

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究 B

研究期間：2011 年度～2012 年度

課題番号：23701063

研究課題名（和文） 幹細胞様腫瘍細胞の形質を制御する新規経路の同定とがん治療への応用

研究課題名（英文） Identification of regulatory system for cancer stemness and application to cancer therapeutics.

研究代表者 谷口 博昭 (TANIGUCHI HIROAKI)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：90563289

研究成果の概要（和文）：

がん幹細胞の維持に関与するヒストンメチル化酵素(HMT)に着目し、その標的遺伝子の同定、分子機構を解明することを目的として研究を推進した。その結果、①HMT である EZH2 遺伝子産物の新規標的遺伝子である KLF2 を同定した。また、②KLF2 遺伝子の機能解析を行い、KLF2 が腫瘍形成能、転移能に影響を及ぼすことが判明した。KLF2 遺伝子の発現を乳癌、前立腺癌の臨床検体で評価し、腫瘍マーカーへの応用が可能である根拠が得られた(Oncogene 2011)。以上から、同分子が癌の標的分子治療へ応用できると考えた。最終年度は、KLF2 遺伝子の癌幹細胞形質に及ぼす影響を FCM、遺伝子発現により検証を行い、本分子が癌細胞の幹細胞性に関わることが判明した。さらに、KLF2 遺伝子の発現を誘導する低分子化合物のスクリーニングを目的に、レポーターアッセイを基本としたセルベースのハイスループットスクリーニング系を構築し、薬剤ライブラリーを用いて網羅的に検討した。その結果、代謝性疾患に臨床応用されている薬剤により、KLF2 遺伝子が誘導されることが分かった。結果、すでに大きな副作用の無い本剤を腫瘍の治療薬として応用できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Methylation events driven by histone methyltransferases have been implicated in gene silencing and carcinogenesis. We focused on histone methyltransferases related to cancer stemness. In this project, we show that epigenetic silencing of KLF2 occurs in cancer cells through direct transcriptional repression mediated by the histone methyltransferase, Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2). The transfection of KLF2 in cells with EZH2-associated silencing showed a significant anti-tumoral effect, both in culture and in xenografted nude mice. Most importantly, the translation of the described results to human primary samples demonstrated that patients with prostate or breast tumors with low levels of KLF2 and high expression of EZH2 had a shorter overall survival. Moreover, KLF2 regulates stemness phenotype for cancer cells. Finally, we find a low molecular weight compound, which induces KLF2 gene expression using cell-based high-throughput screening system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：幹細胞

1. 研究開始当初の背景

我々は細胞の分化に關与する Wnt シグナル (Taniguchi et al. *Oncogene* 2005)、ヘッジホッグシグナル (Taniguchi et al. *J Pathol* 2007)、さらに、概日リズム (Taniguchi et al. *Cancer Res* 2009)に關連する腫瘍において特異的な腫瘍抑制遺伝子のプロモータ領域の異常メチル化、クロマチン修飾の異常に關して、世界に先んじて複数報告を行ってきた。さらに、腫瘍における miRNA 研究に従事してきた (Silanes IL, Taniguchi et al. *Nucleic Acids Res* 2009)。Wnt シグナルやヘッジホッグシグナル、概日リズム、さらに、miRNA は腫瘍細胞においてその異常が報告されていると同時に、正常幹細胞の維持にとって非常に重要であることが知られている。以前から注目していた分化と腫瘍という研究テーマに立脚し、幹細胞の維持に重要な分子、特に、ヒストンメチル化酵素 (HMT) の腫瘍に及ぼす影響を、その標的遺伝子から解明し検証することとした。

一方、幹細胞様腫瘍細胞が腫瘍の再発、転移現象の主役を担うことが、国内外の研究グループより報告されているが、その分子的な背景は殆ど明らかとなっておらず、その結果、臨床応用への展開に關して検討の余地が残されたままである。

本研究計画は、HMT の標的遺伝子に幹細胞様腫瘍細胞の形質を制御する分子が存在すると想定し、その新規経路を解明するための基礎研究を完成し、加えて、腫瘍マーカーや新規抗腫瘍薬開発という臨床応用に展開するための基盤研究を行うことを目的に研究を開始した。

2. 研究の目的

【研究の全体構想】

幹細胞様腫瘍細胞は腫瘍の転移・再発に關与し、既存の抗腫瘍療法の障壁である。申請者の専門である癌エピジェネティクスの観点から、幹細胞の維持に關与するヒストンメチル化酵素(HMT)に着目し、同酵素の標的遺伝子の機能を、特に、幹細胞様腫瘍細胞に認められる形質の観点から、その分子機構を解明する。さらに、腫瘍マーカーや新規抗腫瘍薬開発という臨床応用に展開するための基盤研究を行う。

3. 研究の方法

①HMT に対するクロマチン免疫沈降法を基本としたアレイシステム、さらに、同酵素の阻害剤や RNA 干渉を利用し発現量の変化を認める遺伝

子に着目して、標的遺伝子を選定する。

②標的遺伝子の機能を解析し、幹細胞様腫瘍細胞の形質に及ぼす影響を検証する。

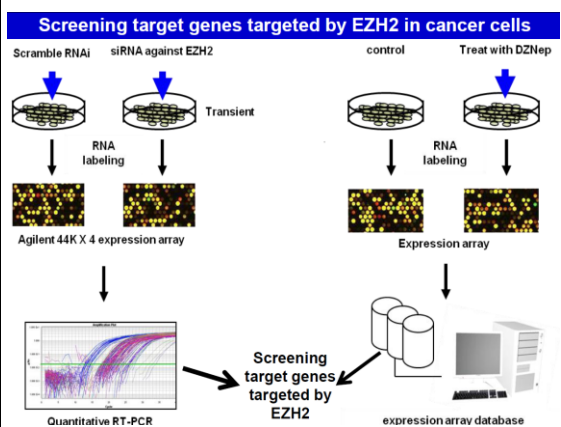
③標的遺伝子の発現を臨床検体で評価し、腫瘍マーカーへの応用が可能か検討する。

④標的遺伝子の発現を左右する薬剤を、レポーターアッセイを基本としてスクリーニングする。

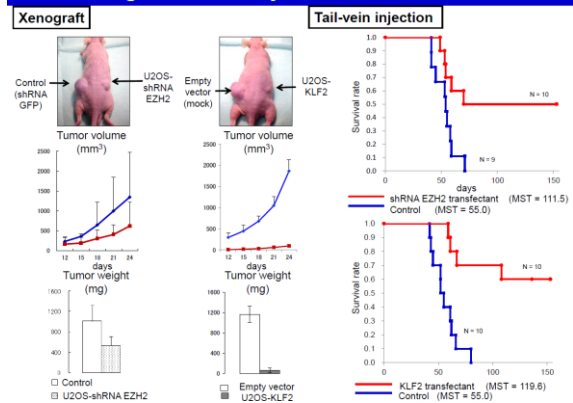
4. 研究成果

【具体的内容】

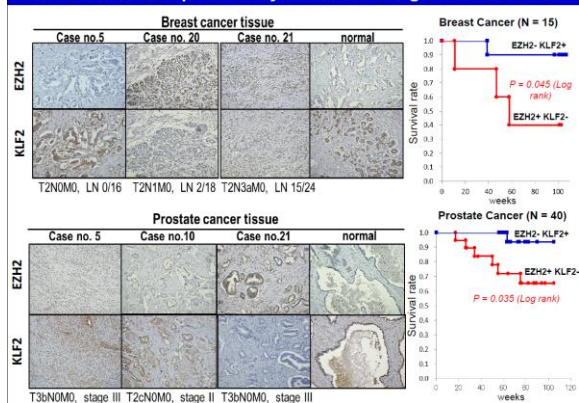
がん幹細胞の維持に關与するヒストンメチル化酵素(HMT)に着目し、その標的遺伝子の同定、分子機構を解明することを目的として研究を推進した。その結果、①HMT である EZH2 遺伝子産物の新規標的遺伝子である KLF2 を同定した。また、②KLF2 遺伝子の機能解析を行い、KLF2 が腫瘍形成能、転移能に影響を及ぼすことが判明した。KLF2 遺伝子の発現を乳癌、前立腺癌の臨床検体で評価し、腫瘍マーカーへの応用が可能である根拠が得られた (*Oncogene* 2011)。以上から、同分子が癌の標的分子治療へ応用できると考えた。最終年度は、KLF2 遺伝子の癌幹細胞形質に及ぼす影響を FCM、遺伝子発現により検証を行い、本分子が癌細胞の幹細胞性に關与することが判明した。さらに、KLF2 遺伝子の発現を誘導する低分子化合物のスクリーニングを目的に、レポーターアッセイを基本としたセルベースのハイスループットスクリーニング系を構築し、薬剤ライブラリーを用いて網羅的に検討した。その結果、代謝性疾患に臨床応用されている薬剤により、KLF2 遺伝子が誘導されることが分かった。結果、すでに大きな副作用の無い本剤を腫瘍の治療薬として応用できる可能性が示唆された。



The KLF2 growth-inhibitory role in vivo mouse models



EZH2 and KLF2 expression by immunostaining in clinical tumor



【意義、重要性】

EZH2 遺伝子は転移・再発現象に関与する癌幹細胞の存在に深く関わり、腫瘍における EZH2-標的遺伝子-腫瘍形質の新規経路の解明は、腫瘍の転移・再発の克服に繋がる。今回、我々は EZH2 の下流にある新規標的遺伝子 KLF2 を同定した。また、KLF2 は独立した予後因子であり、新規腫瘍マーカーとしての利用が可能である。さらに、細胞の恒常性に関与する EZH2 の直接阻害は癌治療において副作用を生じるが、正常細胞で発現を認める KLF2 を誘導する癌の治療法は副作用が軽減される可能性が高く、さらに、今回の課題により、KLF2 を誘導する有力な化合物が同定された。

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 6 件)

1. Taniguchi H, Jacinto F.V., Villanueva A, Fernández AF, Yamamoto H, Carmona F.J, Puertas S, Marquez VE, Shinomura Y, Imai K, and Esteller M. Silencing of the

Kruppel-like factor 2 by the histone methyltransferase EZH2 in human cancer.

Oncogene, 31: 1988-1994. 2012.

2. Ohashi H, Adachi Y, Yamamoto H, Taniguchi H, Noshio K, Suzuki H, Arimura Y, Imai K, Carbone DP, Shinomura Y. Insulin-like growth factor receptor expression is associated with aggressive phenotypes and has therapeutic activity in biliary tract cancers. *Cancer Sci*, 103(2):252-61.2011.
3. Ii M, Li H, Adachi Y, Yamamoto H, Ohashi H, Taniguchi H, Arimura Y, Carbone DP, Imai K, Shinomura Y. The Efficacy of IGF-I Receptor Monoclonal Antibody against Human Gastrointestinal Carcinomas is Independent of k-ras Mutation Status. *Clin Cancer Res*, 17: 5048-5059. 2011.
4. Ii M, Yamamoto H, Taniguchi H, Adachi Y, Nakazawa M, Ohashi H, Tanuma T, Sukawa Y, Suzuki H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y. Co-expression of laminin β 3 and γ 2 chains and epigenetic inactivation of laminin α 3 chain in gastric cancer. *Int J Oncol*, 39: 593-599. 2011.
5. Fernandez AF, Assenov Y, Martin-Subero JI, Balint B, Siebert R, Taniguchi H, Yamamoto H, Hidalgo M, Tan AC, Galm O, Ferrer I, Sanchez-Céspedes M, Villanueva A, Carmona J, Sanchez-Mut JV, Berdasco M, Moreno V, Capella G, Monk D, Ballestar E, Ropero S, Martinez R, Sanchez-Carbayo M, Prosper F, Agirre X, Fraga MF, Graña O, Perez-Jurado L, Mora J, Puig S, Prat J, Badimon L, Puca AA, Meltzer SJ, Lengauer T, Bridgewater J,

Bock C, Esteller M. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples.

Genome Res, 22(2):407-19. 2011.

6. Hizaki K, Yamamoto H, **Taniguchi H**, Adachi Y, Nakazawa M, Tanuma T, Kato N, Sukawa Y, Sanchez JV, Suzuki H, Sasaki S, Imai K, Shinomura Y. Epigenetic inactivation of calcium-sensing receptor in colorectal carcinogenesis. *Mod Pathol*, 24: 876-884, 2011.

[学会発表] (計 5 件)

1. 第 71 回 日本癌学会学術総会 (札幌, 2012.9.19)
Brush border Myosin Ia inactivation in gastric tumors and its clinical application.
2. 第 21 回 がん転移学会総会 (広島, 2012.7.12)
Silencing of Kruppel-like factor 2 by the histone methyltransferase EZH2 in human cancer.
3. 第 6 2 回 日本電気泳動学会総会 (横浜, 2011. 11. 13)
悪性腫瘍におけるヒストンメチル基転移酵素 EZH2 による KLF2 の発現抑制とその臨床応用
4. 第 70 回 日本癌学会学術総会 (名古屋, 2011.10.3)
ヒト腫瘍におけるヒストンメチル基転移酵素 EZH2 による Kruppel-like factor 2 の転写抑制
5. 第 20 回 日本癌病態治療研究会 (東京, 2011. 6. 18)
悪性腫瘍におけるヒストンメチル基転移酵素 EZH2 による KLF2 の発現抑制とその臨床応用 (優秀演題賞)

[図書] (計 3 件)

1. **谷口博昭**、今井浩三 固形がんの免疫・抗体療法—基礎研究の進歩と臨床応用—抗体療法の基礎(種類、特徴など):概論 日本臨床 70 巻 12 号 p. 2087-2092, 2012.
2. **谷口博昭**、今井浩三 DDS を利用した抗体医薬の展望 ドラッグデリバリーシステム

の新展開 II—核酸医薬・抗体医薬・ワクチン医療を支える DDS 技術- シーエムシー出版 p113-119, 2012.

3. 星野大輔、**谷口博昭**、越川直彦 分子標的薬—がんから他疾患までの治癒をめざして—分子標的薬の作用機序・薬理作用—がん浸潤とその抑制 日本臨床増刊号 p.154 - 158, 2012

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等:

抗体・ワクチン・分子標的寄付研究部門ホームページにて本研究内容に関する研究内容に関して一般公開している。

ホームページアドレス:

<http://www.avmr.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 博昭 (HIROAKI TANIGUCHI)
東京大学・医科学研究所・特任准教授
研究者番号: 90563289

(2) 研究分担者: 無し

(3) 連携研究者: 無し