

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09791

研究課題名(和文) ヒト有棘細胞癌関連遺伝子変異の解析 - ヒストン脱メチル化酵素欠損マウスを用いた探索

研究課題名(英文) Searching for human SCC related gene aberrations by using Gasc1 knockout mice

研究代表者

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：40595708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱メチル化の一つGASC1 (JMJD2C) は多くのヒト腫瘍で高発現またはゲノム増幅を示し、我々の作成したGasc1 ノックアウト・マウスにおいても皮膚SCCの発生率が低い。このことからGASC1に発現制御を受ける遺伝子中に、腫瘍の発生・進展に必須の遺伝子が含まれる可能性が高いと考え、本研究ではKOと野生型マウス(WT)の正常皮膚で発現レベルの異なる遺伝子について、SCCの発生・進展における役割の検討を行った。その中で、候補遺伝子の一つZNF618が、細胞の遊走能を抑制する機能があること、またその発現が上皮間葉系転換の制御に関わる転写因子ZEB1により制御されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：GASC1 encodes a histone demethylase which specifically demethylates lysine residues (H3K9, H3K36 and H1.4K26) and plays a crucial role in the regulation of gene expression, as well as heterochromatin formation. Recently, we have found that Gasc1-heterozygous mice (Gasc1+/-), is clearly resistant to chemically induced skin squamous cell carcinoma (SCC), indicating that Gasc1 is regulating gene(s) involved in susceptibility for SCC. Based on this result, we have conducted functional analysis of the genes differentially expressed between the skin of Gasc1+/- and wild type mice (WT), to elucidate the roles of those genes in the development and/or progression of SCC. In the present study, we have found that ZNF618, which showed significantly lower expression level in Gasc1+/- skins than those of WT, has a function to suppress cell migration ability. Detailed analysis revealed that ZNF618 could be regulated by epithelial-mesenchymal -transfer related transcription factor ZEB1.

研究分野：腫瘍学

キーワード：皮膚有棘細胞癌 ヒストン脱メチル化酵素 マウスモデル

### 1. 研究開始当初の背景

皮膚腫瘍のうち有棘細胞癌(SCC)は日本人に多く発症する疾患であり、皮膚悪性腫瘍の中では25%を占める。欧米においても年々増加傾向にあり、有効な診断法・治療法の確立が急がれる。体表部に発生する腫瘍であることから、より侵襲性の低い治療法が求められ、そのためには最適な治療標的の同定や、早期診断および、良性疾患との鑑別を容易にするマーカーの開発が必要となる。

SCC組織で生じている変異としてはp53、H-rasの点突然変異やc-Mycの増幅などの配列変異が報告されているが、これらの変異の見られないSCCも多く、また変異の生じ易さを左右する遺伝的背景についても、知見は限られている。

近年、DNAのメチル化やヒストン修飾などepigeneticな変異もまたSCCの発生に関与していることが明らかになってきた。ヒストン修飾により調節因子の結合能やクロマチンの立体構造の変化が生じ、遺伝子の発現状態が変化するが、腫瘍の多くで、ヒストン修飾酵素の異常や、修飾状態の変異が報告されている。ヒストン修飾酵素の一つJMJD2C(GASC1)はヒストンH3の9番目と36番目のリジン(H3K9、H3K36)およびH1.4K26の脱メチル化を行う酵素であるが、この遺伝子を含むゲノム領域が食道SCC、乳癌において増幅していることや、前立腺癌や大腸癌においてGASC1が過剰発現していることが知られている。これらの現象はGASC1遺伝子が癌遺伝子として働いている可能性を示唆するが、GASC1の過剰発現が癌の発生を誘導する直接の証拠は得られていなかった。

そこで我々は*Gasc1*ノックアウト・マウス(KO)を作成し、その発癌感受性の解析を行ってきた。通常の飼育状態では*Gasc1* KOヘテロ(+/-)は特に明確なフェノタイプの変化を示さなかったが、7,12-dimethylbenz(a)anthraceneと12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetateを用いた2段階化学発癌プロトコールにて皮膚腫瘍の誘導を試みたところ、良性皮膚腫瘍およびSCCの発生頻度が野生型と比較して有意に低かった。この結果より、GASC1が発癌を促進する機能を持つことが証明された。さらにこの実験結果より、GASC1による発現制御をうける遺伝子の中に、腫瘍の発生に必須の遺伝子が含まれており、KOマウスではその発現が変化し、その結果腫瘍の発生が低下したと考えられた。

これらの結果をふまえ、GASC1の下流で制御を受け発癌感受性に影響を与えている遺伝子をスクリーニングするために、*Gasc1* KO(+/-)と野生型マウスの正常皮膚よりRNAを抽出し網羅的発現解析を行い、KOにおいて有意に2倍以上発現が変化していた遺伝子を絞り込んだ。

### 2. 研究の目的

*Gasc1* KO(+/-)において野生型と比較して発現が変化していた遺伝子について、ヒトSCC細胞における機能を解析し、腫瘍の発生・進展における役割の検討を行うことを目的として研究を行った。

### 3. 研究の方法

(1) 細胞株; ヒト皮膚SCC細胞株A431および不死化ケラチノサイト細胞株HaCaTを用いた。

(2) 機能解析; 各細胞における候補遺伝子の発現量をsiRNAを用いて抑制し、細胞の増殖能をMTT assayにより、細胞遊走能をWound healing assayにて、浸潤能をMatrigel invasion assayにより解析した。また低接着性の培養皿を用い、増殖因子を添加した無血清培地で培養することによりsphere形成能の検討を行った。培地はwith 0.4% BPE, 0.1% hEGF, 0.1% hydrocortisone, 0.1% GA1000, 0.1% insulin, 1% L-glutamineを添加したMEGM BulletKit無血清培地を用いた。

### 4. 研究成果

*Gasc1* KO(+/-)マウス皮膚において野生型個体の皮膚と比べて発現の低下していた遺伝子ZNF618は新規ヒトSCC関連遺伝子候補の1つと考えられたが、その機能は全く不明であることから、詳細な機能解析を行った。そこで、A431およびHaCaT細胞におけるZNF618の発現をsiRNAにより抑制し、細胞増殖能、遊走能について検討したが、コントロールsiRNAを導入した細胞と比較して明確な差は見られなかった。また細胞のストレス応答性への影響を調べるために、DNA損傷剤や過酸化水素水の投与、放射線照射を行い、ZNF618の発現抑制により、細胞死の誘導レベルに変化が見られるかどうかを検討したが、こちらについても特に違いは観察されなかった。一方、遊走能について検討を行ったところ、HaCaT細胞においてはZNF618の発現抑制によりコントロールと比較して、有意な遊走能の亢進が見られた。これは、TGF $\beta$ 1投与により細胞の遊走能を亢進させた状態においても顕著であった(図1)。

そこで、ZNF618がTGF $\beta$ 1のシグナル伝達系に作用し上皮間葉系転換の誘導に影響を与えた可能性を検討するために、EMT関連のマーカーの変異を調べたが、これらの遺伝子の発現はZNF618の発現抑制によっては変化しなかった。またZNF618の発現抑制はTGF $\beta$ 1の発現レベルにも影響を与えなかった。

一方、TGF $\beta$ 1の投与によりHaCaT細胞におけるZNF618発現レベルの低下が観察された(図2A)。逆にEMTにおいて促進的な機能をもつSNAI1もしくはZEB1の発現をノックダウンしたところ、ZEB1の発現を

抑制した場合に、ZNF618 の発現が顕著に上昇した(図 2B)。これらの結果は、ZNF618 が EMT に対し抑制的な作用を持つ事、その発現は ZEB1 によって抑制を受けていることを意味する。

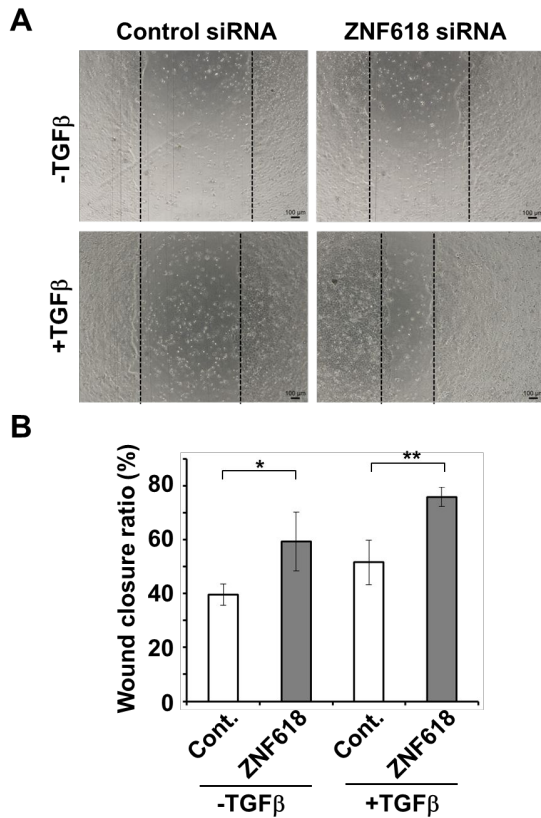


図 1 ZNF618 発現抑制による細胞遊走能の変化。

創傷作成後、培養液を交換し siRNA (コントロール、ZNF618) を導入し、半分には 2ng/ml の TGFβ を添加した。48 時間後に、創傷部の幅を測定し、wound closure ratio ((最初の幅-48 時間目の幅)/最初の幅)×100(%)を計算した。A. 代表的な画像、B. 各条件につき 3well ずつ実験を行い、それぞれについて 3ヶ所ずつ計 9ヶ所創傷部の幅を測定した。平均値と SD を示す。

\* $P < 1 \times 10^{-3}$ , \*\* $P < 1 \times 10^{-5}$

EMT は腫瘍の幹細胞性を促進する作用を持つこと、幹細胞性を獲得した腫瘍細胞は非接着性の環境下において sphere 形成能を獲得することが報告されていることから、本研究ではさらに、sphere における ZNF618 の発現レベルを調べた。その結果、HaCaT および SCC 細胞株 A431 より形成された sphere はいずれも、通常の接着培養を行った場合と比べて、ZNF618 の発現が顕著に低下することが判った(図 3)。この結果もまた、ZNF618 が EMT に対して抑制的な効果を持つという上述の見解を裏付ける。

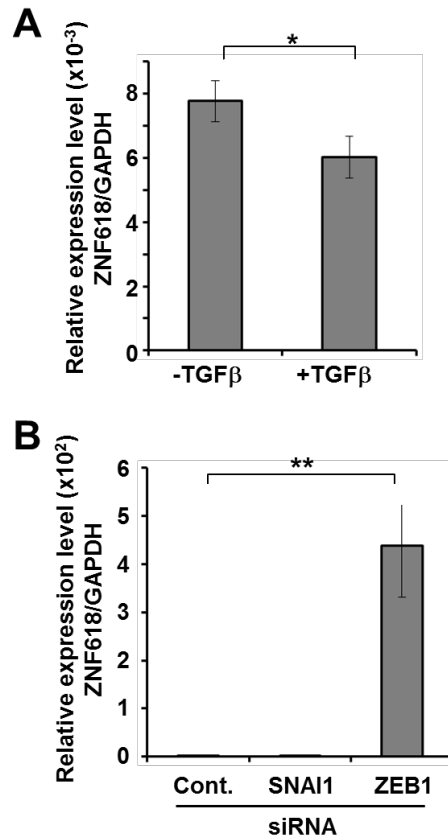


図 2 TGFβ 刺激または EMT 関連転写因子抑制後の ZNF618 の発現変化(real-time PCR)。A. 2ng/ml の TGFβ 投与 12 時間後の ZNF618 の発現レベル。\* $P < 0.05$ 。B. siRNA (コントロール、SNAI1、ZEB1) 導入 48 時間後の ZNF618 の発現レベル。\*\* $P < 1 \times 10^{-5}$

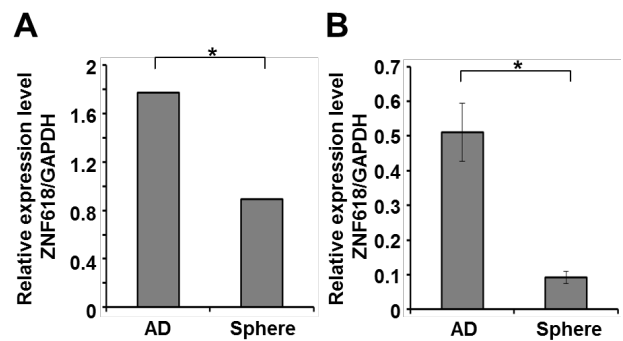


図 3 接着培養(AD)および Sphere 培養における ZNF618 の発現量 通常の培養条件で接着培養した細胞、もしくは低接着性の培養皿にて無血清培地を用いて培養し、sphere を形成させた細胞よりそれぞれ RNA を抽出し、real-time PCR によって ZNF618 の発現量を調べた。A431、B. HaCaT \* $P < 1 \times 10^{-5}$

表1 ZNF618と発現が相関する遺伝子の機能分類

| GO biological process complete                           |
|--|
| substrate adhesion-dependent cell spreading              |
| cell-substrate junction assembly                         |
| adherens junction assembly                               |
| axon extension   |
| hippo signaling  |
| positive regulation of smoothened signaling pathway      |
| face morphogenesis                                       |
| collagen fibril organization                             |
| cell-substrate adherens junction assembly                |
| focal adhesion assembly                                  |
| neuron projection extension                              |
| head morphogenesis                                       |
| regulation of smoothened signaling pathway               |
| body morphogenesis                                       |
| actin filament bundle organization                       |
| embryonic cranial skeleton morphogenesis                 |
| cell-substrate adhesion                                  |
| neural crest cell development                            |
| endothelial cell migration                               |
| mesoderm morphogenesis                                   |
| adherens junction organization                           |
| endochondral bone morphogenesis                          |
| proteoglycan biosynthetic process                        |
| developmental cell growth                                |
| multicellular organismal macromolecule metabolic process |

ZNF618 の機能を予測するために、Public database である R2 platform (<http://r2.amc.nl>) に登録されている 627 種類の細胞株の網羅的発現解析のデータを解析し、ZNF618 と発現が相関する遺伝子群の絞り込みを試みた。有意な正の相関を示した 1500 個の遺伝子を enrichment 解析により機能分類し、5 倍以上の enrichment を示した機能区分を表 1 に示す。この結果から、ZNF618 と発現パターンが似ている遺伝子には、細胞間の接着や、細胞と培養皿等の基質との接着に関連した遺伝子、Hippo-Yapp 経路関連遺伝子が多く含まれることが判った。

以上のことから、ZNF618 が細胞間の相互作用や細胞外基質との結合、この結果生じる組織の形態形成に必要なシグナル伝達等に関与している可能性が強く示唆された。

しかしながら、例えば HaCaT における ZNF618 の発現を抑制しても、Hippo-Yap 関連遺伝子 YAP1, LATS2, TEAD1 の発現には明瞭な変化が見られず、ZNF618 がこれらの経路にどのように関与しているのか、その機序は不明である。そのため、ZNF618 の機能について現在引き続き詳細な解析を進めている。

#### 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 1 件)

Ozaki Y, Fujiwara K, Ikeda M, Ozaki T, Terui T, Soma M, Inazawa J and Nagase H. The oncogenic role of GASC1 in chemically-induced mouse skin cancer. **Mammalian Genome** 査読有、26巻,2015, 11-12

〔学会発表〕(計 1 件)

藤原恭子、尾崎由美、照井正、永瀬浩喜、相馬正義、Analysis of the role of GASC1 in development of skin tumor. 第 9 回日本大学先端バイオフォーラム、2016 年 1 月 27 日、市ヶ谷

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤原 恭子 (FUJIWARA, Kyoko)  
日本大学・医学部・助教  
研究者番号：40595708

##### (2) 研究分担者

照井 正 (TERUI, Tadashi)  
日本大学・医学部・教授  
研究者番号：30172109

##### (3) 連携研究者

尾崎 俊文 (OZAKI, Toshinori)  
千葉県がんセンター・研究局・室長  
研究者番号：40260252

永瀬 浩喜 (NAGASE, Hiroki)  
千葉県がんセンター・研究局・所長  
研究者番号：90322073

##### (4) 研究協力者

( )