

平成 30 年 8 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10142

研究課題名(和文) ヒストン脱メチル化酵素を制御するmicroRNAを標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of the new treatment strategy targeting microRNA which controls histone de-methylase

研究代表者

坂本 快郎 (SAKAMOTO, Yasuo)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：00452897

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)：EZH2と反対の酵素活性を持つヒストン脱メチル化酵素JMJD3を抑制するmicroRNA、miR186-5pを同定した。大腸癌細胞株においてmiR186-5pを強制発現させると、JMJD3の発現およびCDH1、VASH1、TFAP2Eといった大腸癌進展に重要な遺伝子の発現抑制を確認できた。大腸癌細胞株においてヒストンメチル化酵素EZH2の発現を抑制するとオキサリプラチン受性が増強することを確認した。

研究成果の概要(英文)：We identified microRNA, miR186-5p which suppress the expression of histone de-methylase JMJD3 with enzyme activity opposite to EZH2. We confirmed that the suppression of JMJD3, CDH1, VASH1, and TFAP2E by the over-expression of miR186-5p in colon cancer cell line. We confirmed that cisplatin sensitivity was increased when I controlled expression of histone methylase EZH2 in colon cancer cell line.

研究分野：消化器癌、DNAメチル化、ヒストンメチル化

キーワード：JMJD3 microRNA EZH2

1. 研究開始当初の背景

<ヒストンコード>

ヒストンはH2A, H2B, H3, H4それぞれがダイマーを形成し集まった8量体である。各ヒストンのN末端のリジン残基にメチル化、アセチル化などの修飾が入ることであたかも遺伝情報の如く、細胞における遺伝子発現に影響を与えつつ次世代への細胞へと受け継がれる。このことはヒストンコードと呼ばれ (*Science*. 293:1074-80, 2001)、H3K27のメチル化は遺伝子不活性化のヒストンコードであり、癌抑制遺伝子の不活性化と関連している (*Curr Opin Cell Biol*. 14:286-98, 2002)。これまでに多くのメチル化・脱メチル化酵素が同定されており、H3K27の特異的メチル化酵素として EZH2 が、脱メチル化酵素として JMJD3 が同定されている (*Biochim Biophys Acta*. 2011, Fig.1)。

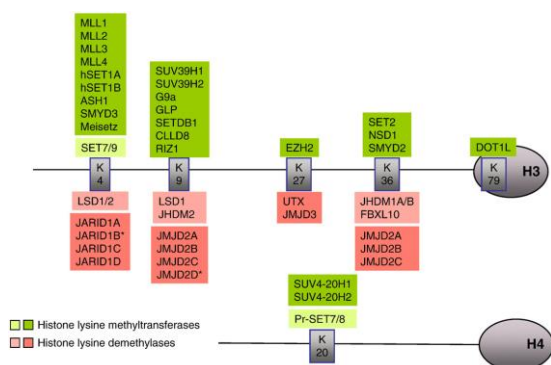


Fig.1 ヒストンのメチル化と酵素

<EZH2 および JMJD3 と癌との関連>

ヒストンメチル化酵素 EZH2 は、H3K27 をメチル化することで転写を抑制し、癌抑制遺伝子の転写を抑制することで癌遺伝子として機能することが報告された。これまでに前立腺癌 (*Nature*. 2003, Fig.2)、乳癌 (*PNAS*. 2003, Fig.3)、胃癌 (*Cancer Sci*. 2006)、悪性黒色腫 (*J Clin Oncol*. 2006)、膵癌 (*Clin Cancer Res*. 2008)、食道癌 (*Int J Cancer*. 2010)、卵巣癌 (*Carcinogenesis*. 2010)、そして我々が報告した胆管癌 (*Ann Surg Oncol*. 2013) など多くの癌腫において、予後不良因子として報告されている。

一方で、H3K27を脱メチル化する JMJD3 は 2007年に同定されたが (*Cell Res* 2007)、癌との関連についての報告はいまだ乏しい。ホジキンリンパ腫 (*Oncogene*. 2011) や腎細胞癌 (*BMC Cancer*. 2012) で高発現しており、乳癌細胞株では上皮間葉転換 (EMT) を誘導する (*J Biol Chem*. 2012) との報告がある一方で、大腸癌細胞株において JMJD3 をノックダウンすると EMT を引き起こす (*Hum Mol Genet*. 2011) といった報告もあり、癌におけるその機能解析は未だ十分ではない。

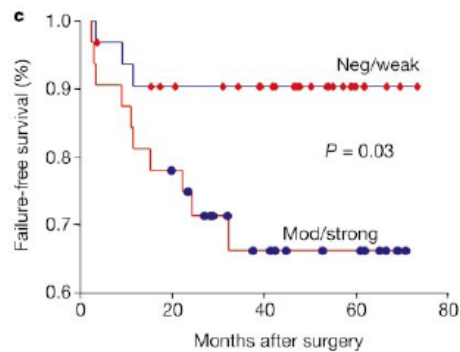


Fig.2 EZH2 発現量と前立腺癌の予後

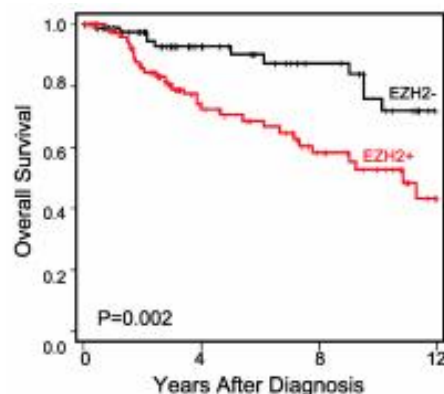


Fig.3 EZH2 発現量と乳癌の予後

<我々のこれまでの研究成果>

我々は以前よりエピジェネティクスを研究対象としており、メチル化 DNA 結合タンパク質 MBD1-MCAF-ヒストンメチル化酵素 SETDB1 複合体によるヘテロクロマチン形成や (*J Biol Chem*, 2005) (Fig.1)、MBD1-ポリコームタンパク質 hPc2 による転写抑制機構について報告してきた (*J Biol Chem*, 2007) (Fig.2)。

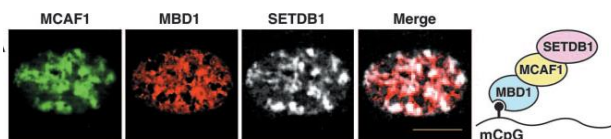


Fig.1 複合体によるヘテロクロマチン形成

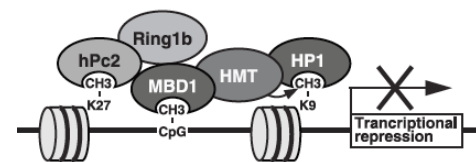


Fig.2 MBD1 と hPc2 による転写抑制機構

その後、ポリコームタンパク質群の一つであり、ヒストンメチル化酵素である EZH2 と癌との関係に着目し、EZH2 の発現上昇と膵管内乳頭性腫瘍の癌化との関連性を報告した (*Ann Surg Oncol*. 2011) (Fig.3)。また、EZH2 の発現が胆管癌の予後と相関し、EZH2 は胆管

癌における治療ターゲットとなり得ることを報告している (Ann Surg Oncol. 2013) (Fig. 4)。さらに、H3K27 メチル化阻害剤である DZNep による細胞増殖抑制と、治療薬の可能性を報告した (Oncol Rep, 2014) (Fig. 5)。

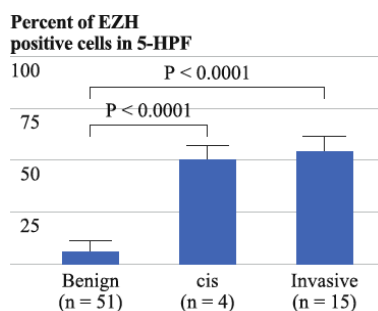


Fig. 3 IPMN における EZH2 発現

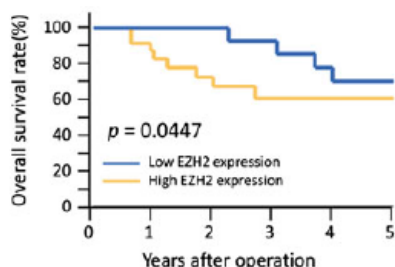


Fig. 4 EZH2 発現と胆管癌予後

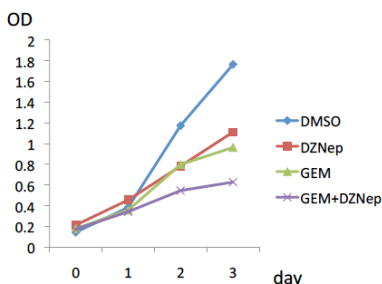


Fig. 5 DZNep による細胞増殖抑制

## 2. 研究の目的

ヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) を特異的にメチル化する酵素である EZH2 は多くの癌腫で過剰発現が認められる。一方、EZH2 と反対に H3K27 の特異的脱メチル化酵素として JMJD3 が同定され、癌抑制遺伝子の可能性が示唆されている。我々は JMJD3 の発現を抑制する microRNA を同定しており、癌関連 microRNA と考えている。分子生物学的手法を用いて、大腸癌における EZH2、JMJD3、さらには JMJD3 を抑制する microRNA の相互の関連を解析することにより、大腸癌における H3K27 メチル化と microRNA のエピジェネティックな制御機構を解明し、新たな治療法の開発を目指すことを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) JMJD3 と microRNA に関する分子生物学的検討

①大腸癌由来細胞株における JMJD3 および microRNA の発現状況の確認

まず、JMJD3 および microRNA の発現状況を、当教室で既に保有している各種の大腸癌細胞 cell line において分子生物学的手法を用いて確認する。

②大腸癌由来細胞株における JMJD3 および microRNA の機能解析

JMJD3 の高発現細胞株に対して siRNA の手法を用いて JMJD3 を Knock down することで、H3K27 メチル化レベルの変化と細胞の増殖能 (proliferation assay) ・浸潤能 (invasion assay) の変化を検証する。JMJD3 の siRNA 用 vector 作成し、microRNA 導入による細胞の増殖能・浸潤能の変化を検証する。

(2)大腸癌症例の臨床検体における JMJD3 と microRNA に関する検討

①大腸癌切除標本における JMJD3 および microRNA の発現状況の確認

新鮮凍結標本や新鮮凍結血清を用いて、免疫染色や PCR、western blotting 法で実際の検体における JMJD3 や microRNA の発現状況を確認する。

②JMJD3 および microRNA の発現状況と予後との関連性の検討

先の分子生物学的手法で得られたデータと、臨床データを用いて臨床病理学的因子や予後との関連性を統計的に解析することで、予後との関連性や、予後因子を同定する。

(3) JMJD3 および microRNA の発現量と抗癌剤感受性に関する検討

JMJD3 および microRNA の発現量と抗癌剤感受性との関連を、大腸癌細胞株を用いて検証する。EZH2 高発現が卵巣癌におけるシスプラチン抵抗性と関連しているとの報告があることから (Cancer Biol Ther. 10:788-95, 2010)、EZH2 と相反する酵素活性を有する JMJD3 を高発現している細胞株は、抗癌剤感受性が高いことを想定している。このことから、siRNA の手法による Knock down や microRNA 導入により JMJD3 を抑制すると、抗癌剤抵抗性を獲得すると想定しており、microRNA を抑制する anti-microRNA が治療薬になり得ると考えている。具体的な実験方法として、anti-microRNA 導入と大腸癌治療の Key drug である 5-FU、oxaliplatin、irinotecan を至適濃度で投与した場合の、細胞増殖速度を anti-microRNA 未導入の細胞と比較・検証する。

(4) in vivo における検討

in vitro assay で得られた結果を in vivo で確認する予定である。具体的にはヌードマウスの皮下に通常の大腸癌細胞株および JMJD3 抑制 microRNA 導入細胞株を注入することにより、それぞれの腫瘍形成能を比較・評価する。また、抗癌剤を投与した場合の腫瘍増殖も比較・評価する。

#### 4. 研究成果

(1) 先行研究にて、JMJD3 は正常部で高発現であり、大腸癌での低発現が予後不良因子であること (Fig. 1) に加えて、癌抑制遺伝子 p15<sup>INK4b</sup> を制御し大腸癌進展を抑制するメカニズムを初めて明らかにした (*Ann Surg Oncol.* 2015)。

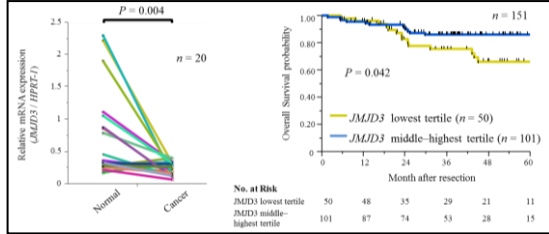


Fig.1 JMJD3 の発現パターンと生存曲線

(2) JMJD3 の発現を抑制する microRNA を検索するべく、当科保有の大腸癌細胞株の中で JMJD3 高発現株である colo201 と、JMJD3 低発現株である HT29 の細胞株に対して 328 種類の miR をターゲットとした PCR array を施行し、colo201 にて低発現、HT29 において高発現である miR のうち、5 倍以上の差があり、JMJD3 の 3' -UTR との結合能を有する miR を 2 種類抽出した。さらに in vitro にて JMJD3 を抑制する miR として miR186-5p を同定した (Fig. 2)。

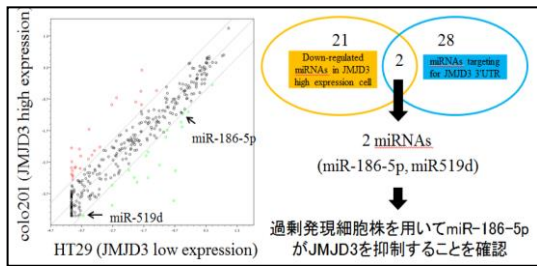


Fig.2 大腸がんにおける JMJD3 を抑制する microRNA の検索

(3) 文献検索にて、JMJD3 によって発現が維持されていると考えられる p15, CDH1, VASH1, TFAP2 を pick up し、miR186-5p を用いて JMJD3 を抑制したところ、それらの遺伝子の発現が低下することを確認した (Fig. 3)。

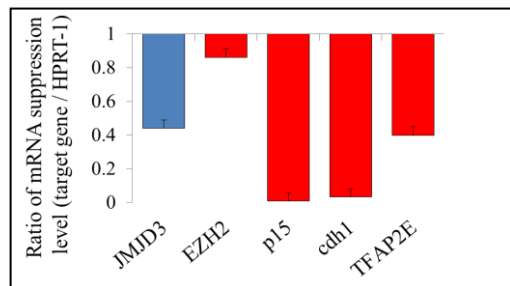


Fig.3 miR186-5p 過剰発現による標的遺伝子の発現抑制

(4) 副実験として、EZH2 のシスプラチン感受性に関する実験を行った。大腸癌肝転移症例において、EZH2 の発現が予後と関連することを確認した (Fig. 4)。

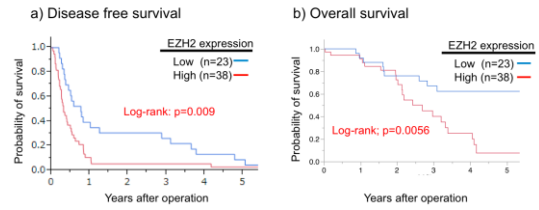


Fig.4 大腸癌肝転移症例と EZH2 発現と予後

(5) EZH2 を siRNA の腫瘍でノックダウンすると、大腸癌細胞株におけるオキサリプラチンの抵抗性が増加し、IC50 が低下することが確認できた。EZH2 阻害薬である DZNep を用いても同様の結果が得られた (Fig. 5)。さらに Growth assay にてオキサリプラチンによる増殖抑制効果が、EZH2 をノックダウンすることで相乗効果を得ることが確認できた (Fig. 6)。

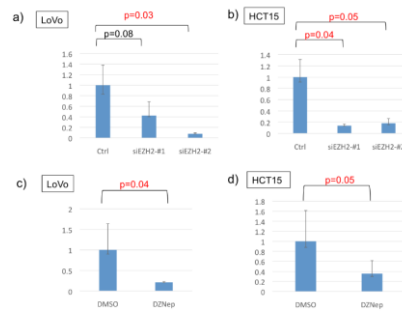


Fig.5 EZH2 発現抑制による IC50 低下

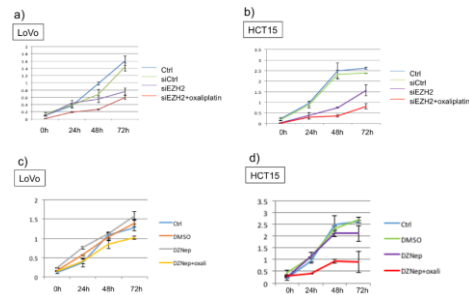


Fig.6 オキサリプラチンと EZH2 発現抑制による相乗効果

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)

①The Prognostic Significance of Histone Lysine Demethylase JMJD3/KDM6B in Colorectal Cancer.

Tokunaga R, Sakamoto Y, Nakagawa S, Miyake K, Izumi D, Kosumi K, Taki K, Higashi T, Imamura Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Oki E, Watanabe M, Baba H.

Ann Surg Oncol. 2016 Feb;23(2):678-85.  
査読有 doi: 10.1245/s10434-015-4879-3.

[学会発表] (計2件)

①大腸癌肝転移におけるオキサリプラチン耐性と EZH2 発現の関連性

大内 繭子, 坂本 快郎, 徳永 竜馬, 糸山 明莉, 江藤 二男, 黒田 大介, 玉置 裕香, 中村 健一, 小澄 敬祐, 原田 和人, 志垣 博信, 蔵重 淳二, 岩槻 政晃, 馬場 祥史, 宮本 裕士, 吉田 直矢, 馬場 秀夫

第 116 回日本外科学会定期学術集会抄録集 Page OP-085-6 2016.04.16 リーガロイヤルホテル大阪

②miR 186-5p はヒストン脱メチル化酵素 JMJD3/KDM6B を介し大腸癌の腫瘍増殖を促進させる

徳永 竜馬, 坂本 快郎, 大内 繭子, 中村 健一, 清住 雄希, 泉 大輔, 小澄 敬祐, 高城 克暢, 東 孝暁, 江藤 弘二郎, 杉原 栄孝, 原田 和人, 坂田 和也, 坂本 慶太, 蔵重 淳二, 日吉 幸晴, 岩上 志朗, 馬場 祥史, 宮本 裕士, 吉田 直矢, 馬場 秀夫

第 115 回日本外科学会定期学術集会抄録集 Page OP-001-4 2015.04.16 名古屋国際会議場

[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

坂本 快郎 (SAKAMOTO, Yasuo)  
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師  
研究者番号：00452897

(2)研究分担者

馬場 祥史 (BABA, Yoshifumi)  
熊本大学・医学部附属病院・特任講師  
研究者番号：20599708

宮本 裕士 (MIYAMOTO, Yuji)  
熊本大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：80551259

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )