

令和元年6月18日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10038

研究課題名(和文) hSNF5による RUNX制御機構の解明と悪性ラドイド腫瘍発生病態の解明

研究課題名(英文) The clarification of a tumorigenesis of malignant rhabdoid tumor through a understanding of control mechanism of RUNX1 by hSNF5

研究代表者

桑原 康通 (Kawahara, Yasumichi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30590327

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：悪性ラドイド腫瘍(以下MRT)におけるクロマチンリモデリング機構とRUNX familyの機能関連に着目し、SNF5欠損によるRUNX familyの制御機構への影響を検討した。MRT細胞でRUNX1とSWI/SNF複合体は相互に結合し機能協調していた。結合にはRUNX1のC末端側が重要であった。SNF5の欠損によってp21遺伝子のプロモーター領域における、RUNX1のリクルートメントが変化した。MRTではSNF5欠損によって転写因子との相互作用が変化し、遺伝子のプロモーター領域で転写因子のリクルートメントが異常な制御を受け、遺伝子の転写制御に影響することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRTは乳幼児に発症する予後の悪い小児固形腫瘍である。SNF5遺伝子の単一の異常でMRTは発症するため、病態の解明や治療法の開発にはSNF5遺伝子の機能解析は重要であるものの、十分解明されていない。また、SNF5と関係性のある転写因子を解析した研究の報告は少なく限定的であった。今回、SNF5欠損による転写因子との相互作用の変更が確認されたが、今後SNF5欠損によって影響している転写因子の解明が、有効な治療法の開発に直結することが示された点で意義のある研究結果である。

研究成果の概要(英文)：To elucidate alterations of functions of transcription factor with a loss of SNF5, we focused the relationship between SWI/SNF complex and transcription factor, RUNX1 on p21 locus in malignant rhabdoid tumor (MRT) cells. We indicated that RUNX1 binds to SWI/SNF complex with or without SNF5 via C-terminal of RUNX1. A loss of SNF5 caused an increase of RUNX1 recruitment on p21 promoter region, followed by an aberrant of transcription activities of p21 gene. SWI/SNF complex interacts with transcription factor to regulate transcription activities. However, SWI/SNF complex without SNF5 has abnormal function to transcription factors, resulted in abnormal control of gene expressions.

研究分野：転写機構、小児がん

キーワード：RUNX1 SWI/SNF複合体 悪性ラドイド腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトのクロマチンリモデリング複合体である SWI/SNF 複合体は ATPase サブユニットの BRG1(または BRM)、SNF5/INI1/SMARCB1(以下、SNF5)、BAF155、BAF250 や BAF180 など約 10 種類のタンパクから構成され、SWI/SNF 複合体サブユニットの異常が様々な腫瘍の発生や悪性化に關与する(Cancer Res 69: 2009)。また、SNF5 ノックアウトマウスの解析では、Snf5^{-/-}マウスは胎生期致死であり、ヘテロ接合体である Snf5^{+/-}マウスの約 20%がラブドイド腫瘍を発生することから、SNF5 は単独で機能しうるがん抑制遺伝子とされている(PNAS 97: 2000, Cancer Cell 2:2002)。

悪性ラブドイド腫瘍(malignant rhabdoid tumor:以下 MRT)は 1 歳未満の乳幼児の主に脳や腎臓に発生するきわめて予後の悪い小児固形腫瘍で、進行例の 4 年生存率は 15.9%、特に 6 ヶ月未満の発症例では 8.8%と絶望的である。MRT の患者検体で全エクソームシーケンシングが行われた結果、共通の遺伝子異常は SNF5 遺伝子の異常のみであり、SNF5 の異常が MRT の driver mutation と考えられている。したがって、SNF5 遺伝子の機能解析と標的遺伝子の解析は MRT の病態解明と、有効な治療法の確立に大きく貢献するものと考えて当該研究を展開している。

これまで我々は MRT の悪性化のメカニズムについて研究し、新規治療標的の候補を検討し報告してきた(Kuwahara et al. Clin Cancer Res, 2004, Kuroda, Kuwahara, et al. Cancer Genetics and Cytogenetics, 2005, Katsumi, Kuwahara et al. Clin Cancer Res, 2008)。さらに最近、ヒト MRT 細胞株と Snf5 ノックアウトマウスを用いて SNF5 の標的遺伝子とその転写制御のメカニズムを解析し、SNF5 は p21 プロモーターに直接結合し転写活性をあげて細胞周期の制御に關与すること(Kuwahara et al. Cancer Res, 2010)、また、アポトーシス関連遺伝子(NOXA, PUMA, BAX など)の中で、MRT では NOXA 遺伝子の発現を認めず、NOXA 遺伝子は SNF5 によって転写制御されていることを明らかにした(Kuwahara et al. Mol Cancer Res 2013)。こうした SNF5 の機能解析の結果、MRT において NOXA/Mcl-1 の経路が薬剤感受性に關係しており、新規治療標的である可能を解明している(Ouchi, Kuwahara et al. J cell physiol 2015)。くわえて、MRT では SWI/SNF 複合体の因子である BAF250A (ARID1A)、BAF60B、BAF180 の発現が低下しており、SNF5 は SWI/SNF 複合体の安定性に關与し(Wei, Kuwahara et al. Mol Cancer Res, 2014)、SNF5 欠損によって SWI/SNF 複合体は不完全な複合体(SWI/SNF 複合体)となることが示された。そして、SWI/SNF 複合体はエンハンサーに対して間違えた制御を行い、結果として腫瘍細胞の維持や発生に關与していると理解されている。しかし、現在までに MRT の発生・病態は十分に解明できておらず、次の課題として SNF5 と關係性のある転写因子やタンパクを解析し、MRT 発生病態を検討することで、今後の新しい診断法や治療法への臨床応用に展開するための新たな基礎研究が必要とされている。

一方で、SNF5 は転写因子である RUNX1 と標的遺伝子のプロモーター領域で結合し、血球分化に關与する遺伝子の発現制御に貢獻している(Bakshi et al. J Cellular Physiology, 2010)。さらに、巨核球の最終分化において RUNX1 のリン酸化修飾が SNF5 の相互作用を制御することが報告された(Huang et al. Gene Dev 2012)。また、2009 年には Chi らは、BRG1 のノックアウトでは、CD4 のサイレンスがおこらず、T 細胞の分化の異常が見られることを報告し、さらに 2011 年には Roberts らは、T 細胞の分化において SNF5 欠損による T 細胞の分化に異常をきたし T 細胞性リンパ腫が発生することを報告した。このように、SNF5 欠損は血球の分化にも影響していることが知られている。すなわち、SWI/SNF 複合体と転写因子 RUNX1 との機能協調についての解析は重要であり、特に、SNF5 の機能喪失によって SWI/SNF 複合体が転写因子 RUNX1 との機能協調への影響の検討は重要な課題である。

2. 研究の目的

MRT におけるクロマチンリモデリング機構と RUNX family の機能関連に着目し、SNF5 欠損による RUNX family の制御機構への影響を解明することを目的とする。MRT において SNF5 による影響が確認されている遺伝子の p21 に着目し、p21 遺伝子のプロモーター領域における転写因子 RUNX1 と SWI/SNF 複合体との機能協調を検討した。

3. 研究の方法

使用した細胞株は MRT 細胞株、A204 と G401、HeLa 細胞株、Jurkat 細胞株である。SNF5 の強制発現には pcDNA3-flag-SNF5、RUNX1 は p^{RC/CMV}-M3-Aml1b を用いた。また、p^{RC/CMV}-M3-Aml1b の truncated mutant を 3 種類、RUNX のチロシン残基をフェニルアラニンに変更した Tyr mutant を作成した。p21 のプロモーター領域を pGL3 ベクターに挿入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。mRNA の発現には定量的 PCR(QRT-PCR)、タンパク発現の確認には Western blot 法、タンパク同士の結合の評価には免疫沈降法、さらにプロモーター領域の DNA へのタンパクの結合についてはクロマチン免疫沈降法(ChIP)を用いて検討した。

4. 研究成果

1:細胞株での各タンパクの発現についての検討

使用する細胞株における、RUNX1、SNF5、BRG1 といったタンパクの発現を Western blot 法で確認した。MRT 細胞株である A204、G401 では想定通り SNF5 の発現は確認できないが、BRG1 は発現していた。これは、SNF5 の欠損した SWI/SNF 複合体が存在していることを示唆しており、既報通りの結果であった。また、RUNX1 は両 MRT 細胞株での発現は確認できなかった。これらの MRT 細胞株は、RUNX1、SNF5 を強制発現させ、SNF5 の存在による RUNX1 と SWI/SNF 複合体との關係について検

討するためには適した細胞株であると考えられた。

2: MRT 細胞株へ SNF5、RUNX1 を強制発現させ、*p21* 遺伝子の発現変化の評価

A204 細胞に SNF5 を発現させると、*p21* の mRNA は増加した。この結果は、我々の既報と同様の結果であった(Kuwahara et al. Cancer Res, 2010)。一方で、RUNX1 のみを発現させると、*p21* の mRNA の有意な増加は認めなかった。SNF5 と RUNX1 を共に発現させた場合は、mRNA の増加は見られたが、SNF5 単独の時と比較して抑制的であった。RUNX1 は *p21* 遺伝子に対して転写活性を抑制的に制御するという報告があり、SNF5 が存在しているときには RUNX1 によって抑制効果が見られたが、SNF5 の非存在下では RUNX1 の機能は十分ではない可能性が示唆され、SNF5 の存在している SWI/SNF 複合体と、SNF5 の存在していない SWI/SNF 複合体とでは RUNX1 との機能協調に差が見られることがわかった。

3: *p21* 遺伝子のプロモーター領域における SNF5、RUNX1 の影響についての、ルシフェラーゼアッセイによる評価

2の結果が、*p21* 遺伝子のプロモーターに対する直接的な作用であるかを検討するために、*p21* 遺伝子のプロモーター領域 (-3kb ~ TSS) を pGL3 に挿入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。A204 細胞に SNF5 を発現させた場合、ルシフェラーゼ活性は増加したが、RUNX1 のみを発現させた場合は、ルシフェラーゼ活性の有意な増加は認めなかった。SNF5 と RUNX1 を共に発現させた場合は、ルシフェラーゼ活性は増加したが、SNF5 単独の時に比較して、抑制的であった。G401 細胞でも同様の結果が示された。これは *p21* の mRNA の結果と合致しており、*p21* 遺伝子のプロモーター領域において、SNF5 の存在によって RUNX1 の機能が変更されることを示している。

4: RUNX1 と SWI/SNF 複合体と SWI/SNF 複合体との結合の検討

SWI/SNF 複合体は SNF5 が欠損することで、前述のように通常構成している subunit の一部が脱落し不完全な SWI/SNF 複合体となって存在している。SNF5 の存在によって RUNX1 の機能に差が生じているが、この差が RUNX1 と SWI/SNF 複合体と SWI/SNF 複合体との結合における差異に基づくものか同化について、免疫沈降法と Western blot 法で検討した。A204 細胞に RUNX1 または RUNX1 と SNF5 を強制発現させ、48 時間後にタンパクを抽出し BRG1 抗体で免疫沈降し、SNF5 と RUNX1 の抗体を用いて Western blot 法で確認した。結果、SNF5 の存在下では BRG1 抗体によって RUNX1 と SNF5 は共沈降し、SNF5 が存在する SWI/SNF 複合体と RUNX1 は結合していた。また、SNF5 が存在していない条件でも、BRG1 抗体によって RUNX1 は共沈降し、RUNX1 は SWI/SNF 複合体とも結合することが示された。

5: *p21* 遺伝子プロモーター上での RUNX1 と SWI/SNF 複合体または SWI/SNF 複体の DNA への結合に関する評価。

RUNX1 は SWI/SNF 複合体と SWI/SNF 複体のそれぞれと結合することができた。しかし、この結果は細胞全体での結合状態を反映しており、*p21* 遺伝子のプロモーターでの差異を確認したわけではなかった。そこで、*p21* プロモーター上で RUNX1 と SWI/SNF 複合体または SWI/SNF 複体の DNA への結合について ChIP アッセイを用いて評価した。A204 細胞に RUNX1 のみまたは RUNX1 と SNF5 を強制発現させ、48 時間後にホルムアルデヒドを用いてタンパク質-DNA 複合体の共有結合安定化処理を行い、その後細胞をタンパク抽出バッファーで溶解した。その後、超音波処理によるクロマチンの断片化を行い、BRG1 抗体、RUNX1 抗体、SNF5 抗体を用いてそれぞれ免疫沈降した後、DNA を精製した。*p21* プロモーター上の RUNX1 が結合する DNA コンセンサス配列に対して設定したプライマーを用いて、定量 PCR で精製 DNA 産物を定量した。結果、SNF5 の存在しない場合 RUNX1 は SWI/SNF 複合体とともに *p21* プロモーター上の RUNX1 コンセンサス配列に存在するが、SNF5 を発現させると、SNF5 は SWI/SNF 複合体に取り込まれ *p21* プロモーターへリクルートされるが、逆に RUNX1 は *p21* プロモーターから減少していた。*p21* のプロモーターで SNF5 の欠損によって RUNX1 のプロモーターへリクルートメントが変化することが示され、転写活性への差異の原因が示された。

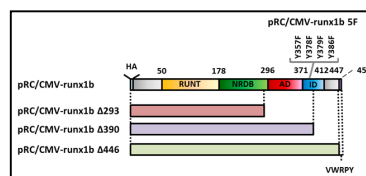
6: RUNX1 と SWI/SNF 複合体への結合を規定している、RUNX1 の構造についての検討。

2012 年 Haung らは、巨核球の分化の系で RUNX1 のチロシン残基のリン酸化が SWI/SNF 複合体との結合についての制御に関与していると報告した。そこで、彼らの報告に基づき RUNX1 の Tyr375、Tyr378、Tyr379、Tyr386 をすべてフェニルアラニンに置換した変異体発現ベクター (Ty5 mutant) と RUNX1 のアミノ酸 293 まで (293)、アミノ酸 390 まで (390)、アミノ酸 446 まで (446) のそれぞれの欠失型変異体発現ベクターを作成した。

これらを用いて SWI/SNF 複合体との結合を、BRG1 抗体で免疫沈降し Western blot 法で確認した。結果、Tyr 残基の変異体である Ty5 mutant では RUNX1 の野生型と同様に SWI/SNF 複合体との結合が確認された。

また、RUNX1 の欠失型変異体の場合、293 と 390 では SWI/SNF 複合体との結合が確認できなかったが、446 では SWI/SNF 複合体との結合が確認できた。

SWI/SNF 複合体との結合には RUNX1 のアミノ酸 390 以降の構造が重要であることが確認されたが、



ラブドイド腫瘍の細胞株を用いた今回の系では、RUNX1 の SWI/SNF 複合体との結合は Tyr 残基のリン酸化による制御を受けていなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1: 栞原康通, 忠垣憲次郎, 奥田司. エンハンサー制御と腫瘍発生. 京都府立医大雑誌 128:69-79, 2018.

〔学会発表〕(計 6 件)

1: 栞原 康通, 近藤則子, 忠垣憲次郎, 山崎健太, 吉田達士, 奥田 司
SWI/SNF クロマチンリモデリング因子と造血系転写因子の機能調節
23 回 造血器腫瘍研究会, 2019 年 1 月, 金沢

2: Yasumichi Kuwahara, Tatsushi Yoshida, Kenjiro Tadagaki and Tsukasa Okuda.
Functional interaction between SWI/SNF complex and a hematopoietic transcription factor in malignant rhabdoid tumor. 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年 9 月, 大阪

3: Yasumichi Kuwahara, Hajime Hosoi, Tsukasa Okuda
Newly established MRT cell lines from multiple sites of a synchronous MRT patient
International Rhabdoid Tumor Meeting(招待講演), 2018 年 4 月, バンフ, カナダ

4: 栞原 康通, 近藤則子, 忠垣憲次郎, 山崎健太, 吉田達士, 奥田 司
クロマチンリモデリング因子 SNF5 と細胞の腫瘍化
22 回 造血器腫瘍研究会, 2018 年 1 月, 横浜

5: Yasumichi Kuwahara, Kenta Yamasaki, Kenjiro Tadagaki, Tatsushi Yoshida, Tsukasa Okuda.
Mechanism of recruitment of SWI/SNF complex via interaction between SNF5 and transcription factor.
2017 年度生命科学系学会合同年次大会(第 40 回日本分子生物学会年会/第 90 回日本生化学会大会), 2017 年 12 月, 神戸

6: 栞原康通. シンポジウム 5 悪性ラブドイド腫瘍. ラブドイド腫瘍の基礎研究の現状と臨床応用に向けた将来展望. 第 58 回小児血液・がん学会学術集会, 2016 年 12 月, 東京

〔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〕

ホームページ等なし

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 奥田 司

ローマ字氏名: Tsukasa Okuda

所属研究機関名: 京都府立医科大学

部局名: 医学(系)研究科(研究院)

職名: 教授

研究者番号(8 桁): 30291587

(2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。