

## 論文の内容の要旨

論文題目      がん転移促進因子 Merm1 による p53-dependent apoptosis の抑制

氏名      中澤 侑也

### Abstract and Introduction

近年がんでの死亡率は増加傾向にあり、毎年全世界で 500 万人以上の方が亡くなっている。原発がんの治療は、治療法の急速な発展により徐々に成果を上げつつあるが、依然としてがん死亡の主たる要因である転移や再発の制御は難しい。転移を扱う難しさは、転移が多くに関連因子が協調的に作用する、dynamic かつ multistep な pathology であるという事実に起因する。転移関連因子の特定とその理解は、がん治癒を目指す上で避けて通れない道である。

我々はマウスを用いた genome-wide genetic screen により、新規がん転移促進因子として Merm1/Wbscr22 を同定した。低転移性細胞に Merm1 を強制発現させると、細胞増殖能や運動能に影響を与えずに、転移形成能が上がった。興味深いことに Merm1 発現は、細胞が肺の微小血管巣に trap された後の生存を高めることが分かった。実際の転移性がん細胞の Merm1 knock down で、転移形成能が抑えられ、かつ血管内で trap 後の細胞生存が抑制された。続いて transcriptome analysis により、Merm1 の発現が tumor suppressor である Zac1 の発現と逆相関することが分かった。そして Merm1 が、Zac1 promoter における histone H3 の Lys<sup>9</sup> メチル化を伴って、Zac1 を発現抑制することが確認された。Zac1 は p53 の transcriptional coactivator として働き、apoptosis 誘導に関わることが知られている。一方 p53 は、がん細胞が血管に trap された後の apoptosis 誘導にも関わっていて、転移形成過程で p53 の downregulation がしばしば観察される。実際に Merm1 knock down により p53-dependent apoptosis は増強し、それが Zac1 の同時 knock down によりキャンセルされた。また Zac1 knock down は、Merm1 knock down による血管内での細胞生存、及び転移能の減弱もキャンセルした。以上により、新規転移促進因子 Merm1 は血管内で trap 後の p53-dependent apoptosis を抑制することで、がん細胞の転移形成能を促進することが示唆された。

## Results

### i. 新規転移促進因子としての Merm1/Wbscr22 の同定

新規転移促進因子の同定のため、我々は mouse *in vivo* genetic screen を行った。高転移性である B16-BL6 マウスメラノーマ細胞の cDNA を retroviral vector に挿入し、低転移性の CHO 細胞に感染させ、マウスに尾静脈注射した。その 28 日後に肺で生存していた CHO 細胞を分離し、B16-BL6 由来の cDNA insertion を調べたところ、Merm1/Wbscr22 という遺伝子が同定された。この遺伝子は Williams-Beuren syndrome において欠損している染色体領域に位置し、methyltransferase に特徴的に見られる domain (SAM-dependent MTase fold) と核局在シグナルを持つことが知られているが、具体的な機能の検証は一切なく、がんとの関連も未知である。tissue array を用いた組織染色の結果から、Merm1 は浸潤性乳管がん(IDC)において正常組織に比べて発現上昇が認められた。IDC はその名の通り容易に周辺組織に浸潤し、全症例の 10%が初診時に転移性と診断される。興味深いことに、未分化型 IDC は分化型 IDC よりも高頻度に Merm1 が発現上昇していた。

我々はマウス wild-type Merm1 (Merm1-WT)を分離し、同時に SAM-dependent MTase fold に変異を入れた methyltransferase-dead Merm1 (Merm1-MD)を作製した。この両者を組み込んだ retroviral vector を CHO 細胞に感染させ、マウスに尾静脈注射して肺への実験的転移を検討したところ、Merm1-WT でのみ肺転移結節数の上昇が見られた。これらの細胞は増殖能、運動能には差はなかったが、尾静脈注射後 12 時間に肺血管巣における生存細胞を可視化すると、Merm1-WT でのみ生存細胞の増加が見られた。

### ii. Merm1 は血管内での腫瘍細胞の生存を促進し、転移を促進する

実際のがんにおける Merm1 の機能を見るため、いくつかの転移性がん細胞の Merm1 発現を検討し、その中で比較的高発現が見られた A375M ヒトメラノーマ細胞の Merm1 を、shRNA により knock down した。CHO 細胞における強制発現の結果と相関し、二種類の shRNA で Merm1 を knock down した結果、共に肺での転移形成能は減弱し、また肺血管に trap された後の細胞生存が抑制された。

### iii. Merm1 は tumor suppressor である Zac1 の発現を抑制する

Merm1 は核内 methyltransferase であり、target としては DNA か histone が考えられる。いずれの場合も遺伝子の転写が変化することが予想されることから、gene chip を用いて A375M/control と Merm1 を knock down した A375M/shRNA2 の間での comparative transcriptome analysis を行った。その結果、tumor suppressor として知られる Zac1/Lot1/Plagl1 の転写が、Merm1 の knock down に伴って上昇していることが分かった。

Merm1 は DNA methyltransferase に特徴的な catalytic center や DNA-binding motif を持っていないため、Merm1 の methylation target としては histone が考えられる。tumor suppressor の転写抑制に関連した histone のメチル化部位は、H3 の Lys<sup>9</sup> と Lys<sup>27</sup> が知られているため、次に Zac1 の promoter 部位における histone H3-Lys<sup>9</sup> 及び H3-Lys<sup>27</sup> のメチル化状態を検討した。メチル化 H3-Lys<sup>9</sup> とメチル化 H3-Lys<sup>27</sup> に対する抗体で、A375M 細胞の genomic DNA を免疫沈降し(ChIP)、その沈降物を template にして Zac1 promoter 特異的な primer で PCR をかけた。その結果、A375M/control では H3-Lys<sup>9</sup> のメチル化が見られたが、Merm1 を knock down した A375M/shRNA2 ではそれが見られなかった。H3-Lys<sup>27</sup> のメチル化は Merm1 knock down による変化は認められなかった。

### iv. Merm1 は p53-dependent apoptosis を抑制し、血管内での細胞生存を促進する

Zac1 は p53 の transcriptional coactivator として機能し、apoptosis を誘導することが知ら

れている。そこで、Merm1 と Zac1 の p53-dependent apoptosis に対する影響を検討するため、A375M 細胞の Merm1、及び Zac1 の knock down を行った。Nutlin-3 により p53 分解を抑制し、p53-dependent apoptosis を誘導したところ、Merm1 knock down により apoptosis が増強されるが、Zac1 knock down によりその効果はキャンセルされた。また血管内の細胞生存、および転移形成能においても、Merm1 knock down による抑制効果が Zac1 knock down によりキャンセルされた。

## Discussion and Perspective

最近になって、化学療法に耐性を示す cancer stem cell や dormant cell などの存在が、転移形成に重要であるということが示されてきている。これらの細胞はゆっくり増殖するか、全く増殖しないかであり、増殖能を target とする既存の化学療法は無効と考えられている。言い換えればこれらの細胞はただ単に survive しているのである。転移の治療を考える上で、腫瘍の survival をコントロールするメカニズムの理解は重要である。本研究により、転移性細胞が Merm1 を介して Zac1-p53-dependent apoptosis を抑制し、血管内の細胞生存を高めることで転移形成を促進するという新たなメカニズムが発見された。このメカニズムはがん治療へ向けた、新たな治療標的としての可能性を秘めている。特に乳がんにおいては、本研究により Merm1 の発現上昇が発見されたが、別のグループからは Zac1 の発現低下が報告されており、この Merm1-Zac1 pathway の重要性が示唆されている。しかしながら、現時点で全く分かっていない Merm1 の physiological function や、Merm1 と histone メチル化の不明瞭な繋がり、効果予測のための bio marker の必要性など、実際の clinical application の検討に向けては更なる検討が必須である。