

[別紙 1]

## 論文の内容の要旨

論文題目

**Molecular mechanism of neuronal gene induction in human non-small cell lung carcinoma cell lines that lack expression of both Brm and BRG1.**

(和訳; Brm と BRG1 の発現を共に欠失するヒト非小細胞肺癌細胞株における神経特異的遺伝子群の発現誘導とその機構)

氏名 渡部 博貴

### 背景と目的

真核生物のゲノム DNA はヒストン 8 量体へ巻き付くことによって、ヌクレオソームと呼ばれるクロマチン構造の基本単位を形成している。クロマチンの核内での状態は、転写が活発に行われている領域では DNA に転写因子などが近づきやすい比較的ゆるい構造をとっている一方、不活性な領域では数珠繋ぎとなったヌクレオソームがさらに高度に折り畳まれ凝縮した構造となっている。クロマチン構造を動的に変化させる機構はエピジェネティクスのひとつとして知られており、それを司る酵素複合体が多数同定されている。その内のひとつである SWI/SNF 複合体は AP-1 をはじめ様々な転写因子と結合して、その標的遺伝子の不活性なクロマチン構造を変換し転写を開始させることが報告されている。哺乳動物の SWI/SNF 複合体は 9~12 のサブユニットから構成され、各複合体はその触媒サブユニットとして Brm か BRG1 のいずれか 1 分子のみ含む。Brm あるいは BRG1 分子内の ATPase 活性は SWI/SNF 複合体のクロマチン構造変換活性に必須である。

SWI/SNF 複合体は、p53, Rb, BRCA 等のがん抑制遺伝子産物や c-Myc, c-Fos,

c-Jun 等のがん原遺伝子産物と相互作用することから分かるように、がん発生機序に深い関与を示す。特に SWI/SNF 複合体の必須サブユニットをコードする *Ini1*, *Brm*, *BRG1* はがん抑制遺伝子としても知られており、前立腺・肺・膵臓などのがん細胞株や腫瘍細胞において様々な遺伝子変異・欠失が起こり、その発現の消失している事が報告されている。特にヒト非小細胞肺癌(non-small cell lung carcinoma; NSCLC)では *Brm* と *BRG1* の発現を共に消失することが多く、このような NSCLC の患者では、*Brm* 及び *BRG1* を保持する NSCLC に比べ予後不良であると報告されている。肺がんは先進国におけるがん死亡原因の第一位であることから、発がんの分子機構の解明や根本治療薬の開発が切望されている。肺がんの中でも 80%以上を占める NSCLC は病理学的に 3 つに分類されているが、最近の microarray による発現解析に基づく複数の報告から、分子レベルでさらに細かく分類できる事が分かりつつある状況を考慮すると、NSCLC における分子レベルでの詳細な記述は益々必要になると考えられる。本研究では、*Brm* と *BRG1* の発現を共に欠いているヒト NSCLC 細胞株で起こっているエピジェネティックな変化を明らかにすることを目的として、NSCLC 細胞株における神経特異的遺伝子の発現抑制の分子機構を探求した。

## 結果と考察

はじめに、いくつかのヒト NSCLC 細胞株での SWI/SNF 複合体のサブユニットの発現を Western blotting 法で解析し、*Brm* と *BRG1* の発現を共に欠失している細胞株を 3 種類選んだ(NCI-H23, NCI-H522, A427)。この *Brm*/*BRG1* 発現消失 NSCLC 細胞株で発現が増加あるいは減少している遺伝子を半定量的 RT-PCR で検討した結果、これらの細胞株では *synaptophysin* や *SCG10* などの神経特異的遺伝子の発現が上昇している事を見出した。まず、これらの遺伝子の発現上昇が SWI/SNF 複合体の欠損によるものかどうか、*Brm* と *BRG1* の発現が正常な NSCLC 細胞株において、VSV-G シュードタイプレトロウイルスを用いて SWI/SNF 複合体の必須サブユニット(*Brm*, *BRG1*, *Ini1*)の発現を抑制するような shRNA (short hairpin RNA)を発現させて半定量的 RT-PCR で解析した。*Brm*/*BRG1* 発現消失 NSCLC 細胞株でみられたように、必須サブユニットを抑えることで *synaptophysin* と *SCG10* の発現が誘導されたことから、NSCLC において SWI/SNF 複合体が神経特異的遺伝子の発現を負に制御する事が分かった。次に、*Brm*/*BRG1* 発現消失 NSCLC 細胞株へ *Brm* あるいは *BRG1* を過剰発現させたところ、SWI/SNF 複合体によって発現が正に調節される遺伝子のひとつである *IL-6* の著しい誘導がみられる一方、*synaptophysin* や *SCG10* の mRNA 発現量は約 4 分の 1 に抑制された。このような *Brm* あるいは *BRG1* の過剰発現による抑制効果は、ATPase 活性を欠損させた変異体である *Brm*

(ATPmut)や BRG1 (KR)を代わりに過剰発現させた場合にはみられなかった事から、SWI/SNF 複合体による *synaptophysin* や *SCG10* の発現抑制は Brm 及び BRG1 の ATPase 活性に依存している事が分かった。

肺がんでの神経特異的遺伝子の異所発現は、小細胞肺癌(small-cell lung carcinoma; SCLC)においてよく知られている。この分子機構として、神経特異的な遺伝子発現を正に調節する転写因子 Mash1 の異所発現、あるいは負に調節する転写因子 NRSF (neuron restrictive silencer factor、または REST と呼称される)の発現欠失がこれまで報告されている。しかし、Brm/BRG1 発現消失 NSCLC 細胞株ではこれら転写因子の発現様式の異常を RT-PCR で認めなかった事から、Brm/BRG1 発現消失 NSCLC 細胞株での *synaptophysin* や *SCG10* の発現上昇は、特異的に Brm 及び BRG1 が共に欠損した結果である事が分かった。

SWI/SNF 複合体が神経特異的遺伝子を抑制する機序として、抑制性転写因子と協調して働くことが想定された。肺などを含め通常神経マーカーを発現しない非神経細胞において、*synaptophysin* や *SCG10* の転写は前述した神経選択的サイレンサー NRSF によって抑制される事が報告されている。したがって、SWI/SNF 複合体による神経特異的遺伝子の発現抑制に対して NRSF が関与するかどうか検証するために、Brm と BRG1 の発現が正常な NSCLC 細胞株へ NRSF の発現を抑制するような shRNA を発現するレトロウイルスを導入した。果たして *synaptophysin* と *SCG10* の mRNA の発現が誘導されたことより、SWI/SNF 複合体と NRSF は神経特異的遺伝子の抑制作用の点で協調している可能性が示唆された。次にこの協調作用が直接の相互作用によるものかどうか免疫沈降法で解析した。293 細胞へ Flag タグを付けた全長の NRSF を発現させ抗 Flag 抗体で免疫沈降したところ、Brm, BRG1 及び BAF155 が共沈したことより、*in vivo* での NRSF と SWI/SNF 複合体の相互作用が確認された。NRSF はその N 末端部分(aa 43-83)と C 末端部分(aa 1009-1097)に独立した転写抑制ドメインを持っており、それぞれ特異的な co-repressor である mSin3 と CoREST が直接結合している事が知られている。したがって、次に SWI/SNF 複合体は NRSF のどちらの領域に主に相互作用して機能するかを検討した。N 末側半分 (N-NRSF; aa 1-528)あるいは C 末側半分 (C-NRSF; aa 502-1097)の Flag タグ付き欠失変異体を使って共沈実験を行った場合、Brm, BRG1, BAF155 は N-NRSF 変異体に強く結合した。このことより、SWI/SNF 複合体は NRSF の N 末側と相互作用し、協調して神経特異的遺伝子の転写を抑制することが分かった。面白いことに一部の SWI/SNF 複合体は mSin3-HDAC 複合体を含む事が報告されている事を考えると、NRSF の N 末部分への SWI/SNF 複合体の相互作用は mSin3 複合体を介している可能性が示唆される。

次にこの NRSF-SWI/SNF 複合体がどのような分子機構によって、神経特異的遺伝子発現の抑制をもたらすかをクロマチン免疫沈降(ChIP)法で解析した。Brm/BRG1 発現消失 NSCLC 細胞株へ Brm あるいは BRG1 を過剰発現し、クロマチン抽出後、ヒストン H3 あるいは H4 のアセチル化抗体で免疫沈降した。精製したゲノム DNA を鋳型とし、*synaptophysin* 遺伝子上のプライマーで PCR を行ったところ、SWI/SNF 複合体が NRSF 結合配列近傍へ動員されることによって、周辺のクロマチン上のヒストン H4 が特異的に脱アセチル化されることが分かった。さらに SWI/SNF 複合体活性を保持した細胞株にヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 FK228 を作用させる事によってもこれらの標的遺伝子の発現誘導がみられた事から、NRSF-SWI/SNF 複合体による抑制機構はヒストン H4 の脱アセチル化を介するものと考えられた。

### まとめと展望

本研究では、SWI/SNF 複合体の活性を失った NSCLC 細胞株では神経選択的サイレンサー NRSF の機能が破綻する事によって、NSCLC において通常は発現が抑制されているいくつかの神経特異的遺伝子の発現が脱抑制されることを証明した。さらにこの抑制分子機構は、NRSF の N 末半分領域への SWI/SNF 複合体の相互作用とそれに引き続く NRSF 結合配列近傍のヒストン H4 の脱アセチル化が関与している事を示した。Brm, BRG1 の発現が共に失われた NSCLC では、予後が不良であるという報告もあることから、以上の知見は、NSCLC における神経特異的遺伝子の脱抑制が SWI/SNF 活性を欠損した肺がんにおける有効な診断マーカーとなりうる可能性があることを示唆する。

最近、大腸がんにおいて *NRSF/REST* 遺伝子の欠失が高頻度で起こっている事が報告され、*NRSF* はがん抑制遺伝子として考えられるようになった。特に NRSF の標的遺伝子には神経細胞での生存・増殖に関わる因子やその受容体などが含まれるため、NSCLC 細胞で SWI/SNF 複合体が欠損した際に、これらの遺伝子の発現が脱抑制することによってがん細胞の形質が変化する可能性も考えられる。