

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

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

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 研究の背景と目的

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、K-Ras 活性型変異をもつがん細胞において、2種類の ZEB1 による E-cadherin 発現抑制の様式が存在することを発見した (Otake *et al.*, Cancer Sci. 2021)。一つは basal repression であり、定常状態の細胞において、ZEB1 は発現量に依存して E-cadherin の発現を弱く抑えている。もう一つは stimulus-dependent repression であり、ZEB1 に加えて発がん性 Ras シグナルと外部刺激を必要とする。興味深いことに、刺激依存的な様式では ZEB1 の発現上昇は必要でなかった。このことから、発がん性 Ras シグナルと外部刺激によって ZEB1 の機能が活性化され、E-cadherin の発現を強く抑制できることが示唆された。さらにその後の研究で、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。

そこで、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

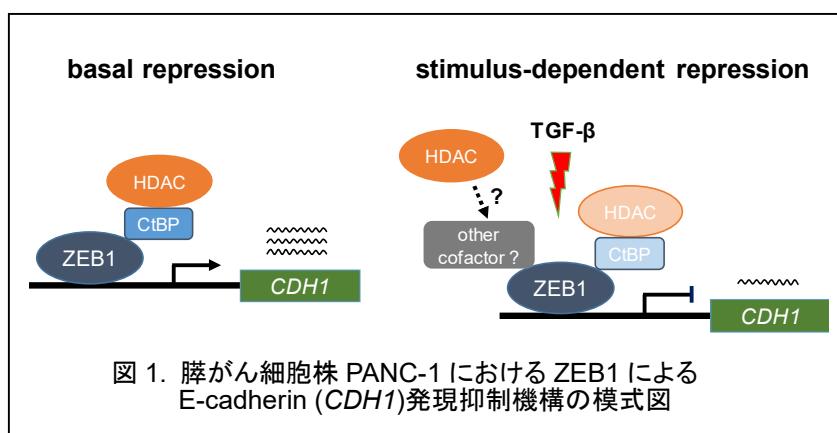
cofactorとして、nucleosome remodeling and deacetylase (NuRD) complexの関与を検証した。NuRD complexとの結合が阻害されるZEB1変異体の作製を行い、PANC-1 ZEB1ノックアウト細胞に導入し、遺伝子発現への影響を調べた。また、NuRD complexサブユニットMTA1のノックダウン実験も行い、NuRD complexの必要性をさらに検証した。

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)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ず、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(図1)。



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

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。