

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591009

研究課題名(和文) ヒストン修飾を介した膵がん悪性度の調節機構の解明とその制御法の探索

研究課題名(英文) An investigation of histone modifications that modulate malignant properties of pancreatic cancer.

研究代表者

山本 恵介 (Yamamoto, Keisuke)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：10608532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌の悪性度を制御する経路として新規にKDM6B-CEBPA経路を同定した。具体的な知見は以下のとおり：(1)ヒストン脱メチル化酵素KDM6Bは膵癌の前癌病変であるPanINにおいて高発現しているが、膵癌においては病理学的悪性度と比例してその発現が減弱する(2)KDM6Bの発現抑制により癌抑制遺伝子CEBPAの発現低下を介して膵癌細胞株の悪性度は増強する(3) KDM6BはH3K27me3脱メチル化作用を介してCEBPAの転写を促進する(4)ヒト膵癌臨床検体においてKDM6BとCEBPAの発現は正の相関を示し、これらの遺伝子は病理学的悪性度と負の相関を示す。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have identified a novel KDM6B-CEBPA axis and revealed its tumor-suppressive role in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). KDM6B is a histone demethylase for H3K27me3, a repressive chromatin mark. We found that KDM6B was highly expressed in pancreatic precancerous lesions PanINs, and that the expression of KDM6B decreased as the malignant grade progressed. Notably, knockdown of KDM6B in PDAC cells enhanced aggressiveness, as shown by increased peritoneal dissemination and liver metastasis in orthotopic transplantation model using nude mice. Microarray and chromatin immunoprecipitation analysis implicated CEBPA for aggressiveness induced by KDM6B knockdown. Indeed, CEBPA knockdown recapitulated the phenotypic change of PDAC cells after KDM6B knockdown. Moreover, similar expression patterns of KDM6B and CEBPA in PDAC emphasized their functional correlation. Together, our results propose a significant role for the KDM6B-CEBPA axis in the PDAC phenotype.

研究分野：消化器病学

キーワード：膵癌 ヒストン修飾 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

(1) 膵癌は再難治癌の一つである。種々の治療法の登場にも関わらず、治療成績の改善はいまだ十分ではない。そのため、この癌の性質をより深く理解し、新たな治療標的となる機序を探索することが急務である。

(2) 膵癌においては癌遺伝子 K-Ras の変異と癌抑制遺伝子である SMAD4, p16, p53 の機能喪失型変異がほぼ全症例でみとめられ、決定的に重要な役割を果たしている。これは以前から知られている事実だが、依然としてこれらの遺伝子変異を標的とした治療法の開発には至っていない。

(3) 近年、癌におけるエピジェネティック修飾の異常が注目を集めている。エピジェネティクスとは、塩基配列の変化を伴わない遺伝子情報と定義される。具体的には、遺伝子 DNA の塩基配列はそのままに、これを取り巻くヒストンタンパクの種々の修飾状況や、DNA 自体のメチル化修飾といった、DNA・ヒストンタンパクの後天的な化学修飾が、遺伝子発現を正・負に調節し、細胞としての個性を規定・維持していることが明らかになっている。すなわち、体を構成するすべての体細胞が同一のゲノム/遺伝情報を有するにも関わらず、肝臓の細胞が肝臓の細胞であり皮膚の細胞と異なるのは、エピジェネティック修飾の違いによって、肝細胞に固有の遺伝子発現パターンが規定されているからである。

(4) これまでに、エピジェネティックな修飾を付加する酵素、これを除去する酵素、修飾パターンを認識して遺伝子発現を調節する因子が真核生物で相次いで同定されており、真核細胞は、エピジェネティック修飾をダイナミックに変化させることで細胞の状態を維持・変化させていることが明らかとなっている。

(5) ここで重要な点は、エピジェネティックな修飾は、遺伝子変異とは異なり、可逆的であるという事実である。すなわち、癌細胞の持つ遺伝子変異を修正することは困難だが、癌の悪性形質に関わるエピジェネティック修飾を修正することは、修飾酵素の阻害剤などの薬剤を用いて実現可能である。

(6) こうした背景から、我々は膵癌におけるエピジェネティック修飾の意義と、その制御による膵癌治療の可能性について研究を行ってきた。我々は先行研究において、ヒト膵癌において 17 番染色体短腕が高頻度に欠失した loss of heterozygosity (LOH) という状態になっていることを報告している。この領域には癌抑制遺伝子 p53 のほかに、今回着目したヒストン脱メチル化酵素 KDM6B が存在していることから、膵癌において KDM6B

の発現が減弱していることが予想された。

(7) KDM6B は、転写抑制性のヒストン修飾である H3K27me3 (= ヒストン 3 (H3) の 27 番目のアミノ酸であるリジン (K27) がトリメチル化された状態) を脱メチル化することで、標的遺伝子の発現を正に誘導する。正常な細胞には、癌原遺伝子に遺伝子変異が生じると、癌抑制遺伝子 p16 が発現し、この細胞が増殖して癌化するのを防ぐ oncogene induced senescence (OIS) という機構が備わっている。KDM6B は、この OIS において p16 の発現を誘導することが報告されており、その観点から癌抑制遺伝子として考えられている。

(8) こうした背景から、KDM6B は膵癌において癌抑制遺伝子としての役割を担っているのではないかと、そして、(LOH その他の機序により) KDM6B の発現が減弱すると、その標的遺伝子の発現低下を介して膵癌の悪性度が増加するのではないかとという仮説をたて、本研究を開始した。

2. 研究の目的

膵癌およびその前癌病変における KDM6B の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト膵癌の切除検体を用いて、免疫染色により KDM6B の発現を評価した。

(2) 膵癌細胞株を用いて、KDM6B の発現を安定的に減弱させた KDM6B のノックダウン細胞株を作成し、KDM6B の発現減弱に伴う膵癌細胞の悪性度の変化を評価した。具体的には、ヌードマウスへの同所移植モデルを用いて、肝転移形成率、腹膜播種形成率、生存期間を評価した。また、in vitro 実験としては、軟寒天コロニー形成アッセイ、スフィア形成アッセイを行った。

(3) KDM6B のノックダウンに伴う遺伝子発現変動を網羅的に比較するために、cDNA マイクロアレイ解析を行った。また、これにより KDM6B の標的遺伝子の同定を図った。

(4) (3) で同定した標的遺伝子が、KDM6B の H3K27me3 脱メチル化酵素活性依存的な発現調節を受けることを調べるために、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析を行い、標的遺伝子のプロモーター領域における H3K27me3, KDM6B 結合レベルを評価した。

(5) (3) で同定した標的遺伝子が、(2) で認めた悪性度の変化に関わることを調べるために、この標的遺伝子のノックダウンならびに強制発現実験を行った。

(6) (3) で認めた標的遺伝子の発現を、ヒト膵

癌切除検体を用いて評価した。

4. 研究成果

(1) ヒト膵癌臨床検体を用いた免疫染色により、KDM6B は正常膵組織ではほとんど発現していないが、前癌病変である PanIN にて高発現しており、膵癌においてその発現が減弱することを見出した。KDM6B の発現は low grade PanIN で最も強く、PanIN grade の進行、さらに癌での病理学的悪性度の増加に伴い、段階的にその発現が減弱することが明らかになった。KDM6B の発現と p16 の発現は概ね一致したが、興味深いことに KDM6B が発現しているにもかかわらず p16 の発現が消失している病変（癌）も少なからず認められた。このことから、膵癌において、KDM6B は p16 以外の標的遺伝子の誘導に関わっている可能性が示唆された。

(2) (1)にて KDM6B の発現が膵癌の病理学的悪性度と負の相関を示したことから、KDM6B には癌抑制遺伝子としての役割があるのではないかと考えた。そこで、KDM6B の発現が比較的高く、生物学的な悪性度も低めな膵癌細胞株 2 種類を用いて、KDM6B の安定ノックダウン細胞株を作成した。すると、これらの KDM6B ノックダウン細胞株は、親株に比して悪性形質が増強することが明らかとなった。具体的には、ヌードマウスを用いた同所移植モデルにおいて、KDM6B ノックダウン細胞株では腹膜播種、肝転移が増加し、さらに生存期間の短縮が確認された。対応する *in vitro* の実験でも同様の傾向を認め、軟寒天コロニー形成能やスフィア形成能の増加を認めた。以上より、KDM6B は膵癌の悪性形質に対して抑制的な機能を有しており、その減弱により膵癌の悪性度が増強することが示唆された。

(3) KDM6B は、転写抑制性のヒストン修飾である H3K27me3 を脱メチル化することにより、標的遺伝子の発現を促進する。したがって、KDM6B は何らかの標的遺伝子の発現を誘導することで、癌の悪性度に対して抑制的な機能を発揮しているとかんがえられる。そこで、まず KDM6B の安定ノックダウンによる遺伝子発現変化を、cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に比較した。すると、転写因子 CEBPA の標的遺伝子群の発現が有意に変動しており、さらに転写因子 CEBPA の結合配列を有する遺伝子群の発現も有意に変動していることが明らかとなった。実際、KDM6B のノックダウンにより CEBPA の発現が低下することが、複数の細胞株を用いて、mRNA レベル、タンパクレベルでそれぞれ確認された。

(4) (3)で KDM6B の標的遺伝子候補として CEBPA が浮上した。CEBPA は癌抑制遺伝子としての働きが報告されており、血液腫瘍

を含む複数の悪性腫瘍において、その発現低下が報告されている。CEBPA の発現低下の機序としては、これまで DNA メチル化を介した発現抑制が報告されているが、ヒストン修飾を介した制御機構の報告はなされていない。そこで、この CEBPA が KDM6B の H3K27me3 脱メチル化作用を介して発現が誘導されているのかどうかを調べるために、ChIP 解析を行った。すると、CEBPA 転写開始点の上流に、KDM6B の結合領域を認め、KDM6B のノックダウンに伴い、同部への KDM6B の結合の低下と H3K27me3 レベルの増加を認めた。このことから、CEBPA の発現は KDM6B による脱メチル化作用を介して誘導されることが強く示唆された。さらに、H3K27 のメチル化酵素である EZH2 の阻害剤投与により、膵癌細胞株において広範な H3K27me3 の喪失を認め、それとともに CEBPA の発現も誘導されることが明らかとなった。重要なことに、KDM6B ノックダウン細胞では EZH2 阻害剤による受動的な H3K27me3 レベルの減弱のみでは CEBPA の発現は回復せず、CEBPA の誘導において KDM6B の存在が重要であることが示唆された。

(5) さらに、KDM6B のノックダウンによる膵癌悪性度増加に、CEBPA の発現低下が関与することを調べるために、CEBPA の安定ノックダウン膵癌細胞株を作成した。すると、KDM6B のノックダウン細胞株と同様、CEBPA のノックダウン細胞株でも悪性度が増強することが明らかとなった。また、KDM6B のノックダウン細胞に、CEBPA を強制発現することで、KDM6B ノックダウンによる悪性度の増加が一部抑制できることが確認された。以上の結果により、KDM6B の発現低下に伴う膵癌の悪性度増加は、KDM6B の新規標的遺伝子として同定した CEBPA の発現減弱が関わっていることが明らかとなった。

(6) 最後に、KDM6B の発現と CEBPA の発現の相関を、ヒト膵癌臨床検体を用いた免疫染色により評価したところ、KDM6B と CEBPA の発現は強い正の相関を認め、CEBPA が KDM6B の標的遺伝子であることが支持される結果となった。さらに、KDM6B の発現パターンと同様、CEBPA の発現は low grade PanIN で高く、high grade PanIN への進展に伴い減弱し、さらに膵癌では病理学的悪性度の増加に伴い段階的に発現が減弱することが明らかとなった。

(7) 以上、膵癌の悪性度を制御する新規経路として KDM6B-CEBPA 経路を同定した。このことは、ヒストン修飾を介した遺伝子発現制御が、癌の悪性形質の制御に関わっていることを示す一例として意義深い。今後、KDM6B の発現低下機序を明らかにし、

CEBPA の発現回復を介した膵癌の悪性度制御を目指したい。

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 1 件)

Loss of histone demethylase KDM6B enhances aggressiveness of pancreatic cancer through downregulation of C/EBPα. Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Sato T, Yamamoto S, Miyabayashi K, Matsusaka K, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Nakai Y, Isayama H, Ikenoue T, Kurokawa M, Fukayama M, Kokudo N, Omata M, Koike K.

Carcinogenesis. 2014 Nov;35(11):2404-14

PMID: 24947179.

doi: 10.1093/carcin/bgu136

〔学会発表〕(計 2 件)

Reduced expression of histone demethylase KDM6B promotes pancreatic cancer progression through downregulation of C/EBPα.

Keisuke Yamamoto, Keisuke Tateishi, Yotaro Kudo, Miwako Kakiuchi, Shinzo Yamamoto, Koji Miyabayashi, Yoshinari Asaoka, Hideaki Ijichi, Masao Omata, Kazuhiko Koike

AACR 104th Annual Meeting 2013; Apr 9, 2013; Washington, DC

ヒストン脱メチル化酵素 KDM6B の発現低下は CEBPA の発現低下を介し膵癌の進展を促進する

山本恵介、立石敬介、工藤洋太郎、佐藤智彦、松坂恵介、山本信三、宮林弘至、浅岡良成、伊地知秀明、中井陽介、伊佐山浩通、池上恒雄、黒川峰夫、深山正久、國土典宏、小俣政男、小池和彦

第45回大会 日本膵臓学会大会 北九州国際会議場 PanCan Award session 4

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 恵介 (YAMAMOTO, Keisuke)

東京大学・医学部附属病院・消化器内科・特任臨床医

研究者番号：10608532

(2)研究分担者

立石 敬介 (TATEISHI, Keisuke)

東京大学・医学部附属病院・消化器内科・講師

研究者番号：20396948

(3)連携研究者

伊地知 秀明 (Ijichi, Hideaki)

東京大学・医学部附属病院・消化器内科 / 病態栄養治療部・講師

研究者番号：70463841