

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18422

研究課題名(和文)クロマチンリモデリング因子SWI/SNF不活化の発がんにおける意義の解明

研究課題名(英文)Clarification of the role of SWI/SNF inactivation in carcinogenesis

研究代表者

竹島 秀幸 (Takeshima, Hideyuki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：40432497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年のがんゲノム解析により、SWI/SNFクロマチンリモデリング因子の突然変異(不活化)が様々ながんで見つがっている。一方で、SWI/SNF不活化による発がん機構は不明である。本研究では、遺伝子発現状態多様性に注目することで、SWI/SNF不活化による発がん機構解明を目的とした。まず、CRISPR/Cas9により、SWI/SNF構成因子SMARCA2・SMARCA4のダブルノックアウト(DKO)細胞を樹立した。次に、DKO細胞における遺伝子発現状態多様性(即ちヌクレオソームポジション多様性)を解析した結果、DKO細胞では、ヌクレオソームポジション多様性が増加していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：SWI/SNF chromatin remodeling factor was frequently inactivated in various types of cancers by somatic mutations of its components. However, the mechanism how SWI/SNF inactivation is involved in carcinogenesis is not well understood. In this study, we aimed to clarify molecular mechanism by focusing on the production of gene expression heterogeneity (diversity). First, SWI/SNF inactivated cell line was established by double knockout of SWI/SNF components, SMARCA2 and SMARCA4, using CRISPR/Cas9 system (DKO cell line). Then, diversity of gene expression status, namely diversity of nucleosome positioning, was analyzed by NOME-seq. It was revealed that the diversity of nucleosome positioning was increased in DKO cell line compared to SWI/SNF wild type cell line. This result suggested that gene expression heterogeneity was produced by SWI/SNF inactivation, and this might be involved in carcinogenesis.

研究分野：がんエピジェネティクス

キーワード：クロマチンリモデリング

1. 研究開始当初の背景

SWI/SNF クロマチンリモデリング因子(クロマチン構造変換因子)は多数のタンパク質からなる複合体で、ヌクレオソームの構造変換を介して様々な遺伝子の発現制御に関わる。最近、SWI/SNF の構成遺伝子の突然変異が様々ながんにおいて存在することが、全エクソン解析から明らかとなってきた。

研究代表者は、1) 胃がん臨床検体について、SWI/SNF 突然変異がある検体ではその検体中のがん細胞のほとんどが変異を持つこと、2) SWI/SNF のエピジェネティック異常はがん患者の非がん部(未だがんになっていない部分)においても存在することを見出している。これらのことから、SWI/SNF の不活化は、発がんの早期に起きていると考えられる。

SWI/SNF は、がん抑制遺伝子として機能することが知られているが、各種論文及び研究代表者のデータでは、その不活化による細胞増殖の亢進は非常に軽度である。このことは、SWI/SNF 不活化は単純な細胞増殖亢進だけでなく、別のメカニズムを介して発がんに関与している可能性を強く示唆する。

一般的に、正常細胞においてがん遺伝子が活性化すると、細胞老化が誘導されることが知られる。つまり、がん遺伝子の活性化が細胞増殖を実際に促進するためには、予め細胞老化機構が破綻している必要がある。

SWI/SNF 不活化が発がんの早期に起こるといふ予備的データ及び SWI/SNF 不活化がクロマチン構造の不安定化を誘導する(遺伝子発現状態の不安定化につながる可能性が高い)ことから、研究代表者は以下のような作業仮説を考えている。

【本研究計画における作業仮説】

SWI/SNF の不活化により遺伝子発現状態が多様なクローンが産生され、その中に含まれるがん遺伝子活性化環境に適応したクローンが選択的に増殖する。

2. 研究の目的

1) SWI/SNF 不活化により遺伝子発現状態が多様なクローンが産生されることを解明する。

2) がん遺伝子の活性化環境に適応した、即ち、細胞老化誘導機構が破綻したクローンが選択的に増殖することを解明する。

3. 研究の方法

(1) SWI/SNF 不活化細胞株の樹立

研究開始時までと同定していた SWI/SNF 機能が正常である細胞株(正常細胞株及び一部のがん細胞株)について、1) shRNA を用いたノックダウン法により SWI/SNF 不活化を誘導できる(テトラサイクリン誘導型)細胞株、または、2) CRISPR/Cas9 システムを用いた SWI/SNF ノックアウト細胞株を樹立する。不活化する SWI/SNF 遺伝子としては、突然変異・異常メチル化が高頻度に存在するサブユニットである *ARID1A*、*SMARCA2* 及び *SMARCA4* などを用いる。

(2) SWI/SNF 不活化による多様なクローン産生の解析

SWI/SNF 不活化細胞を長期間培養し、遺伝子発現状態が多様なクローンの産生をシングルセル定量 RT-PCR 法、または、NOMe-seq 法により解析する。解析には、適切な遺伝子の選択が必要であり、i) 細胞老化誘導に関与する遺伝子群、ii) SWI/SNF の標的遺伝子群などを用いる。SWI/SNF 標的遺伝子群は ChIP-シーケンス解析により同定する。

(3) 細胞老化機構が破綻したクローンの可視化システム構築

SWI/SNF 不活化細胞株をもとにして、細胞老化機構が破綻したクローンの可視化システムを構築する。具体的には、i) 発現誘導型の活性化型がん遺伝子(細胞老化の誘導要因)を導入する。がん遺伝子の下流には、IRES 配列及び緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする遺伝子を連結し、がん遺伝子を活性化させた細胞(細胞老化誘導スイッチが入った細胞)は緑色に光らせる。さらに、ii) 細胞老化の際に発現誘導されることが確立している *p16* 遺伝子のプロモーター下流に赤色蛍光タンパク質(DsRed)を連結して導入、老化が誘導された細胞は赤色に光らせる。

(4) 細胞老化機構が破綻したクローンの選択的増殖の解析

3) で樹立した細胞株を、SWI/SNF を不活化（多様なクローンの産生）または不活化していない状態で培養する。次に、活性化型がん遺伝子を発現させ（細胞老化誘導スイッチを入れる）、以下の解析を行う。

i) がん遺伝子の発現誘導から数日後の解析では、SWI/SNF 不活化をした場合により多くの緑色蛍光のみを発するクローンが産生されることを明らかにする。ii) 発現誘導から長期間経過後には、緑色蛍光のみを発するクローンが選択的に増殖することを明らかにする。

4. 研究成果

【平成 27 年度】

SWI/SNF 不活化細胞の樹立

当初予定していた shRNA によるノックダウンでは SWI/SNF 機能の不活化が不十分であることを考慮し、CRISPR/Cas9 システムを用いノックアウト細胞の樹立を行った。293FT 細胞株を用いて、SWI/SNF の活性サブユニットである *SMARCA2*、*SMARCA4* のシングルノックアウト細胞株、及び、ダブルノックアウト (DKO) 細胞株を樹立した。

SWI/SNF 標的遺伝子の探索

SWI/SNF 標的遺伝子探索のため、*SMARCA2* ノックアウト細胞株、*SMARCA4* ノックアウト細胞株、及び、コントロール細胞株におけるゲノム網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、*SMARCA2* ノックアウト細胞株では、32 遺伝子における発現上昇、及び、25 遺伝子における発現減少が認められた。*SMARCA4* ノックアウト細胞株では、63 遺伝子における発現上昇、及び、77 遺伝子における発現減少が認められた。*SMARCA4* ノックアウトにより発現減少する遺伝子のうち 14 遺伝子について、SWI/SNF のターゲット遺伝子であるかどうかを調べるために、SWI/SNF 構成因子の 1 つである BAF155 の結合の有無をクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) により調べた。その結果、*SMARCA2*、及び、*SMARCA4* が野生型の細胞株 (コントロール細胞) においては、

解析した全ての遺伝子で BAF155 の結合が認められた。また、DKO 細胞においては、BAF155 の結合が低下していることが明らかになった。

【平成 28 年度】

DKO 細胞での遺伝子発現状態多様性の解析

SWI/SNF 不活化により遺伝子発現状態が多様 (即ちヌクレオソームポジションが多様) なクローンが産生されるかどうかを明らかにするために、SWI/SNF の活性サブユニットである *SMARCA2*、及び、*SMARCA4* のダブルノックアウト細胞株 (DKO 細胞株) におけるヌクレオソームポジションを NOMe-seq 法 (ヌクレオソームが存在する領域では DNA が GpC メチル化を受けないことを利用してヌクレオソームポジションを決定する手法) により解析した。その結果、DKO 細胞株においては、SWI/SNF の標的遺伝子である *AQP10* 遺伝子の転写開始点近傍のヌクレオソームポジションが細胞ごとに異なる (ヌクレオソームポジション多様性) ことが明らかになった。

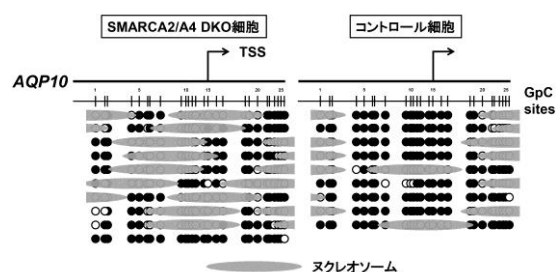


図 1. SWI/SNF 不活化細胞におけるヌクレオソームポジション多様性 (*AQP10* 遺伝子)

このヌクレオソームポジション多様性は、*SMARCA2*、及び、*SMARCA4* が野生型の細胞株 (コントロール細胞) では認められないことから、SWI/SNF 不活化により遺伝子発現状態が多様なクローンが産生されたことが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Nakazato H, Takeshima H, Kishino T, Kubo

E, Hattori N, Nakajima T, Yamashita S, Igaki H, Tachimori Y, Kuniyoshi Y, Ushijima T. Early-Stage Induction of SWI/SNF Mutations during Esophageal Squamous Cell Carcinogenesis. PLoS One, 11, e0147372, 2016 (査読有).

[学会発表] (計 8 件)

1. 竹島秀幸, 丹羽 透, 山下 聡 and 牛島俊和. 慢性炎症による Tet 遺伝子の発現抑制と異常 DNA メチル化誘発. 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月.
2. Takeshima, H., Niwa, T, Yamashita, S, Wakabayashi, M and Ushijima, T. Suppression of Tet genes is a potential mechanism of aberrant DNA methylation induction by chronic inflammation. The 41st Naito Conference, Sapporo, July, 2016.
3. Takeshima, H., Niwa, T, Yamashita, S and Ushijima, T. Suppression of Tet Genes by Chronic Inflammation and Aberrant DNA Methylation Induction. 35th Sapporo International Cancer Symposium, Sapporo, June, 2016.
4. 竹島秀幸, 丹羽 透, 飯田直子, 若林美香, 山下 聡 and 牛島俊和. 慢性炎症による異常 DNA メチル化誘発の分子機構. 第10回日本エピジェネティクス研究会年会, 大阪, 2016年5月.
5. Takeshima, H. Suppression of Tet genes is a potential mechanism of aberrant DNA methylation induction by chronic inflammation. Kick-off Symposium in NCU, Nagoya, March, 2016.
6. Takeshima, H. and Ushijima, T. Role of chromatin remodeler alterations in gastric field cancerization. 74th JCA annual meeting, Nagoya, October, 2015.
7. 竹島秀幸, 丹羽 透, 若林美香, 山下聡 and 牛島俊和. Tet 遺伝子の発現は慢性炎症により低下する. 第9回エピジェネティクス研究会年会, 東京, 2015年5月.
8. Takeshima, H., Niwa T, Wakabayashi, M, and Ushijima, T. Role of chromatin remodeler alterations in gastric field cancerization.

GRL Korea-Japan Epigenome Medicine Meeting 2015, Naha, May, 2015.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織
(1)研究代表者
竹島 秀幸 (TAKESHIMA hideyuki)
国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号 : 40432497

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
該当なし

(4)研究協力者
該当なし