

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03431

研究課題名（和文）ヒストンメチル化酵素KMT2変異によるエピゲノム異常と子宮内膜がん発症および進展

研究課題名（英文）Histone methyltransferase KMT2 mutation-induced epigenomic abnormalities and endometrial cancer development and progression

研究代表者

畑田 出穂（Hatada, Izuho）

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：50212147

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：子宮内膜がんは我が国の婦人科悪性腫瘍で最も新規患者数が多い疾患である。我々はこれまでに、子宮内膜がん症例ではエンハンサー制御に関わるヒストンメチル化酵素・KMT2CおよびDで高頻度に機能欠損型変異が生じていることを見出した。我々は子宮内膜がん由来培養細胞株でKMT2C/Dをノックアウトし、KMT2欠損がエンハンサーの大規模消失により遺伝子発現のゲノムワイドな低下を引き起こすこと、またそのような遺伝子は上皮機能に関連したものに多いことを明らかにした。実際、KMT2欠損細胞では上皮細胞極性が攪乱されていた。さらにバイオインフォマティクス解析等より、複数のKMT2変異がん治療標的候補を抽出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KMT2変異は子宮内膜がん全体の約3割で認められるにも関わらず、がんの発症や進展における変異の意義は全くわかっていなかった。本研究によって、KMT2変異が子宮内膜がん実際にエンハンサー機能障害により上皮機能に関連した遺伝子発現を抑制することが明らかとなり、正常な組織構造からの逸脱を引き起こすことがKMT2変異の子宮内膜がん病態における意義であることが示唆された。このようにKMT2変異がんの分子生物学的特徴を明らかにしたほか、KMT2変異がんの治療標的候補を抽出できたことから、本研究によって、将来的にKMT2変異がん特異的治療を開発する上で重要な知見を提供することができたと考えている。

研究成果の概要（英文）：Endometrial cancer is the most common gynecological malignancy in Japan. We have previously found that KMT2C and D, histone methyltransferases involved in enhancer regulation, are frequently mutated in endometrial cancer patients. We knocked out KMT2C/D in cultured cell lines derived from endometrial carcinoma, and found that KMT2 deficiency causes genome-wide downregulation of gene expression due to massive loss of functional enhancers. Downregulated genes are enriched in those associated with epithelial functions. Indeed, epithelial cell polarity was disrupted in KMT2-deficient cells. Furthermore, our bioinformatics analysis identified several candidates of therapeutic targets for KMT2 mutant cancers.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

我が国における子宮内膜がん(子宮体がん)の罹患数は増加傾向にあり、近年では婦人科悪性腫瘍の中で罹患数第一位を占めている(2014年:13,889人、国立がん研究センター統計より)。子宮内膜がんのリスク因子として食の欧米化や肥満、出産未経験などが挙げられ、現在の社会的状況を考慮すると今後も国内罹患数のさらなる増加が見込まれる。子宮内膜がん治療では、外科手術による子宮摘出が第一選択であり、早期の発見による治癒率は比較的高い。しかし、高度に進行したがんでは治療オプションも限られており、依然として予後不良である。また、患者全体数の増加に伴い30代から40代にかけての若年層患者の罹患数も増加し、晩婚化・高齢出産が進む昨今では、子宮摘出を必要としない妊孕性温存治療が強く望まれる。

近年、米国がんゲノムアトラスプロジェクト(TCGA: The Cancer Genome Atlas)によってがん患者から得られた臨床検体の大規模ゲノム解析が行われ、子宮内膜がんについても頻発する遺伝子変異の特徴づけが進んだ(TCGA, 2013, Nature)。2013年にNature誌に掲載されたTCGAの報告によると、子宮内膜がんでも頻繁に認められる遺伝子変異は、PTEN遺伝子の機能欠損型変異である(約7割)。がん抑制遺伝子であるp53変異を有する患者は全体の3割程であるが、PTEN変異型子宮内膜がんに比べると予後が悪く、より増悪であると考えられる。しかし、最近の動物モデルを使用した研究によると、子宮内膜がんの原発組織である子宮上皮でのPTENやp53の欠損だけでは、どちらも子宮内膜がんの発症には不十分であることがわかってきた(Daikoku et al. 2008, Cancer Res, Liang et al. 2018, PLoS Genet)。これは、子宮内膜がん発症には主要な遺伝子の欠損以外にさらなるイベントが必要であることを示唆しており、その一つの候補としてエピゲノム異常を挙げることができる。

我々はTCGAのデータベースを利用し、子宮内膜がんにおけるエピゲノム調節因子の遺伝子変異の割合とその傾向を調査した。すると子宮内膜がんでは、ヒストンメチル化酵素をコードするKMT2ファミリーの遺伝子群に、これまで考えられていた以上に高頻度で変異が認められることがわかってきた。KMT2A~Dのいずれかに変異がある症例は48.3%(246/509症例)にも上り、中でもKMT2Dの変異は子宮内膜がん全体の28.7%(146/509症例)で認められた。またKMT2Dに変異をもつ子宮内膜がんのうち87%(127/146症例)がPTENにも変異を持ち、KMT2変異のPTEN変異型子宮内膜がんへの関与が疑われた。KMT2ファミリーは主にヒストンH3の4番目のリジン残基(H3K4)のメチル化を担う。H3K4メチル化は、転写的に活性化されたプロモーターやエンハンサーを特徴付けるエピジェネティック修飾であり、特にKMT2C/Dは、H3K4モノメチル化を介してスーパーエンハンサーの形成と維持に関わることが報告されている(Local et al. Nat Gen, 2017)。KMT2C/D変異は肺がんや乳がんなど子宮内膜がん以外でも認められるものの、変異ががんに及ぼす影響は由来組織によって異なり、子宮内膜がん病態においてKMT2変異がどのような役割を持つかは明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大規模データの再解析で新たに浮き彫りとなった子宮内膜がんにおけるKMT2ファミリー遺伝子の高頻度変異、特にKMT2C/D変異(以降、KMT2変異)が引き起こ

すエピゲノム異常の生物学的意義を解明することで、KMT2 変異がんの共通性や脆弱性といった治療標的を見出し、新たな子宮内膜がん治療法の開発に繋げることである。

3. 研究の方法

KMT2 変異の子宮内膜がんにおける生物学的意義を明らかにするため CRISPR-Cas9 ゲノム編集により KMT2 欠損細胞株を樹立した(図1)。KMT2 欠損によって生じる特徴を見出すため、表現型解析(細胞増殖試験、細胞遊走試験、Xenograft 腫瘍形成試験、3次元培養試験など)や RNA-seq/ChIP-seq を実施し、KMT2 野生型細胞と KMT2 欠損細胞との間で比較を行った。

またバイオインフォマティクス解析を駆使して KMT2 変異子宮内膜がん細胞に有効な治療標的候補の探索を実施した。抽出した治療標的候補が実際に KMT2 変異子宮内膜がんにも有効か、薬剤誘導型ゲノム編集システムによる細胞競合アッセイによって検証を行った。

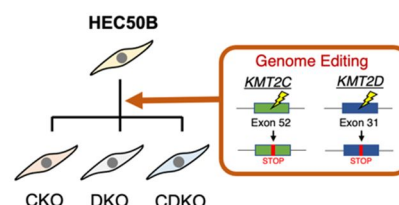


図1 ゲノム編集によるKMT2変異がんの樹立

4. 研究成果

1. KMT2 欠損細胞株の樹立と表現型解析

子宮内膜がん由来培養細胞株 HEC50B をベースに、CRISPR-Cas9 ゲノム編集によって KMT2 欠損細胞株を樹立した。2次元培養下で実施した細胞増殖試験では、いずれの KMT2 欠損細胞株でも、KMT2 野生型細胞と比べて顕著な細胞増殖抑制が認められた。ヌードマウスに細胞を移植する Xenograft 試験でも、KMT2 欠損は腫瘍形成能を低下させた。一方、細胞外マトリクス内でスフェロイドを形成させる三次元培養試験を実施したところ、KMT2 欠損細胞では放射状に突出した異常な形態のスフェロイドを形成した(図2)。透過型電子顕微鏡でのスフェロイドの形態観察より、KMT2 欠損細胞では上皮細胞極性が攪乱されていることが明らかとなった。

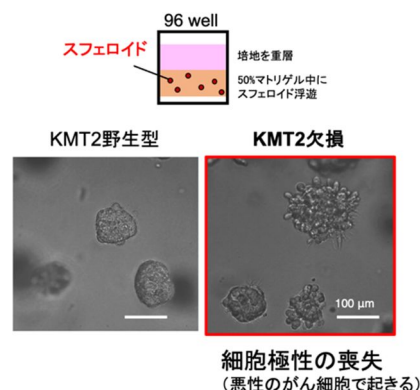


図2 三次元培養試験によるスフェロイド形成

2. 遺伝子発現解析 (RNA-seq)

KMT2 欠損による遺伝子発現への影響を検証するために、RNA-seq を実施した。KMT2 がエンハンサー制御を介して遺伝子発現を正に制御するという知見と一致して、KMT2 欠損細胞では KMT2 野生型細胞と比較して発現減少する遺伝子が多く認められた。特に KMT2C/D ダブル欠損細胞では 800 以上の遺伝子で有意な発現減少が認められた。オントロジー解析により、KMT2 欠損で発現減少した遺伝子は、上皮機能に関連したものやレチノイン酸代謝に関わるものにエンリッチしていることが明らかとなった。

3. エピゲノム解析 (ChIP-seq)

KMT2 はエンハンサーマーカーである H3K4me1 を触媒するヒストンメチル化酵素であるため、KMT2 欠損によるヒストン修飾への影響を ChIP-seq で検証した。KMT2 欠損細胞では H3K4me1 レベルがゲノムワイドに減少しており、また転写的な活性領域を示す H3K27ac レベルも特にエンハンサーと考えられる領域(転写開始点から 5,000 bp 以上離れた領域)で減少し

ていた(図3)。すなわち KMT2 欠損子宮内膜がん細胞では、大規模なエンハンサー機能障害が発生していることが示唆された。実際、KMT2 欠損細胞で活性エンハンサー領域 (H3K4me1 + H3K27ac) やスーパーエンハンサー領域 (H3K27ac シグナルから ROSE アルゴリズムを使用して抽出) が消失した遺伝子の多くで発現が減少していることが明らかとなった。KMT2 欠損細胞株で活性エンハンサーが消失し、かつ発現減少した遺伝子についてオントロジー解析を実施すると、やはり上皮機能に関連したものにエンリッチしていることが明らかとなった。

以上の解析より、KMT2 欠損はエンハンサー機能障害を介して上皮機能関連遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。このよ

うな遺伝子発現変化によって、KMT2 欠損細胞では三次元培養解析で認められたような上皮細胞極性の攪乱が生じ、正常な組織構造からの逸脱によってがんの発症や進展が助長されることが示唆された。

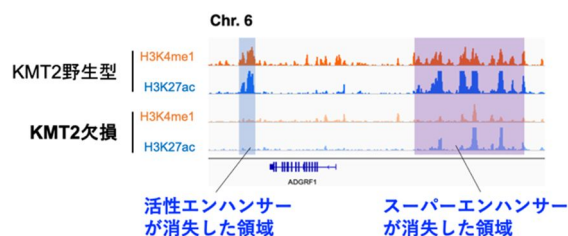


図3 KMT2欠損によって消失したエンハンサー領域の例

4. KMT2 変異がんに対する治療標的候補の探索

KMT2 変異子宮内膜がんに対する有効な治療標的候補を探索するために、1000 以上の培養細胞株に関する CRISPR ライブラリスクリーニングのデータを収録したデータベースに着目した。CRISPR ライブラリスクリーニングでは、ゲノム編集によって遺伝子を破壊した後の生存効率をハイスループットに評価することにより、細胞の生存に必須の遺伝子を知ることができる。データベースから、KMT2 に変異のある子宮内膜がん細胞の生存に必須な遺伝子を約 30 個抽出した (= 治療標的候補)。これらの候補遺伝子をノックアウトしたときに実際に KMT2 欠損がん細胞の生存を抑制できるか細胞競合アッセイによって検証したところ、2つの候補遺伝子のノックアウトが KMT2 欠損細胞の生存を顕著に抑制した。これら治療標的候補のうち1つは子宮内膜がん以外のがん種に対する治療標的としての可能性が報告されており、阻害剤として作用する低分子化合物も開発されていることから、今後 KMT2 変異子宮内膜がん治療への応用も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kobayashi R, Kawabata-Iwakawa R, Sugiyama M, Oyama T, Ohtsuka M, Horii T, Morita S, Nishiyama M, Hatada I	4. 巻 152
2. 論文標題 Multiplexed genome editing by in vivo electroporation of Cas9 ribonucleoproteins effectively induces endometrial carcinoma in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Int J Cancer	6. 最初と最後の頁 2331-2337
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ijc.34342	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林 良祐, 川端 麗香, 杉山 真言, 横堀 武彦, 森田 純代, 堀居 拓郎, 西山 正彦, 畑田 出穂
2. 発表標題 KMT2欠損によるエピゲノム異常はヒト子宮内膜がん細胞で上皮関連遺伝子の発現を障害する
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryosuke Kobayashi, Reika Kawabata-Iwakawa, Makoto Sugiyama, Takehiko Yokobori, Sumiyo Morita, Takuro Horii, Masahiko Nishiyama, Izuhu Hatada
2. 発表標題 Epigenetic dysregulations in the lysine methyltransferase (KMT2) deficient endometrial cancer cells.
3. 学会等名 The 17th International Symposium of The Institute Network
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林良祐, 川端麗香, 横堀武彦, 堀居拓郎, 西山正彦, 畑田出穂
2. 発表標題 ヒストンメチル基転移酵素に変異を伴う子宮内膜がんにおけるエピゲノム異常
3. 学会等名 日本癌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林良祐, 川端麗香, 杉山真言, 横堀武彦, 森田純代, 堀居拓郎, 西山正彦, 畑田出穂
2. 発表標題 ヒト子宮内膜がん細胞におけるKMT2変異の意義
3. 学会等名 第15回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	堀居 拓郎 (Horii Takuro) (00361387)	群馬大学・生体調節研究所・准教授 (12301)	
研究分担者	西山 正彦 (Nishiyama Masahiko) (20198526)	群馬大学・その他部局等・名誉教授 (12301)	
研究分担者	小林 良祐 (Kobayashi Ryosuke) (30802855)	群馬大学・生体調節研究所・日本学術振興会特別研究員 (P D) (12301)	
研究分担者	森田 純代 (Morita Sumiyo) (40589264)	群馬大学・生体調節研究所・助教 (12301)	
研究分担者	川端 麗香 (Kawabata Reika) (90721928)	群馬大学・未来先端研究機構・講師 (12301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------