

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06800

研究課題名（和文）がん抑制遺伝子ELF3のアポトーシス抵抗性及び免疫回避機構に及ぼす影響

研究課題名（英文）E74-like factor 3 (ELF3) is a crucial regulator of apoptosis and immune response

研究代表者

鈴木 雅美 (Suzuki, Masami)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員

研究者番号：80434182

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、上皮細胞の最終分化に関する転写因子であるE74-like factor 3 (ELF3) が、細胞の異常（がん遺伝子の発現など）を感知して細胞死を誘導し、がんの発生を抑制している可能性を明らかにした。さらにELF3は、ウイルス感染細胞やがん細胞などの異常細胞を直接殺傷するNK細胞やCD8陽性T細胞を遊走させる因子を増加させることを見出し、ELF3のがん抑制遺伝子としての機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに私たちは上皮細胞の分化に寄与する転写因子である ELF3 が、ファーター乳頭部癌や胆管癌において機能欠損型の遺伝子異常を起こしていることを明らかにしており、がん抑制遺伝子である可能性が示唆されていた。しかしながら、どのようにELF3ががんを抑制しているかといった詳細な機能は明らかにされていなかった。本研究では、ELF3はがん発生の初期に細胞の異常を感知して細胞死を誘導していることや、異常細胞を攻撃する免疫細胞を呼び寄せる働きをしていることを見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, I revealed that E74-like factor 3 (ELF3), a transcription factor involved in the final differentiation of epithelial cells, may induce cell death by sensing cellular abnormalities (such as expression of oncogenes) and suppress cancer development. Furthermore, ELF3 increases the expression of the factors to induce migration of NK cells and CD8-positive T cells, which directly kill abnormal cells such as virus-infected cells and cancer cells, and the function of ELF3 as a cancer suppressor gene was clarified.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん ELF3 免疫応答 がん抑制遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

E74-like factor 3 (ELF3) は、E26 transformation-specific (ETS) 構造を介して DNA に結合する転写因子である。上皮細胞特異的な機能を有することから ESE-1 (epithelium-specific E26 transformation-specific (ETS) transcription factor) とも呼ばれ、上皮細胞の発生の最終段階で発現を増加させ、正常な上皮組織の維持に重要な役割を担う。我々はこれまでに、フアーター乳頭部がんと胆管がんを用いたゲノム解析から ELF3 の不活化変異を見出し、ELF3 の機能低下は、上皮間葉転換を促進する転写因子の発現を増加させ、細胞の遊走/浸潤を引き起こすことを明らかにした (Yachida et al., Cancer Cell, 2016, Nakamura et al., Nat Genet, 2015)。一方、前立腺がんや大腸がんでは ELF3 は高発現し、がんの進展に寄与することも報告されている (Longoni et al., Cancer Res, 2013, Wang et al., Cell Death Dis, 2014)。したがって ELF3 は、細胞内シグナルや微小環境に依存してがん進展の抑制に関わる tumor suppressive な機能と、がんの増殖を促進する oncogenic な機能の二面性を有している。

一般に、「アポトーシス抵抗性」と「免疫回避」は、がん細胞の重要な特性の一つである。アポトーシスは通常、発生や成長段階で細胞を適切に除去することで正常な組織構築を担い、また損傷を受けた細胞や病原体に感染した細胞を除去することで個体を健康な状態に保つメカニズムである。がん細胞は、異常細胞の検知やアポトーシス誘導シグナルを阻害することにより、正常なアポトーシスを妨害している (Mohammad et al., Semin Cancer Biol, 2015)。免疫回避は、自己寛容の維持と生理的な免疫応答における副次的な損傷を回避するために免疫系に組み込まれたメカニズムであり、免疫チェックポイントと呼ばれる分子の活性化により制御されている。がん細胞は、この免疫チェックポイント制御機構を使って宿主の免疫系を回避していると考えられており、近年、免疫チェックポイント阻害剤の開発とその臨床応用により、その効果予測やバイオマーカー探索など精力的な研究が行われている。

## 2. 研究の目的

我々の解析では、前癌病変においても ELF3 の不活化変異が認められており、ELF3 は founder mutation としてがんの発生に寄与していることが示唆される。すなわち、ELF3 はアポトーシスや免疫を制御し、癌の発生段階における異常な細胞の排除する役割を担っている可能性が考えられる。そこで本研究では、ELF3 が「アポトーシス抵抗性」や「免疫回避」に寄与するか否かを明らかにし、ELF3 のがん抑制遺伝子としての機能を追究する。

## 3. 研究の方法

CRISPR-Cas9 システムにより ELF3 を遺伝子欠損したヒト正常胆管上皮細胞 (HBDEC2 ELF3KO) に、がん遺伝子 (human papillomavirus type 16 E6 and E7, MYC<sup>T58A</sup>, HRAS<sup>G12V</sup> (EMR)) をドキシサイクリン依存的に発現調節 (tetOFF) することが可能な HBDEC2 ELF3KO-EMR 細胞を作製した。さらに HBDEC2 ELF3KO-EMR 細胞を用いて、ELF3 と estrogen receptor ligand-binding domain (ERT2) の融合遺伝子を導入し、タモキシフェンにより ELF3 が活性する細胞 (HBDEC2 ELF3KO-EMR ELF3-ERT2 細胞) を作製した。そこでこれらの細胞を用いて RNA-seq 解析を行った。さらにドキシサイクリンを培地から除くことでがん化させた胆管上皮細胞に 4-O-タモキシフェンを処置し、タイムラプス顕微鏡を用いて細胞形態を観察した。これらの細胞をヌードマウスの皮下に移植し、造腫瘍性の解析を行った。

## 4. 研究成果

ELF3 活性を制御したヒト胆管がん細胞株 (HBDEC2 ELF3KO-EMR ELF3-ERT2 細胞) を用いてトランスクリプトーム解析を行い、ELF3 の活性化に伴い遺伝子発現が 2 倍以上増加する遺伝子群を用いて DAVID 解析を行った。その結果、これまでにヒト正常胆管上皮細胞で明らかにした ELF3 による細胞接着や免疫反応の制御に加え、がん化させた胆管上皮細胞株では、ELF3 の活性化により細胞死や脂質代謝に関連する遺伝子の発現が増加していた。また、がん化させた胆管上皮細胞に 4-O-タモキシフェンを処置し ELF3 を活性化させた影響についてタイムラプス顕微鏡を用いて細胞形態を観察したところ、ELF3 の活性化により細胞質に複数の空胞化を伴う細胞死が認められた。これらのことから、正常上皮胆管細胞にがん遺伝子を導入することによりがん化したヒト胆管がん細胞株では、ELF3 が活性化することにより、細胞死が引き起こされることが明らかになった。さらにこれらの細胞をマウスの皮下に移植することにより、ELF3 の発がんに対する影響を *in vivo* で解析した。まず、がん遺伝子を発現させた細胞を移植することでマウスの皮下に細胞を生着させ、tumor volume が 150-200 平方ミリメートルに達するまで腫瘍を増大させた。次にドキシサイクリン処置を開始し、腫瘍径の計測が不能となるまで腫瘍を退縮させ、皮下組織において正常胆管上皮細胞による腺管構造を形成させた。その後、ドキシサイクリン処置を終了すると同時に、タモキシフェン処置により ELF3 を活性化させた群と vehicle を処置した対照群に分別し、がん遺伝子の発現に伴う腫瘍形成に対する ELF3 の影響について観察を行った。その結果、対照群では腫瘍の増大が認められたのに対し、ELF3 を活性化させた細胞では認められなかった。これらの結果から、ELF3 は発がんの過程で細胞増殖を抑制する働きを有している可能性が示唆された。次に ELF3 が直接的に発現制御する免疫関連因子の同定を行った。HBDEC2 ELF3 KO 細胞と野生型細胞を用いて tetOn による ELF3 を過剰発現させた細胞を作製し、遺伝子発現解析を行った。さらに、ELF3 過剰発現細胞を用いて ELF3 の特異的抗体による ChIP-Seq 解析を行い、KO 細胞と過剰発現細胞の遺伝子発現変動と照合し、ELF3 が直接的に結合することで発現制御すると考えられる 53 遺伝子を抽出した。これらを用いて pathway 解析を行ったところ、defense response、inflammatory response、positive regulation of cell migration において有意差が認められ、いずれも免疫細胞の遊走を制御する因子の発現に関わっていることが明らかとなった。そこで、好中球を遊走させるロイコトリエン B4 の産生酵素である 5-リポオキシゲナーゼ (ALOX5)、活性化 T 細胞の遊走に寄与するケモカインである CXCL16 (CXCL16)、上皮細胞と免疫細胞の接着に関わる integrin beta2 (ITGB2) に着目し、ChIP assay を行ったところ、ELF3 がこれらの遺伝子に直接的に結合していることを明らかにした。以上のことから、ELF3 は、発がんの過程で細胞死を誘導するだけでなく、免疫細胞の遊走にも関わっている可能性が考えられ、ELF3 の機能低下は発癌に寄与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horie M, Tanaka H, Suzuki M, Sato Y, Takata S, Takai E, Miyashita N, Saito A, Nakatani Y, Yachida S	4. 巻 114
2. 論文標題 An integrative epigenomic approach identifies ELF3 as an oncogenic regulator in ASCL1 positive neuroendocrine carcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2596-2608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15764.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yachida S, Totoki Y, Noe M, Nakatani Y, Horie M, Kawasaki K, Nakamura H, Saito-Adachi M, Suzuki M, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Comprehensive genomic profiling of neuroendocrine carcinomas of the gastrointestinal system.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 692-711
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/2159-8290.CD-21-0669.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Suzuki M, Saito-Adachi M, Arai Y, Horie M, Shibata T, Kiyono T, Yachida S
2. 発表標題 E74-like factor 3 is a crucial regulator of epithelial integrity and immune response genes
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年～2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------