

審査の結果の要旨

氏名 中澤 侑也

原発がんの治療は、治療法の発展により徐々に成果を上げつつあるが、がん死亡の主たる要因である転移や再発の制御は依然として難しい。転移を制御する難しさは、転移が多くに関連因子が協調的に作用する事実に起因する。したがって、転移関連因子の特定とその機能解明はがん治癒を目指す上で避けて通れない。

中澤侑也は、新規転移促進因子を同定するため、*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* という遺伝子を同定することに成功した。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った。中澤は、*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していることを見出した。IDC は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。さらに中澤は、未分化型 IDC は分化型 IDC よりも高頻度に *Merm1* が発現上昇していることを明らかにした。

次に、中澤は、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、*Merm1-WT* でのみ肺

転移結節数の上昇を観察した。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を観察した」。

中澤は、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。その結果、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ることを見出した。

次に中澤は、Merm1 は核内 methyltransferase であり、target として DNA か histone を考えた。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、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を明らかにした。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 が考えた。次に中澤は、Zac1 の promoter 部位における histone H3-Lys9 及び H3-Lys27 のメチル化状態を検討した。メチル化 H3-Lys9 とメチル化 H3-Lys27 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-Lys9 のメチル化を見出した。

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、中澤は、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ることを見出した。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ることを明らかにした。

以上、本研究により中澤は、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を発見した。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おり、博士（薬学）に充分値するものと判断した。