

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790178

研究課題名（和文）新規がん抑制遺伝子候補 *Jmjd5* の血管新生・造血における役割と発がん機構の解明研究課題名（英文）Functional analysis of *Jmjd5*, a candidate tumor suppressor gene, for angiogenesis, hematopoiesis and tumorigenesis.

研究代表者

石村 昭彦（ISHIMURA AKIHIKO）

金沢大学・がん研究所・助教

研究者番号：80375261

研究成果の概要（和文）：本研究では、レトロウイルス挿入変異法によって同定された新規がん関連遺伝子候補、*Jmjd5*（ヒストン脱メチル化酵素をコード）について変異マウスを作製し、個体レベルでの生理機能・がん発症との関わりを調べ、発生過程に必須な因子の1つであることが証明された。つまり *Jmjd5* は *Cdkn1a* (*p21*) の発現量を負に制御することで胚細胞の正常な増殖に貢献することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In order to identify novel cancer-related genes, we have performed the retroviral insertional mutagenesis in mice, resulting in identification of *Jmjd5*, a histone demethylase. In this study, we have generated *Jmjd5*-deficient mice to investigate *in vivo* role of *Jmjd5*. Our results showed that *Jmjd5* was involved in embryonic cell proliferation and that *Cdkn1a* might be one of *Jmjd5* targets.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：がん生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・発生学）

キーワード：癌、遺伝子、発生・分化、細胞増殖

1. 研究開始当初の背景

私達の研究グループは、マウス白血病ウイルス感染によりリンパ腫を発症する疾患モデルマウスを用いて、腫瘍細胞ゲノム内のウイルス挿入部位を特定することで、がんに関わる遺伝子のスクリーニングを行ってきた。その結果、Jmjcファミリーに属する遺伝子の約半数がウイルスの標的となっている事が明らかとなった。このファミリー遺伝子は、現在、哺乳類では約 30 種類報告されている

が、最近、ヒストン脱メチル化酵素として「ヒストンの翻訳後修飾」に関わり、標的遺伝子の転写を積極的に制御している、という事が知られている。私は、Jmjcファミリー遺伝子 *Jmjd2c* および *Utx* が、各々がん遺伝子 *Mdm2*、がん抑制遺伝子 *Rb* および *Rb12* の発現を制御することを見出し、腫瘍の発症機構の一端を明らかにしてきた。また他の研究グループからも、Jmjcファミリー遺伝子とがん発症との関係が幾つか報告されている。

私達は、JmJc ファミリーの1つ *Jmjd5* 遺伝子に関してもまた、新規がん関連遺伝子候補として同定した。そして、*Jmjd5* ノックダウン細胞が突然変異率の上昇や薬剤 MNNG 抵抗性を示したことから、*Jmjd5* がゲノム恒常性維持や DNA 修復経路と関わる可能性を報告した。最近他の研究グループから、*Jmjd5* がヒストン脱メチル化酵素としてヒト乳がん細胞 MCF7 の増殖を制御する、という報告がなされた。しかし、これまでの *Jmjd5* の生理機能に関する研究成果は、*in vitro* 培養細胞を用いた実験に由来するものであり、動物個体を用いた *Jmjd5* の研究は全く報告されていない。

2. 研究の目的

私は最近、*Jmjd5* の生理機能を個体レベルで明らかにするために、*Jmjd5* コンディショナル・ノックアウトマウス (*Jmjd5^{fllox/fllox}*) の作製に成功した。予備的観察から、ターゲティング・ベクター由来 *Neo* 遺伝子カセットが挿入されたままの *Jmjd5* 変異アレルをホモに持つマウス (*Jmjd5^{neo/neo}*) は野生型マウスと比較して発生速度が遅く、また心臓浮腫や出血、そして卵黄膜上を走行する血管分布パターンの異常といった典型的な血管新生異常を示して、胎生 12 日目前後に胚性致死となった (約 67%)。定量 PCR 解析の結果、*Jmjd5^{neo/neo}* 胚における内在性 *Jmjd5* の発現量は、野生型胚と比べて著しく低下していたことから、*Jmjd5^{neo/neo}* マウスは hypomorphic 変異を引き起こしていると考えられた。従って、*Jmjd5* は細胞増殖や血管発生制御に関わっている可能性が示唆された。本研究では、予備的観察より推測された上記の新しい *Jmjd5* の機能に関して、動物個体を用いて明らかにするのが目的である。

3. 研究の方法

Jmjd5 の個体レベルでの機能を調べるために、以下に記す変異マウスの作製を試みた。*Jmjd5^{fllox/fllox}* マウスは、*Jmjd5* 遺伝子のエクソン 4 を loxP 配列で挟み込む形で作製された (図 1)。

① *Jmjd5* 欠損マウス (*Jmjd5^{-/-}*) の作製：*Jmjd5^{fllox/fllox}* マウスと精母細胞特異的 Cre 発現マウス (*Pgk2-Cre*) を交配させることで作製する (図 1)。系統樹立後、*Jmjd5^{fllox/fllox}* マウスの表現型を詳細に調べる。

② 誘導型 *Jmjd5* 欠損マウスの作製：*Jmjd5^{fllox/fllox}* マウスとインターフェロン誘導性 Cre 発現マウス (*Mx-Cre*) を交配させることで、インターフェロン誘導性 *Jmjd5* 変異マウス

(*Mx-Cre; Jmjd5^{fllox/fllox}*) を作製する。作製した変異マウスは、生後一ヶ月後に polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC) を腹腔内注射し、*Jmjd5* allele の欠失を誘発させ、その表現型を経過観察する。

③ 血管組織特異的 *Jmjd5* 欠損マウスの作製：*Jmjd5^{fllox/fllox}* マウスと血管組織特異的 Cre 発現マウス (*tie2-Cre*) を交配させることで、血管組織特異的 *Jmjd5* 欠損マウス (*tie2-Cre; Jmjd5^{fllox/fllox}*) を作製する。系統樹立後、{*tie2-Cre; Jmjd5^{fllox/fllox}*} マウスの表現型を詳細に調べる。

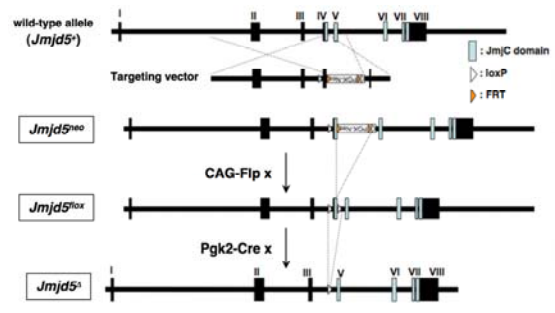


図1 *Jmjd5* 変異マウスの作製

4. 研究成果

① *Jmjd5^{-/-}* マウスの解析

i. *Jmjd5^{-/-}* マウス同士の交配実験の結果、*Jmjd5^{-/-}* マウスは、*Jmjd5^{neo/neo}* hypomorphic 変異マウスの表現型異常と同様に、著しい成長阻害や血管新生異常を伴い、胎生 11 日目前後に胚性致死となることが観察された (100%、図 2)。より詳細な表現型解析を行った結果、上記の成長阻害異常は胎生 7.5 日目に初めて認められ、胎生 9 日目には、明らか

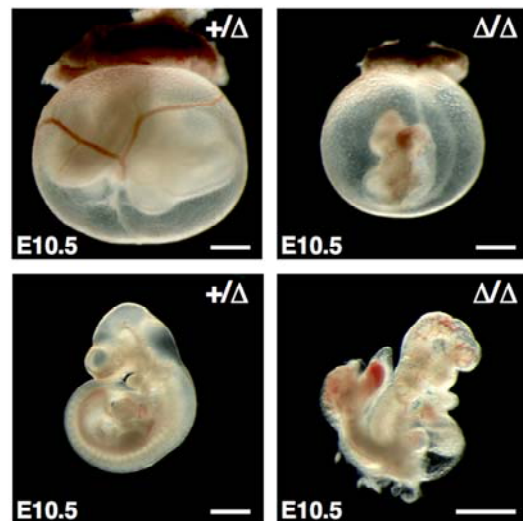


図2 *Jmjd5^{Δ/Δ}* 胚の表現型観察 (胎生10.5日目)

Jmjd5^{Δ/Δ} 胚は、卵黄膜上を走行する血管分布パターンの異常 (上段右) や心臓浮腫といった典型的な血管新生異常を示し、さらに著しい成長阻害 (下段右) を伴って胚性致死となる。Scale bars: 800μm

な成長の遅れを観察することが出来た(図3)。このことから *Jmjd5* は、胚の成長や血管新生過程に関わる、発生過程に必須な因子の1つであることが示唆された。



図3: *Jmjd5*^{Δ/Δ} 胚の表現型観察(胎生9日目)
Jmjd5^{Δ/Δ} 胚は、胎生9日目に明らかに成長が遅れていたが、それ以外の形態異常は認められなかった。

ii. 胚の細胞増殖における影響を細胞レベルで解析する為に、*Jmjd5* 欠損 MEF の樹立を試みた。全ての *Jmjd5*^{-/-} マウスは、MEF 作製に適した胎生 14.5 日目までに胚性致死になるため、代わりに(ホモ胚の一部は胎生 14.5 日目まで発生可能な) *Jmjd5*^{neo/neo} 胚から *Jmjd5*^{neo/neo} MEF の作製を試みた。作製した *Jmjd5*^{neo/neo} MEF から total RNA を抽出し、定量 RT-PCR 解析によって内在性 *Jmjd5* mRNA の発現量を調べた結果、*Jmjd5*^{neo/neo} MEF における *Jmjd5* の発現は、野生型と比較して 75% 減少していた(図4)。同時に *Jmjd5*^{neo/neo} MEF の増殖曲線を調べたところ、野生型と比べて細胞増殖能の著しい低下を観察することが出来た。

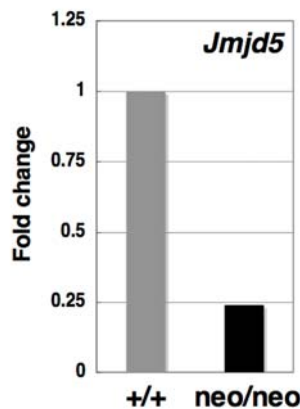


図4: *Jmjd5*^{neo/neo} MEF の作製
Jmjd5^{neo/neo} MEF では、内在性 *Jmjd5* の発現レベルが、定量 PCR の結果、野生型と比較して 75% 減少していた。

iii. 胚発生期に関わる細胞周期調節因子の網羅的な定量 PCR スクリーニングを行った。その結果、*Jmjd5*^{-/-} 胚および *Jmjd5*^{neo/neo} MEF どちらにおいても、*p21* (*Cdkn1a*) の発現が有意に上昇していることを発見した。このこと

から、*Jmjd5* は細胞自律的に *p21* の発現を制御し、正常胚細胞の増殖を調節している可能性が示唆された。

iv. *p21* の発現亢進が、主要な *p21* 発現誘導因子の1つである *p53* の発現量変化に起因しているかを検討した。興味深いことに、*p53* の発現変化は、*Jmjd5*^{-/-} 胚および *Jmjd5*^{neo/neo} MEF、どちらでも認められなかった。また *p53* 応答性ルシフェラーゼ解析の結果も同様、*p53* シグナル経路の活性化に差が認められなかった。よって *Jmjd5*^{-/-} 胚および *Jmjd5*^{neo/neo} MEF における *p21* 発現増加は、内在性 *p53* 経路に依存しない可能性が示唆された。

以上より、*Jmjd5* は *p53* 細胞内シグナル経路の活性化を介さずに、*p21* の発現を負に制御することで、胚細胞の正常な増殖に貢献していることが示唆された。

② *Jmjd5* とがん発症との関連性

Jmjd5^{-/-} マウスは胚性致死を示すため、{*Mx-Cre; Jmjd5*^{flox/flox}} マウスを利用し、成体マウスで任意の時期に *Jmjd5* allele の欠損を引き起こさせた。pI-pC 処理後、処理済みマウスの臓器よりゲノム DNA を抽出し、その遺伝子型を PCR によって調べた。その結果、肝臓や脾臓を含む複数の臓器由来のゲノムにおいて、*Jmjd5* allele の欠損 (*Jmjd5*⁻) を確認することができた。しかし *Jmjd5* を単独で欠損させただけでは、期待通りのがん発症は認められなかった。従って、既存のがんモデルマウス、例えば *p53* 欠損マウスなどと {*Mx-Cre; Jmjd5*^{flox/flox}} マウスを交配させ、がん発症リスクを上昇させた遺伝学的背景下において、リンパ腫発症との関わりを調べる予定である。

③ 血管組織特異的 *Jmjd5* 欠損マウスの作製

Jmjd5^{-/-} 胚では成長阻害と同時に、卵黄膜上の血管網の消失を含む典型的な血管新生異常が観察されている。観察された血管新生異常が細胞増殖異常と非依存的に発症しているか検討するために、血管組織特異的 *Jmjd5* 欠損マウスの作製を試み、その結果、{*tie2-Cre; Jmjd5*^{flox/flox}} マウスの作製に成功した。今後、このヘテロマウス同士を交配させて {*tie2-Cre; Jmjd5*^{flox/flox}} マウスを作製し、発生期と(胚性致死でなければ)成体マウスについて血管形成に対する影響を検討する予定である。

また *Jmjd5*^{neo/neo} 胚由来の卵黄膜を用いた colony forming 解析の結果、*Jmjd5*^{neo/neo} 卵黄

膜 (E9.5) から増殖してくる血液前駆細胞の数は、野生型と比べて明らかに減少していた (図5)。従って *Jmjd5* は、血管発生と血液発生、両方の制御に関わっている可能性が示唆された。血管内皮マーカー *tie2* は、血管内皮細胞と血液細胞の共通祖先であるヘマンジオブラスト細胞でも発現していることが知られている。つまり $\{tie2-Cre; Jmjd5^{flox/flox}\}$ マウスでは、血管組織のみならず血液細胞における影響も同時に観察できる。 $\{tie2-Cre; Jmjd5^{flox/flox}\}$ マウスを用いて、血管と血液、両方の lineage における *Jmjd5* の役割を検討する予定である。

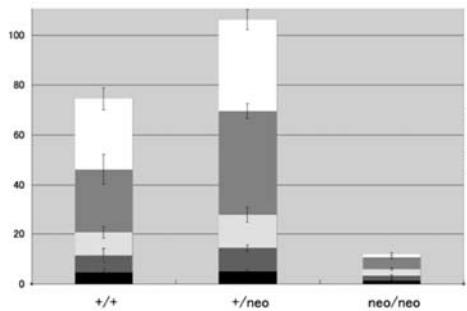


図5. Yolk Sac を用いた colony forming 解析
E, 赤血球前駆細胞; mix, 赤血球・骨髄球前駆細胞; GM, 骨髄球前駆細胞; M, マクロファージ前駆細胞; G, 顆粒球前駆細胞

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2件)

① Terashima M., Ishimura A., Yoshida M., Suzuki Y., Sugano S. and Suzuki T., The tumor suppressor *Rb* and its related *Rb12* genes are regulated by Utx histone demethylase.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 399 (2010), 238-244, 査読有

② Ishimura A., Terashima M., Kimura H., Akagi K., Suzuki Y., Sugano S. and Suzuki T., *Jmjd2c* histone demethylase enhances the expression of *Mdm2* oncogene.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 389 (2009), 366-371, 査読有

[学会発表] (計6件)

① Ishimura A., Minehata K., Terashima M., Hara T. and Suzuki T. The physiological function of *Jmjd5*, a candidate cancer-related gene identified by retroviral insertional mutagenesis. 平成22年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、2011年2月3日、琵琶湖ホ

テル (滋賀県)

② Ishimura A., Minehata K., Terashima M., Hara T. and Suzuki T. The physiological role of *Jmjd5*, a candidate cancer gene identified by retroviral insertional mutagenesis. 第69回日本癌学会学術総会、2010年9月23日、大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル大阪 (大阪府)

③ Ishimura A., Minehata K., Terashima M., Hara T. and Suzuki T. The role of *Jmjd5*, a candidate cancer gene identified by retroviral insertional mutagenesis: Analysis of *Jmjd5*-deficient mice. The Joint Symposium of the 5th International Symposium of Institutes Network and the International Symposium Commemorating Inauguration of Kanazawa University Cancer Research Institute, 2010年9月23日、KKRホテル金沢 (石川県)

④ Ishimura A., Minehata K., Terashima M., Hara T. and Suzuki T. Functional analysis of *Jmjd5*, a candidate cancer gene identified by retroviral insertional mutagenesis. 第32回分子生物学会年会、2010年12月10日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑤ Ishimura A. and Suzuki T. Functional analysis of *Jmjd5*, a candidate cancer gene identified by retroviral insertional mutagenesis. 第68回日本癌学会学術総会、2010年10月2日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

⑥ 石村昭彦、峯畑健一、寺島農、原孝彦、鈴木健之「レトロウイルス挿入変異法により同定された、新規がん関連遺伝子候補 *Jmjd5* の機能解析」、第十回文部科学省特定領域研究「がん」5領域 若手研究者ワークショップ、2010年9月3日、アートランドホテル蓼科 (長野県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石村 昭彦 (ISHIMURA AKIHIKO)

金沢大学・がん研究所・助教

研究者番号：80375261

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし