HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ewing 肉腫原因遺伝子 EWS-FLI1 の クロマチンリモデリング機能と FOXQ1 との協調作用［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	清水, 六花
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13057号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70720
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Rikuka_Shimizu_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　清　水　六　花

学　位　論　文　題　名
Ewing 肉腫原因遺伝子 EWS-FLI1 の
クロマチンリモデリング機能と FOXQ1 との協調作用

一部のがんでは腫瘍特異的な染色体転座によって生じた変異型転写因子が原因遺伝子として働くことが知られている。小児や若年者で多く発症する Ewing 肉腫では、全ての症例で EWS-FLI1 をはじめとする EWS-ETS 融合遺伝子がみられ、強力な oncogene として働くことが知られている。長年発生母地が不明であったため、モデルマウスの作製ができず、治療法開発研究が立ち遅れている。EWS-FLI1 は Ewing 肉腫において Ets 結合サイトや GGAA microsatellites に結合して下流遺伝子を支配していることが知られているが、そのメカニズムや標的遺伝子について不明な点が依然多く存在する。過去の報告では Ewing 肉腫発生過程において、特定の細胞における GGAA microsatellites への EWS-FLI1 の結合はクロマチンリモデリングを介してエピジェネティックな異常を引き起こすことが報告されてきた。一方で GGAA microsatellites のゲノム上の部位はヒトとマウスの間ではあまり保存されていなく、このこともマウスで Ewing 肉腫が形成されない原因の一つとも考えられた。当研究室ではこれまでに、*EWS-FLI1* を胎仔長管骨骨端部の ES の発生母地として同定した embryonic superficial zone (eSZ) に導入した Ewing 肉腫マウスモデルを作製してきた。このモデルはヒトの Ewing 肉腫に非常に類似した生物学的特徴及び病理組織学的特徴を示す。本研究はこのマウスモデルの利点を生かし、EWS-FLI1 の腫瘍発生と進展に関連した機能の解明を目的としている。具体的に、1.マウス Ewing

肉腫細胞を用いて ChIP-seq により EWS-FLI1 の結合サイト及び標的遺伝子を同定し、ヒストン修飾との対応付けを行うとともにヒト肉腫での結合部位と比較すること、2. EWS-FLI1 が多く結合する結合モチーフを明らかにすること、3. アレイ等の遺伝子発現プロファイルとの比較により新規の EWS-FLI1 のターゲット遺伝子を同定すること、を目指した。

実験には当研究室で作製した Ewing 肉腫のマウスモデルから樹立した細胞株、ES49、及び他のヒト肉腫細胞株を使用した。まず ES49 で ChIP-seq を行い、EWS-FLI1 の結合領域と近傍遺伝子、およびヒストン修飾状況を調べた。これとマイクロアレイ等による遺伝子発現プロファイルとの比較から EWS-FLI1 の標的遺伝子候補を絞り込んだ。さらに標的遺伝子候補についてルシフェラーゼアッセイやノックダウンや細胞増殖試験等を行い、その機能を調べた。

ES49 における ChIP-seq の結果、EWS-FLI1 の結合ピークは 576、近傍遺伝子 246 個が同定された。同時にヒストン修飾の ChIP-seq も行い、EWS-FLI1 とエンハンサー活性領域である H3K27Ac の結合ピークの TSS からの距離を比較すると、EWS-FLI1 の結合の多くはスーパーエンハンサーを含めたエンハンサー領域への結合であることがわかった。またモチーフ解析から、Ets binding sites や GGAA microsatellites が高頻度で検出された。GGAA microsatellites を含んだピークのうち、88%が H3K27Ac のピークを伴い、活性化されていることがわかった。ターゲット遺伝子の近傍ピークの例をみてみると、GGAA microsatellites を介した EWS-FLI1 の結合ピーク周囲には、同時に H3K27Ac のピークがみられた。次にピークのみられた近傍遺伝子群を、マイクロアレイ解析にて mES で upregulate されている遺伝子と比較したところ、47 個の共通した遺伝子がみつかり、特に GGAA microsatellites への結合が確認された 26 個の遺伝子を標的遺伝子候補とした。

また今回新たに、EWS-FLI1 結合モチーフの解析から Fox 結合配列が多く検出されたことから、EWS-FLI1 の結合領域の周囲に Fox family 転写因子の結合がしばしば共存し、両者の協調作用がみられる可能性

が示唆された。そこでマウスの全 Fox family 遺伝子 44 個の中から、EWS-FLI1 と協調作用をもたらす可能性のある遺伝子を調べるために、マイクロアレイのデータからマウス Ewing 肉腫での Fox family 遺伝子の発現を確認した。*Foxd4*, *Foxb1*, *Foxq1* がとくに発現亢進しており、これらが EWS-FLI1 の結合領域付近に結合している協調遺伝子候補である可能性を検討した。 まず 3 つの遺伝子を ES49 でノックダウンしてみると、*Foxb1*, *Foxq1* で細胞増殖抑制がみられた。データベース上のヒト Ewing 肉腫組織と他の肉腫のマイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルからも *FOXB1* と *FOXQ1* は比較的高い発現傾向を示した。次にヒトの細胞株を用いて、まずは遺伝子発現を確認したところ、*FOXQ1* はヒト Ewing 肉腫の KH, EWS で発現亢進がみられた一方、*FOXB1* に関しては全く発現がみられなかったことから今回は Foxq1 が EWS-FLI1 の協調因子候補として検討を進めた。さらに、EWS で *FOXQ1* をノックダウンしてみると細胞増殖が抑制された。

そこで、ChIP-seq と array 解析結果の比較による EWS-FLI1 の標的遺伝子候補のうちから、EWS-FLI の結合ピーク内に GGAA microsatellites と Fox 結合領域を共に含んだ Trib1 と Nrg1 に着目してエンハンサー活性を調べた。*Trib1*、*Nrg1* の EWS-FLI1 の結合領域における GGAA microsatellites や Fox 結合配列を含む塩基を組み込んだルシフェラーゼコンストラクトを作成し、U2OS 細胞に導入してレポーターアッセイを行うと、*EWS-FLI1* の導入によってエンハンサー活性の亢進がみられた。*Foxq1* 単独を導入した場合は活性がそれほどみられないが、*Foxq1*, *EWS-FLI1* の両方を過剰発現させた場合に顕著にエンハンサー活性が上昇した。

次に Foxq1 と EWS-FLI1 の結合を確認するために、免疫共沈実験を行った。HA タグ付き *Foxq1* を導入した ES49 細胞を HA で免疫沈降すると Western blot にて EWS-FLI1 が検出された。そこで Foxq1 が EWS 側と FLI 1 側どちらに結合するか調べるために、293T 細胞に HA-*Foxq1* と FLAG-*EWS-FLI1* または FLAG-*EWS* または FLAG-*FLI1* をそれぞれ導入して同様に HA で免疫沈降した場合、EWS-FLI1 と EWS が検出され、FLI 1 は検出されなかった。

今回 EWS-FLI1 と Foxq1 の協調支配を受ける可能性が示唆された

Trib1 と Nrg1 について Ewing 肉腫における機能を調べた。マウスとヒトの Ewing 肉腫細胞株で *Trib1* または *Nrg1* をノックダウンすると増殖が抑えられることが確認された。そのメカニズムについては、*Trib1* と *Nrg1* のノックダウンによって DNA 合成が抑制されたので、Trib1 と Nrg1 には細胞周期回転を促進する働きがあることが示唆された。また *Nrg1* のノックダウンによりアポトーシスが誘導されることも明らかになった。データベース上のヒト ES 組織のマイクロアレイのデータで他の肉腫と比較しても *TRIB1* や *NRG1* は際立って高い発現を示した。

ヒトとマウス Ewing 肉腫における EWS-FLI1 の結合は、多くが Ets 結合部位や GGAA microsatellites を介してクロマチンリモデリングに関与している点で共通していた。一方で、GGAA microsatellites のゲノム上の分布はヒトとマウスで保存が低く、EWS-FLI1 の結合がみられた近傍の標的遺伝子候補については相違点がみられ、今後スーパーエンハンサーの機能解析やゲノムの 3 次元構造を解き明かすことが課題として挙げられる。また新たに Foxq1 が EWS-FLI1 の協調因子としてエンハンサー活性に貢献していることが明らかになった。免疫共沈実験の結果、Foxq1 は EWS−FLI1 の EWS 側の N 末側への結合が示唆された。これについて、EWS-FLI1 の GGAA microsatellites への結合が Foxq1 をリクルートして安定した構造体を形成する可能性や、本来 Foxq1 の結合がある場所に、近傍の GGAA microsatellites への EWS-FLI1 の結合が起こることで、Ewing 肉腫特異的エンハンサー活性化が起こる可能性が考えられる。その協調支配下にある標的遺伝子として同定された *Trib1* は、MAPK シグナルの活性化や C/EBP の分解を促進して白血病の原因遺伝子となっており、また *Nrg1* は ErbB シグナルの活性に関連して様々ながんで発現亢進が報告されている。今回 Trib1 や Nrg1 が Ewing 肉腫の細胞増殖に関与していることが明らかになり、治療標的としての期待が高まった。

今回の研究結果から EWS-FLI1 の GGAA microsatellites を介した転写制御メカニズムの一端が明らかとなった。Foxq1 は EWS−FLI1 の協調因子として働き、標的遺伝子の *Trib1* と *Nrg1* が同定された。