

## 審査の結果の要旨

氏名 堀 口 華 奈

本研究は EMT (上皮-間葉転換) の過程で起こる細胞の特異的な FGF シグナル応答性獲得機構を明らかにするため、TGF- $\beta$  刺激により EMT を誘導したマウス乳腺上皮細胞 (NMuMG 細胞) やヒト乳癌細胞株を用いて FGFR の選択的スプライシング制御機構の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. TGF- $\beta$  により EMT を獲得した NMuMG 細胞では、組織特異的な選択的スプライシングが上皮型から間葉系型へと変化することが示された。また、TGF- $\beta$  により EMT が誘導される他の細胞株である EpRas 細胞 (マウス乳腺上皮 Eph4 細胞に RasG12V を導入した細胞) においても、TGF- $\beta$  刺激により FGFR の選択的スプライシングが上皮型から間葉系型へと変化した。
2. FGFR の組織特異的な選択的スプライシングを制御する RNA 結合因子において、TGF- $\beta$  により発現が変化する因子を探索したところ、FGFR の cis エlement に結合して上皮型の選択的スプライシングを促進する ESRP (Epithelial Splicing Regulatory Protein) と呼ばれる RNA 結合因子の発現が TGF- $\beta$  により減少することが明らかとなった。ESRP をノックダウンした NMuMG 細胞では FGFR の選択的スプライシングが上皮型から間葉系型へと変化した。一方で ESRP を過剰発現させた NMuMG 細胞では TGF- $\beta$  による FGFR の選択的スプライシングの変化が抑制された。このことから、TGF- $\beta$  は ESRP の発現を抑制することにより FGFR の選択的スプライシングを上皮型から間葉系型へと変化させることが示された。
3. タンパク合成阻害剤であるシクロヘキシミド処理を行った NMuMG 細胞では、TGF- $\beta$  による ESRP の発現抑制が阻害され、TGF- $\beta$  は新規タンパク質の合成を介して ESRP の発現を抑制することが示された。ESRP のプロモーター解析から、 $\delta$ EF1 と SIP1 が ESRP のプロモーター上に結合することが示された。 $\delta$ EF1 と SIP1 を過剰発現させた NMuMG 細胞では ESRP の発現が減少し、 $\delta$ EF1 と SIP1 をノックダウンした NMuMG 細胞では TGF- $\beta$  による ESRP の発現抑制の阻害と FGFR のスプライシングの変化が抑制され、TGF- $\beta$  は  $\delta$ EF1 と SIP1 の発現誘導を介して ESRP の発現を抑制することが示された。
4. ヒト乳癌細胞パネルを用いて ESRP 及び  $\delta$ EF1/SIP1 の発現を解析したところ、それらの発現は負に相関した。ESRP の発現が低く、 $\delta$ EF1 と SIP1 の発現が高い乳癌細胞株は未分化で、浸潤性の高い表現型を有する Basal type の乳癌細胞に分類された。これらの細胞株で  $\delta$ EF1 と SIP1 をノックダウンすると ESRP の発現が上昇し、ヒト乳癌細胞株においても  $\delta$ EF1 と SIP1 により ESRP の発現が抑制されていることが示された。
5. ESRP の発現が低い Basal type の乳癌細胞株に ESRP を過剰発現させたところ、細胞形態が紡錘形から敷石状へと変化した。E-cadherin の発現量が上昇した。この時、間葉系マーカーの発現やアクチンストレスファイバーの形成には影響は認められなかった。NMuMG 細胞においても、ESRP を過剰発現させることにより TGF- $\beta$  による細胞形態の変化と E-cadherin の発現低下が抑制された。一方で、間葉系マーカーやアクチンストレスファイバーの形成には影響は認められず、ESRP は E-cadherin の発現量を亢進させることで EMT の抑制に機能することが示された。
6. 公開データベースを用いて乳癌患者における ESRP の発現と転移や予後との関連を解析したところ、肺転移が認められた症例では認められなかった症例と比較して ESRP の発現が低く、また ESRP の発現が低い患者群では発現量が高い患者群と比較して無肺転移生存率が低い傾向が認められた。

以上、本論文ではマウス乳腺上皮細胞 NMuMG 細胞やヒト乳癌細胞を用いて、two-handed zinc-finger 型転写因子である  $\delta$ EF1 と SIP1 による ESRP の発現抑制が、EMT に伴う間葉系型の FGFR への選択的スプライシングの変化や細胞の EMT 形質の獲得に重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究は、EMT の過程で起こる細胞の劇的な形質変化が遺伝子産物の「発現変化」だけでなく、選択的スプライシングによるタンパク質の「質の変化」にも起因することを示したものであり、EMT を標的とした新規治療戦略の開発に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。