

論文内容要旨

Dexamethasone resets stable association of
nuclear Snail with LSD1 concomitant
with transition from EMT to partial EMT

(デキサメタゾンによる EMT から partial EMT への移行
に伴って核内 Snail と LSD1 の会合をリセットする)

主指導教員：加藤 功一 教授

(医系科学研究科 生体材料学)

副指導教員：相川 友直 教授

(医系科学研究科 口腔外科学)

副指導教員：太田 耕司 教授

(医系科学研究科 公衆口腔保健学)

奥田 哲史

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

口腔扁平上皮癌は、上皮から間質への浸潤に始まり、脈管内移動を経て転移巣を形成する。上皮間葉転換 (Epithelial to Mesenchymal Transition, 以下, EMT) は、上皮細胞が可逆性に間葉細胞に転換する生理的プログラムで、癌細胞は浸潤・転移する過程でこれを利用する。近年、EMT は単純な上皮・間葉の 2 極ではなく波のような多相性を持ち、癌細胞が上皮形質と間葉形質を兼ね備えた中間相が段階的にも存在することが報告されてきた。この中間相/段階は **partial EMT** (以下, **pEMT**) と呼称され癌のいち表現型として着目されている。さらに、EMT による定常的間葉形質獲得後であっても間葉上皮転換 (Mesenchymal to Epithelial Transition, 以下, MET) が上皮形質への可塑性を担保している。また、**Epigenetic** な制御がこの多段階的かつ可逆的な性質を制御することに注目が集まっている。EMT 誘導性転写因子 **Snail** の標的遺伝子転写制御にはヒストン脱メチル酵素 **LSD1** との会合が重要な役割を果たしていることが知られており、本研究では、**pEMT-EMT** の状態が **Snail** 結合クロマチンでの **LSD1** と **Snail** の複合体形成を通じ調節される可能性を検討した。

申請者は舌癌由来細胞株 OM-1 に **Snail** をコードする *Snail* を導入した、*Vimentin* の転写活性を示しながらも *CDH1* の転写抑制がない **pEMT** 表現型を示す細胞株 (**pEMT OM-1^{Snail}**) に着目した。**pEMT OM-1^{Snail}** は、安定した **pEMT** 状態を示したが、条件依存的に EMT が誘発され、シングルセルクローニング法にて定常的に間葉形質を示し、上皮形質は完全に抑制された細胞株 (**EMT OM-1^{Snail}**) を樹立することに成功した。本研究では、この EMT の多段階性を再現する 3 つの細胞株 OM-1, **pEMT^{Snail}**, **EMT OM-1^{Snail}** を材料として用いた。まず EMT の可逆性を再現するために、細胞外刺激によって **EMT OM-1^{Snail}** から **pEMT** への MET を誘導することを試み、デキサメタゾンへの長期的な暴露が定常的 EMT を定常的 **pEMT** に逆変換することを発見した。この成果により、核内 **Snail** が **pEMT-EMT** の行き来において結合クロマチン領域に **Epigenetic** な調節を伴うことを検証できることになった。まず、直接ヒストン修飾活性を持たない **Snail** がヒストン脱メチル化を誘導するための結合パートナーの **LSD1** に焦点を当てた。近接ライゲーシオンアッセイ (以下, PLA) を使用し、OM-1, **pEMT OM-1^{Snail}**, **EMT OM-1^{Snail}** に

において Snail-LSD1 複合体を視覚化した。Snail-LSD1 複合体は核内スポットとして検出されスポット数を定量化した結果, EMT OM-1^{Snail}において Snail-LSD1 複合体の数は著明に上昇し, デキサメタゾンにより EMT OM-1^{Snail}を pEMT へ逆変換すると, その数が減少した。このことは, 核内 Snail-LSD1 複合体の数で pEMT-EMT 状態が代替できることを示した。次に LSD1 は, 結合したクロマチン領域のヒストンメチル化マークを変化させることから基質となるメチル化された H3K4 または H3K9 と Snail の間に PLA を行い, Snail 結合クロマチン領域のヒストンメチル化マークを分析した。EMT OM-1^{snail}におけるデキサメタゾン依存的 pEMT への逆行に伴い, Snail 結合クロマチン領域には H3K9 me1 が集積した。すなわち, デキサメタゾンによって Snail 結合クロマチンから LSD1 が解離した際, H3K9 me1 は脱メチル化を回避し集積した。

以上の結果より, 核内 Snail と LSD1 のクロマチン上での会合とヒストンメチル化マークの変動が pEMT と EMT の段階的行き来に伴うことが示された。このことはクロマチンに結合した Snail が周辺遺伝子の発現パターンを Epigenetic に変化させることで pEMT と EMT 相を可逆的に制御することを示唆した。またデキサメタゾンが MET を誘導することより核内レセプターが Snail 結合クロマチン複合体をリセットする可能性が示唆された。