

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17684

研究課題名(和文)大腸癌におけるSWI/SNF複合体の癌制御機能の解明

研究課題名(英文)Functional elucidation of SWI/SNF complex in colorectal cancer

研究代表者

三代 雅明(Miyo, Masaaki)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：70645077

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):パブリックデータベースを用いた解析の結果、癌の発生や進行に深く関与するいくつかの遺伝子のプロモーター、エンハンサー領域において既知のSWI/SNF複合体サブユニットと癌関連転写因子と共局在していることを明らかにした。そこでこの転写因子と、SWI/SNF複合体サブユニット(SMARCA4, C1, C2, ARID1A)に対する抗体を用いて共免疫沈降実験を行ったところ、今後再現性も含め、更なる検討の余地があるものの、この転写因子がSWI/SNF複合体の新規サブユニットである可能性を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SWI/SNF複合体は多数の腫瘍でそのサブユニットの遺伝子変化が報告され、癌の発生や進行に深く関与していることが示唆されている。しかしながら、癌制御のメカニズムについては依然として不明な点が多く、未知のサブユニットの存在も示唆されている。本研究ではSWI/SNF複合体の新たなサブユニット候補として癌関連転写因子を同定することに成功しており、新たなSWI/SNF複合体のサブユニットを標的とした新規の癌マーカーや治療法の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文):The public database analysis revealed that the subunit of SWI/SNF complex such as SMARCA4, SMARCC1 co-localized with a certain cancer-associated transcription factor (TF) in promoter and enhancer regions of several cancer-related genes. Therefore, we performed co-immunoprecipitation experiments using antibodies against the TF and the subunit of SWI/SNF complex (SMARCA4, C1, C2, ARID1A). As a result, the precipitants by the antibody against the subunit of SWI/SNF complex (SMARCA4, C1, C2, ARID1A) contained this TF. On the other hand, the precipitants by the antibody raised against the TF somehow did not contain the subunit of SWI/SNF complex (SMARCA4, C1, C2, ARID1A). This might be because the TF makes complex with so many molecules. Therefore, although further investigation is required, our results suggest the possibility that this cancer-associated TF may be a new subunit of SWI/SNF complex.

研究分野：消化器外科

キーワード：SWI/SNF複合体 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

癌の発生と進行には、遺伝子の変化だけでなく DNA のメチル化・ヒストン修飾・ヌクレオソームのポジショニングなどのエピジェネティクス異常も関与しており、画期的な創薬の鍵を握ると期待されている。近年、エピジェネティクス変化を生じさせるクロマチンリモデリング因子の1つである SWI/SNF (Switch/Sucrose Non-Fermentable) 複合体についての研究が盛んに行われるようになってきた。SWI/SNF は、アデノシン三リン酸 (ATP) 加水分解のエネルギーを利用してプロモーターとエンハンサーの両方の領域においてヌクレオソームを除去、あるいは移動させることでクロマチン構造を変化させるマルチサブユニット複合体であり、DNA にヒストン修飾因子や転写調節因子を誘導し、遺伝子発現を調節することで、分化や増殖などのさまざまな細胞プロセスに関与している。SWI/SNF 複合体は複合体を構成する分子の組み合わせによって canonical BAF (BRG1/BRM-associated factor), PBAF (polybromo-associated BAF), non-canonical BAF (ncBAF or GBAF) の3種類が知られており、複合体を構成する分子には3種類全てに含まれる SMARCA2, A4, B1, C1 や canonical BAF のみに含まれる ARID1A, 1B, PBAF のみに含まれる ARID2, PBRM1、non-canonical BAF のみに含まれる GLTSCR1, BRD9 などがある。多数の腫瘍で SWI/SNF 複合体サブユニットの遺伝子変化が同定され、SWI/SNF が癌の発生や進行に深く関与していることが示唆されているが、そのメカニズムに関しては十分には明らかにされていない。また、未だ同定されていない癌制御に関連する重要なサブユニットが他にも存在する可能性も指摘されている。したがって、SWI/SNF による癌制御メカニズムを複合体の構成から究明することにより、クロマチンリモデリングの観点からの新規治療法の開発につながることを期待される。

2. 研究の目的

SWI/SNF 複合体は、プロモーター領域やエンハンサー領域といった転写活性化エレメントにおいてヌクレオソームを除去、移動させることによってクロマチン構造を変化させるマルチサブユニット複合体である。クロマチン構造変化に伴い、ヒストン修飾因子や転写調節因子が誘導され、遺伝子発現が調節される。SWI/SNF 複合体が癌制御に重要であることを示す報告の例として、SWI/SNF 複合体のサブユニットである SMARCB1 は小児ラブドイド腫瘍で不活性化されており、SMARCB1 が消失することで SWI/SNF のエンハンサーへの結合が低下することから腫瘍抑制因子として機能していることが報告されている。またサブユニットの1つである ARID1A の変異腫瘍において ARID1B が治療ターゲットとなりえることが報告されている。このように SWI/SNF の既知のサブユニットの癌関連機能の解明が進められつつ、現在 EZH2・SMARCB1・SMARCA4 の遺伝子異常を伴う進行再発固形癌に対する Tazemetostat の phase II study も National Cancer Institute 主導で進行中であり、SWI/SNF は臨床応用に向けて非常に期待されている分子の1つである。しかしながら、SWI/SNF 複合体による癌制御メカニズムにはまだ明らかになっていない部分も多く、未知のサブユニットの存在も示唆されている。そこで本研究の目的は SWI/SNF による癌制御機構を複合体の構成から究明し、クロマチンリモデリングの観点からの新規治療法の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

1. パブリックデータベース解析による SWI/SNF 複合体の新たなサブユニットの探索

パブリックデータベース (ChIP Atlas: <https://chip-atlas.org/>等) を用いた *in silico* 解析を行い、癌の発生や進行に深く関与するいくつかの遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域において既知の SWI/SNF 複合体と共局在している分子を探索した。

2. SWI/SNF 複合体の新たなサブユニット候補分子 X と既知の SWI/SNF 複合体サブユニットとの結合についての検討とノックダウン実験による分子 X, SWI/SNF 複合体の標的分子の探索

パブリックデータベース解析によって絞り込んだ SWI/SNF 複合体の新たなサブユニット候補分子 X と既知の SWI/SNF 複合体サブユニットとの結合を分子 X の抗体、SWI/SNF 複合体サブユニット (SMARCA4, C1, C2, ARID1A) の抗体を用いた共免疫沈降法によって検討した。細胞株は大腸癌細胞株 SK-CO-1 を用いた。また分子 X や SWI/SNF 複合体サブユニット (SMARCA4, C1, C2) のノックダウン実験を行い、分子 X と SWI/SNF 複合体によって発現が制御される遺伝子についても検討した。

4. 研究成果

まず始めに、パブリックデータベース (ChIP Atlas: <https://chip-atlas.org/>等) を用いた *in silico* 解析を行い、癌の発生や進行に深く関与するいくつかの遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域において既知の SWI/SNF 複合体サブユニットと共局在している分子を探索した。その結果、SWI/SNF 複合体の新たなサブユニット候補分子として、X を同定した。図 1 に例を示すように、分子 X と SWI/SNF 複合体サブユニットのピークがいくつかの遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域において一致していた。

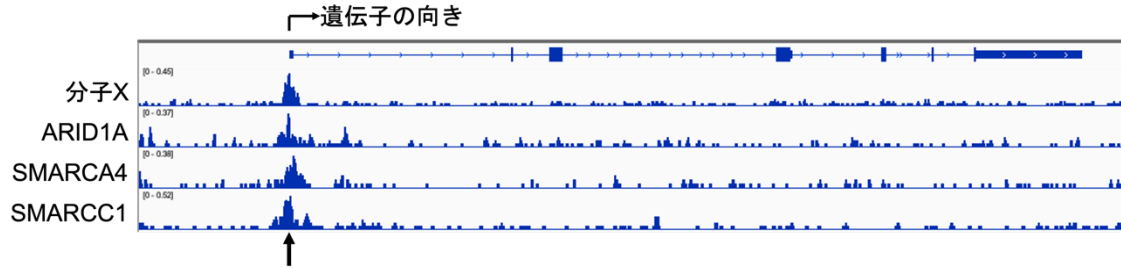


図 1. ChIP Atlas による解析の結果、ある遺伝子のプロモーター上で分子 X と SWI/SNF 複合体サブユニットのピークが一致しており (矢印)、分子 X が SWI/SNF 複合体の新規サブユニットである可能性が示唆された。

続いて、大腸癌細胞株 SK-CO-1 を用いて、分子 X と既知の SWI/SNF 複合体サブユニットとの結合を共免疫沈降法によって検討した。分子 X の抗体、SWI/SNF 複合体サブユニット (SMARCA4, C1, C2, ARID1A) の抗体で免疫沈降を行い、ウェスタンブロットにてタンパク結合の有無を検討した。その結果、抗 SMARCA4, C1, C2, ARID1A 抗体で免疫沈降した際には分子 X を検出できた (図 2)。

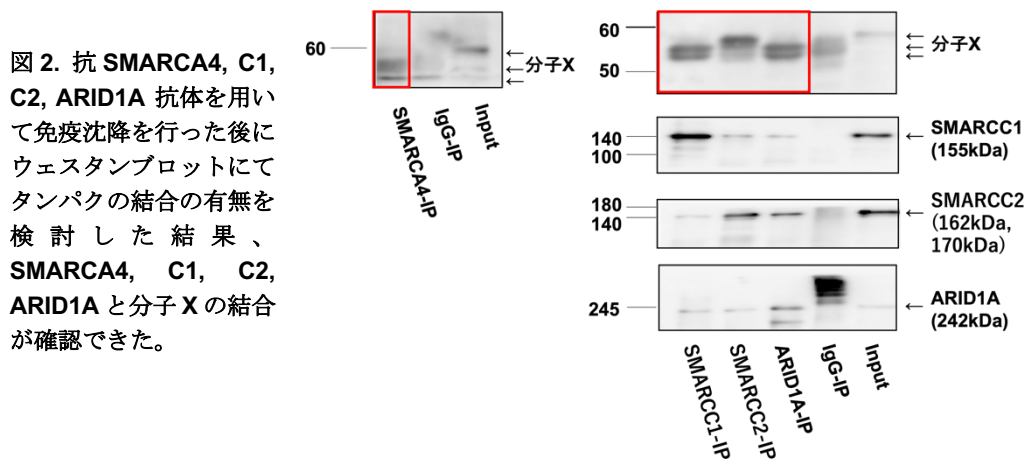


図 2. 抗 SMARCA4, C1, C2, ARID1A 抗体を用いて免疫沈降を行った後にウェスタンブロットにてタンパクの結合の有無を検討した結果、SMARCA4, C1, C2, ARID1A と分子 X の結合が確認できた。

一方、抗タンパク X 抗体で免疫沈降した際には SMARCA4, C1, C2, ARID1A を検出することができなかった (図 3)。そのため、今後再現性も含め、SWI/SNF 複合体と分子 X の direct binding については更に検討の余地がある。また大腸癌細胞株を用いて SWI/SNF 複合体サブユニット (SMARCA4, C1, C2) や分子 X のノックダウン実験を行い、SWI/SNF 複合体によって発現が制御される遺伝子についても検討し、再現性の検証を行なっているところである。

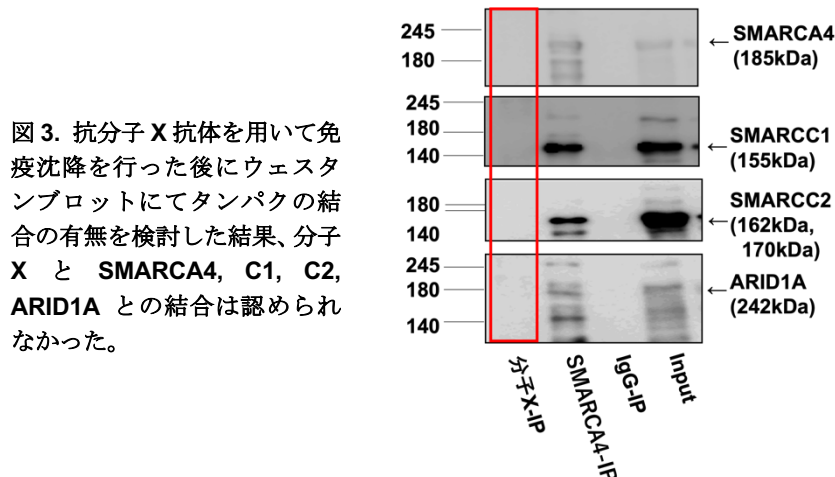


図 3. 抗分子 X 抗体を用いて免疫沈降を行った後にウェスタンブロットにてタンパクの結合の有無を検討した結果、分子 X と SMARCA4, C1, C2, ARID1A との結合は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------