

氏名	市川 舞
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	医工農博4甲 第67号
学位授与年月日	令和5年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
専攻名	医学専攻
学位論文題名	Ets family proteins regulate the EMT transcription factors Snail and ZEB in cancer cells (Ets ファミリータンパク質は、がん細胞において EMT 転写因子である Snail と ZEB を制御している)
論文審査委員	委員長 教授 安達 登 委員 准教授 市川 二郎 委員 講師 石井 裕貴

学位論文内容の要旨

(研究の目的)

上皮間葉転換 (EMT) は、上皮性腫瘍の進展過程で起こる形質学的変化であり、EMT 転写因子として知られる複数の転写因子で誘導される。その代表的分子として Snail と ZEB1/2 (ZEB1 と ZEB2) が知られている。ZEB1/2 の発現は、EMT 分子マーカータンパク質発現や癌の侵襲性と非常に綺麗な正の相関を示す。しかし、Snail は癌の侵襲性と相関しているが、EMT 分子マーカータンパク質発現とは相関していない。癌に深く関与するサイトカインのひとつである Transforming Growth Factor- β (TGF- β) は、ZEB1/2 や Snail の発現を促進させ、EMT を誘導し、癌を悪化させている。特に、TGF- β は活性型 RAS と協調的に Snail を誘導することが知られている。そこで、本研究では、癌細胞において ZEB1/2 や Snail の発現が高く維持される分子メカニズムに関して検討した。

(方法) 培養癌細胞を用い、必要に応じて遺伝子導入や siRNA などによるノックダウンなどを行い、qRT-PCR による mRNA 発現解析、細胞染色やウエスタンブロット法によるタンパク質解析などの分子生物学的・細胞生物学的解析を行なった。

(結果) 先行研究により、①Snail 発現は、TGF- β と活性型 RAS によって協調的に誘導される。②悪性度の高い乳癌細胞での ZEB1/2 の高発現は、転写因子 Ets1/2(Ets1 と Ets2)により維持されていることがわかっており、本研究では以下の事を新たに明らかにした。

1. TGF- β と活性型 RAS による Snail の発現誘導も、Ets1/2 が制御していた。
2. Ets1 と Ets2 は redundant に、ZEB1/2 と Snail の発現を調節していた。
3. 複数の Ets1 の選択的スプライシング変異体のうち、p54-Ets1 がこれらの発現に関与し、p42-Ets1 は関与していなかった。

(考察) 本研究では、Ets1/2 が、代表的な EMT 転写因子である Snail、ZEB1/2 の発現を制御していることを明らかにした。大規模データベースを mRNA レベルで解析すると、ZEB1 と ZEB2 は正の相関

があるが、ZEB1 と Snail、ZEB2 と Snail には正の相関がなかった。実際に ZEB と Snail が共に高発現している癌細胞は限られており、miRNA などの転写調節以外のメカニズムにより厳密に制御されていると考えられた。しかし、肉腫細胞では、Snail と ZEB が高発現しており、ETS1/2 のノックダウンで共に発現が低下するので、本研究結果は肉腫細胞でも保存されていることがわかった。また、大規模データベースでは ZEB1 と Ets1 にも相関性がない。これは、他の Ets ファミリー分子 (EHF と ELF3) が調整していることがわかっていることから、Ets ファミリー分子は非常に巧みに EMT を誘導しているものと考えられた。

Ets1/2 は Snail プロモーター活性を促進した。プロモーター上には典型的な Ets 結合部位が含まれていたため、点変異を導入し、詳細な検討を行ったが、Ets1/2 が Snail プロモーター活性を促進した。このことは、Ets1/2 が putative な結合部位を介し、ZEB1 プロモーター活性を促進する機構と類似していることから、Ets1/2 による発現調節は、未知な部位を介して誘導していることが示唆された。

p54-Ets1 は Snail の発現を増強するが、exonVII を欠失した p42-Ets1 は増強しないことから、Ets1 の exonVII が Snail の発現に重要な役割を担っていることが示唆された。exonVII 結合タンパク質の作用機構は、不明な点が多く、今後その分子機構を解明したいと考えている。

Snail と ZEB1/2 が共に高発現している癌細胞は少ないが、肉腫細胞や正常線維芽細胞では高発現している。そこで、正常線維芽細胞で Snail と ZEB1/2 をそれぞれノックダウンして機能を比較すると、ZEB1/2 より Snail が細胞老化誘導に深く関与していることがわかった。

EMT は、運動性亢進、抗癌剤耐性、間葉系・未分化性形質 (癌幹細胞様形質) 獲得、循環内腫瘍細胞の生存などに関与していると考えられている。したがって、ZEB1/2 や Snail はこの現象の一部に関与していると思われ、これらの分子の発現を制御している Ets 転写因子ファミリーのメンバーは、今後診断や治療法に応用できる可能性がある。

本研究は、主に *in vitro* での分子生物学的な研究であり、これらの結果を現在マウスを使った *in vivo* の実験を検討中である。

(結論) Ets 転写因子ファミリーのメンバーである Ets1 および Ets2 が、代表的な EMT 転写因子 Snail および ZEB1/2 の双方の発現を正に調節していた。

論文審査結果の要旨

本論文は、上皮性腫瘍の進展過程で起こる上皮間葉転換の転写因子である Snail と ZEB1/2 に着目し、癌細胞においてこれらの分子の発現が高く維持されるメカニズムについて検討したものである。その結果、転写因子 Ets1/2 が、Snail と ZEB1/2 の発現を制御していることを明らかにした。この知見は癌細胞の侵襲性を制御することへの生化学的礎石となるものであり、最終的に癌の治療につながる有用性と先見性、独自性が認められる。

本論文に対する各委員の質問に対し、学位申請者は概ね適切に回答した。よって、この論文は学位論文として認められる内容と考えられる。審査内容の詳細については、別紙「各委員からの質問およびそれに対する回答」を参照されたい。

別紙・各委員からの質問およびそれに対する回答

市川委員からの質問およびそれに対する回答

- ① Cellular Senescence とはがん細胞にとってどのような現象で、どのような意味があるか教えてください。

回答

がんでの細胞老化は、特に OIS (oncogene-induced senescence) が問題視されており、RAS に変異が入った初期では、Rb や p53 が野生型であるため、p16 や p21 の発現を介し、増殖が停止し、老化細胞となります。近年、この老化した細胞から分泌されるさまざまな因子 {老化関連分泌表現型 (SASP) とよばれる} が、周囲のがん細胞の悪性度に関与することがわかっています (多くの報告は悪化させるが、抑制性に働く報告もある)。

- ② Fig4J ですが、siEts1/2 で上がっているものに対して SnailHA を入れて下がるかどうかを検討していると思います。あまりレスキューされていない印象を受けますが、いかがでしょうか？

回答

Ets1 が Cellular Senescence を引き起こすことが報告されています (*Nature. 2001;409:1067-70.*)。この時は p16 の発現を介しますが、今回検討した Snail による Senescence には p16 を介しません (Fig. S2D)。したがって、Ets は p16 を介する経路と Snail を介する経路を同時に ON にしており、そのため Snail の効果が限定的と考えます。

- ③ Ets1/2 の抑制の際の Cellular Senescence が上がる理由として P16、P21 を検討しましたが、変化はないとの結果でした。Snail とのバランスとのことですがそれ以外の CDK inhibitor の変化を見る必要はないでしょうか？

回答

RB や p53 が野生型の細胞では、Ets1 は p16 を介し、Cellular Senescence を引き起こします (*Nature. 2001;409:1067-70.*)。一方、Snail は CDKI を介さずに Cellular Senescence していることから、RB や p53 非依存的に Cellular Senescence を誘導しているという新たな idea を考えています。ご指摘の CDKI の関与のみならず、このメカニズムに関し、今後も検討したいと思っています。

- ④ Ets1/2 の患者サンプルでの発現に関しての知見はありますか？

回答

今回は検討しておりませんが、ETS1 のノックアウトマウスは T cell の著しい減少を認めることもあり、リンパ球系の細胞での発現が高い事が知られています。その他の癌では、発現は確認されておりますが、発現と悪性度などの関連性は報告上あまりありません。

⑤ Fig4D ですが、骨肉腫に Snail や ETS1/2 を抑制すれば Cellular Senescence は上がるのでしょうか？（あるいは Invasion は下がるのでしょうか？）。

回答

このメカニズムは癌細胞で保存されていると考えられるので、実際に実験は行っていないですが、Cellular Senescence は誘導されます。Invasion は抑制されると考えています。ただし、全ての細胞で Senescence は起こらないので、起こった周囲の細胞は SASP を介して、全体として invasion が増加する可能性が高いと思われます。

⑤ Fig1D ; (P54) ETS1、ETS2 を一緒に Transfection した場合は相乗効果があるのか？

回答

実際に ETS1、ETS2 を一緒に Transfection する実験を行いました。顕著な協調作用は認めませんでした。ただし、厳密な titration を行い解析する必要があると思います。また、上流の ERK の不足については考慮せずに行った実験なので、相乗効果の有無については今後検討が必要です

⑥ 本論文では Snail、Zeb を見ているが、それ以外のマーカーに変化はないのか？

逆に Epithelial Marker に変化はないのか？

回答

頭頸部癌では Slug の発現が高い事が知られていることもあり、この発現をふくめ、上皮マーカーやがん幹細胞マーカーなど今後検討が必要と思います。

⑧ Fig4A、Fig4B の WB の結果から、SiEts1/2 では P-ERK が増強される感があります。何かしらの相互関係は考えられないでしょうか？

回答

ERK の phosphatase である DUSP は ETS1 によって発現が上昇することが知られております。そのため、ETS をノックダウンした結果 DUSP の発現が増加せず、ERK のリン酸化が持続している可能性があります。今後、再現性を含め、そのような観点から実験を継続してみたいと思います。

石井委員からの質問およびそれに対する回答

1. Snail のプロモーター活性を見る実験 (Fig. 2E) で ETS 1 がリン酸化されない状況にしても Snail promoter 活性が上がっており、違う binding site が存在するのかと考察しているが、今回全体を通して ChIP でその領域に ETS1/2 が結合するかどうか確認できているのか？ Snail プロモーターの ETS binding 領域に変異を入れてはいない？

回答

今回の実験内で、ChIP での確認は行っていません。

Snail プロモーターないの Ets binding 領域の数カ所に変異を入れて検討しましたが、顕著な変化は認めませんでした。

2. Snail 発現が siETS1 と siETS2 の両方を落とさないと下がらないとのことだった。これは PANC 1 以外の乳がん細胞や頭頸部癌細胞、肉腫細胞などで共通の事象として確認できているのか？ Snail の細胞内量は phenotype の違いに関係してくるか？例えば低発現細胞株と高発現細胞株で細胞老化や細胞浸潤に変化が予想されるか？

回答

Snail 発現が siETS1 と siETS2 の両方を落とさないと下がらないことは Panc-1 以外でも確認しています。

Snail のノックダウンで細胞老化や細胞浸潤に変化が見られたことから、発現レベルの違いでそれらの現象に変化が生じてくると考えています。

3. Snail ノックダウン細胞のテロメラーゼ活性はどうなっているのか？考察内に抗がん剤への感受性に影響する場合はあると書いてあるが、今回別の DNA ストレス(タキサン系化合物)を与えた時の変化は何か確認できているか。

回答

テロメラーゼ活性は確認していません。

また、DNA ストレスについても今後の検討が必要だと考えます。

4. Fig. 4a の中で MEK inhibitor 処理した際に Snail が下がっているが、この際に p54-ETS1 ectopic expression で SNAIL が減らないまたは下がりが弱くなるということは確認できているのか？

回答

本研究では確認していません。今後、検討していく必要があると考えます。

5. 頭頸部癌は RAS 変異が数%しかないと言われていて、あまりがん化シグナルとしては強くなく、EGFR を介したシグナルが強い。もし RAS 変異が入った場合、より転移しやすかったり EMT phenotype が強くなったりする変化が起こるのか？

回答

RAS からの EMT 促進経路はどの細胞でもある程度保存されていると思いますので、RAS に変異が入ることで活性化し、ERK 経路が活性化するとより悪性転化に傾くと思われます。

6. ETS 2 にも機能を持つ splicing variant があるのか？

回答

Ets2 にも選択的スプライシングにより複数のバリエントが存在することは報告がありますが、その機能の詳細について検討している報告はありません。

7. Snail ノックダウンで細胞老化が起こりやすくなり、さらに細胞浸潤能が弱くなる傾向を示している。確かに悪性形質が弱くなるという印象はもつが、一般的に活性型 RAS をもつ細胞はがん化シグナルが強くなるため細胞老化が逆に起こりやすい状況も考えられる。その視点から考えると Snail を発現させることで細胞老化を食い止めようとしている可能性も考えられる。今回の研究をもとに細胞老化と EMT の関係性についてどのような考察ができるか。

回答

Snail による細胞老化の抑制が EMT を介した癌の悪性化に直接関与しているかは、マウスを用いた実験で明らかにできればと考えています。

Ras の活性化と細胞老化に関しては、内因性 KRAS 変異 (RasG12D)により MEK-ERK 経路の構成的活性化を示し、通常の培養条件下では細胞老化を頻繁に起こさないとの報告もあり、Ras の変異の有無や種類によって未知の機能の違いが生じている可能性も考えます。それを踏まえ、本実験 (Ras WT の癌細胞) の条件では、Snail や ZEB によって EMT は促進されるが、細胞老化によって悪性化の一部は抑制されていると考えます。

8. マウス実験を今後行う予定としているが、Snail の細胞老化を in vivo 内でどのように評価するのか。

回答

まずは、Snail の免疫染色を行い、その発現と SA- β -gal positive 細胞に相関があるか検討し、評価できればいいなと考えています。

9. 今回の発見をもとに頭頸部がん治療応用を考えたとき、どのような戦略を考えつくか。

回答

Snail や ZEB 1/2 など個々の EMT-TF を治療のターゲットとするのではなく、その上流で制御している Ets をターゲットにできたらいいなと考えています。

安達からの質問およびそれに対する回答

Ets 1 のスプライシング変異体のうち、p54-Ets 1 と p42-Ets 1 について ZEB と Snail の発現への関与をみているが、他の変異体については検査しているのか。また、p54 と p42 を選択した理由は何か。

回答

p27-Ets1 はすでにドミナントネガティブフォームとして知られており、抑制性に働くことがわかっています。Snail のプロモーター活性でも抑制的に働くことを確認しました。また、p64-Ets1 はタンパク発現が安定しなかったため、結果を示していません。そのため、p54-Ets1 と p42-Ets1 に着目しました。