

氏 名	NGUYEN DUY SINH
博士の専攻分野の名称	博 士（医科学）
学 位 記 番 号	医工博甲 第 366 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 28 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	人間環境医工学専攻（生体環境学コース）
学 位 論 文 題 名	Ets1 enhances expression of ZEB1/ZEB2 to induce malignant phenotypes in basal breast cancer cells (Ets1 は ZEB1/ZEB2 の発現を増強することにより乳がん細胞の悪性形質を誘導する)
論 文 審 査 委 員	委員長 教授 有田 順 委員 准教授 北間 敏弘 委員 講師 荻原 明

学位論文内容の要旨

Purpose

Breast cancer is currently considered as a heterogeneous disease whose treatment individually adapted with clinical, histologic, cellular and molecular characteristics. The basal-like subtype represents 10-20 % of all breast carcinoma, characterized by epithelial mesenchymal transition (EMT) phenotypes and high malignancy. ZEB1 and ZEB2 are transcription regulators that induce EMT. They are highly expressed in the basal-like breast cancer cells while hardly expressed in the luminal-type breast cancer cells. Molecular mechanisms underlying the differential expression of ZEB1/ ZEB2 in two types of breast cancer cells have not been elucidated. However, it was reported that the expression profile of Ets1 in breast cancer cells is similar to that of ZEB1 and ZEB2. This study thus aims to unveil the roles of Ets1 transcription factor in regulating expression of ZEB1/ZEB2 in breast cancer.

Methods

I examined expression of ZEB1/ZEB2 in three basal-like breast cancer cells (MDA-MB-231, BT549, Hs578T) and two luminal-type breast cancer cells (MCF7 and T47D). Silencing of Ets1 expression was performed by siRNA transfection. Luciferase reporter assays were performed in HeLa cells using a human ZEB1 promoter reporter construct hZEB1-Luc (containing the human ZEB1 promoter region -1129 to +55 from the transcription start site). Truncated mutants and point mutated of hZEB1-Luc were also constructed. Protein expression and mRNA expression were examined by immunoblotting and qRT-PCR, respectively. Cell viability after treatment

with anti-cancer drugs (cisplatin and adriamycin) were evaluated by cell counting using WST-8.

Results

- 1) Knockdown of Ets1 in basal-like breast cancer cells resulted in down-regulated expression of both ZEB1 and ZEB2. In Ets1-silenced cells, expression of E-cadherin, an epithelial marker was up-regulated while that of N-cadherin, a mesenchymal marker, was down-regulated. Importantly, cells became more sensitive to anti-cancer drugs including cisplatin and adriamycin.
- 2) I mapped the region responsible for induction by Ets1 in the ZEB1 promoter as a putative Ets binding site at -842 from the transcription start site.
- 3) A MEK inhibitor U0126 efficiently suppressed mRNA expression of Ets1 as well as ZEB1/2. Notably, Ets1 phosphorylation status does not appear to affect its ability to transactivate the ZEB1 promoter because Ets1 (T38A) that is resistant to phosphorylation by ERKs enhanced the ZEB1 promoter as well.
- 4) ESE-1 is a transcriptional repressor expressed in luminal-type breast cancer cells. I found that ESE-1 counteracted Ets1, thus down-regulating ZEB1 expression.

Discussion

The mechanism how the MEK-ERK axis is involved in maintenance of Ets1 expression can be interpreted as follows: The Ets1 promoter contains two consensus AP-1 binding sites and an Ets binding site. Phosphorylation of Ets1 by ERK1/2 is known to enhance interaction of Ets1 to CBP or p300 transcriptional co-activator, thus possibly facilitating formation of the Ets1-CBP/p300-AP-1 complex at Ets/AP1 elements in the Ets1 promoter. It seems that a MEK inhibitor interrupts this positive feedback loop up-regulating Ets1 expression, and dramatically represses Ets1 transcription.

In addition to the effect on transcription of Ets1 mRNA, U0126 may affect protein stability of Ets1. The effect of threonine 38 phosphorylation on protein stability has not been fully elucidated. However, I noticed that U0126 down-regulated Ets1 protein that was expressed as a transgene. So far, several phosphorylation sites of Ets1 other than threonine 38 have been reported. Of these, serine phosphorylation at positions (251, 257, and 285) by Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II (CaMK II) facilitates degradation of Ets1 protein while phosphorylation of Ets1 at serine 276 and serine 282 promotes ubiquitination and degradation of Ets1. Additionally, phosphorylation of tyrosine 138 in Ets1 by Src family kinases disrupts the interaction with ubiquitin ligases, thus increasing its protein stability. It is possible that U0126 destabilizes Ets1 protein through affecting posttranslational modifications of Ets1, although they may not involve phosphorylation of threonine 38.

Conclusion

I found that ZEB1/ZEB2 expression is up-regulated by Ets1 transcription factor in the basal-like

breast cancer cells while down-regulated by ESE-1 in the luminal type breast cancer cells. These findings unveil the mechanism by which ZEB1 and ZEB2 are differently expressed in the basal-like and the luminal breast cancers. Silencing of Ets1 by siRNA in basal-type breast cancer cells resulted in expression of epithelial marker protein and sensitization of cells to anti-cancer drugs, suggesting that Ets1 controls EMT through regulating expression of ZEBs, leading to aggressiveness of breast cancers.

論文審査結果の要旨

癌浸潤に見られる上皮間葉移行 (EMT) は E-cadherin の発現抑制を伴っている。この発現抑制は ZEB を介することが知られているが、本研究論文は、悪性乳癌細胞株を使って、ZEB の発現調節機構への転写因子 Ets1 の関与を調べている。さらに、同じ family の ESE1 の役割も調べている。

著者は、ZEB1 のプロモーター解析によって、Ets1 のプロモーター内のコンセンサス結合 DNA 配列の変異では Ets1 によるプロモーター活性の促進は影響を受けないが、-842 位にある推定結合配列の変異によってプロモーター活性の促進が阻害されることを見つけている。この興味ある結果を、Chip 解析等によってこの部位へ Ets1 が結合することを調べることによって確認することが望ましい。

著者は、同じ Ets family の転写因子である ESE1 が ZEB1 の発現促進を抑制することを明らかにし、Ets1 と ESE1 が ZEB1 発現に拮抗的に作用していることを示唆した。ただ、この拮抗作用の分子機構は不明である。両者が独立して ZEB1 発現に作用するのか、それとも ESE1 が Ets1 の発現を抑制することによって ZEB1 発現を抑制するのか、二つの可能性を著者は考えている。ESE1 による ZEB1 の発現抑制に関わる ZEB1 プロモーター領域を決定することによって、ESE1 による調節機構と Ets1 による調節機構の相互関係を調べるのが重要であると思われる。

著者は、Ets1 のノックダウンによって抗ガン剤の効果が増強されることを明らかにしている。この結果は、今後、Ets1 の抑制による悪性乳癌細胞の治療方法の開発に大きく貢献すると思われる。

図 1 と図 3 の Western Blot 解析の結果に関して、ZEB1 と ZEB2 のバンドの出方に微妙な相違がみられる。追試することによって Reviewer に誤解を与えない図を作製することが望ましい。図 4 における ESE-1 単独発現による ZEB promoter 活性の抑制に関し、統計的有意差があるかを記載することが必要である。

本研究論文の研究成果は、乳癌の悪性形質の抑制方法の開発に寄与するものであることが、審査員全員によって確認されたので、本研究論文は学位論文に値するものと判断した。