OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Regulatory mechanism of the SRC oncogene expression mediated by TGF-β-responsive enhancer
Author(s)	野下, 創史
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/93028
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　野下　創史　）	
論文題名	Regulatory mechanism of the *SRC* oncogene expression mediated by TGF-β-responsive enhancer （TGF-β応答性エンハンサーを介したがん遺伝子*SRC*の発現制御機構）

論文内容の要旨

がんは遺伝子疾患の一種であり、がんの初期発生や悪性化にはがん遺伝子の突然変異や過剰発現が大きく関与することが知られている。がん遺伝子*SRC*は非受容体型のチロシンキナーゼをコードしており、SRCタンパク質は細胞内外の刺激に応答して細胞の増殖や生存、運動などに関わる様々な細胞内シグナル伝達経路を制御する。SRCの恒常活性化型変異体は細胞の形質転換を誘導するとともに、がん細胞の浸潤・転移を促進することが知られており、正常細胞においてはSRCの発現量及び活性状態は厳密に制御されている。ヒトのがんにおいて、SRCは高い割合で過剰発現・高活性化していることが報告されており、SRCの制御破綻ががん進展に深くかかわることが示唆されている。興味深いことに、がんにおいてSRC遺伝子に変異が生じることは非常に稀であり、多くの場合でSRCは過剰発現していることが確認されている。しかしながら、SRCの過剰発現が生じる分子機構やSRCの過剰発現が持つ生理的意義については不明な点が多く残されている。我々はこれまでに、ヒト乳腺上皮細胞株MCF10Aを用いた検討により、がん組織中で豊富に存在することが報告されているサイトカインの一種、TGF-βによってSRCの発現量が増加する現象を見出している。そこで本研究では、TGF-β刺激によってSRCの発現量が増加する現象の詳細な分子機構の解明とSRCの発現量の増加が細胞機能に与える影響について解析を実施した。

まず、TGF-β刺激によるSRCの発現量の増加は、*SRC*遺伝子の転写活性が増大していることに起因することを示した。また、TGF-βシグナル伝達経路の下流で機能するSMADが*SRC*遺伝子の転写活性化に必要な転写因子であることを明らかにした。次に、*SRC*遺伝子の転写制御に必要なゲノム領域を同定するために、抗SMAD2/3抗体を用いたクロマチン免疫沈降法による網羅的解析を行ったところ、*SRC*のプロモーター周辺にSMADの結合を示すピークが複数確認され、いずれの領域も活性化型エンハンサーを示すヒストン修飾と共局在していることが明らかとなった。さらに、SMADが結合しているエンハンサーのうち、TGF-βの刺激に応答して*SRC*のプロモーター活性を高めるために必須な領域を同定し、TGF-β-responsive SRC Enhancer (TSE)と命名した。また、TSEのDNA配列に基づいた転写因子モチーフ解析の結果、SMADに加えてAP-1ファミリー転写因子であるJUNもSRCの転写活性の増大に必要であること見出し、TGF-β/SMAD経路とTGF-β/JNK/JUN経路、及びTSE配列を介した*SRC*遺伝子の発現制御機構を明らかにした。

続いて、SRCの発現量の増加の生理的意義を解析するために、ゲノム編集によってTSE欠損株を作製し、TSE欠損株ではTGF-β刺激によってSRCの発現量が変動しないことを確認した。興味深い事に、野生型株とTSE欠損株間でTGF-β刺激後の細胞増殖や細胞形態に顕著な違いは確認されなかった一方で、SRCの発現量の増加はSRCの基質であるFAKの効率的なリン酸化に必要であり、TSE欠損株ではSRC/FAK経路で制御されることが知られている細胞の運動能が有意に減少することを示した。

本研究により、TGF-βによる*SRC*遺伝子の発現制御機構が明らかとなり、がんにおいてSRCの発現量が増加する分子機構の一端が解明されたと考えられる。また、SRCの発現量の増加はTGF-βによる細胞の運動能の亢進に必須であることが示され、がん細胞におけるSRCの過剰発現は、がんの浸潤・転移を促進している可能性が示唆された。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　野下創史　）	
論文審査担当者	（職）	氏　名
	主査　教授	石谷　太
	副査　教授	岡田眞里子
	副査　特任教授	岡田雅人

論文審査の結果の要旨

がん原遺伝子 SRC は細胞の増殖や生存、運動などに関わる多様なシグナル伝達経路を制御するチロシンキナーゼである。がんにおいて、SRC は発現量の亢進・高活性化が報告されており、SRC の制御破綻ががんの悪性化に寄与すると考えられている。しかしながら、がんにおいて SRC の制御破綻が生じる分子機構や生理的な意義については未解明な部分が多い。本研究では、ヒト乳腺上皮細胞株 MCF10A において、がん悪性化に関わるサイトカインの一種である TGF-β が SRC の発現量を増加させる現象に注目し、その詳細な分子機構の解明に取り組むとともに、SRC の発現量の増加が細胞機能に与える影響について解析を実施した。

まず、TGF-β 刺激によって *SRC* 遺伝子の発現が転写レベルで活性化していることを確かめ、SRC の発現量の増加には転写因子 SMAD が必須であることを示した。また、SMAD が結合するゲノム領域を網羅的に解析した結果、*SRC* 遺伝子のプロモーター近傍において、TGF-β 刺激依存的に SMAD が結合する複数のエンハンサー領域を同定し、そのエンハンサー領域のうち一つが TGF-β 刺激に応答して *SRC* 遺伝子プロモーターを活性化させることを明らかにした（TGF-β-responsive SRC Enhancer, TSE と名付けた）。さらに、TSE 配列の転写因子モチーフ解析の結果、SRC の発現量の増加には転写因子 JUN も必要であることを見出した。

上記の結果に基づき、次に TSE を介した SRC の発現量の増加が細胞機能に与える影響について解析を実施した。ゲノム編集によって TSE 欠損細胞株を作製したところ TSE 欠損株では TGF-β 刺激による SRC の発現量の増加が抑制されることを見出した。野生型株と TSE 欠損株との比較解析の結果、TSE を介した SRC の発現量の増加は SRC の基質である FAK の活性化に必須であることを見出した。さらに、SRC/FAK 経路と深く関連する細胞機能である細胞運動に注目して解析を行った結果、TSE を介した SRC の発現量の増加は、TGF-β によって誘導される細胞運動に必須であることを明らかにした。

これらの発見はがん遺伝子 SRC の制御メカニズムに新たな識見を与えるものである。よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。