

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830069

研究課題名(和文)レトロエレメントによるエピゲノム変動可視化レポーターを用いた発がんメカニズム解明

研究課題名(英文)Establishment of visualization system for cancer epigenome with 2C reporter

研究代表者

蝉 克憲 (Semi, Katsunori)

京都大学・iPS細胞研究所・研究員

研究者番号：90633058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：2C reporterを肺がんモデル、大腸腫瘍モデル、エピゲノム発がんモデル(tet0-OSKM)の各ES細胞に導入後、キメラマウスを作製した。発がん誘導後にレポーター遺伝子の発現を検討した結果、肺がんモデルおよびエピゲノム発がんモデルマウスにおいて、レポーターの発現が観察された。さらに、がん遺伝子の発現をドキシサイクリン添加により制御できるマウス淡明細胞肉腫細胞株を用いて、レトロトランスポソンの発現を検討したところ、がん遺伝子の発現抑制時に発現上昇が認められた。この現象は、ヒトがん細胞においても観察されたことから、レトロトランスポソンを指標とした新しい創薬スクリーニング系の構築を試みている。

研究成果の概要(英文)：Establishment of chimeric mice which were derived from lung cancer model, colon tumor model and OSKM-inducible ESCs. After the induction of tumorigenesis, we observed reporter expression in lung cancer and OSKM-inducible model. Moreover, we examined the expression of transposable element in EWS/ATF1-inducible mouse clear cell sarcoma cell lines. The expression level was increased in the absence of oncogene expression. This phenomenon was also observed in human cancer cells. So, we trying to establish the drug screening system which apply the retrotransposon expression to indicator for oncogene suppression.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：がん エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

発がん過程において、遺伝子変異と共に DNA メチル化に代表されるエピゲノム変化が注目されている。事実、がん細胞においてはゲノムワイドに DNA の低メチル化が認められるなど、正常体細胞に見られないエピゲノム異常が多数報告されている。

レトロトランスポゾン(転移因子)は、体細胞においては DNA のメチル化により発現が抑制されており、近年、発がんとの関連性に注目が集まっている。さらに、体細胞リプログラミング過程において、レトロトランスポゾンの発現が細胞の運命転換と密接に関わることが報告されている。これらの点から、がん細胞におけるエピゲノム変化とレトロトランスポゾンの発現が、がん細胞の分化度や悪性化に関与する可能性が考えられる。

2. 研究の目的

マウスレトロトランスポゾンの発現制御に係る LTR プロモーター(2C reporter)を用いて、DNA 低メチル化によるレトロトランスポゾンの発現を可視化する系を樹立するとともに、レトロトランスポゾンの発現が誘導される条件を検討する。これらの結果を元に、がんにおけるエピゲノム変化とレトロトランスポゾンの発現との関連性に着目し、そのメカニズム解明を目指す。

3. 研究の方法

マウス ES 細胞(Apc^{min}: 大腸がんモデル、OSKM inducible : エピゲノム発がんモデル、Sftpc-CreER^{T2}/LSL-KrasG12D/LSL-p53 : 肺がんモデル)に、レトロトランスポゾンの LTR をプロモーターとして用いたレポーター遺伝子を導入し、キメラマウスを作成後、発がん誘導過程におけるレトロトランスポゾンの発現を観察した。また、がん遺伝子(EWS/ATF1)の発現をドキシサイクリン添加によりコントロールすることが可能なマウス淡明細胞肉腫細胞株(Yamada K et al., JCI 2013)を用い、がん遺伝子の発現時、発現抑制時におけるレトロトランスポゾンの発現を qRT-PCR および RNA-seq により検討した。さらに、ヒト各種がん細胞を用いて、抗がん剤投与時におけるレトロトランスポゾンの発現量変化を qRT-PCR により観察するとともに、siRNA を用いて、レトロトランスポゾンの発現抑制に働くエピジェネティクス制御因子のノックダウンを行い、レトロトランスポゾンの発現量変化を検討した。

4. 研究成果

LTR プロモーターを用いた *in vivo* 発がん解析の結果、初期化因子を発現誘導し、エピゲノム変化を誘導した場合、および肺がんマウスモデルにおいて、レポーター遺伝子の発現が認められた。一方、大腸がんモデルマウ

スにおいては、DSS(デキストラン硫酸ナトリウム)による炎症、発がん誘発によるレポーターの発現誘導は認められなかった。

一方、*in vitro* の解析の結果、マウスおよびヒトがん細胞において、ドライバー変異を有するがん遺伝子の機能阻害時に優位にレトロトランスポゾンの発現が上昇することが明らかとなった。qRT-PCR の結果、内在性レトロトランスポゾンの内、ERV や L1 の発現が優位に上昇していること、発現抑制にヒストンメチルトランスフェラーゼである *Suv39h1* が関与していることが明らかとなった。さらに、RNA-seq の結果、マウスがん細胞において、発現が上昇するレトロトランスポゾンの同定を行った。現在、マウス淡明細胞肉腫において発現が上昇するレトロトランスポゾンを用いた新規レポーターの構築を行うとともに、レトロトランスポゾンの発現とがん遺伝子との関連性について検討を行っている。

また、レトロトランスポゾンの発現ががん遺伝子の機能抑制と相関することから、レトロトランスポゾンを指標とした抗がん剤の新規スクリーニング系の構築を行っている(特許出願中)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

Komura S, Semi K, Itakura F, Shibata H, Ohno T, Hotta A, Woltjen K, Yamamoto T, Akiyama H, Yamada Y. An EWS-FLI1-Induced Osteosarcoma Model Unveiled a Crucial Role of Impaired Osteogenic Differentiation on Osteosarcoma Development. *Stem Cell Reports*. 2016 6(4):592-606. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.02.009.

査読有

Semi K, Yamada Y. Induced pluripotent stem cell technology for dissecting the cancer epigenome. *Cancer Sci*. 2015 106(10):1251-6. doi: 10.1111/cas.12758.

Review. 査読有

Hatano Y, Semi K, Hashimoto K, Lee MS, Hirata A, Tomita H, Kuno T, Takamatsu M, Aoki K, Taketo MM, Kim YJ, Hara A, Yamada Y. Reducing DNA methylation suppresses colon carcinogenesis by inducing tumor cell differentiation. *Carcinogenesis*. 2015 36(7):719-29. doi: 10.1093/carcin/bgv060.

査読有

Matsuda Y, Semi K, Yamada Y. Application of iPS cell technology to cancer epigenome study: uncovering the mechanism of cell status conversion

for drug resistance in tumor.
Pathol Int. 2014 64(7):299-308.
doi: 10.1111/pin.12180.
Review. 査読有
Ohnishi K, Semi K, Yamada Y. Epigenetic regulation leading to induced pluripotency drives cancer development in vivo.
Biochem Biophys Res Commun. 2014 5;455(1-2):10-5.
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.07.020.
Review. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Semi K, Matsuda Y, Komura S, Woltjen K, Yamamoto T, Yamada Y. Oncogene expression stabilizes cancer cell identity, revealed by cancer cell reprogramming.
ISSCR 2015/06/24-27 Sweden, Stockholm
Semi K, Ohnishi K, Takana A, Yamamoto T, Woltjen K, Yamanaka S, Yamada Y.
Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation.
ISSCR 2014/06/18-21 Canada, Vancouver
Semi K, Ohnishi K, Takana A, Yamamoto T, Woltjen K, Yamanaka S, Yamada Y.
Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation.
個体レベルでのがん研究の新展開 細胞の可塑性と発がん 2015/02/05-06 滋賀県

〔図書〕(計 3 件)

八木正樹、蝉克憲、山田泰広
日本臨牀社、日本臨牀 73 巻 5 号 がん幹細胞 新しい医療を求めて、2015、751
蝉克憲、山田泰広
実験医学、リプログラミング技術を用いたがんエピゲノム研究、2014、3061
大西紘太郎、蝉克憲、山田泰広
実験医学、不完全な初期化によるエピゲノム発がん、2014、1763

〔産業財産権〕

出願状況(計 4 件)

名称：がんの治療薬のスクリーニング方法
発明者：山田泰広、蝉克憲、Woltjen Knut、

松田穰
権利者：国立大学法人京都大学/中外製薬株式会社
種類：特許
番号：特願 2015-077264
出願年月日：2015/04/03
国内外の別：国内

名称：がんの治療薬のスクリーニング方法
発明者：山田泰広、蝉克憲、山本拓也
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：特願 2015-077267
出願年月日：2015/04/03
国内外の別：国外

名称：がんの治療薬のスクリーニング方法
発明者：山田泰広、蝉克憲、Woltjen Knut、松田穰
権利者：国立大学法人京都大学/中外製薬株式会社
種類：特許
番号：PCT/JP2016/060974
出願年月日：2016/04/01
国内外の別：国外

名称：がんの治療薬のスクリーニング方法
発明者：山田泰広、蝉克憲、山本拓也
権利者：国立大学法人京都大学
種類：特許
番号：PCT/JP2016/060975
出願年月日：2016/04/01
国内外の別：国外

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
iPS 細胞を用いた新たな腫瘍モデルにより、肉腫形成メカニズムの一端を解明
<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/newslist/news/160318-090000.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者
蝉 克憲 (SEMI, Katsunori)
京都大学 iPS 細胞研究所・
初期化機構研究部門・特定研究員
研究者番号：90633058

(2) 研究分担者
対象無し

(3)連携研究者
対象無し