

令和元年5月7日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08569

研究課題名(和文)p53による上皮エピゲノム調節機構の解明

研究課題名(英文)Epigenetic regulation of the epithelial integrity by p53

研究代表者

及川 司(Oikawa, Tsukasa)

北海道大学・医学研究科・講師

研究者番号：20457055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの癌の80%以上が上皮組織由来であるが、悪性化に伴い、少なくとも一過的に上皮形質を失い、間葉形質を獲得(上皮-間葉転換, EMT)することが知られている。EMTは癌細胞に運動能、浸潤能、薬剤耐性能などを付与することが知られているが、EMTは細胞が十分に癌化する前であっても起こり、癌の早期発見とその切除だけでは解決策とは言えない。従って、上皮細胞がその本来的性質を保つ仕組みの根本的な理解が必要と言える。

癌抑制タンパクp53は様々な分子の転写を司る転写因子であり、癌の半数以上は正常p53を失っていることが知られている。本研究では、p53が上皮細胞の本来的性質を維持させる新しい機構を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、長期培養した幾つかのヒト癌細胞株やヒト正常乳腺上皮細胞を用いた解析から、上皮形質の維持機構に多様性、もしくは、多層性がある可能性を強く示唆した。このような多様性が培養細胞だけでなく正常組織にも存在する普遍的なものであるならば、癌研究だけでなく、iPS技術などを用いる再生医療の安全性にも深く考慮されるべき、未解明の上皮形質維持機構が存在することになる。

研究成果の概要(英文)：Analyses of various cancer cells have demonstrated a statistical correlation between TP53 mutations and the infringement of epithelial phenotypes, suggesting that some epithelial cells require TP53 to maintain their integrity. Likewise, the ENCODE project indicates the enrichment of putative p53 binding motifs within the regulatory regions of epithelial genes. However, the roles of p53 in epithelial integrity still largely remain elusive. We showed that epithelial genes may require normal-p53 to encounter EZH2. The loss of normal-p53 induced EZH2-mediated H3K27me3 deposition at histones regulating epithelial genes, such as CDH1. p53 can access this locus in epithelial cells but not in mesenchymal cells. Our results in vitro and from TCGA datasets indicated that H3K27me3 deposition by the loss of p53 is specific to epithelial genes. Our results identified an uncharted function of normal-p53 to protect epithelial genes from EZH2-mediated repression to maintain epithelial integrity.

研究分野：細胞生物学

キーワード：p53 上皮間葉転換 ヒストン修飾 EZH2

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん細胞における上皮形質の喪失と間葉形質の獲得(EMT)、そして上皮形質の再獲得(MET)に見られる表現系の可塑性は、特に薬剤や放射線による治療環境下におけるがんの悪性進展(再発や転移)の本質と考えられる。特定の転写因子(Snail, Zeb1 など:EMT-TFs)が、サイトカイン刺激やそれ自身のエピゲノム変化により可逆的に誘導されることが可塑性の基盤であることが示唆されている(Jeff, T and Yang, J, *Genes Dev*, 2013; Puisieux, A et al., *Nat Cell Biol*, 2014)。がん抑制遺伝子 *TP53* の産物である転写因子 p53 は、いくつかの micro RNA の発現を介して、間葉系細胞に特徴的な転写因子である Zeb1 や Snail の発現を抑制することが示されている(Chang, C et al., *Nat Cell Biol*, 2011; Kim, T et al., *J Exp Med*, 2011)。一方、乳がんや肺がんにおいて p53 の喪失は、幹細胞様の遺伝子発現パターンと相関することも示されており(Mizuno, H et al., *PNAS*, 2010)、p53 が細胞の分化状態、特に上皮細胞形質を決定する上で中心的な働きをしていることが示唆されてきた。

国際的な大規模エピゲノム解析プロジェクトである ENCODE プロジェクトにより、「エンハンサー」が特定のエピゲノム状態を持つゲノム領域として定義し直され、細胞系譜を特徴付ける遺伝子発現と密接な関わりがあるとされた。すなわち、特定の細胞系譜を特徴づける遺伝子近傍のエンハンサーは、その細胞系譜特異的に形成されることが示されたが、興味深いことに、上皮細胞系譜特異的に形成されるエンハンサー部位には、p53 結合候補配列が濃縮していた(Ernst, J et al., *Nature*, 2011; The ENCODE Project Consortium, *Nature*, 2012)。p53 は様々な分子の発現を誘導する転写因子として最も良く研究されてきた分子の一つであるが、上皮への分化を引き起こす「マスター転写因子」であるとの報告はない。従って上記の知見は、p53 が上皮細胞において特定のゲノム領域に結合し、転写活性とは独立にエピゲノム状態を調節し、エンハンサーそのものを作り出している可能性を示唆しており、それを支持する報告も出てきている(Sammons, M et al., *Genome Res*, 2015)。

申請者は、乳がん細胞において p53 の状態(変異型、欠失、野生型)に応じて発現量の変動する分子をスクリーニングし、上皮性維持・獲得に必須である分子群(上皮性因子群: *CDH1*, *OVOL1*, *GRHL2* など)を抽出した。この中には遺伝子間領域(intron 領域を含む)に存在するエンハンサー部位(ENCODE project の定義による)に p53 結合候補配列が存在するものがあった。つまり、p53 により直接エピゲノム状態が調節されている可能性が考えられた。そこで野生型 p53 を持ち、p53 ノックダウン(KD)により EMT を起こすヒト肺がん細胞株 A549 と、ヒト正常二倍体繊維芽細胞である BJ 細胞を比べながら、(1)このゲノム領域に p53 が結合するか、(2)p53KD により周辺ゲノム領域のヒストンコードが変化するか、を ChIP アッセイにより調べた。その結果、BJ 細胞ではどの領域においても p53 は結合せず、ヒストン H3 の Lys27 がトリメチル(H3K27me3)化されていた。一方 A549 では遺伝子の 5'上流に p53 が結合し、この領域はヒストンコードから見ても、確かにエンハンサーの特徴(H3K4me1, H3K4me3, H3K27ac)を示した。そしてこの領域は p53KD により、H3K27me3 が増加することが分かった。ただしウェスタンブロットから見た H3K27me3 の総量は変化しなかった。上記の結果は、p53 が上皮性因子群のエンハンサー部位に結合し、この部位が転写抑制性ヒストン修飾 H3K27me3 に支配されるのを防いでいると解釈することができる。実際に、H3K27 のメチル化酵素である EZH2 の発現をあらかじめ siRNA で抑制しておく、p53KD による EMT は抑制された。

2. 研究の目的

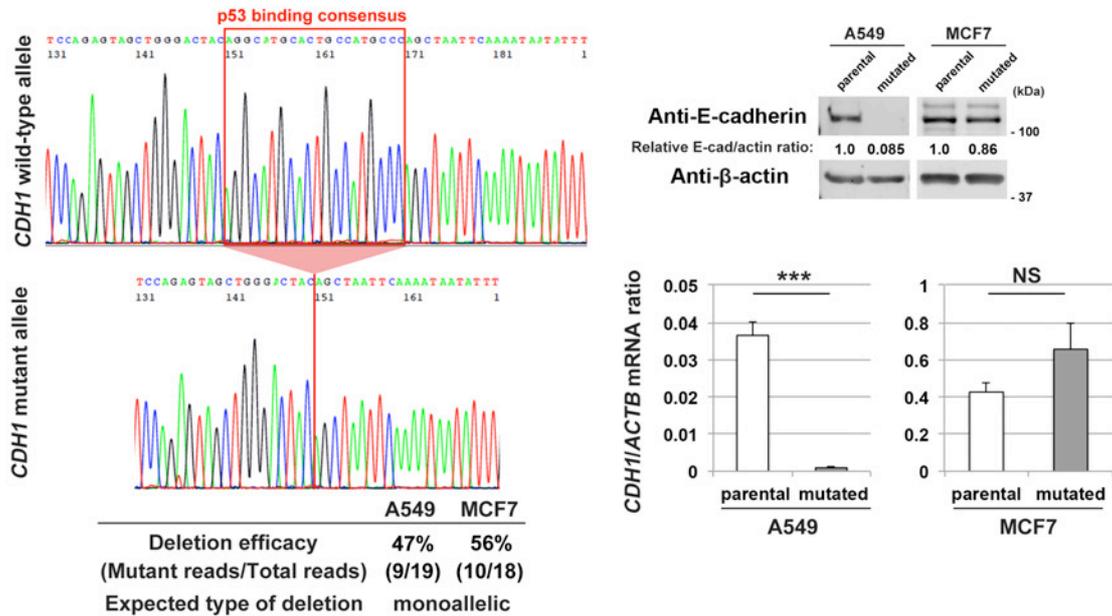
本研究では、上皮性因子群の発現に関して p53 が EZH2 と機能的に拮抗することを証明するために、次の課題に取り組む。(1) H3K27me3 に対する抗体を用いた ChIP アッセイと次世代シーケンサー解析を行い、p53 喪失時の H3K27me3 の分布変化がゲノム全域に渡って見られるのか、あるいは上皮性因子群の遺伝子座近傍においてのみ見られるのか、解析する。p53 の有無で H3K27me3 の総量に変化が見られないことから、後者であると予想される。さらにその領域近傍に p53 結合候補配列を探索する。(2) p53 喪失時の H3K27me3 の分布変化がゲノム上の p53 結合部位に局限して起きていることが示されたら、p53 と EZH2 が拮抗するメカニズムを調べる。具体的には、p53 と結合するヒストン脱メチル化酵素を同定する。(3) The Cancer Genome Atlas (TCGA)に登録された様々なヒトがんの RNA-Seq データベースを解析し、「EZH2 と上皮性因子群との負の相関は、野生型 p53 が存在しない時にのみ見られる」か否かを検討する。

3. 研究の方法

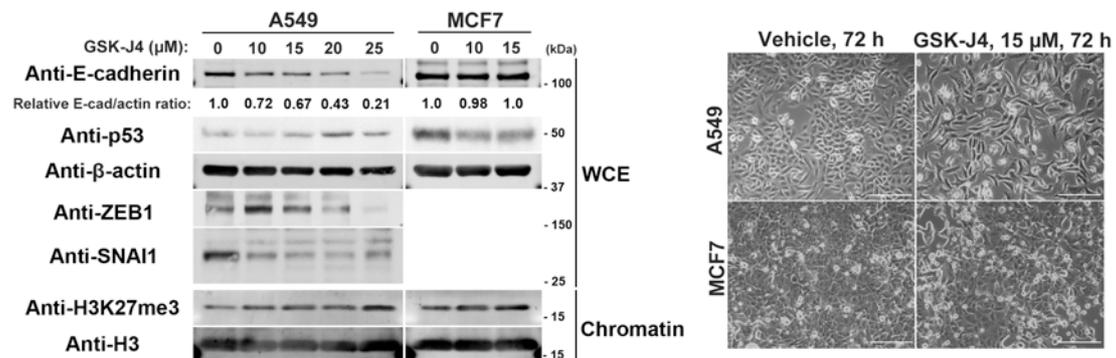
上皮特有の遺伝子発現において p53 と EZH2 が機能的に拮抗することを証明するために、次の課題に取り組む。(1)p53 喪失時の全ゲノムにわたるエピゲノム変化を、ChIP-Seq 解析により解析する。上皮特有の遺伝子近傍において、主に抑制性ヒストンマーク H3K27me3 が増加することを示す。(2)p53 と結合するヒストン脱メチル化酵素を同定する。上皮細胞でこの発現を抑制すると、p53 を喪失した時と同様に上皮-間葉転換を引き起こすことを示す。(3) The Cancer Genome Atlas (TCGA)に登録された様々なヒトがんの RNA-Seq データベースを解析する。上皮細胞に特有の分化状態や機能に関わる遺伝子の発現と EZH2 の発現が、野生型 p53 が存在しない時にのみ負に相関することを示す。

4. 研究成果

(1) p53 喪失時のエピゲノム変化がゲノム全体に及んでいるのか、一部に限られるのかを、H3K27me3 に対する抗体を用いた ChIP アッセイと次世代シーケンサー解析(ChIP-Seq 解析)を行い、検討した。A549 細胞を用いた解析では、p53KD による H3K27me3 の変化は、E-cadherin をコードする *CDH1* 座を含むゲノムの一部領域で起きた。さらに、*CDH1* 座のこの領域の近傍に p53 結合候補配列があることも明らかとなった。p53 結合候補配列とは、RRRCWWGYYY (R=purine, W=A or T and Y=pyrimidine)が 0-13 bp のスペーサー配列を介して、パリンドローム構造を成している配列である。p53 結合候補配列の探索は、p53scan アルゴリズム(Smeenk, L et al., *Nucleic Acid Res*, 2008)を用いた。さらに、この配列が実際に p53 と結合することを、p53 抗体を用いた ChIP-qPCR により確認した。ゲノム編集技術を用いて *CDH1* の 5'非翻訳領域に存在する p53 結合配列を削除したところ、E-cadherin の発現が抑制された。従って、こうした p53 結合配列が E-cadherin の発現において重要であることが明らかとなった。ただし、p53 喪失しても EMT しない MCF7 細胞では、p53KD による *CDH1* 座の H3K27me3 変化、p53 結合可能配列への p53 結合、及び、p53 結合可能配列の削除による E-cadherin の発現抑制が見られなかった(下図)。

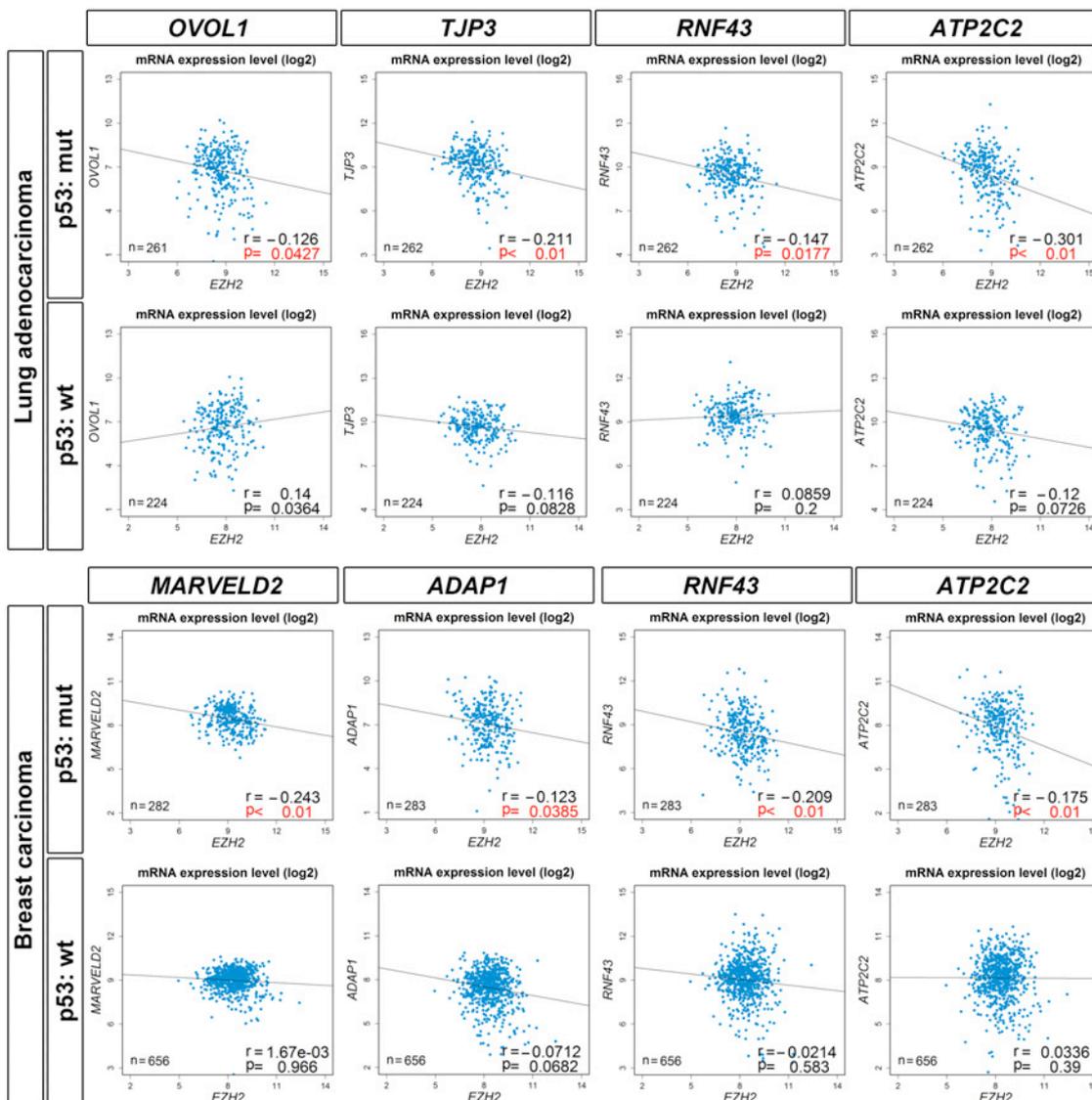


(2) ある特定のゲノム領域で p53 が H3K27me3 による支配を抑制することから、p53 と共に作動する H3K27me3 脱メチル化酵素が存在すると考えられた。このような脱メチル化酵素として、既に JMJD3/KDM6B が知られていた(Williams, K et al., *PLOS ONE*, 2014)。そこで、JMJD3/KDM6B を含む H3K27 脱メチル化酵素の阻害剤である GSK-J4 を用いた。その結果、GSK-J4 による処理は、A549 細胞において p53KD と同じ効果、すなわち EMT 様変化を引き起こされた。ただし、p53 喪失しても EMT しない MCF7 細胞では、この効果は見られなかった(下図)。



(3) The Cancer Genome Atlas (TCGA)に登録された様々なヒトがんの RNA-Seq データベースを解析し、*CDH1*, *OVOL1*, *GRHL2* など、上皮細胞としてのアイデンティティに深く関わる遺伝子の発現と *EZH2* の発現が、p53 の有無に依存してどのように相関するかを検証した。まず、(1)で行った ChIP-Seq 解析の結果、p53KD によってその遺伝子座近傍で H3K27me3 が増加した上皮性遺伝子を抽出した。次に、それらの上皮性遺伝子の発現と *EZH2* の相関を、母集団を

「野生型 p53 を持つ群」と「野生型 p53 を持たない群」とに分けて解析した。その結果、肺がん及び乳がんのデータベースにおいて、それぞれ複数の上皮性遺伝子が「野生型 p53 を持たない」群(p53:mut)のみで *EZH2* と負の相関を持った(下図)。すなわち、複数の上皮性遺伝子が、p53 と *EZH2* の競合によりその発現が制御されている可能性が示唆された。



本研究では、上皮性を p53 に依存する細胞(肺がん細胞 A549 や H1299)を用いる一方、上皮性を p53 に依存しない上皮細胞(乳がん細胞 MCF7 や正常乳腺上皮細胞 HMLE)を用い、比較した。後者は、p53KD によっても、遺伝子発現変化から見ても細胞形態変化から見ても、EMT を起こさない。こうした p53 への依存性の違いは何に起因するのだろうか? という問いに答えることも視野に入れ、研究を進めた。E-cadherin の発現を p53 に依存するタイプの細胞(A549 や H1299)では、先に述べた通り遺伝子の 5' 上流に p53 が結合するのに対し、p53 に依存しないタイプの細胞(MCF7 や HMLE)では結合しないことが明らかとなった。CDH1 の 5' 非翻訳領域に存在する p53 結合配列の近傍には他の転写因子の結合可能配列も存在する。このことから、他の転写因子の存在がこの領域への p53 結合に関わり、その結果、上皮性の p53 依存性を生んでいるという仮説が考えられる。あるいは、細胞内代謝状況が当該ゲノム領域のヒストン修飾に影響を及ぼし、p53 結合性と p53 依存性に関与しているのかもしれない。いずれにしても、上皮細胞の上皮性維持機構には、多層性あるいは多様性があることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2 件）

1. Oikawa T, Otsuka Y, Onodera Y, Horikawa M, Handa H, Hashimoto S, Suzuki Y and Sabe H: Necessity of p53-binding to the *CDH1* locus for its expression defines two epithelial cell types differing in their integrity. *Scientific Reports*, 8, 1595, 2018, 査読あり, 10.1038/s41598-018-20043-7
2. Oikawa T, Otsuka Y, Sabe H: p53-Dependent and -Independent Epithelial Integrity: Beyond miRNAs and Metabolic Fluctuations. *Cancers*, 10(6), E162, 2018, 査読あり, 10.3390/cancers10060162

〔学会発表〕（計 5 件）

1. Oikawa T, Shino Y, Kurosawa S, Onodera Y, Otsuka Y, Hashimoto A, Sabe H: Requirement for p53 in intra-nuclear dynamics of the K27-trimethylated histone H3 during replication. Gordon Research Conference, 2018 年
2. Oikawa T, Shino Y, Kurosawa S, Onodera Y, Otsuka Y, Hashimoto A, Sabe H: Requirement for p53 in intra-nuclear dynamics of the K27-trimethylated histone H3 during replication. Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB, 2018 年
3. Oikawa T, Otsuka Y, Onodera Y, Horikawa M, Handa H, Hashimoto A, Hashimoto S, Suzuki Y, Sabe H: p53 binds to the *CDH1* locus in epithelial cells to antagonize EZH2-mediated H3K27me3 deposition and the onset of mesenchymal programs. ConBio2017, 2017 年
4. Oikawa T, Otsuka Y, Onodera Y, Horikawa M, Handa H, Hashimoto A, Hashimoto S, Suzuki Y, Sabe H: Necessity of p53-binding to the *CDH1* locus for its expression defines two epithelial cell types with different integrity. 第 76 回日本癌学会学術総会, 2017 年
5. Oikawa T, Otsuka Y, Handa H, Hashimoto A, Hashimoto S, Suzuki Y, Sabe H: p53 antagonizes EZH2 function to maintain epithelial integrity. 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://g21001.med.hokudai.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。