

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22890157

研究課題名（和文） hSNF5 の標的遺伝子の同定とその転写制御メカニズムの解明

研究課題名（英文） The determination of the hSNF5 target genes and the clarification of the transcriptional mechanism of hSNF5

研究代表者

栗原 康通 (KUWAHARA YASUMICHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：30590327

研究成果の概要（和文）：

悪性ラブドイド腫瘍（malignant rhabdoid tumors ; MRT）は主に 1 歳未満の乳幼児に発症するきわめて予後の悪い小児固形腫瘍のひとつである。hSNF5 遺伝子の異常は MRT に共通する異常であり、hSNF5 の欠損は MRT の腫瘍形成などに関与している。そのため、hSNF5 の機能解析は重要な課題である。われわれは hSNF5 は p21 のプロモーターへ直接リクルートされ、p21 の転写を促進し、p21 の発現増加によって細胞周期を制御することを報告した。しかし、hSNF5 発現による p21 の転写活性化の機序の詳細は明らかになっていない。今回、hSNF5 による p21 転写制御機構の詳細と p53 標的遺伝子の発現を解析したので報告する。MRT 細胞株に、アデノウイルスベクターを用い hSNF5 を導入した。クロマチン免疫沈降法（ChIP）によりプロモーターでのヒストン修飾、転写関連因子の変化を解析した。また、レンチウイルスを用いた shRNA で p53 をノックダウンした。hSNF5 は p21 プロモーター転写開始点に直接結合し、BRG1 など SWI/SNF 複合体を誘導する。さらに、RNA ポリメラーゼ II が誘導され、H3K4me3、H3K36me3 が増加することから、転写開始反応、伸張反応が活性化されていることが明らかになった。また、hSNF5 による p21 の転写活性化には p53 依存性または非依存性の機序が存在した。さらに hSNF5 はアポトーシス関連 p53 標的遺伝子の発現に関与していたが、細胞により影響される遺伝子は異なっていた。hSNF5 は p21 のほかにも p53 標的遺伝子の転写制御に直接関与している。MRT では hSNF5 欠損により p53 標的遺伝子の発現が影響を受け、細胞周期、アポトーシスの制御に影響していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Malignant rhabdoid tumor (MRT), a highly aggressive cancer of young children, displays inactivation of the hSNF5 gene in primary tumors and cell lines. We have previously reported that reexpression of hSNF5 in MRT cell lines causes a G1 arrest via p21WAF1/CIP1 (p21) mRNA induction. However, the mechanisms of p21 promoter activation by hSNF5 remain unclear.

Because p21 is a transcriptional target of the p53 tumor suppressor gene, we determined the role of p53 in hSNF5-induced p21 activation. We reexpressed hSNF5 in the A204 and TTC642 MRT cell lines, with or without stable knockdown of p53 expression, using adenoviral vectors expressing either hSNF5 and GFP or GFP. While loss of p53 expression significantly inhibited p21 transcriptional activity induced by hSNF5 in A204 cells at 24 hours, it did not alter its activity by hSNF5 after 24 hours in the TTC642 cells. These results suggested that the up-regulation p21 transcription by hSNF5 operated through p53-dependent and -independent mechanisms in the A204 and TTC642 cell lines, respectively. Next, we used chromatin

immunoprecipitation (ChIP) analysis of the p21 promoter to determine where hSNF5 appeared at the p21 promoter and whether its recruitment altered binding of other transcription factors or the chromatin landscape. Our results indicated that reexpressed hSNF5 binds within 1 kb of transcript start site (TSS), with maximal enrichment at the TSS in both cell lines. Furthermore, histone acetyltransferases (HATs), RNA polymerase II (RNAPII), and BRG-1 are assembled with p53 and CDK8 (co-activator of p53 transcriptional program) by reexpression of hSNF5 in A204 cells. In contrast, while p53 and CDK8 occupancy did not change after hSNF5 reexpression in the TTC642 cells, HATs, RNAPII, and BRG-1 levels increased at the p21 promoter. These findings correlated with the results of p53 knock-down experiments. Furthermore, histone H3K36 tri-methylation increased downstream of the TSS in both cell lines. These results suggested hSNF5 regulates the initiation activity of the p21 promoter by either itself or p53 recruitment, resulting in the mRNA elongation. Our findings demonstrate that while induction of p21 transcription by hSNF5 in A204 cells depends on p53, it occurs independently of p53 in TTC642 cells. The lack of dependence upon p53 appears to extend to other MRT cell lines tested in our laboratory. Furthermore, our results suggest that hSNF5 may alter p21 transcriptional initiation by itself or through the recruitment of other uncharacterized transcription factors.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,220,000	366,000	1,586,000
平成 23 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,270,000	681,000	2,951,000

研究分野：小児腫瘍学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：ラブドイド腫瘍、hSNF5、NOXA

#### 1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA は、ヒストン八量体の周りを DNA が巻きついたヌクレオソームを基本単位としたクロマチン構造を形成している。遺伝子が転写され、発現するには転写因子などのプロモーター領域へのアクセスが必須であり、クロマチン構造の変化が重要である。この変化に関与するのが DNA のメチル化、ヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化、ATP 依存性クロマチンリモデリング複合体などで、これらが密接に関与し様々なタンパク質の転写を制御する。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 サブユニットである BRG1 (または BRM)、さらに hSNF5 (別名 INI1)、BAF155 や BAF170 など約 10 種類のタンパクから構成されている。近年、これら SWI/SNF 複合体のサブユニットの欠損が肺がんなど様々ながんで確認され、がんの発生に関与しているという報告が相次いでいる

(Cancer Res 69:8223-30, 2009).

なかでも、hSNF5 遺伝子の欠失、変異に起因する hSNF5 の欠損は悪性ラブドイド腫瘍 (malignant rhabdoid tumors ; MRT) にみられ、家族性の MRT ではその 25% に hSNF5 の germline mutation がみられる (Cancer Biol Ther 8:412-6,2009)。さらに、hSNF5 のノックアウトマウスの系では hSNF5 -/- マウスは胎生期に全滅し、hSNF5 +/- マウスではマウスのラブドイド腫瘍を生後 11 ヶ月で約 20% に発生する。したがって、hSNF5 は単独でがん抑制遺伝子と認識されている (PNAS 97:13796-800, 2000, Cancer Cell 2:415-25,2002)。hSNF5 の機能に関する報告がいくつかあり、hSNF5 が失われることが p16 の抑制、E2Fs やサイクリン D の増加を介して細胞周期の進行を促進し、細胞増殖に関与しているというもの (Oncogene 21:5193-203, 2002, Oncogene 25:722-734, 2006, Mol Cell Biol 28:3457-64, 2008, )、また RhoA を介して細胞の転移に関係している

といったものである (Cancer Res 68:6154-61, 2008). しかし、hSNF5 の機能が解明された状態ではない。一方で、MRT は 1 歳未満の乳幼児に発症するきわめて予後の悪い小児固形腫瘍のひとつで、主に脳や腎臓、軟部組織に発生する。MRT は治療法が進歩した現在であっても 4 年生存率は非進行例で 41.8%、進行例では 15.9%、特に 6 ヶ月未満発症例では 8.8% と悲劇的である (J Clin Oncol 23:7641-5, 2005)。しかし、その発生機序、増大、浸潤する病態は十分解明されておらず、有効な治療法は確立していない。hSNF5 遺伝子の異常は MRT に共通する異常であるので、hSNF5 の機能解析は MRT の病態の解明につながり、最終的に MRT に対する有効な治療法の確立につながると考えている。また、最近 hSNF5 の欠損は家族性 schwannomatosis (Clin Genet 74:358-66, 2008)、メラノーマ (Clin Cancer Res 15:6404-11, 2009) や悪性 epithelioid 腫瘍 (Am J Surg Pathol 33:542-50, 2009)、腎髄質癌 (Mod Pathol 21:647-52, 2008) でも認め、hSNF5 の欠損と腫瘍発生の機序を明らかにすることは難治性の腫瘍の病態を解明する可能性もある重要な課題である。

## 2. 研究の目的

ヌクレオソーム構造を変化させ転写を制御する因子として同定された SWI/SNF 複合体のサブユニットである hSNF5 は癌抑制遺伝子と認識され、きわめて予後の悪い小児悪性腫瘍、悪性ラブドイド腫瘍 (MRT) のほぼ 100% で発現が欠損する。MRT の発生など病態は十分解明されておらず、有効な治療法は確立していない。hSNF5 の機能解析は MRT のエピソード的な病態解明につながり、最終的に MRT に対する有効な治療法の確立につながる。我々はヒト MRT 細胞株を用いて hSNF5 の標的遺伝子を同定し、その遺伝子の転写制御への hSNF5 の関与の機構を解析する。

## 3. 研究の方法

MRT 細胞株にアデノウイルスベクターを用いて hSNF5 遺伝子を強制発現させ、標的遺伝子の候補を PCR expression array を用いて同定する。それぞれの候補遺伝子の mRNA、タンパクの発現を real-time PCR、western blot で確認し、標的遺伝子を確認する。さらに、hSNF5 の標的遺伝子のプロモーター領域への発現を、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を用いて同定するとともに、RNA ポリメラーゼや転写因子のリクルートを評価する。さらに、hSNF5 のプロモーターでのヒストン化学修飾、その他の SWI/SNF 複合体の因子 (BAF155, BAF180, BAF57, BRG1 など) の発現に

及ぼす影響を同定する。つづいて、shRNA を組み込んだレンチウイルスベクターを作成し、標的遺伝子をノックダウンすることで、MRT 細胞株における、標的遺伝子の役割を同定し、分子標的療法の新規ターゲットに適切であるか評価する。

## 4. 研究成果

### 1 : p21プロモーターにおけるhSNF5の転写制御の機構の解明

MRT細胞株にアデノウイルスベクターを用いてhSNF5遺伝子を強制発現させ、p21プロモーターで転写開始点を中心に前後3kbにわたった領域で、導入したhSNF5の分布をChIPアッセイで行った。hSNF5はp21プロモーターで転写開始点をピーク全領域に発現していることがわかった。また、BRG-1は全領域で均等に上昇していた。hSNF5を発現することでSWI/SNF複合体がp21ローカスに集合し、RNAポリメラーゼIIが転写開始点にリクルートされていた。ヒストン修飾に関してはH3K4のメチル化、H3K36のメチル化の変化を確認した。トリメチル化H3K4は転写開始点周辺で上昇し転写開始段階の活性化を示した。また、トリメチル化H3K36は転写開始点以降で増加し転写伸張の活性化が起こっていることを示した。P21に関係する転写因子であるp53に関してはA204では増加しCDK8もリクルートされていたが、TTC642では増加は示さなかった。hSNF5によるp21の転写活性化にはp53をリクルートを伴わない機構が存在することが明らかになった。

### 2 : p53の標的遺伝子におけるhSNF5の新規標的遺伝子の同定 : NOXAを中心に

MRTの細胞株6種で、NOXA遺伝子の発現を確認するとやはり低発現であった。PUMAなどその他のp53関連遺伝子の発現は細胞株でまちまちであった。そこで、NOXAが重要と考えた。MRT細胞株ではNOXA mRNAの発現が低く、hSNF5の発現に伴って速やかにmRNAとタンパクが増加した。ChIPで検討したところ、hSNF5はNOXAプロモーター転写開始点に直接結合し、BRG1などSWI/SNF複合体を誘導し、さらに、RNAポリメラーゼIIが誘導され、H3K4me3、H3K36me3が増加することから、転写開始反応、伸張反応が活性化されていることが明らかになり、MRTでのNOXAの転写抑制にpausingがかかっていることが示唆された。NOXAはアポトーシス関連遺伝子であり、ラブドイド腫瘍の化学療法体制のメカニズムの解明と有効な治療法の確立に向けて意義のある結果が今後、期待できる。

## 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 : Sensitivity of malignant rhabdoid tumor cell lines to PD0332991 is inversely correlated with p16 expression  
Katsumi Y, Iehara T, Miyachi M, Yagyu Y, Tsubai-Shimizu T, Kikuchi K, Tamura S, Itoh H, **Kuwahara Y**, Tsuchiya K, Kuroda H, Sugimoto T, Houghton PJ, Hosoi H  
*Biochem Biophys Res Commun* 413 62-68, 2011

〔学会発表〕 (計 6 件)

1 : Reexpression of hSNF5 regulates the transcriptional activity of the p21 promoter through p53 dependent or independent mechanisms in malignant rhabdoid tumors.

**Kuwahara Y**, Durand J, Weissman BE  
102th American Association for Cancer Research Annual Meeting 2011 年 4 月, Orlando, Florida

2 : 悪性ラブドイド腫瘍細胞株において hSNF5 は p21 を介して細胞周期を制御する  
葉原康通, Bernard Weissman, 細井 創  
第 26 回日本小児がん学会学術集会  
2010 年 12 月, 大阪

3 : 悪性ラブドイド腫瘍細胞株における hSNF5 による p53 標的遺伝子の発現制御  
**葉原康通**, Bernard Weissman, 細井 創  
平成 22 年度日本ウィルムス腫瘍スタディ (JWiTS) 研究会 2011 年 1 月, 東京

4 : hSNF5 は p53 依存性機序と p53 非依存性機序で p21 の転写を制御する  
**葉原康通**, Bernard Weissman, 細井 創  
第 5 回日本エピジェネティック研究会年会  
2011 年 5 月, 熊本

5 : 悪性ラブドイド腫瘍細胞株における hSNF5 による p53 標的遺伝子の発現制御のメカニズム  
**葉原康通**, Bernard Weissman, 細井 創  
第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会 2011 年 11 月, 前橋

6 : Malignant Rhabdoid Tumor (悪性ラブドイド腫瘍: MRT) の最新治療と今後の課題 : COG、EU の現況をふまえて  
**葉原康通**, 勝見良樹, 土屋邦彦, 家原知子, 細井 創  
平成 23 年度日本ウィルムス腫瘍スタディ (JWiTS) 研究会 2012 年 1 月, 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

葉原 康通 (KUWAHARA YASUMICHI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号 : 30590327