

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20841

研究課題名（和文）乳癌の形成・進展における新規ヒストン修飾制御因子の役割

研究課題名（英文）Role of a novel histone modification regulator in breast cancer tumorigenesis

研究代表者

高島 謙 (Takashima, Ken)

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教

研究者番号：10802647

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：我々は新規ヒストン修飾制御因子として核小体タンパク質Xを同定し、分子XがヒストンH3K27me3修飾を制御することを見出した。本研究では(1)分子XによるH3K27me3修飾制御メカニズムと(2)乳癌の形成・進展における分子Xの役割に着目した。まずCUT&RUN-seqの結果から、分子XはH3K27me3をゲノムワイドで制御することが明らかとなった。また分子Xは各種H3K27me3修飾酵素群と相互作用し、ヒストン修飾における"デコイ"様の役割を果たしていることが推察された。さらに免疫不全マウスへの腫瘍移植実験から、分子Xは乳癌の形成・進展に重要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子Xは乳癌の予後不良因子として報告があり、また予後不良の乳癌患者由来組織ではH3K27me3修飾の低下が指摘されていたが、両者の関連についてはこれまで知られていなかった。本研究により分子XによるH3K27me3修飾機構を見出し、また分子Xは乳癌の形成・進展に必須であることが明らかとなった。我々の治療モデルを用いた結果から、この分子Xそのもの、またはヒストン修飾制御機構は難治性乳癌の新規治療標的となり得ることが推察され、生物学的意義のみならず臨床応用へ発展性も期待できる知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We identified nucleolar protein X as a novel histone modification regulator and found that molecule X regulates histone H3K27me3 modification. In this study, we focused on (1) the regulatory mechanism of H3K27me3 modification by molecule X and (2) the role of molecule X in the formation and progression of breast cancer. First, CUT&RUN-seq revealed that molecule X regulates H3K27me3 genome-wide. Molecule X interacted with various H3K27me3 modifying enzymes, and was speculated to play a "decoy"-like role in histone modification. In addition, tumor transplantation experiments in immunodeficient mice revealed that molecule X is important for the formation and progression of breast cancer.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：ヒストン修飾 核小体 乳癌

1. 研究開始当初の背景

乳癌は女性の癌で最も多く、罹患率や死亡率は増加の一途をたどっている。新たな治療標的の探索のためにも乳癌の形成・進展メカニズムの解明は急務である。特に治療抵抗性の予後不良の乳癌では、ヒストン修飾をはじめとしたエピジェネティクスの異常が認められるが、その原因や意義については不明な点が多い(Garcia-Martinez et al., *Nat. Commun.*, 2021)。

(1) 新規ヒストン修飾制御因子 X による H3K27me3 修飾メカニズムの解明

最近、申請者は新規ヒストン修飾制御因子として核小体タンパク質 X を同定し、分子 X が転写抑制性のヒストン修飾 H3K27me3 修飾の責任酵素と相互作用することを見出した。さらに『分子 X は H3K27me3 修飾を負に制御する』ことを発見したが(未発表) 詳細な分子機構は不明である。H3K27me3 修飾は適切な遺伝子発現の制御に必須であり、正常発生・分化・生理状態の維持に重要である。その破綻は乳癌などの多くの腫瘍で見られるが、制御機構には不明な点が多い(Greer et al., *Nat. Rev. Genet.*, 2012)。

(2) 乳癌の形成・進展における新規ヒストン修飾制御因子 X の役割の解明

興味深いことに、分子 X はエストロゲン刺激で発現誘導され、乳癌培養細胞の増殖に必須であること、さらに分子 X の高発現は乳癌の予後不良因子として報告されている。そして重要なことに予後不良の乳癌では H3K27me3 修飾が低下している。これらの関連は不明であり、また乳癌での H3K27me3 修飾の異常の意義は明らかになっていない。

2. 研究の目的

上記の背景から、申請者は分子 X が乳癌のエピジェネティクス異常や遺伝子発現の変化を引き起こし、乳癌の性質に影響を与えていると考えた。本研究では「新規ヒストン修飾制御因子 X が H3K27me3 修飾を負に制御する機構の全容を解明し、この機構が乳癌の形成や進展に及ぼす影響を明らかにすること」を目的とする。本研究は申請者が独自に発見した「分子 X は H3K27me3 修飾を負に制御する」という現象を切り口に、これまで不明だった乳癌でのエピジェネティクス制御異常の仕組みや意義に迫る。申請者は本研究で乳癌での分子 X による H3K27me3 制御の重要性を示し、新規治療標的を見出すことで、乳癌に対するエピジェネティクス創薬の新たな可能性を切り開く。

3. 研究の方法

研究項目 1：分子 X が H3K27me3 を負に制御するメカニズムの解明

これまで分子 X は H3K27me3 修飾酵素の PRC2 複合体と脱メチル化酵素 JMJD3 の両方と相互作用し、H3K27me3 を負に制御することが明らかになったが、その詳細は不明である。

(1) 分子 X が PRC2 複合体、JMJD3 の機能に及ぼす影響

分子 X 過剰発現・欠損細胞での PRC2 や JMJD3 の発現量を調べる。さらに分子 X と H3K27me3 制御因子のリコンビナントタンパク質を用い、結合部位や様式を明らかにし、分子 X がヒストンと H3K27me3 制御因子の結合に及ぼす影響についてもプルダウン法により調べる。

(2) 分子 X がゲノムワイドでのエピゲノム状態や遺伝子発現に及ぼす影響

分子 X による H3K27me3 修飾の制御がゲノム局所的な現象なのか、ゲノム全般に及ぶ現象なのかという点を明らかにするため、分子 X 欠損・過剰発現細胞について CUT&RUN-seq を行い(Skene PF et al., *Elife*, 2017)、H3K27me3 の分布を調べる。次に RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い、CUT&RUN-seq の結果と合わせて分子 X 依存的に発現が変動する遺伝子と分子 X 依存的に制御されるエピゲノム状態との関連を解明する。乳癌の形成・進展に影響を与える遺伝子群の発現が変化するかも調べる。

研究項目 2：乳癌の形成・進展における分子 X の役割の解明

これまでの申請者の解析から、分子 X 欠損乳癌細胞では細胞増殖、遊走・浸潤能、足場非依存的な sphere 形成能が著しく減少することが明らかとなった。これらの表現系が分子 X による H3K27me3 制御に依存するか検討するため、分子 X 欠損・過剰発現乳癌細胞に対し PRC2 構成因子や JMJD3 の欠損・過剰発現を行い、表現系への影響を調べる。次に生体での分子 X の腫瘍形成・転移への役割を評価するため、分子 X 欠損・過剰発現乳癌細胞を用いて、免疫不全マウスへの移植実験を行う。経皮的な移植により腫瘍径の違いから腫瘍形成への影響を検討する。

4. 研究成果

1. 分子Xはポリコーム複合体PRC2とEED WD40ドメインを介して結合する

分子XはヒストンH3K27me3修飾を抑制するが、その分子機構を明らかにするため、分子XおよびH3K27me3修飾酵素群であるPRC2との結合様式を検討した。培養細胞への過剰発現系での実験から、分子XはPRC2構成因子のEZH2、EED、SUZ12との相互作用することが明らかとなった(図1A)。リコンビナントタンパク質を用いた解析から、分子Xはその中でもEEDと直接的に結合することが明らかとなり、PRC2がH3K27me3修飾を認識し、周囲にH3K27me3修飾を拡大させるために必要なEED WD40ドメインが、分子Xとの結合に必要であることが明らかとなった(図1B)。この結果から、分子XはヒストンとPRC2との結合を阻害することによって、ヒストンH3K27me3修飾を抑制していることが示唆された。また分子XのN末端領域がEEDとの結合に必要なことも、リコンビナントタンパク質を用いたプルダウンアッセイから明らかとなった。

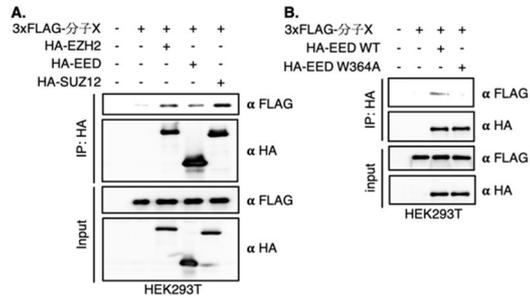


図1. 分子Xはポリコーム複合体PRC2のEEDと結合し、またその結合にはEEDがヒストンとの結合に必要なWD40ドメインが必要である。HEK 293T細胞に分子XおよびPRC2の構成因子を過剰発現させ、免疫沈降およびウエスタンブロットにより相互作用を検討した。EED W364A変異体はEEDとヒストンH3K27me3との直接的な結合に必要であるWD40ドメインの機能欠損体であり、分子XはWD40ドメインを介して、EEDと結合している。

2. 分子XはゲノムワイドにH3K27me3修飾を制御する

分子Xの安定過剰発現株を用いた生化学的解析から、分子XはH3K27me3修飾を抑制することが示唆されたが(図2A)、これがゲノム局所における現象なのか、ゲノムワイドでの現象なのか不明であった。分子X過剰発現乳癌細胞を用いたCUT&RUN-seqによる解析から、分子X過剰発現により、ゲノムワイドにH3K27me3修飾の減少を認めた(図2B)。

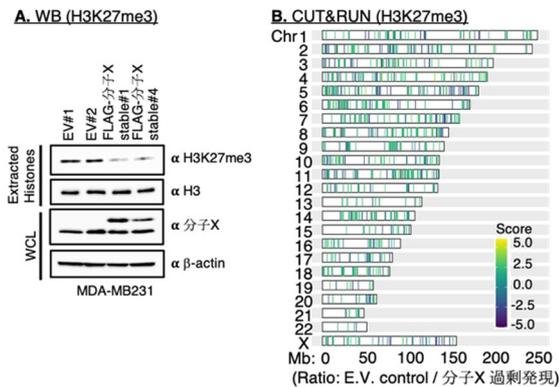


図2. 分子X過剰発現乳癌細胞でのH3K27me3修飾の変化。Scoreが高いほど、分子X過剰発現細胞でH3K27me3修飾が低下していることを示している。

3. 分子Xが遺伝子発現に及ぼす影響

分子X欠損細胞を用いてRNA-seqによるトランスクリプトーム解析を行なったところ、分子X欠損細胞では1213遺伝子のDEG(発現量変動遺伝子)を認め、その大半において発現量が著減していることが認められた。これは分子X欠損細胞では転写抑制性のH3K27me3修飾が増加しているという過去の我々のデータから得られた知見と傾向が合致する結果であった。

さらにGSEA解析の結果から、分子X欠損細胞ではH3K27me3によって発現制御される遺伝子の発現が著減しており、また細胞周期、脂質代謝、DNA複製、細胞分化・運命などの多様な遺伝子群の発現量が低下していることが明らかとなった。

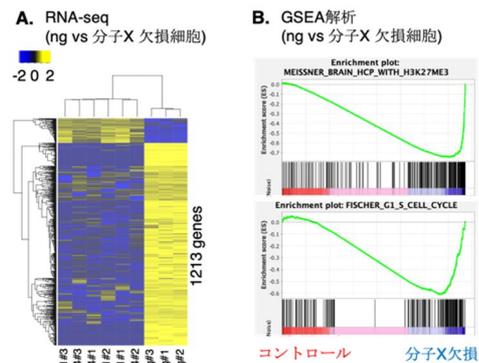


図3. 分子X欠損細胞でのトランスクリプトーム解析。分子X欠損細胞を用いたRNA-seq解析について、発現量変動遺伝子についてHeat mapで表した。またトランスクリプトームについてGSEAによるGO解析を行なったところ、H3K27me3によって発現制御されている遺伝子群において有意な発現量の低下を認めた。また、分子XはG1-S期制御をはじめとする細胞増殖に関わる遺伝子の発現にも影響を与えていた。

4. 分子Xが乳癌の形成・進展に与える影響

我々のこれまでの解析から、分子X欠損乳癌培養細胞では、in vitroでの細胞増殖が顕著に抑えられていることが判明していた。これが生体内ではどうなのか、免疫不全マウスに分子X欠損乳癌細胞を移植する担癌マウスモデルにて評価を行なった。図4に示すとおり、分子X欠損乳癌細胞は生体内においても、その増大が顕著に抑制されていた。またトリプルネガティブ乳癌モデルとして用いられるMDA-MB468細胞を免疫不全マウスに移植し、さらに分子Xを標的としたsiRNAに上皮特異的に取り込まれるようなRNAアプタマーを付加した分子X-標的AsiCsにて治療を行なった。分子X-標的AsiCsの投与により、腫瘍組織中の分子Xの発現は半分程度まで抑制されており、また治療群ではその腫瘍増大が、有意に抑制されていた。これらの結果から、分子Xは生体内での乳癌の形

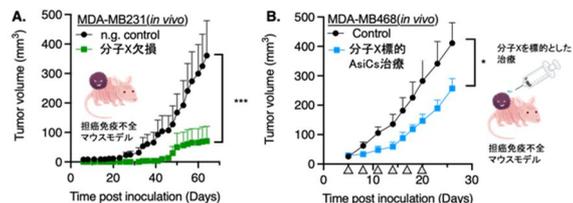


図4. 分子Xは乳癌の形成進展に必須であり、さらに難治性乳癌の新たな治療標的となり得る分子X欠損乳癌細胞を免疫不全マウスに皮下移植し、増大を評価した。分子X欠損乳癌細胞はコントロール細胞と比較して著明にその増大が抑制された。また分子Xを標的としたsiRNAにRNAアプタマーを付加したAsiCsを用いて治療を行なったところ、分子X標的治療群において、有意な腫瘍増大の抑制を認めた。

成・進展にも必須であり、さらに難治性乳癌の新たな治療標的となり得ることが明らかとなった。

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 0件）

1. 著者名 Yusuke Miyashita , Takanobu Yoshida , Yuriko Takagi , Hirotake Tsukamoto , Ken Takashima , Takahisa Kouwaki , Katsunari Makino , Satoshi Fukushima , Kimitoshi Nakamura , Hiroyuki Oshiumi	4. 巻 7
2. 論文標題 Circulating extracellular vesicle microRNAs associated with adverse reactions, proinflammatory cytokine, and antibody production after COVID-19 vaccination.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NPJ vaccines	6. 最初と最後の頁 16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41541-022-00439-3	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ken Takashima
2. 発表標題 Nucleolus dysfunction-induced DNA leaking alters innate immune response under nutrition starvation
3. 学会等名 JSICR/MMCB 2023（国際学会）
4. 発表年 2023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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------