

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 9 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15654

研究課題名(和文)血管肉腫のエピジェネティクス-KDM2Bの役割の解明とマウスモデルの作製~

研究課題名(英文) Epigenetics of Hemangiosarcoma - The Role of KDM2B and Generation of Hemangiosarcoma Mouse Model -

研究代表者

青島 圭佑 (Aoshima, Keisuke)

北海道大学・獣医学研究院・助教

研究者番号：90745069

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究を通して血管肉腫においてヒストン脱メチル化酵素KDM2BがDNA修復機構の働きを活性化し、これにより腫瘍細胞がアポトーシスを回避していること、そしてこの機構はヒストンユビキチン化(H2AK119ub1)を介して機能していることが明らかとなった。また、腫瘍移植マウスモデルにおいて腫瘍形成後にKDM2Bノックダウンまたはヒストン脱メチル化酵素阻害剤GSK-J4の投与を行うと、腫瘍の増殖が抑制されることが明らかになった。さらにマウス血管肉腫細胞 ISOS-1 由来腫瘍はイヌ血管肉腫と類似の特徴を有しており、KDM2B がイヌ血管肉腫細胞と同様のメカニズムで機能していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により KDM2B が血管肉腫の治療標的となり得ることを示し、ヒストン脱メチル化阻害剤である GSK-J4 がマウスモデルにおいて副作用なく移植細胞由来の血管肉腫の増殖を抑制できることを明らかにした。しかしながら KDM2B特異的な阻害剤が存在しないこと、そして GSK-J4 は腫瘍を退縮させなかったことから、臨床応用へはさらなる検討が必要である。本研究ではこのほかにマウス血管肉腫細胞 ISOS-1 がイヌ血管肉腫のモデルとなり得る可能性を示し、正常免疫能を有するマウスモデルにおける血管肉腫研究が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found that KDM2B, a histone demethylase, activated DNA repair system, which allowed tumor cells to avoid apoptosis. We also revealed that this was achieved through histone ubiquitination. Furthermore, KDM2B knockdown and histone demethylase inhibitor GSK-J4 treatment after tumor formation in canine hemangiosarcoma cell line xenograft mouse models decreased and slowed tumor growth, respectively. We also revealed that murine angiosarcoma cell line ISOS-1 derived tumor in BALB/c mice showed similar characteristics to clinical canine hemangiosarcoma cases. ISOS-1 also highly expressed KDM2B that worked in the same mechanism as in canine hemangiosarcoma cell lines.

研究分野：基礎動物腫瘍学

キーワード：血管肉腫 エピジェネティクス ヒストン脱メチル化 イヌ マウス

1. 研究開始当初の背景

血管肉腫はイヌに好発する悪性腫瘍で、軟部腫瘍の 20%を占める。1 年生存率はおよそ 10%で、有効な治療法は無い。未だ病態メカニズムが明らかになっておらず、血管内皮細胞のがん化機構も不明である。

DNA は核タンパク質であるヒストンに巻き付いた状態で存在している。エピジェネティクスとは、DNA メチル化やヒストンメチル化によって、ゲノム情報を変化させずに遺伝子発現を制御する機構を指す。KDM2B はヒストン脱メチル化酵素の一つであり、正常細胞では細胞増殖・老化に関与している。また、KDM2B は白血病や乳がんなどにおいて過剰発現が認められ、がん遺伝子として機能している。申請者はこれまでに、イヌ正常血管内皮細胞と 7 株のイヌ血管肉腫細胞株を用いて全てのヒストンメチル化酵素とヒストン脱メチル化酵素の遺伝子発現を比較した。その結果、ヒストン脱メチル化酵素 KDM2B がイヌ血管肉腫において、培養細胞株・臨床症例どちらにおいても高発現していること、KDM2B ノックダウンによりイヌ血管肉腫培養細胞株の増殖が著しく抑制されることを明らかにした。さらにイヌ正常血管内皮細胞に KDM2B を過剰発現させると細胞が不死化することを発見した。

がん組織はがん細胞に加えて、免疫細胞や線維芽細胞などから構築されている。このがん細胞を取り巻く環境を微小環境と呼ぶ。免疫細胞はがん細胞を排除しようとするが、がん細胞は PD-L1 などの免疫抑制因子を発現することで宿主免疫から逃れている。一方で、免疫細胞はサイトカインの分泌によりがん細胞の成長を助けることも報告されており、免疫細胞とがん細胞との複雑な関係を明らかにすることは、病態解明に向けて必須である。しかし、現在世界で利用できる血管肉腫細胞はイヌとヒトのものしかない。すなわち、*in vivo* の実験をするためには正常な免疫を持たない免疫不全マウスを使わざるを得ない。この問題を解決するためには、マウス由来の腫瘍細胞を同系統のマウスに移植する syngenic モデルの開発が必要である。しかし、マウス由来血管肉腫細胞は未だ樹立されていない。

2. 研究の目的

本研究では以下の 2 つを目的に設定する。

- (1) 血管肉腫の増殖・生存において、KDM2B が制御するメカニズムを明らかにする
- (2) マウス血管内皮細胞をがん化させ、マウス血管肉腫モデルを作製する

エピジェネティクスの観点から血管肉腫の病態に迫る研究はこれまでに報告がなく、本研究は血管肉腫の病態に全く新しい知見を提供できることが期待される。これにより、血管肉腫の進展や生存に寄与するエピジェネティック調節機構が明らかになれば、すでに開発、製品化されているヒストン修飾酵素阻害剤を用いることで、即時に臨床応用可能な新規治療法を樹立することができる。さらに、マウス血管肉腫モデルを作り出すことができれば、syngenic モデルを用いた *in vivo* 実験が可能となり、本腫瘍疾患で初めて、完全な微小環境の中での病態や腫瘍に対する宿主の免疫応答を調べることが可能となる。

3. 研究の方法

(1) イヌ血管肉腫における KDM2B の役割の解明

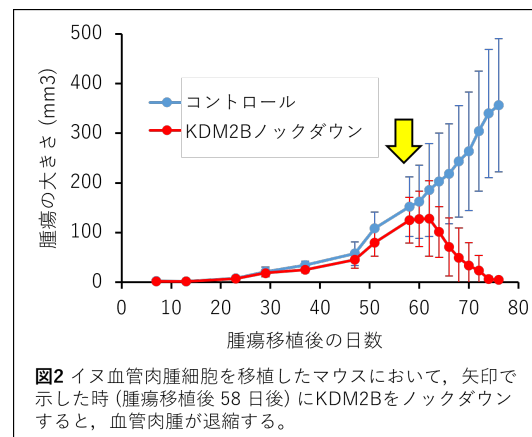
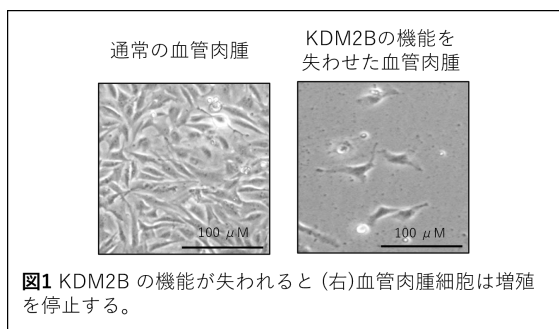
本実験ではイヌ血管肉腫培養細胞株を用いて RNA-seq を行い、KDM2B ノックダウンにより発現が変動する遺伝子群の網羅的な発現データを得る。このデータをもとに Gene Ontology(GO)解析および Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)を行い、KDM2B ノックダウンにより発現が増加または減少する遺伝子を標的候補遺伝子として絞り込む。その後、これらの遺伝子に着目して KDM2B が制御するメカニズムを調べる。また、ドキシサイクリン依存性に KDM2B のノックダウンを誘導できるイヌ血管肉腫細胞株を免疫不全マウスに移植する。腫瘍形成後にノックダウンを誘導し、腫瘍増殖への影響を調べる。さらに、ヒストン脱メチル化阻害剤 GSK-J4 による腫瘍形成マウスへの治療実験を行う。

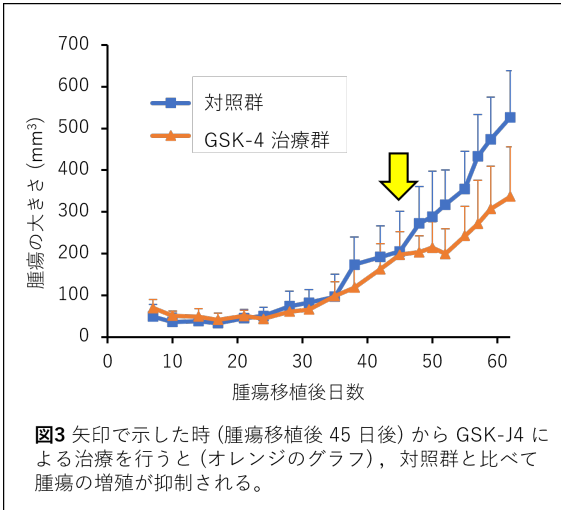
(2) マウス血管肉腫モデルの作製

マウス血管肉腫モデルを作製するために、マウスから血管内皮細胞を分離し、KDM2B 遺伝子を導入・過剰発現させる。これを同系統のマウスに移植し、造腫瘍能を調べる。また、KDM2B 過剰発現で腫瘍化が認められない場合には、がん抑制遺伝子のノックアウトを重ねて行い、造腫瘍能を得られるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) の KDM2B メカニズム解析では KDM2B が DNA 修復機構の働きを活性化し、これにより腫瘍細胞がアポトーシスを回避していることを明らかにした。また、KDM2B は血管肉腫においてヒストンユビキチン化 (H2AK119ub1)を介して機能していることが明らかとなった。さらに、血管肉腫形成マウスに対して、KDM2B ノックダウンおよび GSK-J4 投与を行ったところ、腫瘍の増殖が抑制されることがわかった。





次に(2)のマウスモデル作製では、マウス正常血管内皮細胞をマウス肺から分離し、KDM2Bを過剰発現させることで血管内皮細胞の腫瘍化を試みた。また、合わせてがん遺伝子であるPIK3CAの過剰発現も同時に行い、血管内皮細胞の腫瘍化を試みた。しかし、いずれにおいてもマウス内で腫瘍は形成されなかった。そこで、既存のマウス血管肉腫細胞(ISOS-1, UV 2)を利用し、イヌ血管肉腫細胞との相同性を探ることで、比較研究に利用できるかどうかを検討することとした。その結果ISOS-1は通常免疫能を有するBalb/cでも造腫瘍能があり、形成された腫瘍もイヌ血管肉腫と類似の特徴を有していた。また、ISOS-1においてもKDM2Bが高発現しており、イヌ血管肉腫細胞と同様のメカニズムで機能していることがわかった。

以上より、本研究においてKDM2Bが果たすメカニズムを明らかにし、ISOS-1がマウス血管肉腫細胞として比較研究に有用であることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Gulay Kevin Christian Montecillo, Aoshima Keisuke, Shibata Yuki, Yasui Hironobu, Yan Qin, Kobayashi Atsushi, Kimura Takashi	4. 巻 48
2. 論文標題 KDM2B promotes cell viability by enhancing DNA damage response in canine hemangiosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Genetics and Genomics	6. 最初と最後の頁 618 ~ 630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jgg.2021.02.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Gulay Kevin Christian M., Aoshima Keisuke, Kim Sangho, Kitaguchi Ryusei, Kobayashi Atsushi, Kimura Takashi	4. 巻 -
2. 論文標題 The expression of histone lysine demethylase 2B in canine hemangiosarcoma is associated with disease progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gulay Kevin Christian M., Aoshima Keisuke, Maekawa Naoya, Suzuki Tamami, Konnai Satoru, Kobayashi Atsushi, Kimura Takashi	4. 巻 12
2. 論文標題 Hemangiosarcoma cells induce M2 polarization and PD-L1 expression in macrophages	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-06203-w	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 GULAY Kevin Christian Montecillo, Aoshima Keisuke, Kobayashi Atsushi, Kimura Takashi
2. 発表標題 Histone lysine demethylase 2B regulates endothelial cell carcinogenesis by enhancing gene stability
3. 学会等名 8th Sapporo Summer Seminar of One Health (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Montecillo Gulay Kevin Christian、Aoshima Keisuke、Shibata Yuki、Yasui Hironobu、Yan Qin、Kobayashi Atsushi、Kimura Takashi
2. 発表標題 KDM2B promotes endothelial cell carcinogenesis by enhancing DNA damage repair through the ATM and c-FOS pathways
3. 学会等名 第6回北海道大学部局横断シンポジウム
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>本研究成果は2021年3月15日付けの北海道大学プレスリリースにて紹介された。 https://www.hokudai.ac.jp/news/2021/03/post-806.html</p>

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

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		
米国	Yale School of Medicine		