。

まず、ChIP 実験に用いるために ELF4 の C 末端側に FLAG エピトープタグを付加したタンパク (ELF4-C-FLAG) の発現プラスミドを作成し、同タグが ELF4 の転写誘導活性に影響しないことを確認した (図 13)。次に、対照、野生型 ELF4、L211M 変異体をそれぞれ導入した T3M-1 Cl-10 細胞株を対象として抗 FLAG 抗体による ChIP 実験を行った。ChIP 産物を次世代シーケンサーにより解析した結果、Q 値が 30 以上のユニークリードが平均 8.7×10^6 個得られ、そのうちゲノム上に一義的にマッピングされたものは平均 5.6×10^6 個であった。CisGenome による解析の結果、野生型 ELF4 では 17,127 種類の有意な ChIP 結合ピーク (FDR <10%) が得られたのに対し、対照および L211M 変異体では 0 であった。図 14 に代表的な ChIP 結合ピークを示す。野生型 ELF4 検体では *ING4* 遺伝子のプロモーター領域において鋭い ChIP 結合ピーク (FDR = 0.00831) を有しており、野生型 ELF4 の強い結合があると考えられた。この結果は ChIP-PCR でも確認された (図 14)。

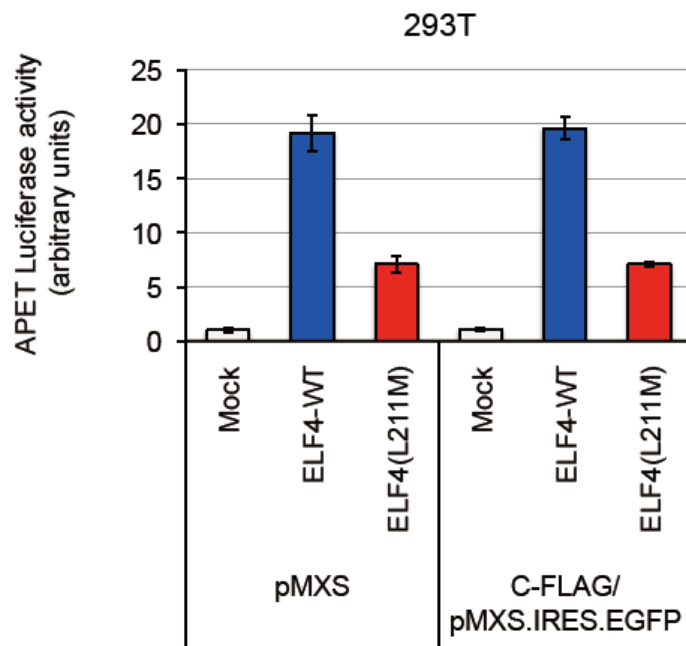


図 13 FLAG エピトープタグ付加 ELF4 の転写誘導活性

野生型 ELF4 (ELF4-WT) あるいは L211M 変異体の cDNA 発現プラスミドを pGL4/APET と共に 293T 細胞株へ導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。グラフは、レポータープラスミド由来ホタルルシフェラーゼ活性値を pGL-TK 由来レニラルルシフェラーゼ活性値で正規化した後、対照 (Mock) に対する比 (平均値±標準偏差) で示す。

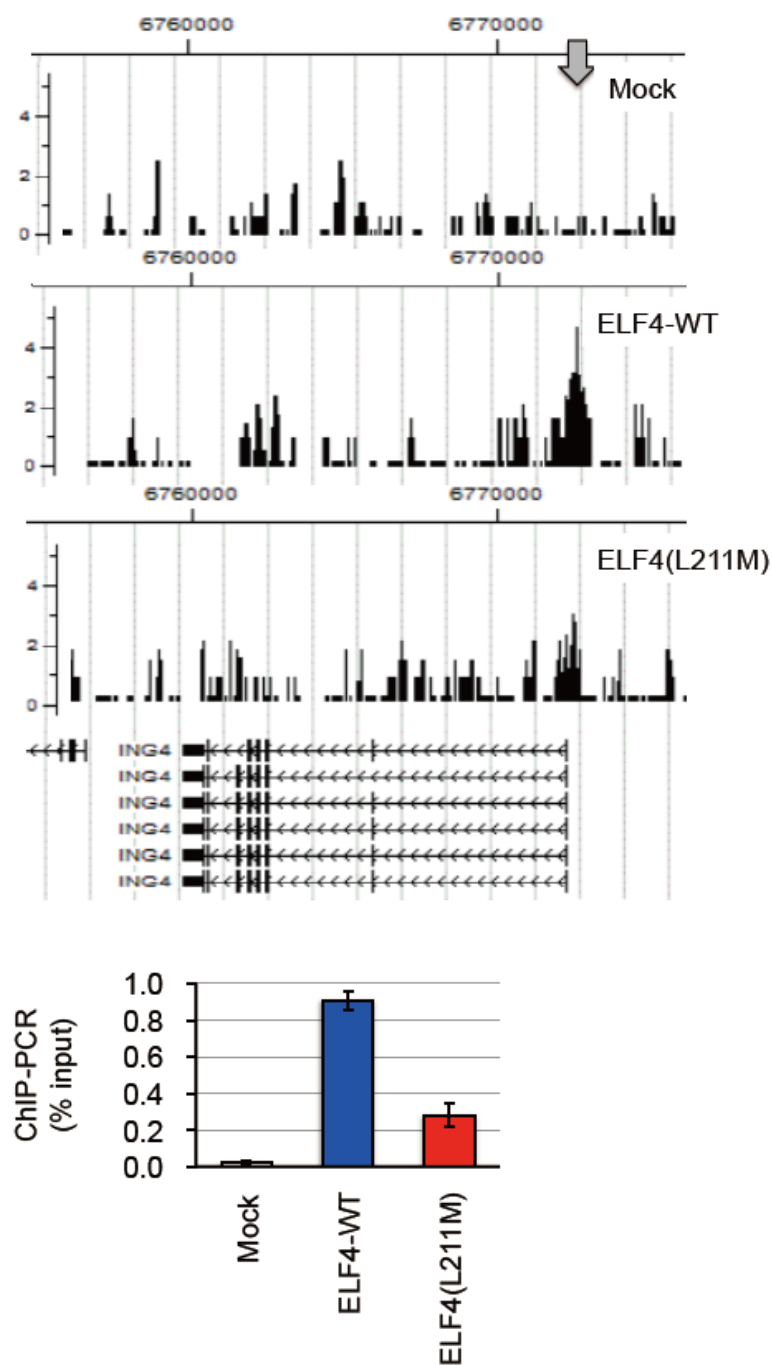


図 14 *ING4* 遺伝子上の ChIP 結合ピークおよび ChIP-PCR

CisGenome により算出した *ING4* プロモーター領域上の DNA 結合部位 (矢印) を、対照 (Mock)、野生型 ELF4 (ELF4-WT)、L211M 変異体について示す (上段)。ChIP 産物の定量的 PCR により、同領域の DNA 断片の濃縮を確認した (下段)。グラフは、各インプット値により正規化した後、対照 (Mock) に対する比 (平均値±標準偏差) で示す。

ChIP-seq によって得られた野生型 ELF4 の DNA 結合部位が、ゲノム上のどのような領域に分布しているかを検討した結果を図 15 に示す。ランダムシミュレーションの分布が示すようにゲノム上のほとんどの領域は遺伝子間領域 (59.68%) あるいはイントロン (36.34%) であるが、ChIP 産物の分布は遺伝子間領域 (46.16%)、プロモーター領域 (2.03%)、エクソン (13.33%)、イントロン (32.81%) であり、プロモーター領域、エクソン、noncoding RNA において有意に濃縮されていた (chi-square test、順に $P = 4.07 \times 10^{-42}$ 、0、 3.12×10^{-132})。すなわち、野生型 ELF4 はヒトゲノム上のプロモーターあるいはエンハンサー領域に選択的に結合し、標的遺伝子の発現を調節している可能性が強く示唆された。

次に、野生型 ELF4 の DNA 結合配列モチーフを探索するため、CisGenome を用いて de novo motif 解析を行った (図 16)。その結果、ELF4 が属する転写因子ファミリーである ETS タンパクの DNA 結合配列モチーフ “GGAA” が導出され、ChIP-seq 実験が成功していることが確かめられた。また、ELF4 と結合することが知られている AML1[16]の DNA 結合配列である RUNT モチーフ “Py-G-Py-G-G-T-Py” (Py はピリミジンすなわち C または T を表す) も示された。また、3 個の未知の DNA 結合配列モチーフが示唆され、おそらくは ELF4 が他の転写因子と複合体を形成した場合の結合配列モチーフであると考えられた。

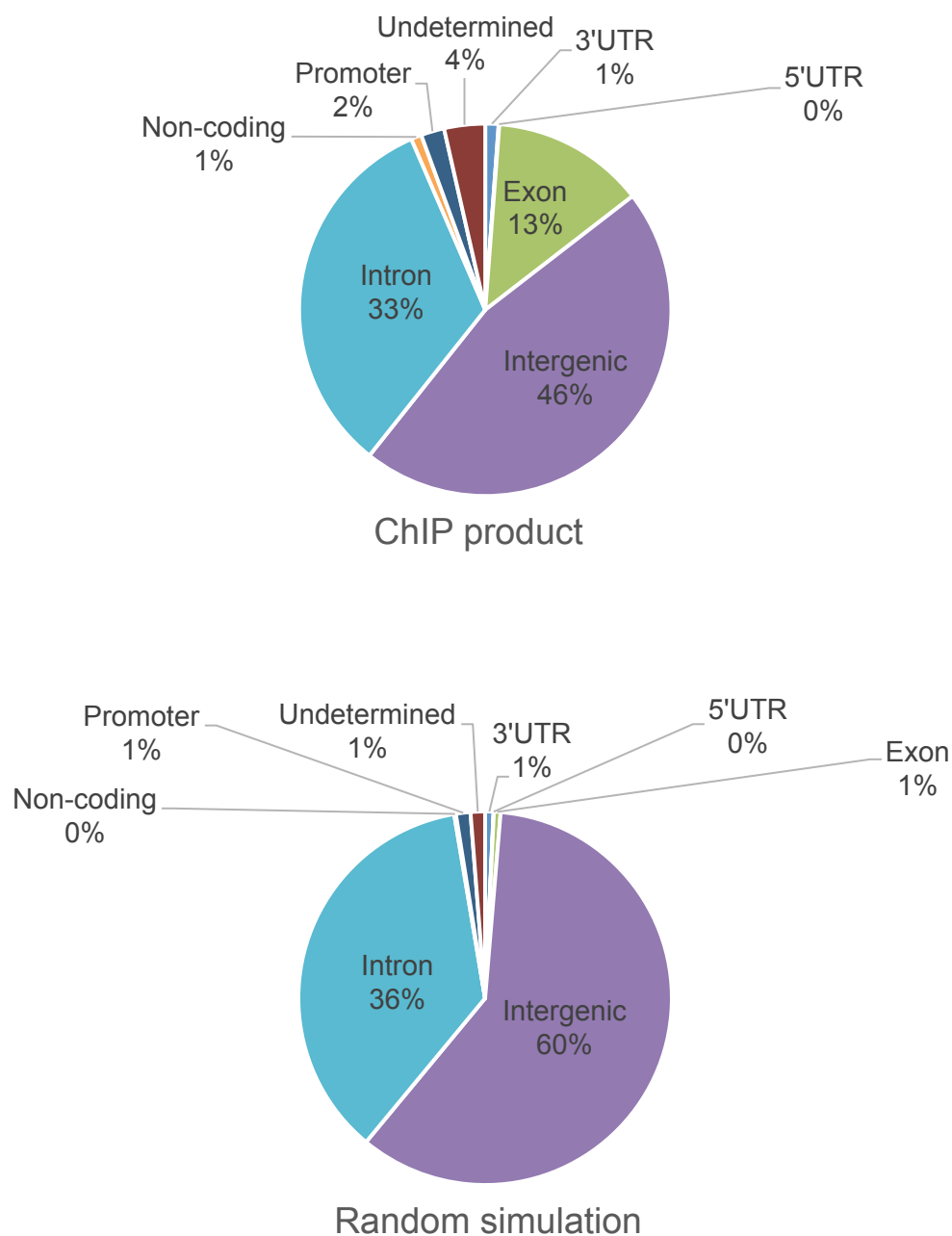


図 15 野生型 ELF4 が結合する DNA 領域のゲノム上における分布

野生型 ELF4 の ChIP-seq (ChIP product) あるいは対照 (Random simulation) データが、ゲノム上で Intergenic (遺伝子間領域)、Promoter (プロモーター領域)、Exon (エクソン)、Intron (イントロン)、5'UTR (5'非翻訳領域)、3'UTR (3'非翻訳領域)、Non-coding (noncoding RNA) へ分布する割合を示す。

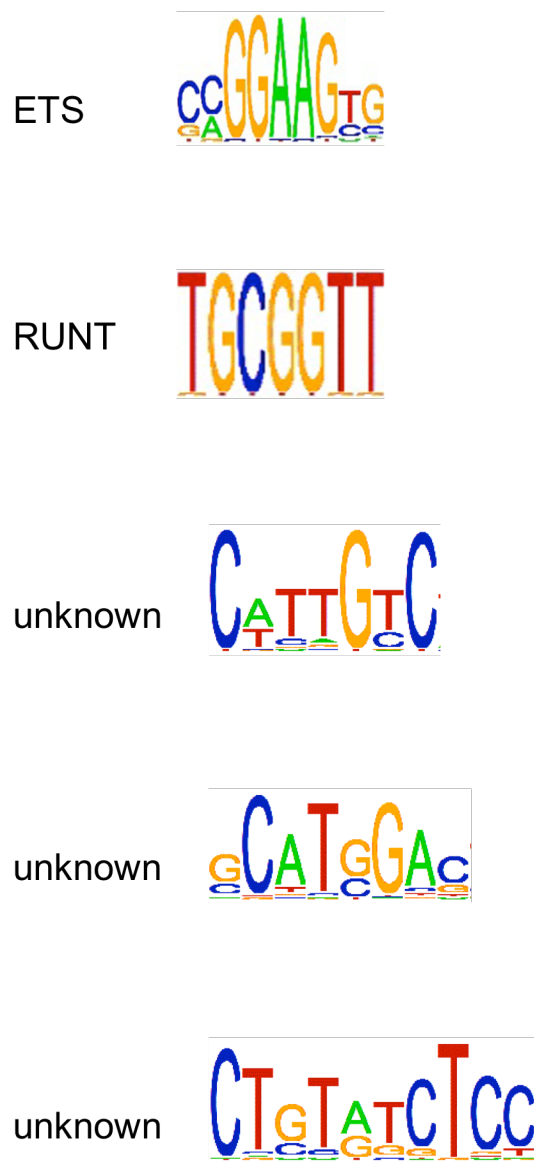


図 16 野生型 ELF4 の DNA 結合配列モチーフ

野生型 ELF4 の ChIP-seq データを用いて、CisGenome の novel motif discovery アルゴリズムにより DNA 結合配列モチーフをロゴで導出した。

転写開始点の上流 1000 bp から下流 50 bp までをプロモーター領域と定義した場合、野生型 ELF4 の ChIP 結合ピークがこの領域にマップされるヒト遺伝子は計 204 種類存在した。そこで、これらの遺伝子産物がどのような生物学的機能を有するか検討する目的で、DAVID アルゴリズムによる gene ontology 解析を行った。その結果、表 8 に示すように細胞死に関連する遺伝子が有意に濃縮されており、ELF4 が細胞死を司る遺伝子群を直接的に転写制御している可能性が示唆された。

表 8 プロモーター領域に ELF4 が結合する遺伝子群の gene ontology 解析

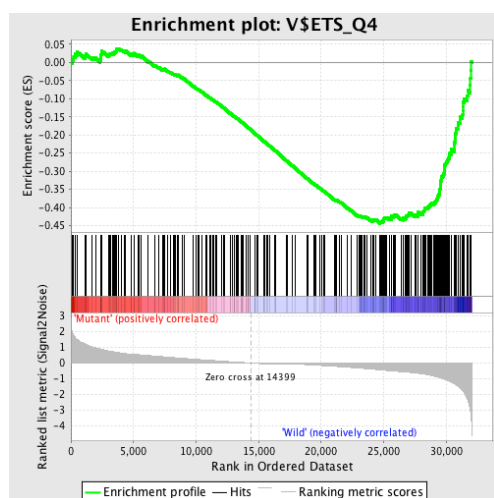
| Gene Ontology Term | Fold Enrichment | P value | FDR (%) |
|---|--------------------|----------|---------|
| translation | 4.06 | 0.000039 | 0.06 |
| ribosome biogenesis | 5.50 | 0.001670 | 2.67 |
| ribonucleoprotein complex biogenesis | 4.26 | 0.002675 | 4.24 |
| positive regulation of programmed cell death | 2.66 | 0.005340 | 8.30 |
| positive regulation of cell death | 2.65 | 0.005524 | 8.57 |
| induction of apoptosis by extracellular signals | 5.14 | 0.006121 | 9.46 |

ELF4 により発現制御される遺伝子の探索

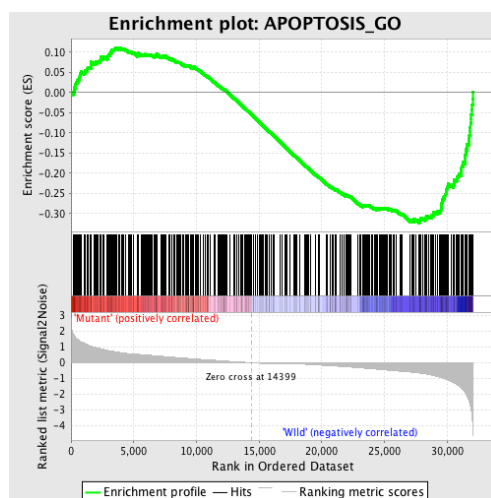
転写因子である ELF4 が最終的にどのような遺伝子発現に変化をもたらし細胞増殖抑制を誘導するかを明らかにする目的で、T3M-1 Cl-10 細胞株に野生型 ELF4 あるいは L211M 変異体を強制発現させ、網羅的遺伝子発現プロファイルを測定した。どのような遺伝子群の発現が ELF4 によって有意に変動しているか探索するため *gene set enrichment analysis* (GSEA) を実施したところ、ETS 結合配列モチーフ、細胞増殖、アポトーシス、細胞周期の G₁ 期に関わる遺伝子群の発現が、野生型 ELF4 と L211M 変異体間で有意に変動していることが示された (図 17)。以上より、ELF4 が細胞死あるいは細胞周期の制御に関わることが再び確認され、L211M 変異体が機能失活型変異であることも強く示唆された。

得られた発現プロファイルによれば、8 倍以上の発現増強あるいは 1/8 以下の発現抑制を示す遺伝子は、野生型 ELF4 では 90 個、L211M 変異体では 5 個あった (表 9、10)。これまでの実験結果により野生型 ELF4 が細胞周期停止およびアポトーシス誘導を介して細胞増殖を抑制することが明らかになっているので、野生型 ELF4 により発現が誘導される遺伝子のなかから *DLX3* および *HRK* に注目した。*DLX3* (distal-less homeobox 3) は転写因子であり、皮膚の基底細胞の増殖を阻害する機能や、がん細胞株におけるアポトーシス誘導に関連することが知られている[17,18]。また、*HRK* (harakiri) は BCL2/BCL2L1 に結合し、様々な細胞において強力にアポトーシスを誘導する分子として知られる[19]。

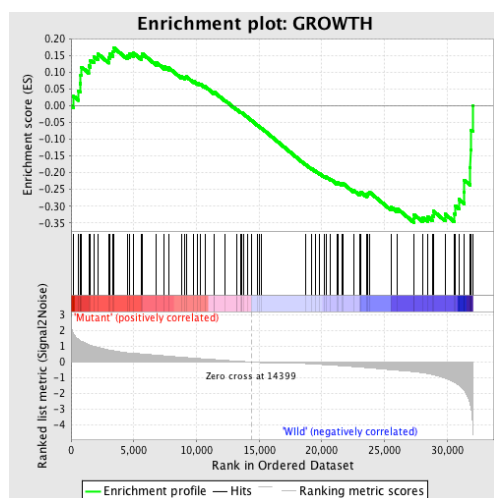
ETS motif (q = 0.132)



GROWTH (q = 0.146)



APOPTOSIS (q = 0.246)



G1 PHASE (q = 0.150)

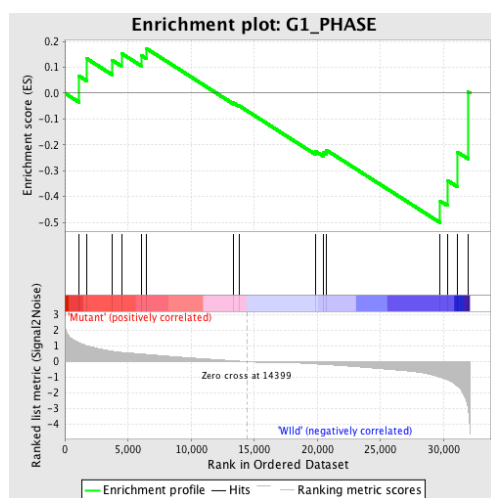


図 17 Gene set enrichment analysis

対照、野生型 ELF4 (ELF4-WT)、L211M 変異体それぞれ triplicate の網羅的発現解析データを GeneSpring を用いて正規化し対照に対して標準化した後、GSEA 解析を行った。野生型 ELF4 と L211M 変異体とで発現が偏位している様子を示す。それぞれ右方 (青色) が野生型 ELF4 優位、左方 (赤色) が L211M 変異体優位の方向を表す。

表 9 野生型 ELF4 によって誘導される遺伝子

| Gene symbol | GenBank accession no. | Normalized log ₂ value for ELF4 | Normalized log ₂ value for ELF4(L211M) | Fold-induction by ELF4 |
|------------------|--------------------------|---|--|---------------------------|
| <i>AIF1</i> | NM_004847 | 8.058 | 0.807 | 152.3 |
| <i>RSAD2</i> | NM_080657 | 4.903 | -1.310 | 74.2 |
| <i>GIMAP6</i> | NM_024711 | 5.641 | 0.319 | 40.0 |
| <i>MAP7D2</i> | NM_152780 | 5.178 | 0.075 | 34.4 |
| <i>CCDC85A</i> | NM_001080433 | 5.165 | 0.085 | 33.8 |
| <i>RNASE6</i> | NM_005615 | 5.153 | 0.087 | 33.5 |
| <i>ASMT</i> | NM_004043 | 5.656 | 0.650 | 32.2 |
| <i>CHRM1</i> | NM_000738 | 5.027 | 0.134 | 29.7 |
| <i>CCR1</i> | NM_001295 | 5.503 | 0.791 | 26.2 |
| <i>FBXO15</i> | NM_152676 | 4.505 | -0.129 | 24.8 |
| <i>FAM65C</i> | NM_080829 | 5.401 | 0.970 | 21.6 |
| <i>SH2D3C</i> | NM_170600 | 5.447 | 1.041 | 21.2 |
| <i>CAMK2B</i> | NM_172082 | 4.987 | 0.637 | 20.4 |
| <i>SP8</i> | NM_198956 | 4.890 | 0.563 | 20.1 |
| <i>DLX3</i> | NM_005220 | 4.450 | 0.148 | 19.7 |
| <i>CCDC85A</i> | NM_001080433 | 4.654 | 0.537 | 17.4 |
| <i>CMPK2</i> | NM_207315 | 5.099 | 0.990 | 17.3 |
| <i>C19orf59</i> | NM_174918 | 6.397 | 2.335 | 16.7 |
| <i>TNS1</i> | NM_022648 | 4.645 | 0.644 | 16.0 |
| <i>PTPRN2</i> | NM_002847 | 4.799 | 0.809 | 15.9 |
| <i>ATP12A</i> | NM_001676 | 4.632 | 0.648 | 15.8 |
| <i>MX2</i> | NM_002463 | 5.661 | 1.686 | 15.7 |
| <i>GJC3</i> | NM_181538 | 4.398 | 0.449 | 15.4 |
| <i>SLC23A1</i> | NM_152685 | 4.012 | 0.090 | 15.2 |
| <i>MPO</i> | NM_000250 | 4.093 | 0.208 | 14.8 |
| <i>SHC4</i> | NM_203349 | 3.220 | -0.635 | 14.5 |
| <i>RASL10A</i> | NM_001007279 | 4.695 | 0.895 | 13.9 |
| <i>RNF183</i> | NM_145051 | 3.880 | 0.082 | 13.9 |
| <i>FAM153B</i> | NM_001079529 | 5.963 | 2.198 | 13.6 |
| <i>WFDC2</i> | NM_006103 | 4.280 | 0.540 | 13.4 |
| <i>ARHGAP31</i> | NM_020754 | 3.274 | -0.464 | 13.3 |
| <i>ERP27</i> | NM_152321 | 3.493 | -0.234 | 13.2 |
| <i>GOLGA6L6</i> | NM_001145004 | 3.811 | 0.099 | 13.1 |
| <i>ENTPD8</i> | NM_001033113 | 3.635 | -0.068 | 13.0 |
| <i>KLHDC7B</i> | NM_138433 | 3.400 | -0.281 | 12.8 |
| <i>MS4A15</i> | NM_001098835 | 3.761 | 0.095 | 12.7 |
| <i>PLA2G10</i> | NM_003561 | 6.415 | 2.787 | 12.4 |
| <i>HMP19</i> | NM_015980 | 3.798 | 0.200 | 12.1 |
| <i>SLC25A41</i> | NM_173637 | 4.364 | 0.766 | 12.1 |
| <i>KIAA0408</i> | NM_014702 | 3.658 | 0.079 | 12.0 |
| <i>OR52N2</i> | NM_001005174 | 3.664 | 0.089 | 11.9 |
| <i>FAM83E</i> | NM_017708 | 4.843 | 1.272 | 11.9 |
| <i>CHRD2</i> | NM_015424 | 3.380 | -0.137 | 11.5 |
| <i>CACNA2D2</i> | NM_001005505 | 3.773 | 0.268 | 11.4 |
| <i>TYR</i> | NM_000372 | 3.583 | 0.087 | 11.3 |
| <i>FAM154B</i> | NM_001008226 | 3.794 | 0.303 | 11.2 |
| <i>HIST2H2BF</i> | NM_001024599 | 2.783 | -0.702 | 11.2 |

表 9 (続)

| Gene symbol | GenBank accession no. | Normalized log ₂ value for ELF4 | Normalized log ₂ value for ELF4(L211M) | Fold-induction by ELF4 |
|-----------------|--------------------------|---|--|---------------------------|
| (continued) | | | | |
| <i>RFPL2</i> | NM_006605 | 2.882 | -0.589 | 11.1 |
| <i>TRIM50</i> | NM_178125 | 3.323 | -0.100 | 10.7 |
| <i>FEV</i> | NM_017521 | 3.209 | -0.213 | 10.7 |
| <i>LRR1Q4</i> | NM_001080460 | 2.982 | -0.435 | 10.7 |
| <i>CXCR2</i> | NM_001557 | 5.943 | 2.529 | 10.7 |
| <i>CD33</i> | NM_001772 | 3.307 | -0.098 | 10.6 |
| <i>MX1</i> | NM_002462 | 4.460 | 1.098 | 10.3 |
| <i>TNN</i> | NM_022093 | 3.507 | 0.158 | 10.2 |
| <i>KIRREL2</i> | NM_199180 | 3.339 | -0.003 | 10.1 |
| <i>TF</i> | NM_001063 | 3.962 | 0.624 | 10.1 |
| <i>LGALS9C</i> | NM_001040078 | 5.814 | 2.484 | 10.1 |
| <i>APOBR</i> | NM_018690 | 2.965 | -0.352 | 10.0 |
| <i>LXN</i> | NM_020169 | 3.052 | -0.256 | 9.9 |
| <i>SLC8A2</i> | NM_015063 | 3.998 | 0.703 | 9.8 |
| <i>XAF1</i> | NM_017523 | 4.318 | 1.026 | 9.8 |
| <i>VMO1</i> | NM_182566 | 4.776 | 1.484 | 9.8 |
| <i>PHACTR3</i> | NM_080672 | 5.370 | 2.116 | 9.5 |
| <i>LCE5A</i> | NM_178438 | 4.026 | 0.783 | 9.5 |
| <i>HRK</i> | NM_003806 | 4.636 | 1.398 | 9.4 |
| <i>LGALS9</i> | NM_009587 | 5.467 | 2.232 | 9.4 |
| <i>IFIT2</i> | NM_001547 | 5.094 | 1.864 | 9.4 |
| <i>MGAT4C</i> | NM_013244 | 2.874 | -0.343 | 9.3 |
| <i>ATL1</i> | NM_181598 | 3.693 | 0.487 | 9.2 |
| <i>WFDC2</i> | NM_006103 | 4.069 | 0.873 | 9.2 |
| <i>EBF1</i> | NM_024007 | 3.902 | 0.725 | 9.0 |
| <i>TYR</i> | NM_000372 | 3.304 | 0.129 | 9.0 |
| <i>PROS1</i> | NM_000313 | 3.292 | 0.118 | 9.0 |
| <i>LMO2</i> | NM_005574 | 7.391 | 4.220 | 9.0 |
| <i>TMEM217</i> | NM_145316 | 3.529 | 0.388 | 8.8 |
| <i>CXCL10</i> | NM_001565 | 4.919 | 1.792 | 8.7 |
| <i>PDE1B</i> | NM_000924 | 3.625 | 0.512 | 8.7 |
| <i>PTPRH</i> | NM_002842 | 3.245 | 0.132 | 8.7 |
| <i>ARHGAP9</i> | NM_032496 | 3.506 | 0.397 | 8.6 |
| <i>ZG16B</i> | NM_145252 | 3.771 | 0.669 | 8.6 |
| <i>ADAM21</i> | NM_003813 | 2.597 | -0.504 | 8.6 |
| <i>IFIT2</i> | NM_001547 | 4.905 | 1.811 | 8.5 |
| <i>ARC</i> | NM_015193 | 3.532 | 0.447 | 8.5 |
| <i>NDUFA4L2</i> | NM_020142 | 3.060 | -0.025 | 8.5 |
| <i>CIB4</i> | NM_001029881 | 3.950 | 0.873 | 8.4 |
| <i>PLEK</i> | NM_002664 | 2.822 | -0.252 | 8.4 |
| <i>FAM122C</i> | NM_138819 | 4.336 | 1.271 | 8.4 |
| <i>NFAM1</i> | NM_145912 | 4.139 | 1.074 | 8.4 |
| <i>C3orf55</i> | NM_001243729 | 3.464 | 0.412 | 8.3 |

表 10 L211M 変異体によって誘導される遺伝子

| Gene symbol | GenBank accession no. | Normalized log ₂ value for ELF4 | Normalized log ₂ value for ELF4(L211M) | Fold induction by ELF4(L211M) |
|---------------|--------------------------|---|--|----------------------------------|
| <i>CACNG8</i> | NM_031895 | -0.222 | 4.397 | 24.6 |
| <i>TSPY2</i> | NM_022573 | 0.638 | 4.696 | 16.7 |
| <i>CES3</i> | NM_024922 | -0.483 | 2.857 | 10.1 |
| <i>MASP1</i> | NM_001031849 | 0.091 | 3.188 | 8.6 |
| <i>HPCAL4</i> | NM_016257 | 0.362 | 3.434 | 8.4 |

まず、マイクロアレイを用いた発現解析の検証のため *DLX3* (NM_005220.2) と *HRK* (NM_003806.1) mRNA の定量的リアルタイム RT-PCR を実施し、野生型 *ELF4* によって両者の発現が強く誘導されているが、L211M 変異体ではほとんど変化しないことを確認した (図 18)。次に、*DLX3* および *HRK* の cDNA 発現プラスミドを作成し、T3M-1 Cl-10 細胞株に強制発現させて細胞増殖を測定したところ、*DLX3* では野生型 *ELF4* と同等の、*HRK* ではより強い細胞増殖抑制を認めた (図 19)。細胞周期およびアポトーシスアッセイでは *DLX3* は細胞周期停止をもたらし、*HRK* はアポトーシス誘導および細胞周期停止をもたらした (図 5、6)。すなわち、野生型 *ELF4* を強制発現させた場合と同様の表現型を持つことが示され、両者が実際に *ELF4* の標的遺伝子である可能性が示唆された。ChIP-seq の結果によれば、両遺伝子のプロモーター領域あるいはエクソンや 3'UTR に有意な ChIP 結合ピークはないため (図 20)、*ELF4* の直接的な標的遺伝子ではない可能性があるが、*ELF4* による転写制御ネットワークを経て最終的に発現誘導される分子であると考えられた。

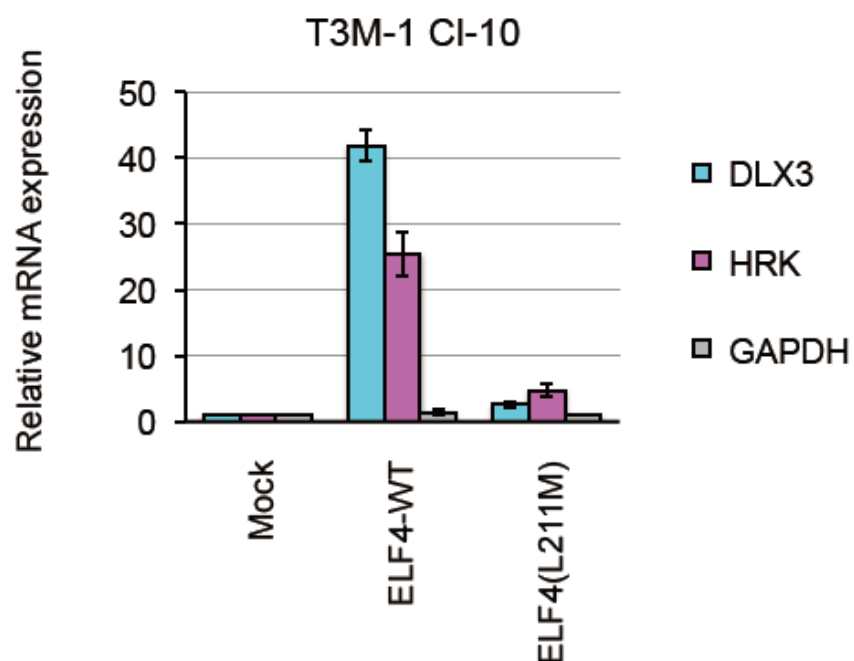


図 18 ELF4 により発現誘導される遺伝子の定量的リアルタイム RT-PCR

T3M-1 CI-10 細胞株に対して野生型 ELF4 (ELF4-WT) あるいは L211M 変異体の cDNA と EGFP とを同時に発現するプラスミドをレトロウイルスにより導入し、48 時間後に EGFP 陽性細胞を FACS AriaII によりソーティングした。回収した細胞から cDNA を合成し、QuantiTect SYBR Green PCR Kit を用いた定量的 RT-qPCR によって DLX3 と HRK の発現量を決定した。グラフは、対照 (Mock) に対する比 (平均値±標準偏差) で示す。

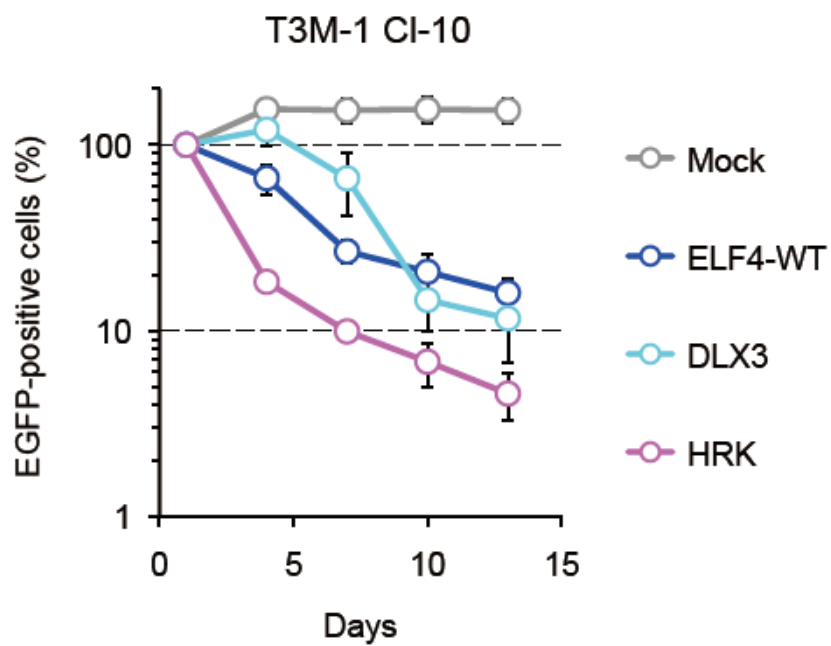


図 19 DLX3 および HRK の細胞増殖抑制作用

T3M-1 CI-10 細胞株に対して野生型 ELF4 (ELF4-WT) あるいは DLX3、HRK の cDNA と EGFP とを同時に発現するプラスミドをレトロウイルスにより導入した。感染 24 時間後より 3 日毎に、FACSCanto II を使用し EGFP 陽性細胞の割合を調べた。グラフは、感染 24 時間後の細胞割合を 100 として、それに対する比 (平均値±標準偏差) で示す。

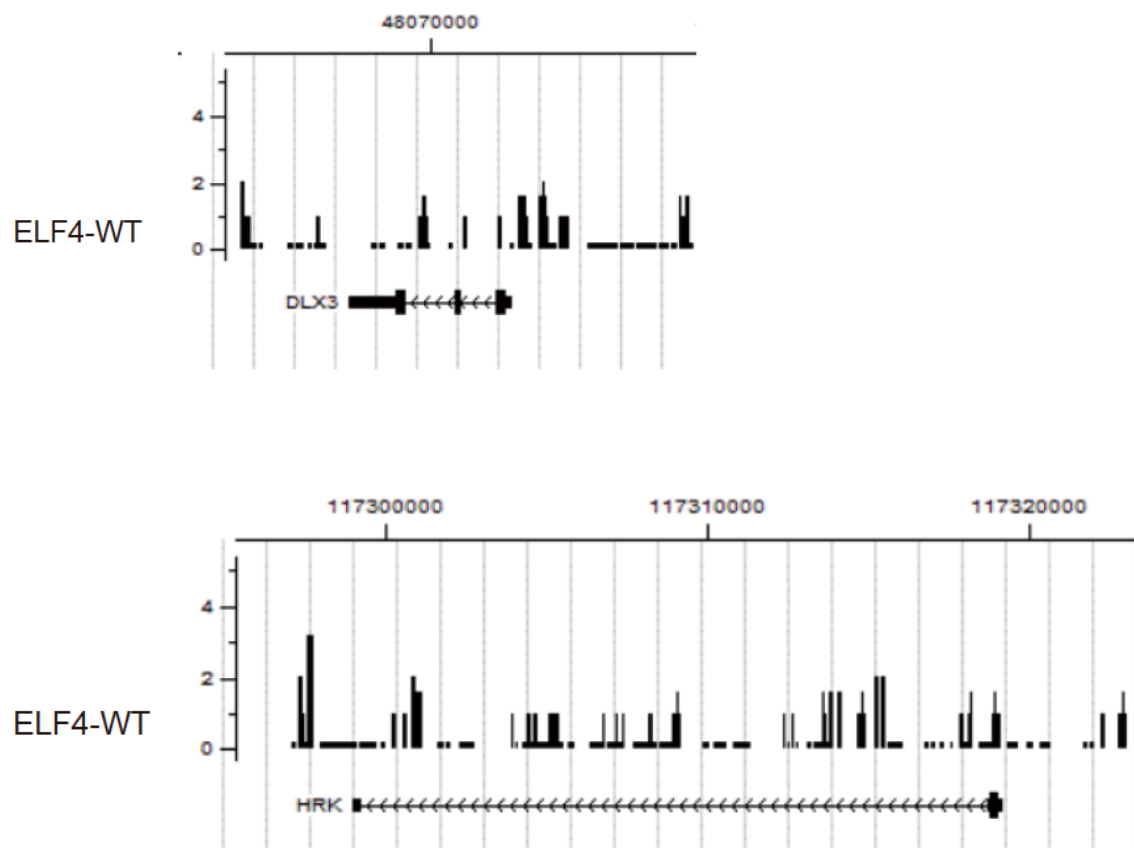


図 20 *DLX3* および *HRK* 遺伝子近傍における野生型 ELF4 の結合状況

CisGenome により算出した *DLX3* あるいは *HRK* 遺伝子近傍にある ChIP 結合ピーク箇所を、野生型 ELF4 (ELF4-WT) について示す。

次に、*DLX3* および *HRK* の発現誘導が *ELF4* による細胞増殖抑制に必須であることを証明するため、shRNA を用いて *DLX3* と *HRK* のノックダウンによる影響を検討した。まず、ノックダウン効果の確認のため、*DLX3* あるいは *HRK* の shRNA を定常発現する T3M-1 Cl-10 細胞株を作成してそれぞれの発現状況を定量的リアルタイム RT-PCR で確認し、良好なノックダウン効果を確認した（図 21）。それぞれ 2 種類の shRNA を試したところ、*DLX3* では sh#5 より sh#8、*HRK* では sh#7 より sh#9 がそれぞれノックダウン効果が高かった。さらに、shRNA 標的配列を含む遺伝子断片を挿入した EGFP 発現プラスミドをそれぞれの shRNA 定常発現株へ導入した場合に、shRNA の作用によって EGFP シグナルが減弱することを利用してノックダウン効果を検討した。その結果、定量的リアルタイム RT-PCR と同様に *DLX3* では sh#5 より sh#8、*HRK* では sh#7 より sh#9 がノックダウン効果が高いことが確認された。次に、*DLX3* shRNA#8 と *HRK* shRNA#9 の双方を同時に定常発現する T3M-1 Cl-10 細胞株も作成して EGFP シグナルによりノックダウン効果を評価した結果、双方とも良好なノックダウン効果が確認された（図 22）。

さらに、shRNA によるノックダウン効果が非特異的效果ではないことを確認するため、両遺伝子の shRNA 耐性 cDNA を用いて検証した。shRNA#5 あるいは shRNA#8 耐性 *DLX3* の cDNA、shRNA#7 あるいは shRNA#9 耐性 *HRK* の cDNA の発現プラスミドを作成し、それぞれの shRNA を定常発現する T3M-1 Cl-10 細胞株に導入して細胞増殖に及ぼす影響を

測定したところ、shRNA を定常発現していない場合と同等の増殖抑制作用が観察され、これらの shRNA が実際に *DLX* あるいは *HRK* を標的として細胞増殖作用を発揮していたことが確認された (図 23)。

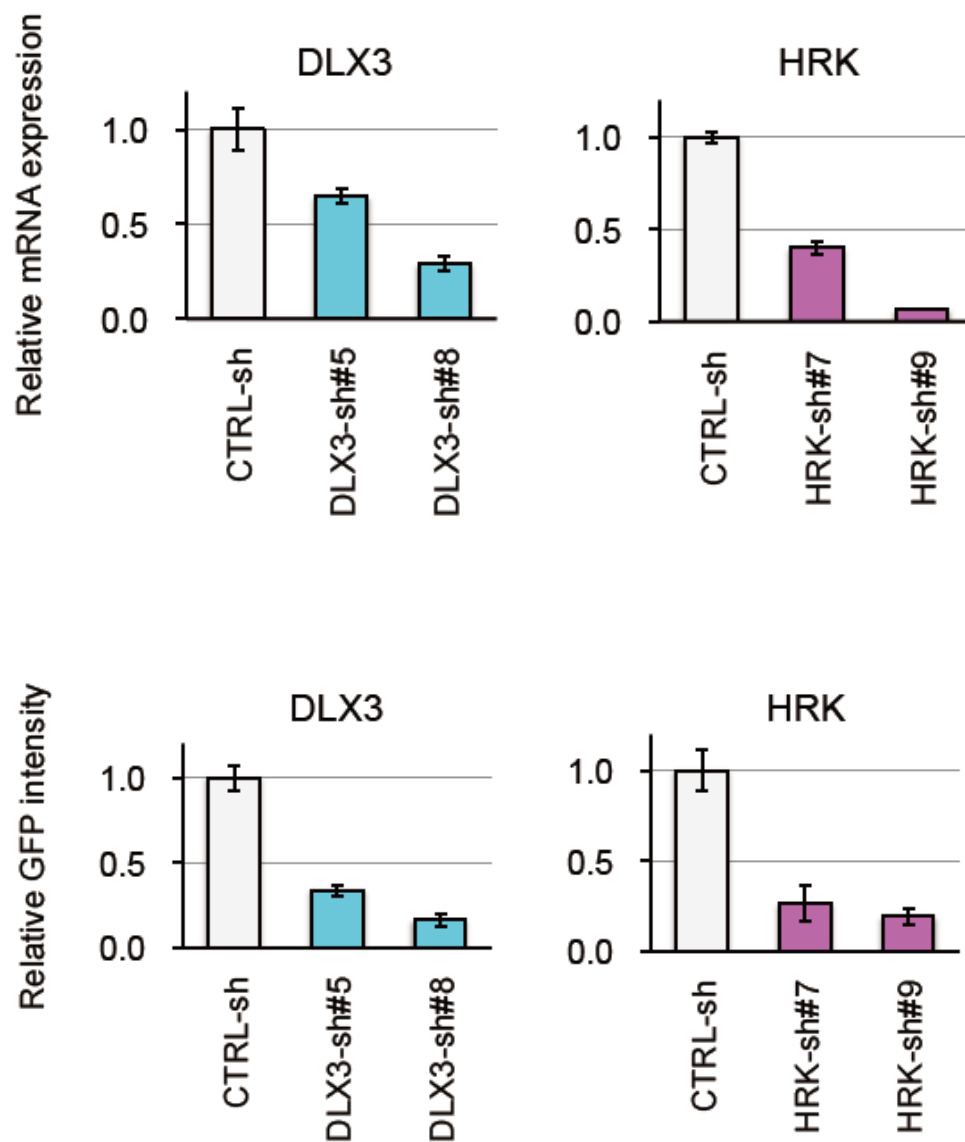


図 21 *DLX3* あるいは *HRK* 単独のノックダウン効果

DLX3 と *HRK* それぞれの shRNA を定常発現する T3M-1 Cl-10 細胞株から cDNA を合成し、QuantiTect SYBR Green PCR Kit を用いた定量的 RT-qPCR によって *DLX3* と *HRK* の発現量を決定した（上段）。また、それぞれの shRNA 標的配列を含む遺伝子断片を EGFP 発現プラスミドに挿入し、shRNA を定常発現する T3M-1 Cl-10 細胞株へレトロウイルスにより導入して3日後にFACSCanto II を用いEGFP シグナルのピーク値を測定した（下段）。グラフは、対照（control shRNA 定常発現株）に対する比（平均値±標準偏差）で示す。

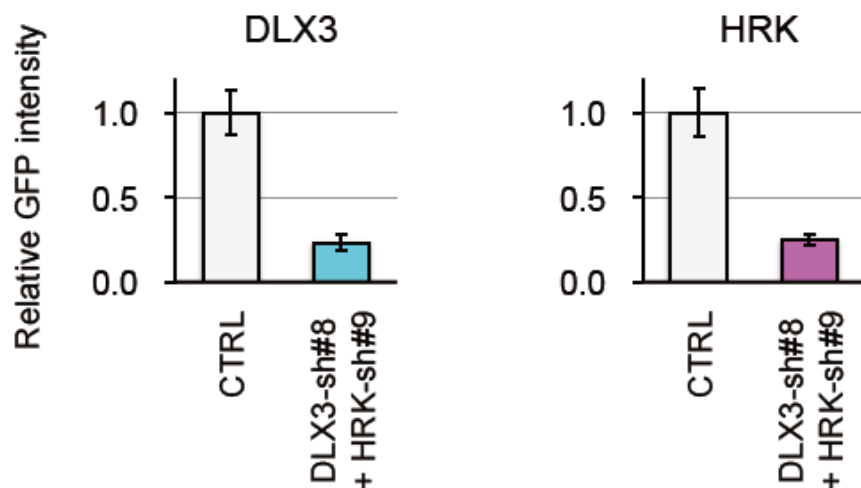


図 22 *DLX3* および *HRK* 同時のノックダウン効果

DLX3 shRNA#8 と *HRK* shRNA#9 の標的配列を含む遺伝子断片を EGFP 発現プラスミドに挿入し、*DLX3* shRNA#8 および *HRK* shRNA#9 の双方を同時に定常発現する T3M-1 Cl-10 細胞株へレトロウイルスにより導入して3日後に FACSCanto II を用い EGFP シグナルのピーク値を決定した。グラフは、対照 (control shRNA 定常発現株) に対する比 (平均値±標準偏差) で示す。

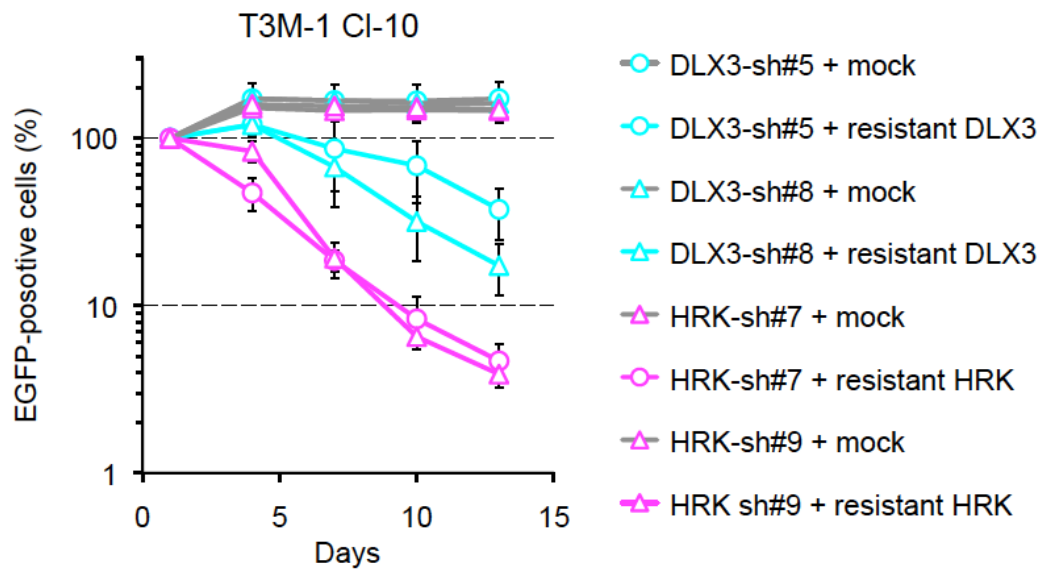


図 23 shRNA 耐性 DLX3 あるいは HRK による細胞増殖抑制作用

DLX3 および *HRK* それぞれの shRNA を定常発現する T3M-1 Cl-10 細胞株に対して、各 shRNA に耐性の *DLX3* あるいは *HRK* の cDNA と EGFP とを同時に発現するプラスミドをレトロウイルスにより導入した。感染 24 時間後より 3 日毎に、FACSCanto II を使用し EGFP 陽性細胞の割合を調べた。グラフは、感染 24 時間後の細胞割合を 100 として、それに対する比（平均値±標準偏差）で示す。

以上により検証された *DLX3* および *HRK* shRNA を用いて T3M-1 Cl-10 細胞株の細胞増殖を測定したところ、予想通り野生型 *ELF4* による細胞増殖抑制作用が減弱した (図 24)。

DLX3 と *HRK* の双方を同時にノックダウンすることによって野生型 *ELF4* の増殖抑制作用がさらにキャンセルされることが示され (図 25)、*DLX3* と *HRK* が *ELF4* による細胞増殖抑制シグナルに必須のタンパクであることが明らかになった。

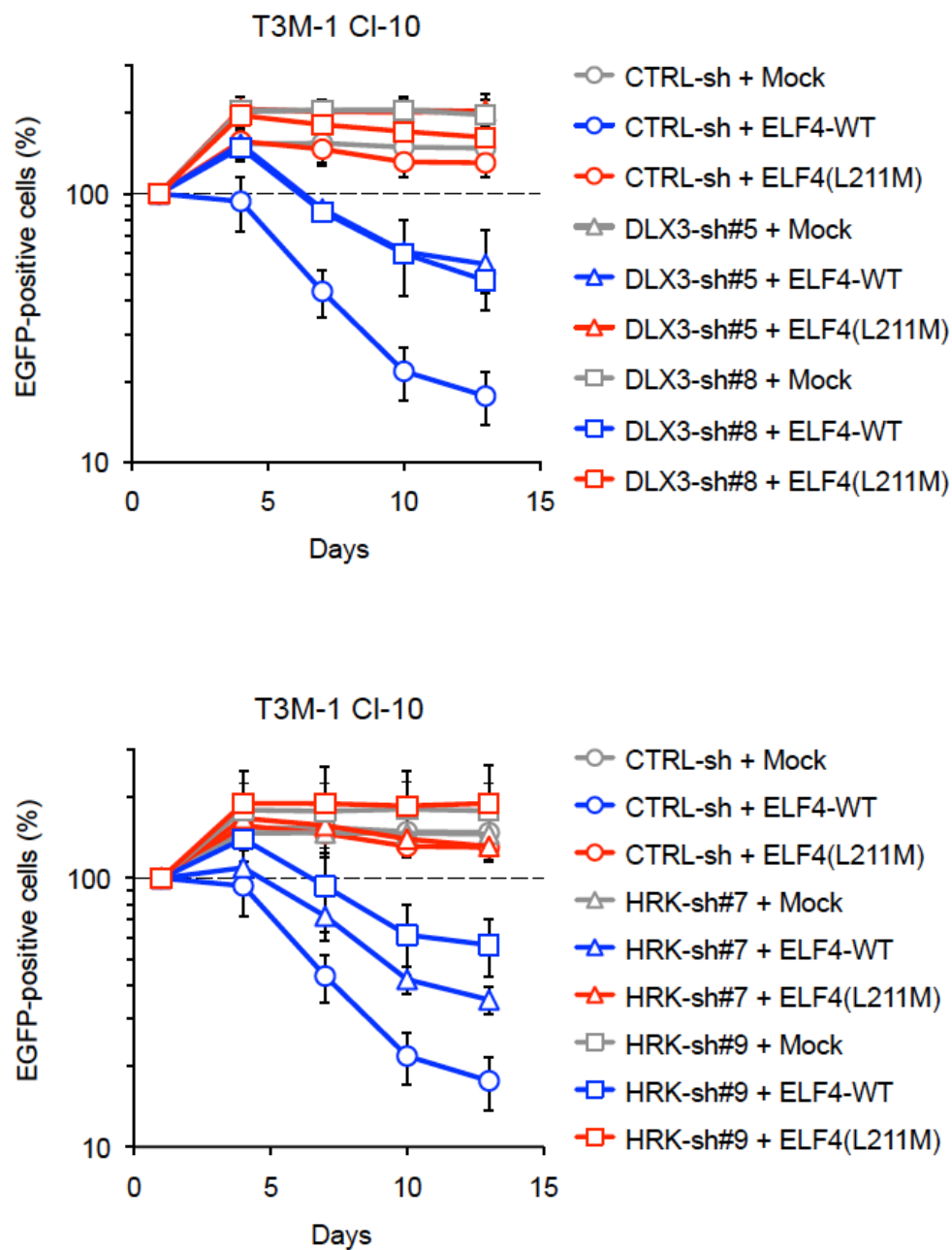


図 24 DLX3 あるいは HRK を単独でノックダウンした場合の細胞増殖抑制作用

DLX3 および HRK それぞれの shRNA を定常発現する T3M-1 CI-10 細胞株に対して、野生型 ELF4 (ELF4-WT) あるいは L211M 変異体の cDNA と EGFP とを同時に発現するプラスミドをレトロウイルスにより導入した。感染 24 時間後より 3 日毎に、FACSCanto II を使用し EGFP 陽性細胞の割合を調べた。グラフは、感染 24 時間後の細胞割合を 100 として、それに対する比（平均値±標準偏差）で示す。

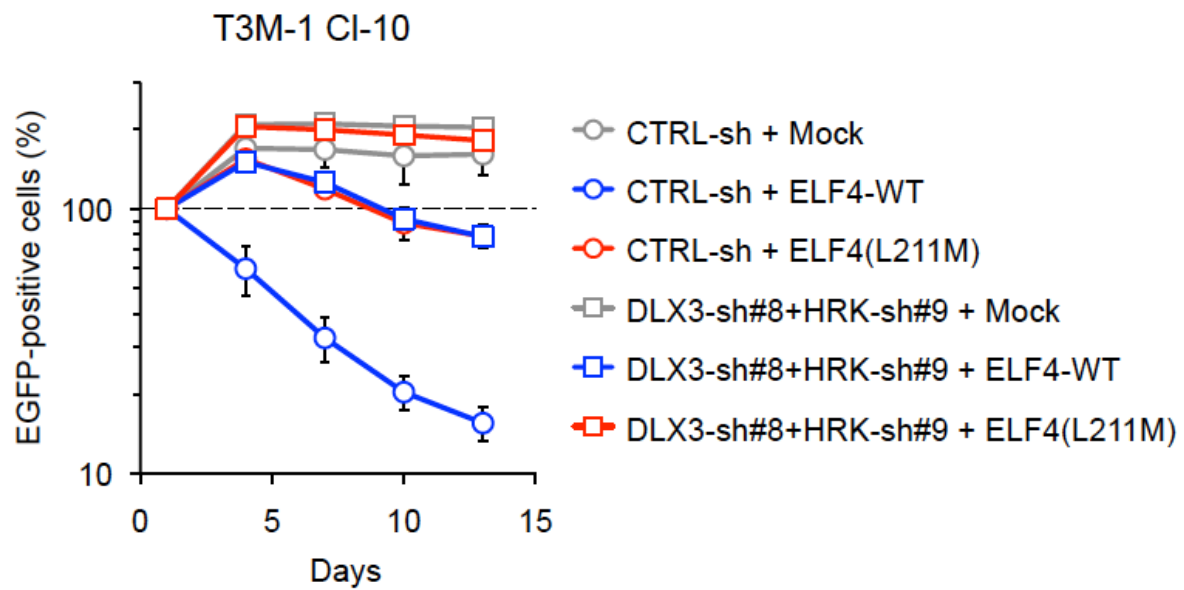


図 25 DLX3 および HRK を同時にノックダウンした場合の細胞増殖抑制作用

DLX3 と *HRK* 双方の shRNA を同時に定常発現する T3M-1 CI-10 細胞株に対して、野生型 ELF4 (ELF4-WT) あるいは L211M 変異体の cDNA と EGFP とを同時に発現するプラスミドをレトロウイルスにより導入した。感染 24 時間後より 3 日毎に、FACSCanto II を使用し EGFP 陽性細胞の割合を調べた。グラフは、感染 24 時間後の細胞割合を 100 として、それに対する比 (平均値±標準偏差) で示す。

考察

本研究では、がん細胞のゲノム解析を行う手法として、ゲノム中の特定の遺伝子に関する点突然変異・挿入・欠失及び融合遺伝子を効率よく検出する「cDNA キャプチャー法」を利用した[10]。cDNA シークエンスを採用した最大の理由は、発がんに強い影響を及ぼすと考えられる融合遺伝子の検出を可能にすることであった。残念ながら日本人の口腔扁平上皮がん由来する T3M-1 Cl-10 細胞株からは有意な融合遺伝子を見い出すことはできなかったが、ELF4(L211M)を新規に見出し、同細胞に野生型 ELF4 を強制発現させると細胞増殖が強く抑制されることを発見した。また、野生型 ELF1 および野生型 ELF2 も野生型 ELF4 同様の機能を有しており、ELF ファミリーが広く固形腫瘍における新たながん抑制遺伝子である可能性を指摘した。また、本論文では議論していないが、著者は同手法を用いて見出した CASP8 (caspase-8) の G325A 変異体 (表 7) が核内因子 κ B (NF- κ B) 誘導に関する機能獲得型変異であることも報告している[20]。

ELF4 遺伝子は myeloid Elf-1 like factor (MEF)の名称でも知られ、ETS ファミリーに属する転写因子である。ヒトの ETS ファミリーは 28 遺伝子が同定されており[14,21]、様々な細胞において細胞増殖、分化、悪性形質転化に関与することが知られている。例えば、ETS ファミリーの中で ERG あるいは PEA3 ファミリー(ETV1、ETV4、ETV5)は、前立腺がんの

半数以上の症例において *TMPRSS2* と融合遺伝子を形成することが知られている[22]。正常前立腺細胞において *TMPRSS2-ERG* 融合遺伝子を強制発現させると、PI3K (phosphoinositide 3-kinase) 経路の活性化依存性に上皮内腫瘍を形成することが報告されており、この融合遺伝子が実際の発がんへ寄与することが示唆されている[23]。また、*EWS-FLI* 融合遺伝子はユーイング肉腫で高頻度に見出され[24]、有望な治療標的として期待される。

本研究で詳細に検討した *ELF4* は、ETS ファミリーの中で *ELF1* および *ELF2* と合わせて ELF ファミリーを形成している。*Elf4*-null マウスではナチュラルキラー細胞 (NK 細胞) とナチュラルキラーT 細胞 (NK-T 細胞) の機能が欠損することが知られている[25]。さらに、そのようなマウスでは野生型 *Elf4* を持つマウスに比べて休止期にある造血幹細胞の割合が多いことから、*Elf4* が G_0 期から G_1 期への移行を司る機能を担っていると推測される[26]。実際、ELF4 活性は G_1 期において上昇しているが、サイクリン A-サイクリン依存性キナーゼ 2 複合体 (cyclin A-CDK2 complex) によって抑制的に調節されている[27]。

ELF4 が発がんには促進的にはたらくことが、これまで多くの報告によって示されてきた。例えば、ELF4 は白血病や卵巣がんの検体で発現が亢進している[28,29]。また、*Elf4* は Mdm2 の発現を誘導し、同時に Cdkn2a の活性を阻害することにより、Hras(G12V)と協調的に機能して発がんには寄与する [30]。さらに、*Elf4*-null マウスは神経幹細胞の培養塊である neurosphere の形成が不良で、*ELF4* のノックダウンによってヒト膠芽腫における幹細胞

胞様細胞の neurosphere 形成が減弱することから、ELF4 には神経細胞・膠芽腫の未分化性を維持する機能もあると考えられている[31]。

これとは対照的に、ELF4 がある種の細胞環境においては「がん抑制的」に機能する可能性も示唆されてきた。例えば、ヒト肺がん由来の細胞株 A549 において野生型 ELF4 を強制発現させると細胞増殖が遅延し、ヌードマウスにおける腫瘍の形成も抑制される[32]。ELF4 は *MMP9* の発現を抑制して細胞移動 (cell migration) を阻害する一方、ETS ファミリーに属する ETS2 は相反する作用を示す。さらに、近年の肝細胞がんのゲノム解析において、ELF4 の ETS ドメインを欠損する *BCORL1-ELF4* 融合遺伝子が発見され、転写因子の機能欠損型変異である可能性が示唆されていた[33]。

本研究では、ELF4 が広く固形腫瘍において直接的ながん抑制遺伝子としてはたらくことを証明し、さらに *DLX3* および *HRK* が増殖抑制シグナルの標的遺伝子であることを世界に先駆けて発見した。ELF4 が発がんや幹細胞維持に関わると同時にがん抑制的にも機能すること、すなわち細胞環境によって相反する表現型をもたらすことは、細胞周期や細胞死を司る分子としての ELF4 の重要性を示すものと考えられる。

ELF4 に代表される ELF ファミリーの細胞増殖抑制作用は、扁平上皮がん以外に HT1080 細胞株や MCF10A 細胞株においても観察された。図 26 に示すように、ELF ファミリーに属する ELF1、ELF2、ELF4 が有する ETS ドメインのコア配列はほぼ一致してお

り、ELF4 の転写誘導活性すなわち標的 DNA 配列との結合活性が基盤となって細胞増殖抑制作用をもたらすことを支持する。ELF1 と ELF2 の比較では、ELF4 との類似性がより高い ELF2 の方が強い細胞増殖抑制作用を有していることも、矛盾しない結果である。

| | | | |
|------|-----|--|-----|
| ELF1 | 206 | WTQREKGIFKLVD SKAVSRLWGKHKNKPD MN YETMGRAL RYYYQ R GILAKVEGQRL | 285 |
| ELF2 | 194 | WTQREKGIFKLVD SKAVSKLWGKHKNKPD MN YETMGRAL RYYYQ R GILAKVEGQRL | 273 |
| ELF3 | 271 | WENRHEGVFKFLRSEAVAQLWGQKKKNSNMTYEKLSRAMRYYYKREILERVDGRRL | 350 |
| ELF4 | 207 | WTQREKGIFKLVD SKAVSKLWGKQKNKPD MN YETMGRAL RYYYQ R GILAKVEGQRL | 286 |
| ELF5 | 171 | WEDREQGIFRVVKSEALAKMWGQRKKNDRMTYEKLSRALRYYYKTGILERVD-RRL | 249 |

|----- central 55 amino acids of ETS domain -----|

図 26 *ELF* 遺伝子群における ETS ドメインの類似性

ETS ドメインのコア配列 (55 アミノ酸) において ELF4 のアミノ酸残基と一致するものを赤色で示す。ELF ファミリーに属する ELF1 では 53 個 (96%)、ELF2 では 54 個 (98%) が一致し、異なる ESE ファミリーに属する ELF3 では 27 個 (49%)、ELF5 では 28 個 (51%) が一致する。

さらに本研究では次世代シーケンサーという強力なプラットフォームを活用した ChIP-seq の解析から、ELF4 が DNA に結合する領域の網羅的検索に世界で初めて成功した。新たな知見として、まず、ELF4 の DNA 結合部位が遺伝子の転写開始点上流に存在する古典的なプロモーター領域だけでなくエクソンにも高度に濃縮されていることが示された。プロモーター領域への結合のみに注目した gene ontology 解析においては細胞死を司る遺伝子群の発現を調節している傾向が示唆されたが、ELF4 は他にエンハンサー領域にも結合し、細胞周期を調節する遺伝子など、多くの標的遺伝子の発現を調節していると考えられる。さらに、未知の DNA 結合配列モチーフを複数同定することができた。これらは ETS ファミリーの DNA 結合配列モチーフである“GGAA”を含んでいないため、ELF4 が DNA に直接結合するのではなく、ELF4 と複合体を形成した別の転写因子の DNA 結合配列モチーフである可能性が高い。これらのモチーフを持つ既知の転写因子を同定するために、MAPPER (<http://genome.ufl.edu/mapper/>)、cisRED (<http://www.cisred.org>)、JASPAR (http://asp.ii.uib.no:8090/cgi-bin/jaspar2010/jaspar_db.pl) の各データベースを検索したが、明確なものは得られなかった。

今回の ChIP-seq データを見る限り、*DLX3* および *HRK* 遺伝子の近傍領域に ELF4 が直接的に結合している確証は得られず、ELF4 がどのような調節機構によって最終的に *DLX3* および *HRK* の発現を誘導するのかは、現在のところ不明である。前述のように ChIP-seq

の gene ontology 解析においては細胞死を司る遺伝子群への強い結合傾向が見られたが、マイクロアレイの発現解析結果を参照すると、必ずしもそれら遺伝子群の発現変動には直結していなかった。つまり ELF4 による調節機構は、転写因子として DNA に結合する段階から最終的なタンパクの誘導に至るまでに複雑な発現制御ネットワークを介して行われていると考えられる。あるいは、ELF4 が他のタンパクと弱い結合による複合体を形成して *DLX3* あるいは *HRK* 遺伝子の発現制御領域に結合する場合、ChIP 反応の過程で複合体との結合が剥がれてしまい、ChIP-seq のデータには反映されなかった可能性も否定できない。

本研究によってがん抑制遺伝子として機能することが明らかになった ELF4 が、どのような細胞刺激によって誘導されるのか解明することも、今後の課題である。ELF4 は放射線照射による DNA 損傷の修復反応に関わっていることが報告されており[34]、腫瘍検体を用いた放射線耐性との関連も明らかにしていきたい。これまで ELF4 は主に造血系腫瘍における発がん促進分子として機能解析がなされてきた。しかしもし、ELF4 機能を阻害する薬剤が使用された場合、上皮系細胞などにおいて発がんを誘導する可能性が危惧される。また、T3M-1 Cl-10 細胞株において ELF4(L211M)と TP53(R280G)および HRAS(Q61L)が併存していたことは示唆的である。ELF4 変異体が、TP53 および HRAS の変異体と協調的に発がんへ寄与する可能性も検討していきたい。

今回 ELF4(L211M)を発見し、その分子メカニズムを詳細に検討した T3M-1 Cl-10 細胞

株は日本人の口腔扁平上皮がん由来であるが、日本人の腫瘍検体における変異頻度は未知である。本論文中で検討した様々な変異体が報告されているデータベースは主に欧米人の腫瘍検体によるものであった。ELF4 のがん抑制遺伝子としての臨床的意義を明らかにするためには、頭頸部扁平上皮がんを初めとする日本人の腫瘍検体における ELF ファミリーの変異頻度を検証し、生存解析を加えていくことが必須である。ELF4 の下流分子である HRK 異常に対しては、既に抗腫瘍効果が示される薬剤が開発されており[35]、ELF4 変異がんに対しても同薬剤が有効である可能性が高い。また、ELF ファミリーの変異有無が前がん病変の発がんリスクを評価するゲノムバイオマーカーとして利用できる可能性もあると考えている。

引用文献

1. Mao L, Hong WK, Papadimitrakopoulou VA. Focus on head and neck cancer. *Cancer Cell* 5:311-6, 2004
2. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359:1143-5, 2008
3. Mok TS, Wu YL, Thongprasert S, Yang CH, Chu DT, Saijo N, Sunpaweravong P, Han B, Margono B, Ichinose Y, Nishiwaki Y, Ohe Y, Yang JJ, Chewaskulyong B, Jiang H, Duffield EL, Watkins CL, Armour AA, Fukuoka M. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med* 361:947-57, 2009
4. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, Deininger MW, Silver RT, Goldman JM, Stone RM, Cervantes F, Hochhaus A, Powell BL, Gabrilove JL, Rousselot P, Reiffers J, Cornelissen JJ, Hughes T, Agis H, Fischer T, Verhoef G, Shepherd J, Saglio G, Gratwohl A, Nielsen JL, Radich JP, Simonsson B, Taylor K, Baccarani M, So C, Letvak L & Larson RA. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 355:2408-2417, 2006.
5. Mardis ER. A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 470:198-203, 2011
6. Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26:1135-45, 2008
7. Okabe, T, Sato, N, Kondo, Y, Asano, S, Ohsawa, N, Kosaka, K, and Ueyama, Y. Establishment and characterization of a human cancer cell line that produces human colony-stimulating factor. *Cancer Res* 38:3910-7, 1978
8. Rasheed S, Nelson-Rees WA, Toth EM, Arnstein P, Gardner MB. Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* 33:1027-33, 1974
9. Soule HD, Maloney TM, Wolman SR, Peterson WD Jr., Brenz R, McGrath CM, Russo J, Pauley RJ, Jones RF, Brooks SC. Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* 50:6075-86, 1990
10. Ueno T, Yamashita Y, Soda M, Fukumura K, Ando M, Yamato A, Kawazu M, Choi YL, Mano H. High-throughput resequencing of target-captured cDNA in cancer cells. *Cancer Sci* 103:131-5, 2012
11. Miyazaki Y, Sun X, Uchida H, Zhang J, Nimer S. MEF, a novel transcription factor with an Elf-1 like DNA binding domain but distinct transcriptional activating properties. *Oncogene* 13:1721-9, 1996
12. Ji H, Jiang H, Ma W, Johnson DS, Myers RM, Wong WH. An integrated software system for analyzing ChIP-chip and ChIP-seq data. *Nat Biotechnol* 26:1293-300, 2008
13. Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A,

- Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:15545-50, 2005
14. Hollenhorst PC, McIntosh LP, Graves BJ. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors. *Annu Rev Biochem* 80:437-71, 2011
 15. Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi YL, Mano H. Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases. *Proc Natl Acad Sci USA* 110:3029-34, 2013
 16. Mao S, Frank RC, Zhang J, Miyazaki Y, Nimer SD. Functional and physical interactions between AML1 proteins and an ETS protein, MEF: implications for the pathogenesis of t(8;21)-positive leukemias. *Mol Cell Biol* 19:3635-44, 1999
 17. Morasso MI, Markova NG, Sargent TD. Regulation of epidermal differentiation by a Distal-less homeodomain gene. *J Cell Biol* 135:1879-87, 1996
 18. Ferrari N, Paleari L, Palmisano GL, Tammara P, Levi G, Albini A, Brigati C. Induction of apoptosis by fenretinide in tumor cell lines correlates with DLX2, DLX3 and DLX4 gene expression. *Oncol Rep* 10:973-7, 2003
 19. Inohara N, Ding L, Chen S, Nunez G. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J* 16:1686-94, 1997
 20. Ando M, Kawazu M, Ueno T, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Yamashita Y, Choi YL, Yamasoba T, Mano H. Cancer-associated missense mutations of caspase-8 activate nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Sci* 104:1002-8, 2013
 21. Lacorazza HD, Nimer SD. The emerging role of the myeloid Elf-1 like transcription factor in hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis* 31:342-50, 2003
 22. Kumar-Sinha C, Tomlins SA, Chinnaiyan AM. Recurrent gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 8:497-511, 2008
 23. King JC, Xu J, Wongvipat J, Hieronymus H, Carver BS, Leung DH, Taylor BS, Sander C, Cardiff RD, Couto SS, Gerald WL, Sawyers CL. Cooperativity of TMPRSS2-ERG with PI3-kinase pathway activation in prostate oncogenesis. *Nat Genet* 41:524-6, 2009
 24. Lessnick SL, and Ladanyi M. Molecular pathogenesis of Ewing sarcoma: new therapeutic and transcriptional targets. *Annu Rev Pathol* 7:145-59, 2012
 25. Lacorazza HD, Miyazaki Y, Di Cristofano A, Deblasio A, Hedvat C, Zhang J, Cordon-Cardo C, Mao S, Pandolfi PP, Nimer SD. The ETS protein MEF plays a critical role in perforin gene expression and the development of natural killer and NK-T cells. *Immunity* 17:437-49, 2002

26. Lacorazza HD, Yamada T, Liu Y, Miyata Y, Sivina M, Nunes J, Nimer SD. The transcription factor MEF/ELF4 regulates the quiescence of primitive hematopoietic cells. *Cancer Cell* 9:175-87, 2006
27. Miyazaki Y, Boccuni P, Mao S, Zhang J, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Kiyokawa H, Nimer SD. Cyclin A-dependent phosphorylation of the ETS-related protein, MEF, restricts its activity to the G1 phase of the cell cycle. *J Biol Chem* 276:40528-36, 2001
28. Fukushima T, Miyazaki Y, Tsushima H, Tsutsumi C, Taguchi J, Yoshida S, Kuriyama K, Scadden D, Nimer SD, Tomonaga M. The level of MEF but not ELF-1 correlates with FAB subtype of acute myeloid leukemia and is low in good prognosis cases. *Leuk Res* 27:387-92, 2003
29. Yao JJ, Liu Y, Lacorazza HD, Soslow RA, Scandura JM, Nimer SD, Hedvat CV. Tumor promoting properties of the ETS protein MEF in ovarian cancer. *Oncogene* 26:4032-7, 2007
30. Sashida G, Liu Y, Elf S, Miyata Y, Ohyashiki K, Izumi M, Menendez S, Nimer SD. ELF4/MEF activates MDM2 expression and blocks oncogene-induced p16 activation to promote transformation. *Mol Cell Biol* 29:3687-99, 2009
31. Bazzoli E, Pulvirenti T, Oberstadt MC, Perna F, Wee B, Schultz N, Huse JT, Fomchenko EI, Voza F, Tabar V, Brennan CW, DeAngelis LM, Nimer SD, Holland EC, Squatrito M. MEF Promotes Stemness in the Pathogenesis of Gliomas. *Cell Stem Cell* 11, 836-844, 2012
32. Seki Y, Suico MA, Uto A, Hisatsune A, Shuto T, Isohama Y, Kai H. The ETS transcription factor MEF is a candidate tumor suppressor gene on the X chromosome. *Cancer Res* 62:6579-86, 2002
33. Totoki Y, Tatsuno K, Yamamoto S, Arai Y, Hosoda F, Ishikawa S, Tsutsumi S, Sonoda K, Totsuka H, Shirakihara T, Sakamoto H, Wang L, Ojima H, Shimada K, Kosuge T, Okusaka T, Kato K, Kusuda J, Yoshida T, Aburatani H, Shibata T. High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet* 43:464-9, 2011
34. Sashida G, Bae N, Di Giandomenico S, Asai T, Gurvich N, Bazzoli E, Liu Y, Huang G, Zhao X, Menendez S, Nimer SD. The mef/elf4 transcription factor fine tunes the DNA damage response. *Cancer Res* 71:4857-65, 2011
35. Ni Chonghaile T and Letai A. Mimicking the BH3 domain to kill cancer cells. *Oncogene* 27:S149-57, 2009

謝辞

本研究を進めるにあたり、基礎研究に従事する機会を与えてくださった東京大学大学院医学系研究科 耳鼻咽喉科学教室 山嵜達也教授に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究に際して直接ご指導してくださった東京大学大学院医学系研究科 細胞情報学 間野博行教授を始め、ゲノム医学講座 崔永林特任准教授および河津正人特任講師、分子病理学 宮園浩平教授および鯉沼代造准教授、血液・腫瘍病態学 黒川峰夫教授および片岡圭亮特任助教および古屋淳史先生に深謝いたします。さらに、本研究の遂行にご尽力くださった耳鼻咽喉科学、細胞情報学、ゲノム医学講座の研究員・研究補助員の皆様に厚く感謝申し上げます。