

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07686

研究課題名(和文) がん悪性形質獲得に関係するエピジェネティック制御因子の探索

研究課題名(英文) CRISPR/Cas9 screening of epigenetic factors relating to cancer malignancy

研究代表者

石村 昭彦 (Ishimura, Akihiko)

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：80375261

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍内のエピジェネティック変異は、遺伝子の取り巻くゲノム環境を変化させ、がん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活性化を引き起こす。その結果、浸潤・転移、がん幹細胞性、薬剤耐性といった様々ながん悪性形質の獲得に関与すると考えられている。

本研究では、120種類のエピジェネティック制御に関係する遺伝子から構成されたsgRNAライブラリーを製作し、がん悪性化に関わる標的遺伝子のスクリーニングを試みた。その結果、ヒストン脱メチル化酵素KDM3Bを含む複数の遺伝子を新規の乳がん悪性化因子として同定した。今後、乳がん悪性化における作用機構を分子レベルで明らかにする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの発生・悪性進展過程において、遺伝子自身の異常のみならず、その遺伝子を取り巻く環境変化(エピジェネティック変異)が高頻度に報告されている。しかし両変異の相互作用とそれらが及ぼす影響は、意外なほど理解されていない。本スクリーニングでは、ゲノム編集によって任意に遺伝子変異を導入した細胞と(対象を絞った)sgRNAを用いることで、これまで報告のないエピジェネティック制御因子を新規がん悪性化因子として同定できた。本スクリーニング法は、様々なタイプのがん悪性形質獲得(薬剤耐性など)に関わる因子の探索にも展開でき、エピジェネティック制御の可逆性に注目した新たな治療戦略の確立に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Epigenetic mutations in tumors alter the genomic environment, leading to the activation of oncogenes or inactivation of tumor suppressor genes. The alteration is involved in the acquisition of various cancer malignant phenotypes such as invasion, metastasis, stemness and drug resistance.

In order to identify essential epigenetic regulators relating to breast cancer malignancy, we performed CRISPR/Cas9 screening using a lentiviral sgRNA library composed of 120 kinds of epigenetic regulators. As a result, we identified KDM3B, one of the histone demethylases, as a breast cancer malignant factor. Cell biological studies and clinical data strongly suggest that KDM3B is a novel tumor suppressor in malignant breast cancer.

研究分野：がん生物学

キーワード：エピジェネティクス がん悪性化 乳がん

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸がんの多段階発がんモデルで提唱されているように、がんは「ドライバー遺伝子」の変化(「がん遺伝子」の活性化や「がん抑制遺伝子」の不活性化)の蓄積によって、浸潤や転移といった悪性形質を獲得すると考えられている。一方、DNAメチル化やヒストン翻訳後修飾に代表される「エピジェネティック修飾」の異常もまた、多段階発がんの重要なステップのひとつとして、ドライバー遺伝子変異の蓄積と協調的にがん悪性化に関与することが知られている(Feinberg et al. *Nat. Rev. Genetics* 2005)。しかし、腫瘍悪性化における両者の相関性は、意外なほど理解されていない。

最近、エピジェネティック制御因子が、ドライバー変異によって誘導される病変に直接作用する例が報告されつつある。例えば、膵がんや黒色腫において oncogenic RAS によって誘導される「前がん病変」の形質転換に、ヒストン脱メチル化酵素が関わるという報告がなされた(Andricovin et al. *Cancer Cell* 2018; Yu et al. *Cancer Cell* 2018)。一方、TCGA データ解析の結果、研究代表者らは、予後の悪い乳がんサブタイプであるトリプルネガティブ(TN)乳がん患者組織で、多くのエピジェネティック修飾酵素の発現が有意に変化することを発見した。以上より、エピジェネティック制御因子とドライバー変異の相関性を検証する上で、乳がん悪性化に注目することが最適だと考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、「乳がん悪性化(幹細胞性、浸潤性)に関わる新規エピジェネティック制御因子を CRISPR/Cas9 スクリーニング法によって同定し、エピジェネティック制御因子とドライバー遺伝子の相互作用による、がん悪性化シグナル形成機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) sgRNA レンチウイルスライブラリーの作製

スクリーニング候補遺伝子を絞り込んだ 120 種類のエピジェネティック制御因子から構成される「Small-scale epigenetic sgRNA library」を作製し、分子的役割に応じて 9 つのサブライブラリーに分割した(図 1)。主に、ヒストンの翻訳後修飾に関わる酵素および脱修飾酵素が含まれる。

#### (2) P53 欠損 MCF7 細胞を用いた CRISPR/Cas9 スクリーニング

ゲノム編集によって作製した P53 欠損(P53KO) MCF7 細胞は、親株と比べて(がん幹細胞性と類似する)スフィア形成能が有意に上昇する。このとき、“エピジェネティック” sgRNA ライブラリーを用いて P53KO MCF7 細胞へランダムに変異を誘導し、スフィア培養中に発生したスフィアを個別に回収する。そして、サンガー・シークエンス法によって個々のスフィアに挿入された sgRNA の種類を決定し、スフィア形成能の上昇を促す候補遺伝子の同定を試みる(図 1)。

#### (3) 臨床データ解析

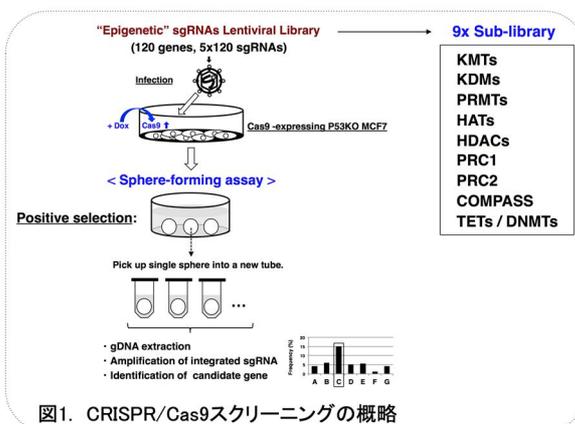
得られた候補遺伝子の発現パターンと乳がん悪性化の関係性を、TCGA に代表される公共の臨床データ・ベースや解析ウェブサイト(Kaplan-Meier Plotter など)を利用して調べる。

#### (4) 細胞生物学的解析

幾つかの乳がん細胞株(MCF7、MDA-MB-231 細胞など)を用いて候補遺伝子のノックダウン実験もしくは過剰発現実験を行い、スクリーニングで得られた結果を実験的に検証する。さらに、マイクロアレイ解析等の包括的アプローチによって候補遺伝子の直接的な標的遺伝子やシグナル経路を特定し、乳がん悪性進展過程における分子メカニズムを明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) 乳がん悪性化に関わる新規エピジェネティック制御因子の探索



ヒストン脱メチル化酵素 (KDM) sgRNA サブライブラリーを用いた CRISPR/Cas9 スクリーニングの結果、「*KDM3B*」をスフィア形成能に影響を与える因子候補として同定した。研究代表者が *KDM3B* の発現を MCF7 乳がん細胞でノックダウンしたとき、細胞のスフィア形成能が *P53* 欠損の遺伝学的背景下で著しく上昇することを観察した (図 2)。

### (2) *KDM3B* に関する臨床データ解析

TCGA 解析の結果、*KDM3B* はトリプルネガティブ型乳がん組織や *P53* 変異型乳がん組織で有意に発現減少していた (図 3)。また、「Kaplan-Meier Plotter」を利用した予後解析の結果、*KDM3B* 低発現乳がん患者群は高発現群と比べて有意に予後不良であった。さらに乳がん患者群を 4 種類の乳がんサブタイプ (Luminal A、Luminal B、HER2 陽性、Basal タイプ) に分類しそれぞれ予後比較した場合、Basal タイプの乳がん患者群のみで *KDM3B* 低発現群が予後不良を示した (図 4)。

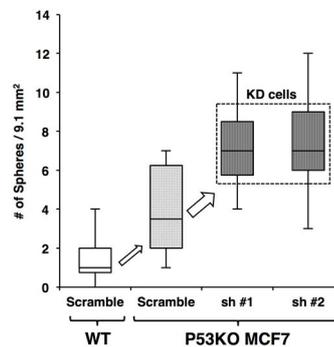


図2. *KDM3B* ノックダウン実験

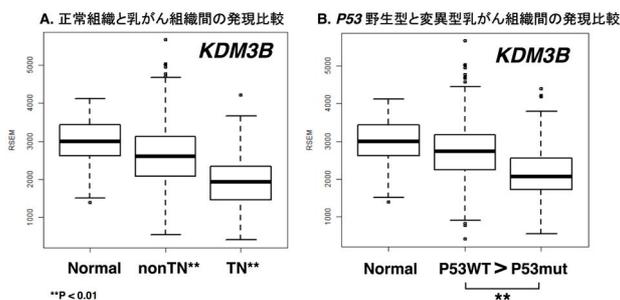


図3. TCGA データ解析

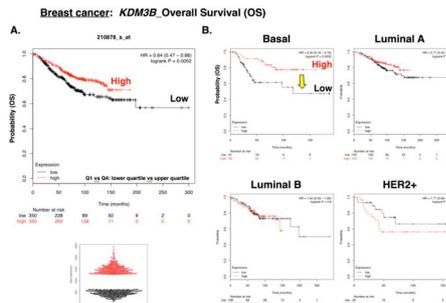


図4. 予後解析

“Kaplan-Meier Plotter” (<https://kmplot.com/analysis/>) を利用し、全乳がん患者 (A) あるいは乳がんサブタイプ別 (B) に予後を比較した。

### (3) *KDM3B* に関する細胞生物学的解析

*P53* 変異型株、MDA-MB-231 細胞や Hs578T 細胞で *KDM3B* の発現をノックダウンしたとき、細胞増殖能や浸潤能がコントロール細胞と比べて有意に上昇することを観察した (図 5)。以上より、*KDM3B* が乳がん悪性化に関与する、新規がん抑制遺伝子の可能性が強く示唆された。これまでの研究成果より、*KDM3B* は抑制的エピジェネティック・マーク、ヒストン H3、9 番目リジンのジメチル化修飾 (H3K9me2) に対する脱メチル化酵素として知られている。研究代表者は、抗 H3K9me2 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った結果、*KDM3B* および *P53* ノックダウン MCF7 細胞においてグローバルな H3K9me2 レベルが上昇することを発見した。一方、H3K9me2 メチル化酵素 *G9A* は、多くのがん組織で発現上昇が認められ、腫瘍内におけるがん抑制遺伝子の不活性と関係すると考えられている (Haebe et al. *Oncogenesis* 2021)。従って、*KDM3B* の発現が低下した乳がん細胞では、がん抑制遺伝子の不活性も同時に引き起こされる可能性が考えられた。今後、マイクロアレイ解析等の包括的アプローチによって *KDM3B* の直接的な標的遺伝子を特定し、乳がん悪性進展過程における役割を明らかにする。

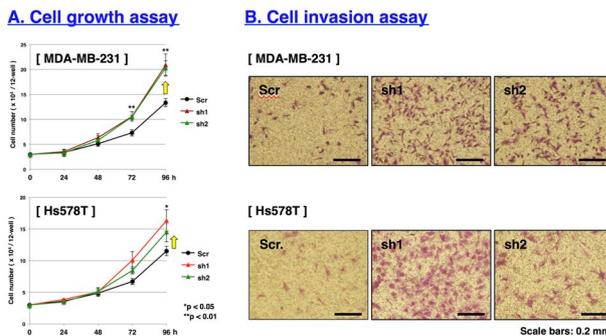


図5. *P53* 変異乳がん細胞を用いた *KDM3B* ノックダウン実験

### (4) 本 CRISPR/Cas9 スクリーニングの新たな展開

研究代表者は、9 つの sgRNA サブライブラリーを個々に用いたスクリーニングの結果、*KDM3B* 以外の候補遺伝子を幾つか同定している。そのうち *ASH2L* は、ヒストンメチル化修飾酵素複合体 (COMPASS 複合体) の構成因子のひとつだが、悪性化乳がん細胞において、がん遺伝子として機能する可能性が示唆されている。また研究代表者らは、PRC1 転写抑制複合体 サブライブラリーを用いたスクリーニングの結果、non-canonical PRC1 構成因子 *KDM2B* が肺がん細胞の EMT プロセスに必須であるということ報告した (Wanna-Udon et al. *J. Biol. Chem.* 2021)。現在、EGF 受容体変異肺がんに対する分子標的薬、オシメルチニブ薬剤耐性に関わるエピジェネティック制御因子を、本研究課題で確立した手法を利用して同定を試みている (基礎研究 (C) #22K07146)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Wanna-Udom Sasithorn, Terashima Minoru, Suphakhong Kusuma, Ishimura Akihiko, Takino Takahisa, Suzuki Takeshi	4. 巻 296
2. 論文標題 KDM2B is involved in the epigenetic regulation of TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in lung and pancreatic cancer cell lines	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100213 ~ 100213
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.015502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wang Rong, Yamada Tadaaki, Ishimura Akihiko, Wang Wei, Suzuki Takeshi, Yano Seiji et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Transient IGF-1R inhibition combined with osimertinib eradicates AXL-low expressing EGFR mutated lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18442-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wanna-udom Sasithorn, Terashima Minoru, Lyu Hanbing, Ishimura Akihiko, Takino Takahisa, Sakari Matomo, Tsukahara Toshifumi, Suzuki Takeshi	4. 巻 524
2. 論文標題 The m6A methyltransferase METTL3 contributes to Transforming Growth Factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells through the regulation of JUNB	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 150 ~ 155
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.01.042	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Ishimura A, Batbayar G, Lyu H, Kusuma S, Wanna-udom S, Terashima M, Yano S and Suzuki T
2. 発表標題 薬剤耐性に関わるエピジェネティック制御因子の探索
3. 学会等名 第44回分子生物学学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishimura A, Wanna-udom S., Tange S, Lyu H, Batbayar G, Terashima M and Suzuki T
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 screening of epigenetic factors related to breast cancer malignancy
3. 学会等名 第43回分子生物学学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiko Ishimura, Sasithorn Wanna-udom, Shoichiro Tange, Lyu Hanbing, Minoru Terashima and Takeshi Suzuki
2. 発表標題 Screening of epigenetic regulators related to breast cancer malignancy
3. 学会等名 分子性生物学学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関