

平成30年6月21日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07461

研究課題名（和文）タンパク質脱メチル化酵素を標的とした新規分子治療薬の創生

研究課題名（英文）Development of new anti-cancer drugs targeted for protein demethylase

研究代表者

金子 修三（KANEKO, SYUZO）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長

研究者番号：10777006

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究計画では、タンパク質脱メチル化異常の細胞がん化における重要性を明らかにし、その知見を基にタンパク質メチル化関連酵素を標的とした、革新的な新規分子標的治療薬を創生することを目的としている。研究成果としては、肝細胞がんにおける臨床検体を用いたヒストン脱メチル化酵素(LSD1)の免疫染色実験を行い、病理組織学的解析の結果、LSD1強陽性は生存率、再発率共に予後不良因子であった。次にLSD1コンディショナルノックアウト細胞株を樹立し、LSD1のノックアウトにより細胞増殖能の低下を認めた。今後の展開として、ヒストン修飾および転写因子の網羅的解析を行い、統合データベースの構築を進めていく。

研究成果の概要（英文）：While alterations in epigenetic machinery have been considered to play crucial events in cancer, it has been clear that protein methyltransferases and demethylases are key enzymes at these events. In this study, we analyzed protein expression of lysine demethylase 1 (LSD1) in hepatocellular carcinoma (HCC) samples by immunohistochemistry. To further understand the roles of LSD1 in HCC, we established conditional CRISPR-Cas9 knockout cell lines. We confirmed that HCC patients with high LSD1 expression had significantly lower overall survival rates and higher recurrence rate. In vitro cell proliferation and colony formation assays revealed that depletion of LSD1 resulted in slower cell growth. These results support our results of clinicopathological features and prognostic value in HCC patients. Finally, we developed novel FFPE ChIP-seq technique using antibodies against H3K4me3 and H3K27ac.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス ヒストン修飾 NGS解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢化社会に突入しつつある日本において、加齢に伴う様々な疾患の対応は、わが国の最重要課題である。特に“がん”と呼ばれる疾患は、その発症率が加齢と正に比例し、現在国民の二人に一人ががんに罹患するという国民病となっている。今後がん患者はさらに増加すると考えられており、その対策は急務である。がんの治療方法の柱の一つである抗がん剤は、これまではがんの異常増殖能に着目した“細胞分裂阻害剤”が用いられてきた。しかしながらこれらの抗がん剤は正常細胞の分裂をも阻害してしまうという重篤な副作用があり、常に患者さんの生活の質(QOL)を低下させている。これらの問題を克服するために、より副作用の少ない特定のがん原因遺伝子を標的とした、新規がんの分子標的治療薬の開発が、強く求められていた。

(2) 次世代シーケンサー(NGS)の進歩と共に、現在はヒトの全ゲノム解析がサンプル当たり 1000 ドル以下、1~2 日で解読できる時代となり、今後はクリニカルシーケンスなど応用面への展開が期待されている。一方、がんなどの疾患発症に、DNA のメチル化やクロマチン制御因子やヒストン修飾の異常が重要だと報告されており、遺伝子異常のみならずエピジェネティクス異常の重要性が指摘されている。その結果、国際研究プロジェクトである ENCODE や IHEC など NGS 解析を用いた大規模データベースの構築が開始され、その重要性は世界的に認知されつつある。一方、依然として未解明の部分が多い理由として、現在の解析技術の限界が挙げられる。特にヒストン修飾に関しては、クロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation: ChIP) と次世代シーケンサーを合わせた技術革新(ChIP-seq 法)が進むにつれ、網羅的にヒストン修飾状態を解析することが可能になってはいる。しかしながら、創薬・診断等の開発において重要な臨床検体を用いた ChIP-seq 法は世界的に見ても報告例は限られていた。

2. 研究の目的

(1) 近年細胞のがん化におけるエピジェネティクスの重要性に注目が集まっているが、ヒストンメチル化及び脱メチル化はその中心的役割を担っていることが明らかになりつつある。本研究助成申請者らは、ヒストンメチル化異常の細胞がん化における重要性を明らかにし、その後も研究を行ってきた結果、ヒストンを含めたタンパク質メチル化・脱メチル化は非常に多様性のある現象であることを解明してきた。本研究計画では、タンパク質脱メチル化異常の細胞がん化における重要性を明らかにし、その知見を基にタンパク質メチル化関連酵素を標的とした、革新的な新規分子標的治療薬を創生することを目的としている。

(2) 臨床検体を使った ChIP-seq は世界的に見ても報告例は限られている。特にホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織サンプルを用いた ChIP-seq は、2016 年にハーバード大学らのグループが報告しているが、我々が独自に検証した結果、依然実験手技が難しくプロテアーゼ処理等の最適化に時間を要していた。そこで我々は、FFPE サンプルを用いた新規 ChIP-seq 法の確立を試み、ヒストンメチル化変異の網羅的解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 和歌山県立医科大学医学部の山上裕機教授らの協力を得て、肝細胞がん(HCC)、胆管細胞がん(CCC)のヒストン脱メチル化酵素(LSD1)特異的抗体を用いた免疫染色実験を行い、タンパク質レベルにおける網羅的な発現解析を行った。病理組織学的解析を行い、豊富な臨床情報と照合させ、臨床学的意義を考察した。

(2) 効率的に創薬を行う場合、標的酵素の直接の下流遺伝子を同定する研究は、in vivo における薬剤の効果判定するバイオマーカーという観点からも有意義である。そこで、CRISPR-Cas9 システムを用いてがん細胞内で標的酵素を効率的にノックアウトした時における発現変動遺伝子を、トランスクリプトーム解析(RNA-Seq 法)を用いた網羅的解析を行う。また LSD1 に関して、標的とするヒストンマーク(H3K4)は既に同定されている為、上記ノックアウトシステムを用いて ChIP-Seq 法により、ヒストンマークの変動をゲノムワイドで検討し、標的酵素が直接制御している下流遺伝子の候補の探索を行う。さらに、過剰発現システムを用いて、目的の標的酵素を強制発現させた時に下流遺伝子発現が上昇するかどうかの確認を同時に行い、直接の下流遺伝子と判断する。LSD1 の病理学的解析、ヒストンマークのゲノムワイド情報、臨床情報を統合させたデータベースを構築し、薬剤効果判定の為の新規バイオマーカーを探索する。

(3) FFPE 肝細胞がん組織を用いた FFPE ChIP-seq 法の開発を試みた。その際我々はプロテアーゼ処理を伴わず、熱処理のみで ChIP-seq に適用可能なクロマチンが調製できるか検討した。次にヒストン H3 リジン 4 トリメチル(H3K4me3) およびヒストン H3 リジン 27 アセチル(H3K27ac) さらに転写因子の特異的抗体を使って免疫沈降反応 (IP) を行った。さらに通常 12~18 時間を要する免疫沈降反応を、超音波処理によって短縮できるか検討した。また FFPE 標本は、通常常温にて長期保存されている為、DNA 損傷を受けている場合がほとんどである。そこで我々は、IP 後の DNA を、NEB 社の PreCR Repair Mix を用いて DNA の修復を行った。その後、Qiagen 社の QIaseq Ultralow Input Library Kit を

用いてライブラリ調製し、イルミナ社 HiSeq 3000 を用いて NGS 解析を行った。

4. 研究成果

(1) 共同研究者らが提供する臨床検体を用いた肝細胞がん(HCC)約 430 例、胆管細胞がん(CCC)85 例のヒストン脱メチル化酵素(LSD1)特異的抗体を用いた免疫染色実験を行い、タンパク質レベルにおける網羅的な発現解析を行った。既に HCC においては病理組織学的解析を行っており、具体的には同一切片の正常閼細胞核と比較し判定を行い、強陽性のみを LSD1 陽性とする事で判定の簡便化を図った。結果として強陽性群(LSD1+): n=232, 弱陽性・陰性群(LSD1-): n=71 であった。陽性群で有意高値であった因子として、T4, 低分化癌、AFP が挙げられ、Kaplan Meier 法から、HCC において LSD1 強陽性は生存率、再発率共に予後不良因子であった(生存率: HR 2.2 (95% CI 1.3-3.6); p=0.0025, 再発率: HR 1.8 (95% CI 1.2-2.5); p=0.0016)。さらに多変量解析でも LSD1 強陽性群に有意差を認め、LSD1 強陽性は独立した予後不良因子であることを見出した。

次に LSD1 の機能解析を行う為、CRISPR-Cas9 システムを用いて LSD1 コンディショナルノックアウト細胞株を樹立した。ドキシサイクリン添加前後にて LSD1 のタンパク質ノックアウトをウエスタンブロットティング法にて確認後(図 1A) 肝がん細胞株における細胞増殖能を Cell proliferation assay (B)、Colony formation assay (C) の 2 種類のアッセイ法を用いて評価した。これらの結果として LSD1 のノックアウトにより、細胞増殖能の低下を統計学的有意差を持って認めた。

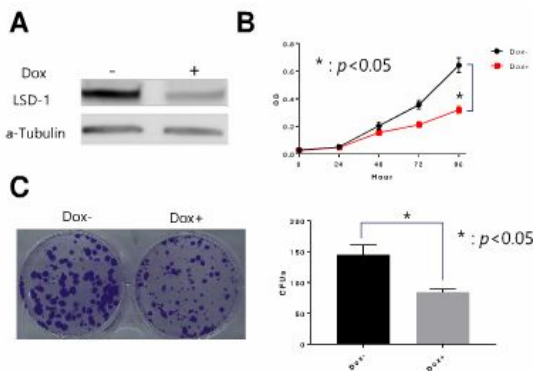


図 1 LSD1 の機能解析

以上の結果から、HCC の増殖浸潤能に LSD1 が関与している可能性が考えられる。今後の研究展開であるが、作成した LSD1 コンディショナルノックアウト細胞株を用いて、トランスクリプトーム解析(RNA-seq)を行い、発現変動遺伝子の網羅的解析を行い、詳細な機能解析を行う予定である。

(2) 共同研究者らが提供する臨床検体を用いて、我々の新規 FFPE ChIP-seq 法を試みた結果、H3K4me3, H3K27ac 共に、Input と比して転写開始点付近に濃縮されており、良好な結果であったと判断している(図 2)。具体的には、(1) 前回ハーバード大らの報告と比較して約 1/5~1/10 程度の少量のサンプルでも対応可能であった。(2) 細かい条件設定が必要な Proteinase K 処理を省き、加熱処理のみでサンプル調製が可能であった。(3) ChIP-seq 工程の律速段階である免疫沈降反応の加速に成功した。(4) 損傷した DNA の修復工程を取り入れ、劣化した FFPE サンプルにおいても対応可能であった。

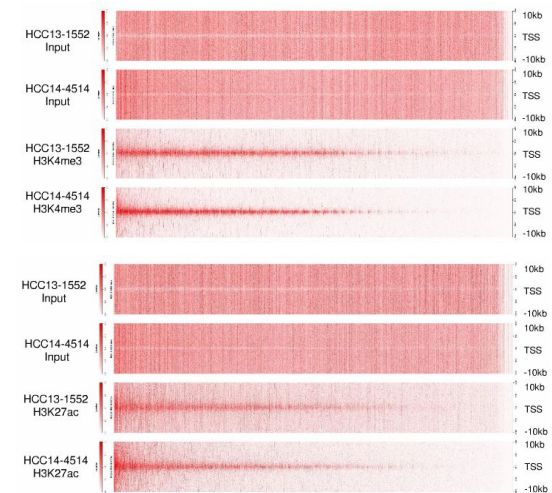


図 2 FFPE ChIP-seq のヒートマップ図

クロマチン濃縮前のサンプル(Input)及び H3K4me3 抗体を用いてクロマチン濃縮後のサンプルを用いた NGS データ(上段)。Input 及び H3K27ac 抗体を用いてクロマチン濃縮後の NGS データ(下段)。使用したサンプル番号は左側に表示した。ヒートマップ図は、IP 後において、各遺伝子の転写開始点の上流 10kb から下流 10kb の間に見られるタグ総数の多い順から左にソートしている。Input は IP と比較する為に表示した。

今回、2 種類のヒストン修飾に絞って FFPE 標本を用いた ChIP-seq 解析を行った。今後の展開として、8~10 種類程度のヒストン修飾の網羅的解析を行い、統合データベースの構築と共に機械学習を用いたマルチオミックス解析に繋げてゆく予定である。更にヒストン修飾関連酵素および転写因子を標的とした FFPE ChIP-seq も行い、新規低分子抗がん剤の開発に繋げてゆく予定である。

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 0 件)

[学会発表](計 2 件)

Syuzo Kaneko and Ryuji Hamamoto
Toward precision medicine: developing new ChIP-seq techniques applied for cancer treatment

第 76 回日本癌学会学術総 口頭発表 横浜
(平成 29 年 9 月)

Syuzo Kaneko and Ryuji Hamamoto
Toward precision medicine: developing
multimodal learning model applied for
cancer treatment
The 72nd Fujihara Seminar, International
Symposium on Molecular Mechanism of
Molding and Disruption of the Epigenomes
Underlying Cellular Community, Poster
session, Tomakomai, Hokkaido, September
2017

〔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

https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/molecular_modification_and_cancer_biology/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 修三 (KANEKO Syuzo)
国立がん研究センター研究所 がん分子
修飾制御学分野・ユニット長
研究者番号：10777006

(2) 研究分担者

浜本 隆二 (HAMAMOTO Ryuji)
国立がん研究センター研究所 がん分子
修飾制御学分野・分野長
研究者番号：80321800

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()