

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08263

研究課題名(和文)挿入変異法で同定されたエピジェネティック制御因子による疾患発症メカニズムの解析

研究課題名(英文)Functional analysis of epigenetic regulators in cancer development identified by retroviral insertional mutagenesis

研究代表者

鈴木 健之 (Suzuki, Takeshi)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：30262075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス挿入変異によってマウスに発症した腫瘍から、ウイルスタギングを用いて新規がん関連遺伝子群の探索を進め、ヒストンのメチル化修飾を担う酵素群の遺伝子を同定した。こうしたエピジェネティック制御に関わる酵素は、がん細胞の増殖だけでなく、悪性進展の様々な局面(細胞の運動・浸潤、上皮間葉転換(EMT)、幹細胞性維持など)において重要な役割を担うことがわかった。さらに、酵素の機能を制御する長鎖非コードRNA(lncRNA)を同定し、lncRNAのがん悪性進展過程における新しい機能を発見した。

研究成果の概要(英文)：Retroviral insertional mutagenesis in mice is one of the powerful strategies for high-throughput identification of novel cancer genes. Using this system, we have frequently identified the genes encoding the enzymes engaged in histone methylation. We discovered that many of the enzymes are involved not only in the tumor initiation but also in the tumor progression such as cell invasion, epithelial mesenchymal transition and maintenance of stem cell properties. Furthermore, we found that long noncoding RNAs played a crucial role in the regulation of these epigenetic enzymes during malignant progression.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん遺伝子 エピジェネティクス 非コードRNA レトロウイルス 挿入変異

1. 研究開始当初の背景

高次生命現象や疾患発症の分子メカニズムを理解するためには、それらに關与する遺伝子ネットワークを効率よく同定できる研究手法が必要である。ウイルスやトランスポゾンなどのモバイルエレメントを用いたゲノム挿入変異は、そのために大変有益な手法のひとつである。マウスレトロウイルス感染による血液腫瘍の発症には、ウイルスのゲノムへの挿入が引き起こす遺伝子の変異や発現変化が深く関係するため、ウイルス挿入部位を特定すれば原因遺伝子の候補が同定可能となる。これまでに私たちは、ウイルス感染発がんモデルマウスにおいて、ウイルス挿入部位の大規模同定によるがん関連遺伝子の網羅的解析を最初に報告し《文献: [Suzuki T et al. Nature Genetics, 32, 164-74, 2002.](#)》、ゲノムワイドに分布する3,000箇所以上の挿入部位から構成されるがん関連遺伝子のデータベースを作成し公開してきた《文献: [Akagi K, Suzuki T et al. Nucleic Acids Res. 32, D523-7, 2004.](#)》。さらに、分裂組換えを頻発するブルーム症候群モデルマウス (Blm遺伝子変異マウス) を用いて、ウイルス挿入変異を行うことによって、両アリルへの変異導入効率を高めて、劣性表現系を示す疾患原因遺伝子を優先的に単離する独自の実験系を構築し、従来の挿入変異法の問題点を克服してきた《文献: [Suzuki T et al. EMBO Journal, 25, 3411-21, 2006.](#)》。

こうした解析から、高頻度に単離される候補因子として、ヒストンのメチル化酵素17種 (Ezh2, Setd7, Smyd2など) と脱メチル化酵素13種 (Fbx110, Jmjd3, Plu1など) を同定した。メチル化、アセチル化、リン酸化などヒストンの翻訳後修飾は、転写制御、DNA複製、X染色体不活性化をはじめとする様々な生物学的現象に關与している。近年、脱メチル化に關与する酵素が次々と同定され、ヒストンやDNAのメチル化は、可逆的に調節されることによって、様々な生物学的現象に關与すると理解されるようになった。また、ヒトのがんではヒストンのアセチル化の制御異常が観察され、脱アセチル化酵素の阻害剤が抗がん剤として既に開発されている。これに關連する新しい治療標的として、ヒストンのメチル化とがんの発症・悪性進展との関係性の解明にも期待が集まっている。

2. 研究の目的

ウイルス挿入変異法を用いて、腫瘍の発症や悪性進展に關連する遺伝子の単離を進め

る。そして、疾患発症に重要な新しい遺伝子や遺伝子ファミリーを見だし、その生物学的な機能や疾患における役割を明らかにする。既に単離された重要な候補であるヒストンのメチル化を制御する酵素群に注目し、がん細胞の浸潤、上皮・間葉転換 (EMT)、薬剤耐性獲得、幹細胞性維持、低酸素応答への關与とその役割を解析し、エピジェネティック制御異常によるがんの悪性進展のメカニズムを明らかにする。特に、EMTにおける遺伝子発現プログラムを司るヒストン H3 の27番目の Lys (H3K27) のメチル化を制御する酵素複合体の機能調節機構を解析する。また、酵素複合体が標的遺伝子を認識し結合する際に、長鎖非コード RNA (long non-coding RNA: lncRNA) が關与する可能性を示すデータを得ており、lncRNA による新しいエピジェネティック制御メカニズムの解明にも取り組む。

3. 研究の方法

(1) ウイルス挿入変異を利用した疾患関連遺伝子の単離

レトロウイルス感染マウスおよび感染 Blm 遺伝子変異マウスに発症した血液腫瘍を採取する。腫瘍のゲノム DNA を鋳型に Inverse PCR を行い、ウイルス挿入部位を含むゲノム断片を増幅する。この塩基配列を決定し、ゲノム上にウイルス挿入部位をマップして、新規候補遺伝子の探索を行う。複数の腫瘍由来のコモンサイト (共通挿入部位) の遺伝子が、腫瘍の発症に重要であると判断される。特に、遺伝子の翻訳領域の内部にウイルス挿入をもち、両アリルの変異が確認されたものが、がん抑制遺伝子の候補となる。

(2) 候補遺伝子の機能解析 (全般)

単離された候補遺伝子の発現を恒常的に発現する cDNA 発現レトロウイルスや、ノックダウンできる shRNA 発現ウイルスを構築し、培養細胞に感染させて、細胞増殖、細胞周期制御、アポトーシスなどにおける機能を解析する。また、感染細胞の mutator 表現型や UV・放射線に対する感受性や抵抗性を調べる実験も行う。さらに、がんの悪性化の重要なステップである細胞の運動能、浸潤能、上皮間葉転換、薬剤耐性、スフィア形成能についても解析する。それに加えて、FLAG および His タグを融合した候補遺伝子産物を発現する細胞株を樹立し、その細胞抽出液から、抗タグ抗体を用いて遺伝子産物を含む複合体を精製する。複合体の構成要素を質量分析で解析して、相互作用する分子を同定し、候補遺伝子の生物学的な役割の解析に活用する。

(3) ヒストンのメチル化を制御する酵素群の機能解析

候補遺伝子として同定したヒストンのメチル化を制御する酵素(メチル化酵素と脱メチル化酵素)については、これらの cDNA または shRNA 発現レトロウイルスを構築し、上記の培養細胞での機能解析、複合体解析の実験を行う。さらに、薬剤の添加で酵素の発現の ON/OFF を調節できる細胞株を樹立し、酵素が転写調節を行う標的遺伝子探索のために、マイクロアレイ解析などを計画している。

4. 研究成果

(1) ヒストンのメチル化を制御する酵素群のがんにおける重要性

ウイルス挿入変異の大規模な解析から、ヒストンのメチル化酵素 17 種 (Ezh2, Setd7, Smyd2 など) と脱メチル化酵素 13 種 (Fbxl10, Jmjd3, Plu1 など) を同定した。ヒストンの翻訳後修飾は、転写制御など様々な生物学的現象に関与している。特に、ヒストンの脱アセチル化酵素の阻害剤が抗がん剤として開発されていることもあり、メチル化と発がんの関係も大変注目されている。ヒストンのメチル化修飾が、がんの発症や悪性進展とどのように関わるかを解明することが重要と考え、次のような研究課題を進行してきた。

CAGE 法により、ヒストンのメチル化を制御する酵素によって発現調節される標的遺伝子を探索し、そのデータベースを作成した。

ヒストン H3 の 9 番目の Lys (H3K9) の脱メチル化酵素 JMJD2C 及び H3K27 脱メチル化酵素 UTX が、がん抑制遺伝子産物 p53 及び RB にそれぞれ作用して細胞増殖を制御することを示した。H3K4 脱メチル化酵素 PLU1 が、がんの発症だけでなく、がん細胞の浸潤能を亢進することを示し、悪性進展過程における新たな役割を見つけた。JMJD5 酵素が、がん抑制遺伝子 p53 の機能を調節し、p53 標的遺伝子の発現調節を介して、胚細胞の増殖を制御することを示した。PLU1 酵素の高発現が上皮間葉転換 (EMT) の促進に寄与すること、EMT を調節する転写因子 ZEB ファミリーを阻害する microRNA-200 の発現制御がその作用機序であることを同定した。H3K27 のメチル化を制御するポリコム複合体 (PRC2) の活性と、PRC2 複合体の標的遺伝子座位への結合が、EMT の進行に必須であることを示した。このように、がんの悪性進展の様々な局面において、ヒストンのメチル化修飾を介する動的クロマチン構造の脱制御が重要な役割を担うことがわかってきた。

(2) がん関連遺伝子候補 JMJD5 は p53 の新しい制御因子として機能する

挿入変異の標的として同定した酵素のうち、JMJD5 の機能やがん発症における役割を解明するために、Jmjd5 遺伝子欠損マウスを作製して解析した。Jmjd5 ノックアウト胚では、がん抑制遺伝子産物 p53 の発現そのものに変化はないが、p53 が転写制御している下流標的遺伝子群 (p21, Noxa, Mdm2 など) の発現が著しく亢進していた。この分子メカニズムを調べた結果、JMJD5 が p53 と相互作用することによって、p53 の標的遺伝子座へのリクルートを阻害することが示された。すなわち、JMJD5 は p53 の転写制御機能を阻害的にコントロールする新規 p53 制御因子として、細胞の増殖に関与することがわかった (発表文献)。また、JMJD5 は悪性度の高い乳がんとして知られるトリプルネガティブ型乳がんで顕著に発現が低下することを見いだした。乳がん細胞株において JMJD5 の発現をノックダウンすると、がん幹細胞様の性質を有するスフィアの形成能が有意に上昇することがわかった。こうした結果をふまえて、乳がんの悪性進展過程における JMJD5 の役割と分子レベルでの作用機序について解析を進行中である。

(3) 乳がん細胞のスフィア形成能や細胞運動能を制御するヒストンメチル化酵素 DOT1L の解析

ヒストンメチル化酵素 DOT1L は、染色体転座を伴う白血病の発症に関与することが知られているが、固形がんにおける役割はあまり報告されていない。私たちは、乳がん、特にトリプルネガティブ型乳がんで、DOT1L が高発現していることを見いだした。さらに、DOT1L の大量発現は、乳がん細胞株のスフィア形成能や細胞運動能を上昇させること、一方、DOT1L のノックダウンはそれらを低下させることがわかった。DOT1L 酵素によって発現制御される標的遺伝子のうち、分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 BCAT1 は、その大量発現やノックダウンによって、DOT1L が引き起こすスフィア形成能や細胞運動能の変化をキャンセルできることから、DOT1L の下流で作用する重要なエフェクター分子であることが示唆された (発表文献)。また、DOT1L 酵素活性阻害剤 EPZ-5676 や BCAT1 酵素阻害剤 gabapentin が、乳がん細胞株の悪性形質に阻害的効果を示すことから、これらの阻害剤のがん治療への有用性を現在検討中である。

(4) 上皮間葉転換 (EMT) における長鎖非コード RNA の新しい役割

PRC2 (Polycomb repressive complex-2) は、ヒストン H3K27 のメチル化を担う酵素複合体であり、EZH2 メチル化酵素および SUZ12, EED, RBBP4/7 のコアコンポーネントから構成される。私たちは、H3K27me3 修飾を認識する EED と、PRC2 複合体をクロマチンにリクルートする役割を担うアクセサリー因子 JARID2 が、がん細胞の上皮・間葉転換 (EMT) に重要な役割を果たすことを明らかにしてきた。これらの因子は、TGF-beta 刺激による EMT プロセスで顕著に発現誘導され、その発現をノックダウンすると、EMT の進行がブロックされた。この原因は、H3K27 のメチル化制御の異常により、E-Cadherin など上皮系マーカー遺伝子の発現抑制がブロックされたためであり、PRC2 の機能が EMT 誘導遺伝子発現プログラムに極めて重要であることが示された。また、JARID2 の強制発現のみでは、PRC2 の標的遺伝子へのリクルートや EMT を誘導しなかったことから、TGF-beta 刺激によって誘導・活性化される何らかの因子が PRC2 の機能に必要であることが示唆された。最近、この因子の有力な候補として、EMT に伴って発現誘導される長鎖非コード RNA である MEG3 を同定した。MEG3 のノックダウンにより、TGF-beta 誘導 EMT はブロックされ、MEG3 の大量発現により、PRC2 の活性化と上皮系マーカー遺伝子の発現抑制が誘導されることがわかった。また、MEG3 は JARID2 と結合することができること、それによって JARID2 と EZH2 の相互作用を増強すること、さらに標的遺伝子の発現制御領域のクロマチンへの PRC2 酵素複合体の相互作用を増強することが示された (発表文献)。

これらの結果は、EMT のエピジェネティック制御において、長鎖非コード RNA が中心的な役割を担うことを示すものであり、さらに詳細なメカニズムを解析している。

(5) がん細胞の EMT におけるヒストン脱メチル化酵素 KDM6A の解析

TGF-beta 刺激によって EMT が誘導されるがん細胞株では、EMT の進行を司る遺伝子発現の制御において、ヒストン H3K27 のメチル化修飾が重要である。今回、H3K27 の脱メチル化に関わる 2 つの酵素 KDM6A (UTX) と KDM6B (JMJD3) について、EMT における機能を解析した。KDM6A は、上皮系遺伝子の発現制御領域における PRC2 のリクルートや H3K27 のメチル化を阻害し、それら遺伝子の発現抑制をブロックすることによって、EMT 誘導を阻止することが示された。すなわち、KDM6A は EMT プロセスにおいて、PRC2 のアンタゴニスティックな制御因子として機能することがわかった (発表文献)。一方、KDM6B は PRC2 複合体や KDM6A と全

く異なる種類の遺伝子の発現を制御している可能性が示唆された。現在、EMT の進行における JMJD3 の複雑な機能を理解するために、標的遺伝子の探索などの解析を進行している。

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)

Terashima M, Ishimura A, Wanna-Udom S and Suzuki T. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition by KDM6A histone demethylase in lung cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 490(4):1407-13, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.07.048, 査読有.

Gunarta IK, Li R, Nakazato R, Suzuki R, Boldbaatar J, Suzuki T and Yoshioka K. Critical role of glioma-associated oncogene homolog 1 in maintaining invasive and mesenchymal-like properties of melanoma cells. *Cancer Sci.*, 108(8):1602-11, 2017. doi: 10.1111/cas.13294, 査読有.

Terashima M, Tange S, Ishimura A and Suzuki T. MEG3 long noncoding RNA contributes to the epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cell lines. *J Biol. Chem.*, 292(1): 82-99, 2017. doi: 10.1074/jbc.M116.750950, 査読有.

Oktyabri D, Ishimura A, Tange S, Terashima M and Suzuki T. DOT1L histone methyltransferase regulates the expression of BCAT1 and is involved in sphere formation and cell migration of breast cancer cell lines. *Biochimie*, 123: 20-31, 2016. doi: 10.1016/j.biochi.2016.01.005, 査読有.

Ishimura A, Terashima M, Tange S and Suzuki T. Jmjd5 functions as a regulator of p53 signaling during mouse embryogenesis. *Cell Tissue Res.*, 363(3): 723-33, 2016. doi: 10.1007/s00441-015-2276-7, 査読有.

[学会発表] (計 20 件)

Terashima M, Ishimura A, Tange S and Suzuki T. Epigenetic Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer Cells. The 12th International Symposium of Institute Network, 2017 年 11 月 28-29 日, Institute of Medical Science, The University of Tokyo (東京都・港区) Suzuki T. Functional characterization of histone methyl-modifying enzymes during

malignant progression of cancer. The Joint International Symposium of Tumor Microenvironment and Precision Oncology, 2017年5月22日、Seoul National University (Seoul, Korea)

Suzuki T, Terashima M, Wanna-Udom S and Ishimura A. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition by KDM6A histone demethylase in lung cancer cells. 2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6-9日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Terashima M, Tange S, Wanna-Udom S, Ishimura A and Suzuki T. The mechanism of epigenetic regulation in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition. 2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6-9日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Ishimura A, Tange S, Wanna-Udom S, Terashima M and Suzuki T. A Tumor suppressive role for JMJD5 in Triple-negative Breast Cancer. 2017年度生命科学系学会合同年次大会、2017年12月6-9日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Suzuki T, Terashima M and Ishimura A. Involvement of long noncoding RNA in the epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. 第76回日本癌学会学術総会、2017年9月28日-30日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Ishimura A, Tange S, Terashima M and Suzuki T. Tumor Suppressive Role of JMJD5, a JmjC-domain Protein, in Breast Cancer. The 5th JCA-AACR Special Joint Conference, 2016年7月13-15日、Maihama Hotel Club Resort(千葉県・浦安市)

Terashima M, Tange S, Ishimura A and Suzuki T. 上皮間葉転換における PRC2 遺伝子発現抑制メカニズム. 第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日-12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Ishimura A, Tange S, Terashima M and Suzuki T. 乳がん悪性化における JMJD5 の役割. 第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日-12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Terashima M and Suzuki T. 上皮間葉転換におけるポリコム抑制複合体 PRC2 を介したエピジェネティック制御機構. 第3回北陸エピジェネティクス研究会、2016年11月21-22日、AOSSA 福井(福井県・福井市)

Suzuki T, Ishimura A, Oktyabri D and Terashima M. DOT1L histone

methyltransferase regulates sphere formation and cell migration of cancer cells through BCAT1 expression. 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月6-8日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Suzuki T. Functional characterization of histone methyltransferases and demethylases in epithelial-mesenchymal transition of cancer cells. Tenth AACR-JCA Joint Conference on Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics, 2016年2月16-20日、Hyatt Regency Maui (Hawaii, USA)

Suzuki T, Tange S, Oktyabri D, Terashima M and Ishimura A. Involvement of histone methyl-modifying enzymes in cancer development identified by retroviral insertional mutagenesis. The 10th International Symposium of Institute Network, 2015年7月23-24日、北海道大学(北海道・札幌市)

Ishimura A, Terashima M, Tange S and Suzuki T. JmjC ドメイン蛋白質 Jmjd5 は、マウス胚発生期の p53 シグナルを負に制御する. 第38回日本分子生物学会年会、2015年12月1-4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Terashima M, Tange S, Oktyabri D, Ishimura A and Suzuki T. JARID2 is involved in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of cancer cells. 第38回日本分子生物学会年会、2015年12月1-4日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Suzuki T, Tange S, Terashima M and Ishimura A. Functional analysis of histone methyl-modifying enzymes in epithelial-mesenchymal transition of cancer cells. 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8-10日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Ishimura A, Tange S, Terashima M and Suzuki T. Identification of JmjC family genes involved in breast cancer malignancies. 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8-10日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Tange S, Oktyabri D, Terashima M, Ishimura A and Suzuki T. EED regulates epithelial-mesenchymal transition of cancer cells induced by TGF-beta. 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8-10日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

Oktyabri D, Ishimura A, Terashima M and Suzuki T. DOT1L は乳がん細胞の細胞運動性とスフィア形成を制御する. 第9回エピジェネティクス研究会年会、2015年5月25-26日、学術総合センター一橋講堂(東京都・千代田区)

Tange S, Oktyabri D, Terashima M,

Ishimura A and Suzuki T. JARID2 は、肺がん細胞株への TGF- β 処理によって誘導される上皮間葉転換に関与する。第9回エピジェネティクス研究会年会、2015年5月25-26日、学術総合センター一橋講堂（東京都・千代田区）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/department/mccb/11.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

鈴木 健之（SUZUKI TAKESHI）

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：30262075