

博士論文概要

論文題目

上皮細胞を用いたスクリーニングによる新規
がん遺伝子 *HNF1B* の同定とその機能解析
Identification and functional analysis of a novel
oncogene *HNF1B* by screening with epithelial
cells

申請者

松井	貴香
Atsuka	MATSUI

生命医科学専攻 細胞情報学研究

2015年12月

日本におけるがんの死亡者数は年間 30 万人を超え、全死亡の 28.9%を占め死因の第一位である。死亡者数は今なお増加傾向にある。そのため、早期診断と治療法の開発は依然として重要な課題である。近年、EGFR や ERBB2(HER2)、VEGF に対する分子標的治療薬として開発されたゲフィチニブやトラスツズマブ、ペバシズマブが肺がん、乳がん、大腸がんなどのがんに適応され、従来の抗がん剤よりも優れた治療効果を上げている。これらの成功例から、がん細胞の無限増殖能や浸潤能といった特性を決める遺伝子(広い意味での「がん遺伝子」)を同定し、その機能を解明することが、副作用の少ない治療薬の開発につながると期待されている。

がん細胞には、その特性(増殖能や浸潤能、血管新生、アポトーシスの抑制など)を決める複数の遺伝子の変異や発現異常が見られる。遺伝子異常の中でも、遺伝子のコピー数が増加する遺伝子増幅はがん研究の初期から注目されており、ERBB2 や MYCN などのがん遺伝子の遺伝子増幅による過剰発現は、予後に関連することが報告されている。遺伝子増幅が単独の遺伝子に起こるのではなく、複数の遺伝子の発現を同時に変化させる現象であることから、遺伝子増幅は発がんに要する時間を短縮する現象ではないかと考えられた。実際、当研究室でも、NIH3T3 細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイによって染色体 17q12-21 の遺伝子増幅領域(アンプリコン)に存在する driver 遺伝子(がん化に働く遺伝子)である ERBB2 と協調的に働く GRB7 や、driver 遺伝子非依存的に EMT を引き起こす RARA を同定している。しかしながら、多くのがんが上皮細胞より発生していることから、線維芽細胞である NIH3T3 ではなく上皮細胞を用いる方がより生体に近い状態を解析できると考えられた。本研究では ERBB2 が存在する 17q12-21 のアンプリコンに存在する遺伝子 52 個を対象とし、これらの遺伝子をレトロウイルスによる高効率な遺伝子導入法を用いてマウスの乳腺上皮細胞株 NMuMG に同時に発現させるスクリーニング法を確立した。この手法により ERBB2 と協調的または単独で細胞のがん化に関わる新規がん遺伝子を探索すると共に、同定した遺伝子の機能の解明を目指した。

本論文は全四章より構成されており、各章の概要は以下の通りである。

第一章である序文では、がんの原因であるがん遺伝子の発見の経緯から、本研究の目的であるがん遺伝子探索・解析の手法について、六節に分けて記している。

第一節では、がん遺伝子の定義とがん遺伝子の機能を評価するための手法を記述している。

第二節では、がんの浸潤・転移のプロセスについて記している。

第三節から第五節では、がんで見られる遺伝子異常や、スクリーニング対象として遺伝子増幅に着目した理由、本研究で着目した 17q12-21 のアンプリコンに存在し、driver 遺伝子として知られている ERBB2 について記述している。

最後に、本研究の特徴でもある上皮細胞を用いたスクリーニング系の着想に至った経緯と本研究の目的について述べている。

第二章は材料と方法について記している。本研究の実験に用いた細胞株やプラスミドベクター、抗体を記述し、本研究で用いた実験手法を詳細に記載している。

第三章は結果であり、上皮細胞を用いたトランスフォーメーションアッセイの確立からその後の機能解析を七節に分けて記載している。

第一節では、マウスの乳腺上皮細胞株 NMuMG を用いたトランスフォーメーションアッセイの確立について述べており、過去に Hynes らが活性化 RAS 遺伝子 DNA の導入によって腫瘍形成を報告したマウスの不死化乳腺上皮細胞株である NMuMG 細胞を検討し、がん遺伝子スクリーニングに適した細胞であることを示している。

第二節では、第一節で確立したトランスフォーメーションアッセイを用いたスクリーニングによる *HNF1B* の同定と HNF1B のトランスフォーミング活性について記述している。すなわち、ホメオボックス遺伝子である *HNF1B* は単独でのトランスフォーミング活性を有しており、その活性は DNA 結合ドメインに依存すること、また、*HNF1B* が活性型変異体 *ERBB2V659E* による足場非依存的増殖能を促進することを見いだした。

第三節では、*HNF1B* ががん細胞のもう一つの特徴である EMT や浸潤能も誘導していることを記述している。実際に、EMT や浸潤の表現型の解析に適した不死化ヒト乳腺上皮細胞株である MCF10A に *HNF1B* を導入したところ、MCF10A の上皮細胞特有の敷石状構造が崩壊し、間葉系細胞に特徴的な細胞間に間隙のある形態を示した。EMT 関連タンパク質の発現を調べたところ、上皮系マーカーである E-cadherin の減少と間葉系マーカーである N-cadherin の増加を確認した。さらに、コラーゲン／マトリゲルを用いた三次元培養において、ゲル中に突起を伸ばすような浸潤の表現型が誘導されることを明らかにした。

第四節では、HNF1B の発現により誘導される STAT3 の活性化の意義を検討している。HNF1B 発現細胞において、がん関連シグナルの活性化を各種のリン酸化抗体を用いたウエスタンブロットティングによって網羅的に解析したところ、発がんやがんの浸潤転移に関わることが報告されている STAT3 の活性化を見いだした。しかしながら、阻害剤や RNA 干渉による STAT3 シグナルの抑制実験により、HNF1B によって誘導されるフォーカス形成や EMT の表現型は STAT3 非依存的であることを示した。

第五節では、*HNF1B* の下流で変化する遺伝子の解析を行って、*HNF1B* が EMT 関連遺伝子の発現を制御することを記述している。*HNF1B* 発現 MCF10A より得られた遺伝子発現プロファイルを用いてパスウェイ解析を行うことで、HNF1B により発現変動する遺伝子群が、転写因子 *ETS1* や $\Delta Np63$ の下流因子群と高い頻度

で一致しており、機能の関連性が示唆された。さらに定量性 RT-PCR においてマイクロアレイ解析によって確認された *ETS1* の発現増加と $\Delta Np63$ の発現減少に加え、*SNAIL1* や *ZEB1*, *ZEB2* などの EMT 誘導因子の発現増加が確認された。これらの EMT 関連遺伝子の中で *ZEB2* と $\Delta Np63$ が *HNF1B* によよって直接的に転写制御される可能性が強く示唆された。また、*ZEB2* のノックダウン実験によって、*ZEB2* が *HNF1B* による EMT と浸潤の誘導に関与していることが示された。

第六節では、*HNF1B* が *ERBB2* によってトランスフォームした細胞の造腫瘍能と転移能を促進することが述べられている。*HNF1B* は単独での造腫瘍能を有していないが、同所性移植と尾静脈移植の 2 つの転移アッセイによって、*ERBB2V659E* 発現細胞による造腫瘍能と転移能を促進することが示された。マウスに生じた原発巣や転移巣の解析により、Ki-67 陽性細胞の増加や血管内皮細胞やリンパ管内皮細胞の変化が見られなかったこと、尾静脈移植による転移巣形成の速度から転移プロセスの最後のプロセスである転移巣でのコロニー形成に *HNF1B* が関わっていることを示唆した。しかしながら、*HNF1B* 発現細胞が肺だけではなく、脳や骨に転移したことから、*HNF1B* が転移先でのコロニー形成能を促進しているだけではなく、がん細胞の血液脳関門 (BBB) 突破や転移先への生着にも関わっている可能性を示唆した。

第七節では、*HNF1B* 以外のホメオボックス遺伝子を解析した結果を記述している。本研究とは別の研究として行っていた *HER2* 陽性乳がんで過剰に発現している 641 個の遺伝子のスクリーニングによって、ホメオボックス遺伝子である *EMX1* を同定したこと、以前からホメオボックス遺伝子とがんとの関連性を示唆する報告が多いことから、ホメオボックス遺伝子のがんにおける重要性をより包括的に理解するため、22 種類のホメオボックス遺伝子のトランスフォーム能をフォーカスアッセイによって調べた。その結果、5 つのホメオボックス遺伝子 (*DLX1*, *DLX3*, *DLX4*, *HOXC4*, *HOXB13*) が NMuMG をトランスフォームし、これらのうち *EMX1* を含めた 4 つの遺伝子 (*DLX4*, *HOXC4*, *HOXB13*) が *STAT3* のリン酸化を引き起こすことを見いだした。

第四章では、本研究で得られた結果に基づく考察を行った。スクリーニングにおいて上皮細胞を用いることやアンプリコンを対象とする意義、本スクリーニングの問題点、本研究において同定・解析を行った *HNF1B* の機能と臨床における意義について議論している。また、*HNF1B* が属しているホメオボックス遺伝子スーパーファミリーとがんとの関連性についても議論を行っており、本研究でトランスフォーミング活性を確認した遺伝子の属するクラスやファミリーに偏りがあることなどからファミリー間での解析の重要性や、ホメオボックス遺伝子が本来発現する時期や組織によってがんにおける機能が変わってくる可能性があることを述べ、様々な角度から本研究の意義について考察している。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 松井 貴香 印

(2016年 4月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<ol style="list-style-type: none"> 1. ○<u>A. Matsui</u>, J. Fujimoto, K. Ishikawa, E. Ito, N. Goshima, S. Watanabe, K. Semba, “Hepatocyte nuclear factor 1 beta (<i>HNF1B</i>) induces transformation and epithelial-to-mesenchymal transition”, <i>FEBS Letters</i>, 2016, doi: 10.1002/1873-3468.12147 2. M. Saito, Y. Kato, E. Ito, J. Fujimoto, K. Ishikawa, A. Doi, K. Kumazawa, <u>A. Matsui</u>, S. Takebe, T. Ishida, S. Azuma, H. Mochizuki, Y. Kawamura, Y. Yanagisawa, R. Honma, J. Imai, H. Ohbayashi, N. Goshima, K. Semba, S. Watanabe., “Expression screening of 17q12–21 amplicon reveals GRB7 as an ERBB2-dependent oncogene”, <i>FEBS Letters</i>, 586(12), 1708–1714., 2012
総説	<ol style="list-style-type: none"> 1. <u>A. Matsui</u>, T. Ihara, H. Suda, H. Mikami, K. Semba, “Gene amplification: mechanisms and involvement in cancer”, <i>Biomol. Concepts</i>, 4(6), 567–582, 2013 2. T. Yamamoto, M. Saito, K. Kumazawa, A. Doi, <u>A. Matsui</u>, S. Takebe, T. Amari, M. O. and K. Semba., <i>ErbB2/HER2: Its Contribution to Basic Cancer Biology and the Development of Molecular Targeted Therapy.</i>, Breast Cancer-Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways (Gunduz, M., Ed), ISBN: 978-953-307-714-7, InTech, 139-170, 2011
講演	<ol style="list-style-type: none"> 1. 松井貴香、藤元次郎、伊藤恵美、渡辺慎哉、仙波憲太郎, “上皮細胞株を用いたアンプリコン 17q12-21 のスクリーニングによる新規がん遺伝子 HNF1B の同定と機能解析”, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015, 名古屋, ポスター 2. 松井貴香、藤元次郎、伊藤恵美、渡辺慎哉、仙波憲太郎, “上皮細胞株を用いたアンプリコン 17q12-21 のスクリーニングによる新規がん遺伝子 HNF1B の同定と機能解析”, 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014, 横浜, ポスター 3. <u>Atsuka Matsui</u>, Jiro Fujimoto, Kentaro Semba, “Identification and functional analysis of HNF1B as a Novel Oncogene”, POST-TRANSLATIONAL REGULATION OF CELL SIGNALING, 2014, SanDiego, poster 4. 松井貴香、藤元次郎、仙波憲太郎 “上皮細胞株を用いたアンプリコン 17q12-21 のスクリーニングによる新規がん遺伝子 HNF1B の同定と機能解析”, 第 2 回低酸素研究会, 2014, 東京, 口頭 (YIA 受賞) 5. 松井貴香、藤元次郎、仙波憲太郎, “上皮細胞株を用いたアンプリコン 17q12-21 のスクリーニングによる新規がん遺伝子 HNF1B の同定と機能解析”, 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2013, 京都, ポスター 6. <u>Atsuka Matsui</u>, Kentaro Semba, “Identification of a novel oncogene by systematic screening using NMuMG immortalized epithelial cells and a full length cDNA expression library.”, American Association for cancer research-Advances in Breast Cancer Research, 2011, San Francisco, CA, poster 7. 松井貴香、齊藤諒、藤元次郎、大竹徹、伊藤恵美、澤田直樹、今井順一、和栗聡、渡辺慎哉、仙波憲太郎, “上皮系細胞と全長 cDNA を用いてのスクリーニングによる新規癌遺伝子の同定と機能の解析”, 第 74 回日本癌学会学術総会, 2011, 名古屋, 口頭