

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果概要書

所属機関名 山梨大学大学院総合研究部医学域

職名・氏名 助教 大嶽 茂雄 印

1 研究テーマ

がん微小環境シグナルに依存する ZEB1 活性化因子の同定

2 研究の目的

上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)は、上皮細胞が間葉系細胞の性質を示すようになる現象であり、がん細胞の浸潤能、抗がん剤耐性、幹細胞性といった悪性形質の獲得に寄与している。EMT 誘導転写因子である zinc finger E-box binding homeobox 1 (ZEB1)は、細胞接着因子である E-cadherin の発現低下を引き起す。

研究代表者はこれまでに、膵がん細胞 PANC-1 において、EMT 誘導因子である transforming growth factor- β (TGF- β)は ZEB1 の発現上昇ではなく、機能的活性化によって E-cadherin の発現を低下させることを見出した。

本研究では ZEB1 の機能制御機構を明らかにするため、E-cadherin の発現を指標としたスクリーニングを行うことで、TGF- β による ZEB1 の機能活性化に必要な因子を同定することを目的とした。

3 研究の方法

当初の研究計画は、ZEB1 の機能制御に関与する因子をスクリーニングによって探索するとしていた。しかし、E-cadherin の発現を指標に細胞を選別するフローサイトメトリーの実験が予想より上手くいかず、スクリーニングを行うことは難しいと判断した。そのため、本研究では、ZEB1 の機能に関与する cofactor の解析や、ZEB1 による標的遺伝子発現のエピジェネティックな制御について研究を行った。

前年度までの研究により、TGF- β による E-cadherin の発現低下にはヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC)の活性が必要であることがわかった。また、HDAC と ZEB1 の結合を仲介する cofactor である CtBP は ZEB1 による E-cadherin 発現の basal repression には必要であるが、TGF- β 刺激時の発現低下には必須ではないことが明らかとなった。そこで、別の cofactor として、nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complex の関与を検証した。NuRD complex との結合が阻害される ZEB1 変異体の作製を行い、PANC-1 ZEB1 ノックアウト細胞に導入し、遺伝子発現への影響を調べた。また、NuRD complex サブユニット MTA1 のノックダウン実験も行い、NuRD complex の必要性をさらに検証した。

E-cadherin の発現低下には HDAC の活性が必要であるため、E-cadherin 遺伝子 (CDH1)

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ②特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。

の発現制御領域におけるヒストンアセチル化レベルの変化を Cut&Run (Cleavage Under Target & Release Using Nuclease) assay により解析した。

4 研究の成果

ZEB1 の cofactor の候補である NuRD complex との結合が阻害される ZEB1 変異体 (ZEB1 R17G)を作製し、PANC-1 ZEB1 ノックアウト細胞に導入して、遺伝子発現への影響を調べた。しかし、ZEB1 R17G は basal の E-cadherin 発現や TGF-β による発現低下に影響を与えるなかった。また、NuRD complex サブユニット MTA1 のノックダウン実験も行った。MTA1 のノックダウンも basal の E-cadherin 発現や TGF-β による発現低下に影響を与える、変異体実験と同様の結果となった。これらの結果から、NuRD complex は ZEB1 による E-cadherin 発現の basal repression と TGF-β 刺激時の発現低下のどちらにも関与していないことがわかった。前年度までの研究により、ZEB1 の cofactor としてよく知られている CtBP も関与していないことが示されており、TGF-β による ZEB1 の活性化には未知の因子が関与していると考えられる。

また、前年度までの研究から、E-cadherin の発現低下には HDAC の活性が必要であることがわかっていたため、E-cadherin 遺伝子 (CDH1)の発現制御領域におけるヒストンアセチル化レベルの変化を Cut&Run assay により解析した。しかし、PANC-1 細胞では、TGF-β 処理によって CDH1 プロモーター や エンハンサー 領域でのヒストンアセチル化 (H3K27ac)の変化は観察されなかった。一方、ZEB1 ノックアウト細胞では、CDH1 や別の ZEB1 標的遺伝子である EPCAM のプロモーターにおけるヒストンアセチル化は顕著に増加していた。これらの結果から、ヒストン脱アセチル化は ZEB1 による標的遺伝子の basal repression には関与しているが、TGF-β 刺激依存的な抑制には関与しないことが示唆され、CtBP や NuRD complex が必要でないことと矛盾しない結果となった。TGF-β 刺激時には、HDAC は E-cadherin 発現低下に必要な因子の発現や機能の制御に関与して、間接的に働いている可能性がある。本研究から TGF-β は ZEB1 依存的な新たなメカニズム (CtBP・NuRD 非依存)によって E-cadherin の発現を低下させることが示唆された。

5 今後の展望

本年度の研究により、TGF-β は ZEB1 依存的な新たなメカニズムによって E-cadherin の発現を低下させることができたが、ZEB1 の活性化に必要な因子の同定には至らなかった。今後、ZEB1 標的遺伝子で細胞表面マーカーとして上手く検出できるものが見つかれば、スクリーニングによって ZEB1 活性化に必要な未知の因子を探索できる可能性がある。

6 研究成果の発信方法（予定を含む）

研究成果の発信については、国際学術誌への発表を予定しており、投稿準備中である。また、これまでに日本癌学会学術総会で発表を行ってきたため、今後も継続的に発表していく。今後得られる研究成果のインパクトによっては、論文発表の際にプレスリリースも検討する。また、県民の方に対するセミナー等の機会があれば、その参加についても積極的に検討していく。

留意事項

- ① 3枚程度で作成してください。
- ②特許の出願中等の理由により、一定期間公表を見合わせる必要がある箇所がある場合であっても、所定の期日までに公表可能な範囲で作成・提出してください。当該箇所については、後日公表可能となった際に追記して再提出してください。