



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 [全文の要約]
Author(s)	清水, 六花
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 http://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/72496
Type	doctoral thesis
File Information	Rikuka_Shimizu_summary.pdf



学位論文内容の要約

学位論文題目

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

博士の専攻分野名称 博士（歯学） 氏名 清水 六花

本稿は Cancer Science, Vol.109 Issue 9, 2018 に収載予定。

原題「EWS-FLI1 regulates a transcriptional program in cooperation with Foxq1 in mouse Ewing sarcoma」 DOI: 10.1111/cas.13710

(緒言) 発がんにはがん遺伝子やがん抑制遺伝子など転写因子の変異や発現異常が関与している。一部の骨軟部腫瘍では腫瘍特異的な染色体転座によって生じる融合型転写遺伝子を原因遺伝子としており、**epigenetic** な異常を介した遺伝子制御異常が発がん機構を解明する上で重要である。小児や若年者に好発する骨軟部腫瘍である Ewing 肉腫は多くの症例で t(11;22) (q24;q12) 転座により生じる融合遺伝子 *EWS-FLI1* の形成がみられ、原因遺伝子として働く。*EWS-FLI1* は Ets binding site (EBS) や GGAA microsatellites に多く結合し、下流遺伝子の発現を制御していることが報告されているが、詳細な遺伝子発現調節機構には未だ不明な点が多く存在する。ヒト Ewing 肉腫に病理組織学的特徴及び遺伝子発現プロファイルが類似した Ewing 肉腫マウスモデルを用いて *EWS-FLI1* の腫瘍発生と進展に関連した機能の解明を試みた。

(材料と方法) マウス Ewing 肉腫細胞株 ES49 で ChIP-seq により *EWS-FLI1* の結合領域と近傍遺伝子、ヒストン修飾状況を調べた。結合領域に濃縮されるモチーフから *EWS-FLI1* の協調遺伝子候補を選出し、免疫共沈実験により *EWS-FLI1* との結合を調べた。マイクロアレイ等による遺伝子プロファイルと比較し、*EWS-FLI1* の標的位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、細胞増殖試験等により、その機能を調べた。

(結果) ES49 における ChIP-seq の結果、結合ピーク 576 が同定された。またヒストン H3K27Ac やヒストン H3K27Me3 に対する抗体を用いて *EWS-FLI1* 結合周囲のヒストン修飾状況を調べると、アクティブエンハンサーの指標である H3K27Ac のピークは *EWS-FLI1* の結合領域に対して 21.3%の一致がみられた。またモチーフ解析の結果、Ets binding sites や

GGAA microsatellites が高頻度で検出された。GGAA microsatellites を含んだピークにおいては 88%で H3K27Ac のピークがみられ、マウス Ewing 肉腫においても、ヒト肉腫と同様に EWS-FLI1 の GGAA microsatellites への結合と H3K27Ac のピークの相関性がみられた。次に EWS-FLI1 の結合ピーク近傍遺伝子 246 個とマイクロアレイで解析したマウス Ewing 肉腫において発現変動する遺伝子を比較すると、47 個の遺伝子が発現亢進しており、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。一方でこれまでヒト Ewing 肉腫で報告されている EWS-FLI1 の標的遺伝子との相関性は低かった。

また今回新たに EWS-FLI1 の結合モチーフに Fox family の結合配列が濃縮されたことから、いくつかの遺伝子が EWS-FLI1 と Fox family 転写遺伝子の協調支配を受ける可能性を考えた。マウス Ewing 肉腫のマイクロアレイで発現亢進していた *Foxd4*, *Foxq1*, *Foxb1* のうち、ヒト Ewing 肉腫でも発現亢進がみられ、細胞増殖試験にてヒト、マウス Ewing 肉腫細胞での増殖作用に関与していた *Foxq1* を EWS-FLI1 の協調因子候補とした。そこで、EWS-FLI1 の 26 個の標的遺伝子候補から結合ピーク内に GGAA microsatellites と Fox 結合配列を共に含む *Trib1* と *Nrg1* に着目し、協調支配を受ける標的遺伝子候補としての可能性を調べた。*Trib1*、*Nrg1* の EWS-FLI1 結合領域中の GGAA microsatellites と 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 細胞に導入してエンハンサー活性を調べると、*EWS-FLI1* の導入によってエンハンサー活性が亢進した。また *Foxq1* を単独で導入した場合には活性はみられなかったが、*Foxq1* 及び *EWS-FLI1* を両方発現させると *EWS-FLI1* 単独導入時に比較して活性が顕著に上昇した。また ES49 と 293T 細胞を使用した免疫共沈試験の結果から、*Foxq1* は EWS-FLI1 の EWS 側に結合していることが明らかになった。またヒト、マウス Ewing 肉腫細胞での *Foxq1* または *EWS-FLI1* のノックダウンによる *Trib1* と *Nrg1* の遺伝子発現量の低下から、両者が EWS-FLI1 と *Foxq1* の協調支配を受ける可能性が示唆された。そこでヒト、マウス肉腫細胞でこれらの遺伝子をノックダウンしてみると細胞増殖が抑制された。また *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。*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。

(考察) マウス Ewing 肉腫の EWS-FLI1 結合領域にはヒト Ewing 肉腫同様に GGAA microsatellites や Ets binding site が優位に含まれており、ヒストン H3K27Ac のピークより EWS-FLI1 の GGAA microsatellites への結合がクロマチンリモデリングに深く関与していることが強く示唆された。一方でヒトとマウスでの GGAA microsatellites のゲノム上の位置の違いがあることから、ヒトで GGAA microsatellites への結合が報告されている標的遺伝子とエンハンサー領域は必ずしも一致せず、今後は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。今回新たに EWS-FLI1 の結合モチーフに Fox family の結合配列が高頻度に検出され、EWS-FLI1 の協調因子候補として Foxq1 が考えられた。EWS-FLI1 結合領域中の GGAA microsatellites と Fox binding site が含まれる配列の一部はエンハンサー作用があり、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。Ewing 肉腫発生過程における EWS-FLI1 のがん原性を EWS の N 末側に結合する Foxq1 がより強固にしている可能性が示唆された。その協調支配を受ける標的遺伝子として *Trib1*、*Nrg1* が同定され、これらの遺伝子はヒト、マウス Ewing 肉腫において細胞増殖を促進する因子であることが示唆された。*Trib1* は、MAPK シグナルの活性化や C/EBP の分解を促進する白血病の原因遺伝子であり、*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。*Trib1*、*Nrg1* の Ewing 肉腫における新たな治療標的としての期待が高まった。

(結論) 今回の研究結果から、Ewing 肉腫における EWS-FLI1 の GGAA microsatellites への結合を介する種をこえた機能の一部が明らかになった。Foxq1 は EWS-FLI1 の協調因子として転写活性を増強させており、その協調支配を受ける標的遺伝子として *Trib1* と *Nrg1* が同定された。

(謝辞) 本稿を終えるにあたり、本研究い数々のご援助、ご協力を頂きましたがん研究会

がん研究所発がん研究部の田中美和先生をはじめ研究室の皆様、奈良先端科学技術大学院
大学腫瘍生物学の横山隆志先生、東京大学先端技術研究センターの油谷浩幸先生、堤修一
先生に厚く御礼申し上げます。