

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590417
 研究課題名（和文） ヒストン修飾を制御する分子によるがんの発生及び進展機構の解明
 研究課題名（英文） Investigation of role of histone modifier protein in carcinogenesis and carcinoma cell progression
 研究代表者
 藤井 誠志（FUJII SATOSHI）
 国立がんセンター（研究所及び東病院臨床開発センター）
 研究者番号：30314743

研究成果の概要：

多種多様ながんにおいて高発現しているヒストン修飾を制御する分子が、腫瘍抑制遺伝子などの細胞の恒常性を維持することのできる重要な遺伝子群の発現の抑制をもたらし、細胞の表現型を変化させることによって、がんの発生と進展を引き起こしていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：実験病理学

科研費の分科・細目：6909

キーワード：ヒストン、メチル化

1. 研究開始当初の背景

遺伝子は genetic または epigenetic な異常により発現が消失し、不活化されると考えられている。Genetic な異常には、点突然変異、LOH(loss of heterozygosity)があり、epigenetic な異常としては、プロモーター領域の DNA のメチル化が挙げられる。しかしながら、これらの異常の組み合わせでも、two-hit theory を完全に満たさない場合があることがわかっている。このような上記のメカニズムだけでは遺伝子発現の消失を説明できない missing link を埋める候補としてヒストンの修飾があり、その中でヒストン残基のメチル化の関与が示唆される。

そこで、転写レベルでの遺伝子発現抑制メ

カニズムにおける missing link を埋める候補であるヒストンのメチル化が、遺伝子発現が抑制された結果としてではなく、がん化及びがんの進展に能動的に関わるのか否かが問題となる。ヒストンの H3 の K27 のメチル化酵素であり、polycomb group protein のひとつである EZH2(enhancer of zeste homologue 2)が、(1) 乳癌、前立腺癌で高発現しており、予後不良に関係している、(2) EZH2 の高発現がもたらすがん細胞に対する機能的なメカニズムが不明である、という 2 点に着目している。転写因子が結合し、遺伝子が発現できる状態にするには、その前断階としてクロマチン構造の状態が重要である。即ち、クロマチン構造の状態を変えることの

できる、EZH2 のような polycomb group protein ががん細胞における遺伝子発現に関して重要な役割を担っていると考えられる。以上が本研究の背景と動機である。

2. 研究の目的

重要な遺伝子の発現の消失のメカニズムは従来、個々の遺伝子異常の蓄積の上で発がん、がんの進展を示すという多段階説に結びついているが、細胞は個々の遺伝子機能の消失では説明がつかない同様の機能をもつ遺伝子を多数擁し、かつそれらを修復しようとするメカニズムも多彩に備えている。

多種多様ながんにおいて高発現しているヒストン修飾を制御する分子が、腫瘍抑制遺伝子のような細胞の恒常性を維持するような重要な遺伝子群をまとめて発現の抑制をもたらすことにより、細胞の表現型を劇的に変化させ、がんの発生と進展を引き起こしているかについて明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) ヒストン修飾蛋白による標的遺伝子の発現抑制のがん細胞の表現型への影響を評価する

EZH2の発現を調節することにより、がん細胞の表現型、即ち、具体的には細胞の浸潤能、増殖能といった性状から、さらには再発現してくる遺伝子に関わるシグナル伝達系にもたらす影響を検討する。標的遺伝子の候補として見出しているE-cadherinについては、

①tight membranous adhesionの回復によるがん細胞の浸潤能の変化をみる

②β-cateninとの結合回復によりWntシグナル系への影響と細胞増殖能の変化をみる

③In vivoにおいて、蛋白レベルでEZH2とE-cadherinとの間に逆の相関関係が存在するか、胃癌組織において免疫組織学的に検討する

④EZH2の発現と細胞増殖能との関係について、標的遺伝子と生物像の面から検討する。
(2) EZH2がクロマチンリモデリングを介して、遺伝子群の発現を抑制しているか否かを検討する

EZH2が、プロモーター領域のDNAのメチル化依存性、或いはDNAのメチル化非依存性に遺伝子の転写を制御するのか又は、ある遺伝子群についてはDNAメチル化状態に関係なく遺伝子発現の制御を行うのかについて検討を行う。具体的な方法としては、

①EZH2をノックダウンすることにより、CpG islandのDNAメチル化状態との関係と遺

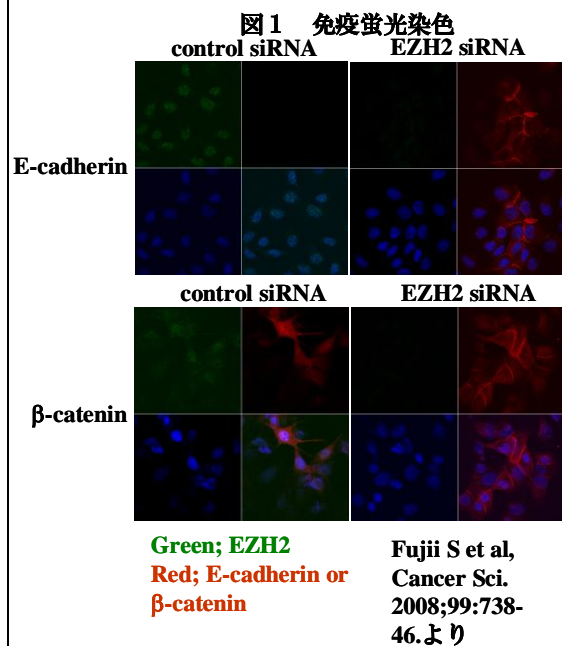
伝子発現の回復を比較して検討する

②クロマチン免疫沈降法により、各CpG islandのEZH2の結合とヒストンメチル化状態が変動するか否かを検討する

③細胞株間の違いからEZH2の機能が有効となることに何が必要か否かを検討する。

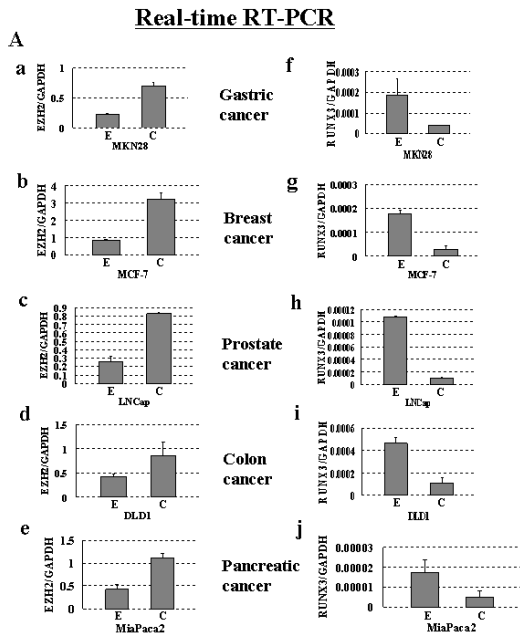
4. 研究成果

(1)E-cadherin が DNA のプロモーター領域のメチル化によって発現していないとされる胃癌細胞株(MKN1)において、siRNA を用いてEZH2 をノックダウンすると、E-cadherin 遺伝子の転写レベルでの発現の回復が起こる。これらがヒストン修飾によるものか否かについて検証するために、クロマチン免疫沈降法を行った。E-cadherin 遺伝子のプロモーターにEZH2 が結合することが見出せ、siRNA によりEZH2 をノックダウンすると、プロモーターからの結合が低下し、ヒストンH3のK27のメチル化レベルが低下した。同時にプロモーター領域のDNAのメチル化の変化を確認したが、DNAのメチル化状態はE-cadherinの発現前と後で変化せず、発現との相関は見出せなかった。免疫蛍光染色においても、E-cadherinの発現のみられなかった胃癌細胞において、EZH2をノックダウンすると、細胞膜にE-cadherinの発現が確認された(図1上段)。同時にβ-cateninの発現が核及び細胞質から細胞膜へ変化した(図1下段)。以上の結果は、EZH2がヒストンH3のメチル化を介して発現を抑制していることを示唆する。



(2) *in vivo*において EZH2 が過剰発現するがん細胞は増殖能が高いと報告されている。様々ながん細胞で過剰発現する EZH2 が細胞周期制御因子としての機能を発揮する背景のメカニズムとして、多くのがん細胞で発現低下がみられ、p21 を誘導する機能を有する RUNX3 に着目し、RUNX3 の発現低下と EZH2 の過剰発現との関係を探ることを試みた。RUNX3 の発現が消失している胃癌、乳癌、前立腺癌、大腸癌、膵癌の 5 種類の癌細胞株において EZH2 を knock down すると RUNX3 の発現の回復が認められた (図 2)。クロマチン免疫沈降法を用いた検討では RUNX3 のプロモーター領域に EZH2 が結合し、H3K27 のメチル化を介して発現を抑制することが判明した (図 3)。またその機能は HDAC と協調することを証明した (図 3)。実際の胃癌組織において症例ごとに RUNX3 のプロモーターの DNA メチル化と EZH2 の過剰発現に対する RUNX3 蛋白の発現との関係を検討した。DNA のメチル化が存在せず、EZH2 が過剰発現し、RUNX3 の発現が低下する症例を認めた。以上の結果から、EZH2 が RUNX3 の発現を低下させることでがん細胞の増殖能を変化させていることがわかり、DNA のメチル化とは関係なく RUNX3 の発現を変化させるメカニズムも存在することが判明した。

図2

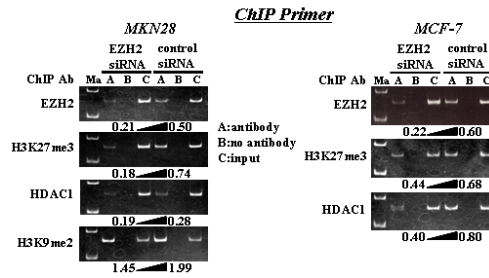


E;EZH2siRNA, C;control siRNA

Fujii S, et al, J Biol Chem. 2008;283:17324-32.より

図3

Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay



Fujii S, et al, J Biol Chem. 2008;283:17324-32.より

(3)以上の結果により、ヒストン修飾蛋白である EZH2 が重要な腫瘍抑制遺伝子である E-cadherin や RUNX3 遺伝子をクロマチンリモデリングにより転写を抑制することがわかった。これらの結果をまとめて、下記の二論文に発表した。その後、EZH2 の標的遺伝子が E-cadherin と RUNX3 であることを他の複数の研究グループが続いて論文を発表し、我々が今回の検討で見出したことが裏付けられている。今後はこのヒストン修飾蛋白の発現を制御しているメカニズムについて解明していくことが、がん細胞を正常細胞に劇的に戻すことにも繋がり、根本的ながんの治療法になり得ると考えている。

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 2 件)

- ① Fujii S and Ochiai A Enhancer of zeste homolog 2 downregulates E-cadherin by mediating histone H3 methylation in gastric cancer cells. *Cancer Sci.*, 2008;99;738-746. 査読 有
- ② Fujii S, Ito K, Ito Y, Ochiai A. Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates RUNX3 by increasing histone H3 methylation. *J Biol Chem.* 2008; 283;17324-32. 査読 有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 藤井誠志、落合淳志 Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates Runx3 by mediating histone H3 methylation 第 66 回日本癌学会学術総会, 2007
- ② 藤井誠志、落合淳志 胃癌における EZH2 発現の意義 第 80 回日本胃癌学会総会
- ③ 藤井誠志、落合淳志 EZH2 down-regulates E-cadherin and RUNX3 by increasing histone H3 methylation. 第 67 回日本癌学会学術総会, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 誠志 (FUJII SATOSHI)

国立がんセンター (研究所及び東病院臨床
開発センター)・臨床腫瘍病理部・室長

(2) 研究分担者

落合 淳志 (OCHIAIA ATSUSHI)

国立がんセンター (研究所及び東病院臨床
開発センター)・臨床腫瘍病理部・部長

(3) 連携研究者

なし