

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501311

研究課題名(和文) 乳がん細胞におけるEMT制御因子のシストローム解析

研究課題名(英文) Cistromic analysis of EMT regulators in breast cancer cells

## 研究代表者

鯉沼 代造 (Koinuma, Daizo)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80375071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では乳腺上皮細胞の上皮間葉転換EMTにおける遺伝子発現変化を次世代シーケンサーを用いたRNA-seqにより解析するとともに、オープンクロマチン領域の変化につきFAIRE-seqを用いてデータ取得を行った。その結果発現変動を受けるnon coding RNAなどの新規転写産物を同定した。このうちlncRNA-Smad7の抗アポトーシス作用を見いだした。また乳腺上皮細胞に恒常活性RASを発現させTGF- $\beta$ によりEMTを起こす細胞ではオープンクロマチン領域に違いが生じることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Transcriptomic analysis was performed by RNA-seq during EMT of mammary epithelial cells. We found a list of differentially expressed non-coding RNAs during this process. We identified lncRNA-Smad7 as an anti-apoptotic non-coding RNA. A FAIRE-seq dataset was also obtained and we observed promising data showing the dynamic changes in the open chromatin regions during EMT.

研究分野：分子病理学、腫瘍生物学、ゲノム科学

キーワード：FAIRE-seq シグナル伝達 EMT 乳がん TGF-beta ZEB1 アポトーシス ゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

上皮間葉転換(EMT)はその発生・分化における役割のみならず、がん細胞の運動能獲得・浸潤・転移への関与が指摘されている。またがん幹細胞の特性との関係も報告される。このようにがん細胞における EMT の制御機構を明らかにすることはその病態のメカニズムを理解するうえで重要である。EMT は transforming growth factor- (TGF-) や Hepatocyte growth factor (HGF) をはじめとする細胞外からのシグナルにより誘導される。そのメカニズムとしては ZEB1/2, Snai1/2, Twist などといった多くの転写因子・調節因子の発現制御が知られ、これらによる E-cadherin の発現抑制と共に N-cadherin, fibronectin などの発現が誘導される。一方で細胞種によって、これら EMT 誘導性の転写因子のどれに依存しているのか異なるということも、loss of function をはじめとした種々の検討により明らかになっている。

研究代表者は、EMT 制御分子の中で ZEB1/2 が種々の乳がん細胞で細胞外からのシグナルの制御を離れ、恒常的に高発現してがん細胞の EMT 形質維持に働いていること、その新たなメカニズムとして RNA 結合蛋白 ESRP の発現抑制による選択的スプライシング制御があることを報告した(Horiguchi et al, Oncogene, 2012)。この検討では ZEB1 の発現と特定の乳がんの組織型との関係が認められたほか、他のがん組織においても予後を含めた関係が指摘されるなど、その重要性が特に示唆される EMT 制御分子の一つであると考えられる。一方で正常乳線上皮細胞での TGF- による EMT においては、ZEB1 の誘導は比較的その後期に見出されることから、ZEB1 発現に先立ちその EMT 誘導に役割を果たす未知の制御因子の存在が示唆される。

近年急速に確立して普及した次世代シーケンサーの活用により、ChIP-seq による網羅的な転写因子結合部位と標的遺伝子の同定や、RNA-seq による遺伝子発現解析、さらにゲノム resequencing による解析も可能になった。研究代表者はこのほか高密度タイリングアレイと合わせ、これまでに同手法を活用して、TGF- シグナルの主たる細胞内伝達分子 Smad2/Smad3 (Smad2/3) や、Smad4 の上皮細胞での結合部位を同定、報告した(Koinuma et al, Mol Cell Biol 2009; Koinuma et al, Cancer Sci 2009)。網羅的結合部位同定によってはじめて、その結合部位に濃縮する DNA 配列から Smad2/3 の作用を修飾する転写因子 ETS1 や TFAP2A の役割を発見した。さらに肝臓がん細胞株での結果との比較により、Smad2/3 結合部位が細胞種によって大きく異なること、肝細胞特異的な制御分子の一つとして Hepatocyte nuclear factor-4 があることを報告した(Koinuma et al, J Biol Chem 2011)。この解析では、がん細胞特異的な Smad2/3 結合・機能修飾プロセスの存在も示唆された。同様の手法を用いて TGF- ファミ

リーの一つ BMP の下流因子 Smad1/Smad5 についても、その結合配列を定義するとともに、細胞種特異的な結合部位の同定を行った(Morikawa et al, Nucleic Acids Res, 2011)。このように転写因子の結合部位などの情報をもとにその機能発揮に重要な新たな制御因子の存在を予測する、「シストローム」の解析はがん細胞をはじめ細胞種特異的な EMT のメカニズムを理解する上でも有効であると考えられる。

## 2. 研究の目的

こうした背景により本研究では、正常乳線上皮細胞の EMT に伴うトランスクリプトームの変化を RNA-seq により解析するとともに、FAIRE-seq を用いてオープンクロマチン領域の変化を解析することで、確立したシストローム解析手法を用いて既知または新規の EMT 制御因子群の同定と役割の解析を行う。解析においては乳がん細胞で高発現が認められる ZEB1 の ChIP-seq による結合部位との比較を行って、相互の関係およびそれらによる転写制御機構の解析を行う。これらの検討により、乳がん細胞に特に着目した EMT 制御機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、正常乳線上皮細胞の EMT に伴う遺伝子発現変化と乳がん細胞での遺伝子発現との比較を RNA-seq により定量的に比較解析するとともに、FAIRE-seq に向けた条件検討と EMT に伴う変化についてデータ取得を行う。合わせて ZEB1 ChIP-seq データ取得を行う。これらの解析を通して得られた乳がん細胞の EMT 制御因子群の働きについて、gain of function や loss of function による検討を行った。

## 4. 研究成果

平成 24 年度は正常乳線上皮細胞の TGF- による EMT に伴う遺伝子発現変化を RNA-seq により網羅的に検討した。その結果刺激により大きく発現変動を受ける、non coding RNA を含む新規転写産物群を同定した。またある lincRNA についてはクローニングを行い、さらに siRNA によるノックダウンの系を樹立してその役割について検討した。さらに乳がん細胞での遺伝子発現変化についてもサンプルを取得し、RNA-seq のデータ取得準備を行った。また網羅的なオープンクロマチン領域の変化を乳がん細胞と比較するため、FAIRE-seq によりデータを取得した。

平成 25 年度は乳がん細胞で RNA-seq データを取得した。FAIRE-seq データの解析結果との比較から、EMT 能獲得の前後におけるオープンクロマチン領域の変化領域における DNA 配列の特徴を網羅的に検討し、近傍の遺伝子の発現と比較することでその意義と重要な制御因子の同定のための解析を行った。

また EMT 能獲得に伴い失われるオープンクロマチン領域に着目してその制御因子の同定解析を行った。RNA-seq により同定した新規 TGF-beta 標的転写産物の機能について siRNA で引き続き検討を行うと共にアデノウイルスベクターによる強制発現による検討をあわせて行った。その結果この因子の抗アポトーシス作用を見出した。マウス乳がん細胞移植モデルを用いてこの転写産物の機能を評価した結果、この転写産物の発現を抑えることで腫瘍形成能が抑えられることを見出した。さらに EMT における主要な転写制御因子の一つ ZEB1 について ChIP-seq による乳がんでの網羅的結合部位の同定解析を行った。

平成 26 年度は乳腺上皮細胞の上皮間葉転換 EMT における遺伝子発現変化を RNA-seq により解析するとともに、オープンクロマチン領域の変化につき FAIRE-seq のデータ解析を行った。その結果発現変動を受ける non coding RNA などの新規転写産物群を同定した。このうち lncRNA-Smad7 と命名した non coding RNA についてはその機能を詳細に解析し、この遺伝子が TGF- による抗アポトーシス作用の一翼を担っていることを見いだし論文報告した(Arase et al)。マウス乳腺上皮細胞の EMT モデルを使用した本研究に関連して、EMT の制御因子 ESRP についても別のがん腫で特徴的な制御機構を見いだし論文報告した(Mizutani et al)。また乳腺上皮細胞に恒常活性 RAS を発現させ TGF- により EMT を起こす細胞ではオープンクロマチン領域に違いが生じることを網羅的解析により見出した。モチーフ解析の結果からそのような変化に寄与する候補転写因子群を同定した。siRNA を用いた RNA-seq や FAIRE-qPCR の検討により、実際にこれらの因子がオープンクロマチン領域の制御と遺伝子発現に影響を与えていることを見いだした。重要なことにこれらの因子は乳がんにおいて oncogene としての働きが知られている。

以上本研究課題で得られた成果はこれまでの知見を統合し、乳がんの進展に役割を果たす EMT のメカニズムの一端をオープンクロマチン領域の変化を伴う転写制御とその下流標的の lncRNA の働きを通して明らかにするものであると考えられる。

#### 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 9 件)

1) Mizutani A, Koinuma D, Seimiya H, and Miyazono K. (2015) The Arkadia-ESRP2 axis suppresses tumor progression: Analyses in clear cell renal cell

carcinoma. *Oncogene*, 掲載確定、査読有り.

2) Arase M, Horiguchi K, Ehata S, Morikawa M, Tsutsumi S, Aburatani H, Miyazono K, and Koinuma D. (2014) Transforming growth factor- $\beta$ -induced lncRNA-Smad7 inhibits apoptosis of mouse breast cancer JygMC(A) cells. *Cancer Science* 105(8), 974-982, 査読有り.

3) Morikawa M, Koinuma D, Miyazono K, and Heldin C-H. (2013) Genome-wide mechanisms of Smad binding. *Oncogene* 32 (13): 1609-1615, 査読有り.

4) Sundqvist A, Zieba A, Vasilaki E, Herrera Hidalgo C, Söderberg O, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH, Landegren U, Ten Dijke P & van Dam H (2013) Specific interactions between Smad proteins and AP-1 components determine TGF- $\beta$ -induced breast cancer cell invasion. *Oncogene*, 32(31): 3606-3615, 査読有り.

5) Ishii R, Isogaya K, Seto A, Koinuma D, Watanabe Y, Arisaka F, Yaguchi S, Ikushima H, Dohmae N, Miyazono K, Miyazawa K, Ishitani R, Nureki O. (2012) Structure of a dominant-negative helix-loop-helix transcriptional regulator suggests mechanisms of autoinhibition. *EMBO J.* 31 (11): 2541-2552, 査読有り.

6) Horiguchi K, Sakamoto K, Koinuma D, Semba K, Inoue A, Inoue S, Fujii H, Yamaguchi A, Miyazawa K, Miyazono K, and Saitoh M. (2012) TGF- $\beta$  drives epithelial-mesenchymal transition through EF1-mediated down-regulation of ESRP. *Oncogene* 31 (26): 3190-3201, 査読有り.

7) Miyazono K, Ehata S, Koinuma D (2012) Tumor-promoting functions of transforming growth factor- $\beta$  in progression of cancer. *Ups J Med Sci.* 117 (2): 143-152, 査読有り.

8) 鯉沼代造. (2013) TGF- $\beta$  シグナルと遺伝子転写. *医学のあゆみ* 244(7): 625-626, 査読なし.

9) 鯉沼代造、宮園浩平. (2012) 癌進展における EMT の役割. *細胞* 44(4): 5-7, 査読なし.

[学会発表](計 13 件)

1) Koinuma D. Identification of Smad regulatory factors through integrated

analysis of ChIP-seq data (Symposium) Joint International Symposium on TGF-Family and Cancer : Signal Network in Tumor Microenvironment (Tsukuba , Japan) 2015 年 1 月 12~13 日

2) Arase M, Koinuma D, Isogaya K, Mizutani A, Tsutsumi S, Aburatani H, Miyazono K. FAIRE-seq analysis of TGF-induced EMT in mouse mammary gland epithelial cells (Poster) Joint International Symposium on TGF-Family and Cancer : Signal Network in Tumor Microenvironment (Tsukuba , Japan) 2015 年 1 月 12~13 日

3) 荒瀬麻友、堀口華奈、江幡正悟、森川真大、堤 修一、油谷浩幸、宮園浩平、鯉沼代造 : Transforming growth factor-induced long non-coding RNA-Smad7 inhibits apoptosis of mouse breast cancer cells (ポスター) 第 14 回東京大学生命科学ネットワークシンポジウム (東京) 2014 年 4 月 26 日

4) Komuro A, Ikushima H, Sakai S, Ino Y, Todo T, Saito N, Watabe T, Koinuma D, Miyazono K. BMP4 suppresses tumorigenic activity of glioma-initiating cells through loss of stemness properties (Poster) 9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association "Breakthrough in Basic and Translational Cancer Research" (Maui, U.S.A) 2013 年 2 月 21 日 ~ 25 日

5) Isogaya K, Koinuma D, Tsutsumi S, Aburatani H, Miyazono K. Molecular mechanisms of TGF-beta signal modification by TTF1 (Poster) 9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association "Breakthrough in Basic and Translational Cancer Research" (Maui, U.S.A) 2013 年 2 月 21 日 ~ 25 日

6) Ogami T, Koinuma D, Tsutsumi S, Horiguchi K, Aburatani H, Miyazono K. Genome-wide identification of Smad2/3 binding regions during TGF-induced epithelial to mesenchymal transition in NMuMG cells (Poster) 9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association "Breakthrough in Basic and Translational Cancer Research" (Maui, U.S.A) 2013 年 2 月 21 日 ~ 25 日

7) 鯉沼代造, 生島弘彬, 堤修一, 櫻

井翼, 今村健志, 宮澤恵二, 油谷 浩幸, 宮園 浩平 : Epigenetic mechanism of TGF-beta-induced transcriptional repression in epidermal keratinocytes (口演 / ポスター) 第 85 回日本生化学会大会 (福岡) 2012 年 12 月 14~16 日

8) Komuro A, Ikushima H, Ino Y, Todo T, Saito N, Watabe T, Koinuma D, Miyazono K. BMP4 suppresses tumorigenic activity of glioma-initiating cells through loss of stemness properties (Oral/Poster) The 2nd International Symposium by JSPS Core-to-Core Program "Cooperative International Framework in TGF-Family Signaling" (Tokyo, Japan) 2012 年 10 月 29~30 日

9) Isogaya K, Koinuma D, Tsutsumi S, Aburatani H, Miyazono K. Regulation of Smad3 binding by FoxA1/2 in adenocarcinoma cells (Oral) 第 71 回日本癌学会学術総会 (札幌) 2012 年 9 月 19~21 日

10) Koinuma D. Epigenetic mechanism of TGF-induced transcriptional repression (Oral) TGF-beta Meeting in Liden (Liden, The Netherlands) 2012 年 8 月 29~31 日

11) 古室暁義、生島弘彬、稲生靖、藤堂具紀、渡部徹郎、鯉沼代造、宮園浩平 : 骨形成因子(BMP) 4 による膠芽腫腫瘍形成細胞の治療効果の検討 (口演) 第 19 回 BMP 研究会 (東京) 2012 年 7 月 22 日

12) Konoeda C, Koinuma D, Miyazono K, Sano A, Nakajima J, Murakawa T. Epithelial to Mesenchymal Transition in Murine Tracheal Allotransplantation: An Immunohistochemical Observation (Oral) 24th International Congress of The Transplantation Society (Berlin, Germany) 2012 年 7 月 15-19 日

13) 鯉沼代造. 次世代シーケンサーが明らかにする TGF-ファミリーシグナルの転写制御機構 (口演) 平成 25 年度 東京大学 大学院医学系研究科 病因・病理学専攻 若手講演会 (東京) 2012 年 5 月 11 日

〔図書〕(計 1 件)

1) 宮園浩平ほか監訳、鯉沼代造ほか訳 (2012) 細胞死のメカニズム. デヴィータがの分子生物学 メディカル・サイエンス・インターナショナル, 第 7 章 121-135, 査読なし.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

鯉沼 代造 (KOINUMA DAIZO)

東京大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80375071

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし