

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18150

研究課題名（和文）食道癌Tumor suppressor KMT2DのTarget gene 解明

研究課題名（英文）Identification of candidate target genes of tumor suppressor KMT2D gene in esophageal cancer.

研究代表者

小田切 数基 (Odagiri, Kazuki)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30781794

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、食道扁平上皮癌におけるKMT2D遺伝子発現と化学療法に対する感受性と、KMT2Dが制御している下流の遺伝子候補について明らかにした。実際の食道扁平上皮癌患者手術サンプルを使用して検討を行ったところ、KMT2D低発現群においては化学療法感受性が低下する傾向が見られ、生命予後も不良であった。これを細胞実験レベルでも確認を行った。KMT2Dの発現を抑制した細胞では、化学療法薬剤の感受性が低下していた。同細胞を用いた実験では他癌で化学療法感受性と関連の報告のあるNF-1遺伝子、ERCC2遺伝子が、KMT2Dが制御する遺伝子である可能性が示唆され、食道癌治療開発の一助となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、ESCCにおけるKMT2Dが制御している遺伝子の解明は今後の同遺伝子およびEpigenetic regulatorの機能解析の一助となると考えられる。また、臨床面においては治療開始前の腫瘍生検検体のKMT2Dの発現を調べることにより、発現低下例に対して化学療法薬に併用してKMT2D遺伝子の発現自体やその下流の遺伝子発現を制御する薬剤を使用することによって治療効果の改善が見込め、食道癌患者の予後改善に直結する。

研究成果の概要（英文）：This study clarified the relationship between KMT2D gene expression and susceptibility to chemotherapy in esophageal squamous epithelial cancer and the downstream gene regulated by KMT2D. We examined using a sample of patients with esophageal squamous cell carcinoma. Sensitivity to chemotherapy tended to decrease in the KMT2D low expression group. And the prognosis was also poor. In vitro assays, esophageal cancer cells that suppressed KMT2D expression had reduced sensitivity to chemotherapeutic agents. Experiments using the same cells suggested that the NF-1 gene and ERCC2 gene may be genes controlled by KMT2D. Previous reports say that these two genes are associated with chemosensitivity in other cancers. Thus, this study may help develop treatments for esophageal cancer.

研究分野：食道癌

キーワード：食道癌 化学療法 KMT2D epigenetic regulator

1. 研究開始当初の背景

日本人の食道扁平上皮癌において、**lysine (K) methyltransferase (KMT)**のうち、**KMT2D** 遺伝子は約 **20%** 変異が見られると報告されている。同遺伝子の変異の約 **85%** は **Nonsense**、**Frameshift** もしくは **Missense** 変異であり、同遺伝子の蛋白発現が低下していることが予想される。一般的に **KMT2D** は **Histone 3** の **4** 番目の **K** を **mono methylation (H3K4me1)** することにより、**DNA** の **enhancer** 領域近傍を **euchromatin** 化する機能を有しており、遺伝子の転写調節に関与している **epigenetic regulator** である。

これまでに、**KMT2D** 遺伝子の発現と発癌および癌の予後との報告がなされている。乳癌においては癌部で **KMT2D** の発現が低下していることや、**KMT2D** の **methyl** 化の低下は尿管癌の発生に關与するなど、**KMT2D** の発現低下が癌化に關与するという **Tumor suppressor** としての報告が見られる。一方で **KMT2D** の発現亢進は、膵癌の化学療法薬に抵抗性を示し、びまん性大細胞性 **B** 細胞性リンパ腫や髄膜腫の予後不良因子とされ、**KMT2D** の発現亢進が癌の悪性化に關与する **Oncogene** としての報告も見られる。この **KMT2D** の機能の **2** 面性は、**KMT2D** の **H3K4me1** によって転写制御されている遺伝子が **Tumor suppressor** であるか **Oncogene** であるかによると考えられている。ここで、食道扁平上皮癌において多く見られる変異の一つである **KMT2D** は **Tumor suppressor**、**Oncogene** のいずれの **Target gene** の制御に關与しているのか、**KMT2D** の **Target** はどのように制御されているのか、**KMT2D** もしくは **H3K4me1** が食道扁平上皮癌において治療標的となり得るのかという疑問が浮かび上がってくる。

2. 研究の目的

食道扁平上皮癌における **KMT2D** の機能と **Target** の発現、機能の制御について検証することを目的とする。

3. 研究の方法

研究期間内に、**KMT2D** の発現とその **Target gene** の下流の機能解析を行う。**In vivo** 実験では下流機能の阻害薬を使用し、以下実験 ~ を行った。

患者検体を用いた ESCC 癌部の KMT2D の免疫染色および PCR による KMT2D 発現と予後
2005 年 1 月から 2013 年 12 月までに根治切除が行われた胸部食道扁平上皮癌患者手術サンプル 281 例を使用し、**anti-KMT2D** 抗体を用いて免疫染色を行い、発現量と予後との相関を検討する。続いて 281 例の検体を用いて **DNA** を抽出し **KMT2D** の **mutation** と上記の **KMT2D** の発現との関連および、予後や化学療法治療効果との関連を検討する。

食道癌細胞株の KMT2D Knock down (KD)/Knock out (KO)、Over expression (OE)の樹立
右に食道癌細胞株における **KMT2D** の発現量を示す。食道癌細胞株間で **KMT2D** の発現に差が見られ、**In vivo** 実験を視野に入れ、マウスでの生着が可能な細胞株である **TE11**(低発現株)、**TE14**(高発現株)を使用して **KMT2D** の **KD/KO**、**OE** 株を樹立する。

KMT2D KD/KO、OE 株を用いた細胞の悪性度、化学療法感受性の比較
In vitro において **KMT2D KD** 細胞株と **Control** 株を用いて、細胞の増殖能や浸潤能などの悪性度との関連や、**5-FU**、**CDDP**、**Docetaxel** などの化学療法薬などの感受性の比較を行う。**KMT2D KD** 細胞株において腫瘍の悪性度の上昇や化学療法薬感受性の低下が予想される。

Gene Set Enrichment Analysis(GSEA)にて KMT2D の Target gene の検索
GSEA 解析において **KMT2D** の高発現と関連のある **Gene set** は紡錘体形成に關連する **Gene set** であった ($p < 0.01$)。その関連遺伝子上位 20 位のうち、**Tumor suppressor** や化学療法と関連の報告がある遺伝子で、**KMT2D** の **Target** と考えられる遺伝子を上位から選択し、**ESCC** の悪性度との関連を検索する。

KMT2D KD/KO、OE 株と Control 株の LATS1 enhancer 領域の H3K4 mono-methyl 化の比較
LATS1 の **enhancer** 領域として報告のある **chr6** 上において **anti-KMT2D** 抗体を用いて **ChIP-PCR** を行い、**enhancer** 領域の結合頻度を **KMT2D KD** 株と **control** 株において比較する。また同時に **H3K4 mono-methyl** 化の解析を行う。同実験において **KMT2D** の **KD/KO** によって **LATS1** の **enhancer** 領域への **KMT2D** の結合低下と **H3K4me1** の低下が予想される。

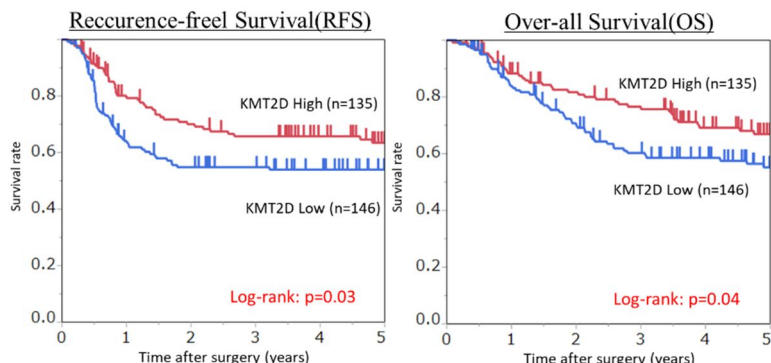
4. 研究成果

患者検体を用いた ESCC 癌部の KMT2D の免疫染色および PCR による KMT2D 発現と予後
2005 年 1 月から 2013 年 12 月までに根治切除が行われた胸部食道扁平上皮癌患者手術サンプル 281 例を使用し、**anti-KMT2D** 抗体を用いて免疫染色を行い、発現量と予後との相関を検討する。

KMT2D 高発現群(n=135)と KMT2D 低発現群(n=146)にて Recurrence free survival と Overall survival において有意に低発現群が予後不良であった。また両群間で化学療法の病理組織学的治療効果 **Grade2** は高発現群: 低発現群=31%: 19% ($p=0.038$) と差が見られ、**KMT2D** の発現と化学療法治療効果との関連が示唆された。同結果から、**ESCC** において **KMT2D** は **Tumor**

suppressor gene の制御を行っている可能性が示唆された。続いて **281** 例の検体を用いて **DNA** を抽出し **KMT2D** の **mutation** と上記の **KMT2D** の発現との関連および、予後や化学療法治療効果との関連を検討する。

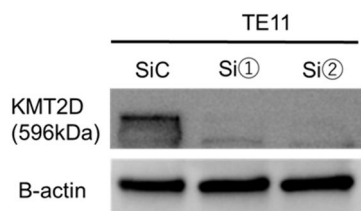
DNA 抽出と **KMT2D** の **PCR** については、**DNA** 抽出作業が困難であり、結果を得るに至らなかった。



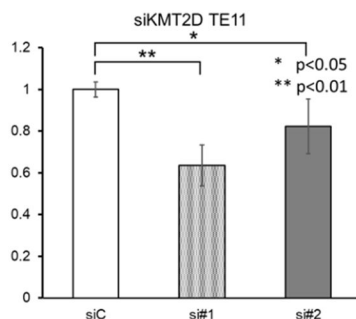
食道癌細胞株の **KMT2D Knock down (KD)**

食道癌細胞株に対して、以下の実験系においては **siRNA** を用いた **KD** を行った。

< **Western Blotting** >



< **Realtime PCR** >



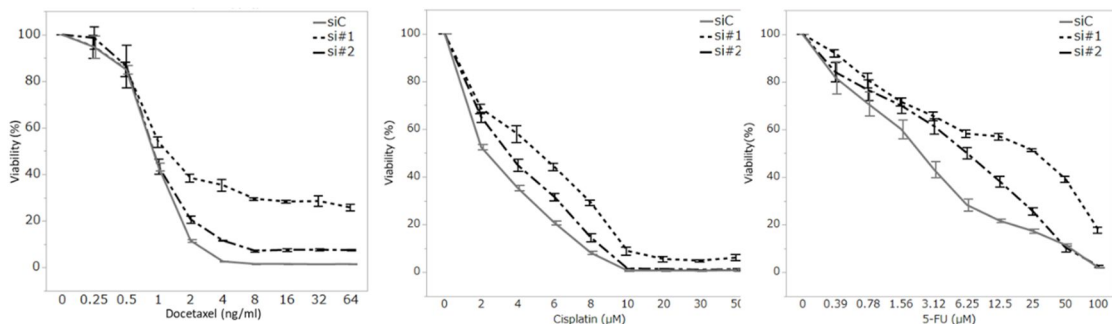
KMT2D KD 細胞を用いた化学療法感受性の比較

In vitro において **KMT2D KD** 細胞と **si Control** 細胞を用いて、**Docetaxel (DTX)**、**Cisplatin (CDDP)**、**5-FU** などの化学療法薬などの感受性の比較を行った。**KMT2D KD** 細胞において、細胞形態の変化化学療法薬感受性の低下が生じた。

< 細胞形態 >

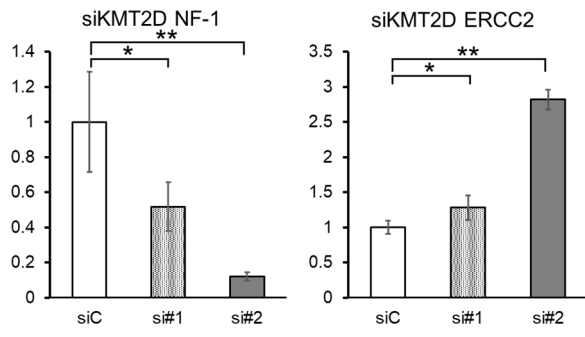


< **Chemosensitivity assays** >



Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) にて **KMT2D** の **Target gene** の検索

GSEA 解析において **KMT2D** の高発現と関連のある **Gene set** は紡錘体形成に関連する **Gene set** であった ($p < 0.01$)。その関連遺伝子上位 **20** 位のうち、**Tumor suppressor** や化学療法と関連の報告がある遺伝子で、**KMT2D** の **Target** と考えられる遺伝子のうち、**GSEA** の結果と合致する遺伝子は **NF-1** と **ERCC2** であり、**Target gene** の候補であると考えられた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小田切数基、田中晃司、山下公太郎、牧野知樹、山崎誠、西塔拓郎、高橋剛、黒川幸典、中島清一、森正樹、土岐祐一郎
2. 発表標題 KMT2D発現の食道扁平上皮癌における意義についての検討
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020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
---------	---------