

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09092

研究課題名(和文) 大腸がんの治療耐性におけるKDM2Bの意義解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the Significance of KDM2B in Drug Resistance of Colorectal Cancer

研究代表者

中村 友紀 (Nakamura, Yuki)

千葉県がんセンター(研究所)・がん治療開発グループ 細胞治療開発研究部・特任研究員

研究者番号：50869287

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)：化学療法による切除不能大腸がん治療の成績を改善するために、本研究では大腸がん細胞の薬剤耐性におけるヒストン脱メチル化酵素KDM2Bの意義を検討した。KDM2Bの発現量を低下させると、抗がん剤5-FUに対するヒト大腸がん細胞株の抵抗性は増した。このとき、KDM2BはH3K4me3修飾を介して様々な遺伝子の発現を制御し、新たな標的遺伝子として、薬物代謝に関連するAKR1B1とAKR1C1遺伝子が同定された。同酵素の阻害剤は大腸がん細胞の薬剤抵抗性を無効化させた。以上から、KDM2Bによるエピゲノム的な薬剤抵抗性の獲得機構の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、これまで不明であったKDM2Bによるエピゲノムの薬剤耐性獲得の仕組みの一端が解明された。この成果によって「エピゲノムの遺伝子発現制御」という生物学における問いの一部を明らかにしたという点で、本研究を実施した学術的意義があったと考える。

加えて、本研究からKDM2Bの標的遺伝子群として新たにAKRファミリー遺伝子の一部を見出し、AKR酵素の機能阻害が手術不適応の進行がんの治療成績改善につながる可能性を示した。このことは難治性の進行性大腸がんの治療奏効率改善に対する新たな治療法開発に向けたシーズの提案いつながったと考えられ、そこに本研究の社会的意義も見出されると考える。

研究成果の概要(英文)：To further improve standard chemotherapy for advanced colorectal cancer (CRC) patients, the molecular basis behind its acquired drug resistance should be clarified. Here, we have examined how KDM2B, an H3K4me3-eraser, could enable CRC cells to become resistant to anti-cancer drugs. To this end, human CRC-derived HT-29 and SW620 cells were transduced with shRNA or cDNA for KDM2B. From our results, it is indicative that a lower expression of KDM2B is implicated in their resistance to 5-FU along with an increase in H3K4me3 level. Our comprehensive epigenetic analysis revealed that KDM2B negatively regulates genes involved in detoxification such as AKR1B1 and AKR1C1 through the modulation of H3K4me3 level around their transcription start sites. Consistently, their inhibitors sensitized KDM2B-depleted CRC cells to 5-FU. Together, our findings strongly suggest that KDM2B plays a vital role in acquired drug resistance of CRC, and thus might be a promising molecular target for its chemotherapy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：大腸がん 治療耐性 KDM2B ヒストン脱メチル化

1. 研究開始当初の背景

(大腸がん治療の課題)

厚生労働省の人口動態調査から、本邦の大腸がんの罹患者数・死亡者数は依然として増加傾向にある。標準的治療の第一選択は手術治療だが、切除不能症例には化学療法が主な選択肢となる。2019年版治療ガイドラインによると、切除不能の進行再発大腸がんでは化学療法を受けない患者の生存期間中央値(MST)は約8か月だが、化学療法で治療した症例のMSTは30か月を超えてきた。しかし、完治を望むことは難しく、その主たる原因の一つである「腫瘍細胞の薬剤耐性獲得」の克服は喫緊の課題である。抗がん剤に順化した大腸がん細胞では物質輸送ポンプや薬物代謝を司る酵素群の発現亢進が報告される。したがって、当該遺伝子群の発現制御は化学療法の治療効果を高め、その結果として根治切除術への移行を促進し、切除不能症例の治療成績向上につながると考えられる。

(エピジェネティックな遺伝子発現制御と治療耐性獲得)

近年、DNA やそれに付随するヒストン蛋白質の化学修飾(メチル化やアセチル化など)の組み合わせによる遺伝子発現の制御機構(エピジェネティック制御)の一端が解明されつつある。がんにおいてはエピジェネティック制御の異常による発がん機構の存在(Sogabe *et al.*, *Cancer Sci.*, 2018)が示唆される一方で、抗がん剤によるヒストンアセチル化(Mannironi *et al.*, *BBRC.*, 1988)やヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の異常な活性化による薬剤耐性獲得(Krumm *et al.*, *Cancer Res.*, 2016)が報告されている。また、HDAC 阻害剤による治療抵抗性の克服(To *et al.*, *Lung Cancer*, 2017 など)も検討されているが、他のヒストン修飾酵素の関与を含め、エピジェネティック制御による治療抵抗性獲得の仕組みの解明とその対応策の構築は十分に検討されていない。

(ヒストン脱メチル化酵素 KDM2B)

上記のヒストン修飾に係るヒストン脱メチル化酵素の一つである KDM2B (図1)は、転写の活性化している遺伝子本体に見られるヒストン H3 の 36 番目のリシン残基の 2 重メチル化修飾(H3K36me2)の脱メチル化反応を触媒する酵素として同定され、その後、プロモーター領域でよく見られるヒストン H3 のアミノ末端から 4 番目にあるリシン残基における 3 重メチル化修飾(H3K4me3)の脱メチル化を触媒することが報告された。また、CxxC ドメインを介して DNA と相互作用し遺伝子抑制に関与すると考えられている(図1)。その機能は、線維芽細胞の不死化などに寄与し、「がん」の病態促進に作用することが報告される一方で、一部の癌腫では抑制性の機能が報告されている(図1)。この異なる背景の細胞における機能の差異については十分に解析されていない。

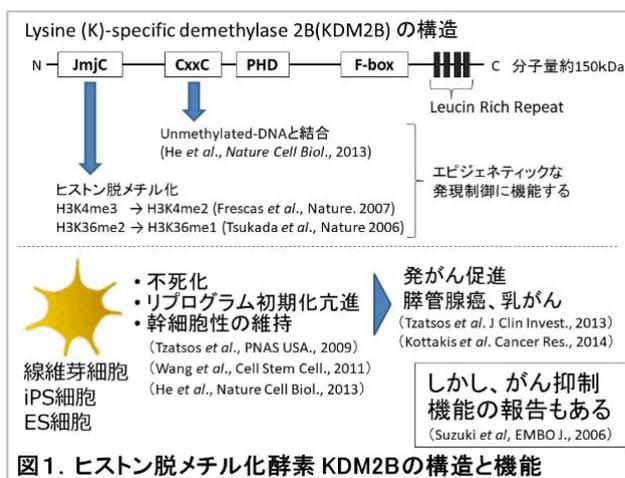


図1. ヒストン脱メチル化酵素 KDM2Bの構造と機能

2. 研究の目的

エピジェネティックな遺伝子発現抑制に関与することが想定される KDM2B の大腸がん細胞の薬剤耐性における意義を探求し、KDM2B を起点とするエピジェネティックな遺伝子発現の亢進および抑制の全体像を解明すること。さらに、大腸がん化学療法の奏効率改善を目指した基盤研究として、KDM2B とその下流遺伝子産物の機能を制御することによる大腸がんに対する化学療法の奏効率改善の実現性を検討することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 細胞株

ヒト大腸がん由来 SW480 細胞からゲノム DNA を抽出し、PCR 法と In Fusion 試薬 (クロンテック社) を用いてヒト *KDM2B* 遺伝子をクローニングした。この遺伝子を鋳型として、点突然変異導入法により酵素活性中心のアミノ酸配列を改変し、酵素活性を持たない変異型 *KDM2B* 遺伝子を作製した。両者はレンチウイルスベクターをもちいてヒト大腸がん由来 HT-29 および SW620 細胞へ導入した。*KDM2B* 遺伝子の恒常的なノックダウンはレンチウイルスに搭載された shRNA を用いた。抗がん剤に対する感受性は Cell counting kit-8 試薬 (Dojindo 社) による WST 法を用いて解析した。

2) 遺伝子発現解析

ISOGEN 試薬 (ニッポンジーン社) を用いて各細胞から全 RNA を抽出し、下記の解析に供した。遺伝子の発現変動は、マイクロアレイ (Agilent Technology 社) および定量的逆転写反応-ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) を用いて解析した。マイクロアレイで得られた発現量の差が 2 倍以上の遺伝子について、オンライン解析ツール (DAVID) を用いてその生物学的意義を検討した。

3) エピゲノム解析

細胞核内のヒストン H3 のメチル化修飾レベルは、ウェスタンブロット法を用いて解析した。さらに、H3K4me3 修飾されたクロマチン領域の探索は市販のクロマチン免疫沈降キット (Cell Signaling Technology 社) を用いてクロマチンを抽出し、当該領域の DNA を定量的 PCR (ChIP-qPCR) 法、あるいは次世代シーケンサー (Ion S5, Thermo Fisher 社) を用いた ChIP-シーケンス (ChIP-seq) 法で解析した。

4. 研究成果

1) *KDM2B* は薬剤抵抗性の獲得に關与する

KDM2B による薬剤抵抗性の獲得を検討するため、2 種類の異なる shRNA (sh#1 および sh#2) をヒト大腸がん由来 HT-29 および SW620 細胞に導入し、*KDM2B* 遺伝子のノックダウン (KD) を試みた。図 2A に示すように、各細胞内の *KDM2B* の発現低下がウェスタンブロット法で確認された。さらに、KD 細胞におけるヒストン H3 のメチル化をウェスタンブロット法で解析すると、*KDM2B* の発現が減少するとともに H3K4me3 レベルの上昇と H3K4me2 レベルの減少が二つの細胞株で観察されたが、H3K36me2 レベルは変化しなかった (図 2A)。すなわち、*KDM2B* はこれらのヒト大腸がん細胞内では、

H3K36me2 よりも H3K4me3 の脱メチル化反応を触媒することが示された。次に、*KDM2B* の KD が薬剤感受性に与える影響を検討した。各細胞を異なる濃度の抗がん剤 5-FU の存在下で 3 日間培養したときの生存率を WST 法で評価すると、KD 細胞は薬剤抵抗性を獲得したことが示された (図 2B)。

これらの現象が *KDM2B* に依存しているかどうかをさらに検討するため、野生型 *KDM2B* (WT) あるいは酵素活

性を失った変異型 *KDM2B* (MT) を過剰発現する HT-29 および SW620 細胞株を作製し、そのヒ

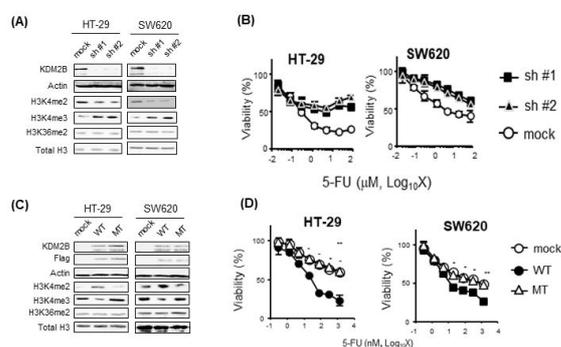


図2. *KDM2B*による薬剤耐性の獲得
A) ヒト大腸がん由来HT-29とSW620細胞の*KDM2B*に対するshRNAを導入した。Whole cell lysatesを調製し、表示したタンパク質をウェスタンブロット法で検出した。
B) *KDM2B*をノックダウンした細胞を抗がん剤5-FUの存在下で3日間培養し、生存率を解析した。データは平均±SDで表し、アスタリスクは統計学的有意差を示す。
C) ヒト大腸がん由来HT-29とSW620細胞の野生型*KDM2B* (WT) あるいは変異型遺伝子 (MT) のcDNAを導入した。Whole cell lysatesを調製し、表示したタンパク質をウェスタンブロット法で検出した。
D) WTあるいはMTを発現する大腸がん細胞を抗がん剤5-FUの存在下で3日間培養し、生存率を解析した。データは平均±SDで表し、アスタリスクは統計学的有意差を示す。

ストン修飾の状況をウェスタンブロット法で検討した。図 2C に示すように、WT 発現によって H3K4me3 レベルが減少したが、MT 発現では H3K4me3 レベルは、空ベクターを導入した陰性コントロールである mock 細胞と同程度に維持されていた。そこで、KD 細胞と同様に、KDM2B の過剰発現が薬剤感受性に与える影響を検討した。各細胞を異なる濃度の抗がん剤 5-FU の存在下で 3 日間培養したときの生存率を WST 法で検討すると、mock 細胞と比較して、WT 発現細胞では 5-FU に対する感受性が高くなったが、MT 発現では薬剤感受性に対する影響は認められなかった (図 2D)。これらの結果から、H3K4me3 修飾を制御する KDM2B は薬剤抵抗性の獲得に直接的に関与する可能性が示唆された。

2) KDM2B による AKR1B1 遺伝子のエピゲノム制御

図 2 に示した結果から、KDM2B は H3K4me3 修飾の制御を介して薬剤耐性に関与する遺伝子の発現制御に関与すると仮説を立て、sh#1 を導入した HT-29 細胞内で発現量の変化した遺伝子をマイクロアレイ法で探索した。図 3A に示すように、統計学的に有意な差をもって対照群の細胞内での発現量より 2 倍以上に上昇していた遺伝子は 305 個であり、逆に 1/2 倍以下に低下していた遺伝子 258 個であった。そこで、発現上昇した遺伝子群が関与する生物学的経路を Gene Ontology (GO) 解析で探索した結果、

KDM2B 遺伝子の KD によって薬剤代謝に関連する生物学的経路が活性化している可能性が示唆された (図 3B)。

GO 解析で抽出されたドキソルピシン代謝経路に係る遺伝子として複数の AKR ファミリー遺伝子 (*AKR1B1*、*AKR1B10*、*AKR1C1*) が含まれていた。これらの遺伝子産物は化合物の代謝・解毒に作用することから、qRT-PCR 法を用いて当該遺伝子群の発現量を検討

した。図 3C に示すように、HT-29 および SW620 の KD 細胞でこれらの発現量は上昇していた。一方、KDM2B 過剰発現では、3 つの遺伝子は WT 発現で発現低下したが、MT 発現でのそれらの発現レベルは低下しなかった (図 3D)。したがって、少なくとも *AKR1B1*、*AKR1B10*、および *AKR1C1* 遺伝子は KDM2B の新規標的遺伝子である可能性が示唆された。

次に、KDM2B が制御する H3K4me3 修飾を網羅的に解析するため ChIP-seq を行った。WT あるいは MT を過剰発現する大腸がん細胞からクロマチンを抽出し、H3K4me3 に対する抗体でクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行い、得られたクロマチンに含まれるゲノム DNA の塩基配列を次世代シーケンサーで解析した。図 4A に示すように、コントロールである mock 細胞に比べて WT 発現細胞では、様々な遺伝子の転写開始点 (TSS) 周辺における H3K4me3 レベルが全体的に減少する傾向が観察され、その一方で MT 発現細胞ではそれが見られなかった。すなわち、KDM2B は TSS 周辺の H3K4me3 レベルの制御に関与することが示された。そこで、前述した KDM2B の標的遺伝子の候補である *AKR1B1* および *AKR1C1* 遺伝子の TSS 周辺の H3K4me3 レベルを ChIP-qPCR 法でも解析した。具体的には、WT あるいは MT を過剰発現する細胞からクロマチンを抽出し、抗 H3K4me3 抗体あるいは抗 KDM2B 抗体で ChIP を行い、図 4B に示す *AKR1B1* 遺伝子のエクソン 1 周辺領域を標的するように設計した PCR プライマーを用いて、得られたクロマチンに含まれるゲノム DNA を qPCR 法で定量した。その結果、WT 発現細胞におけるエクソン 1 上流領域 (アンプリコン 2 と 3)

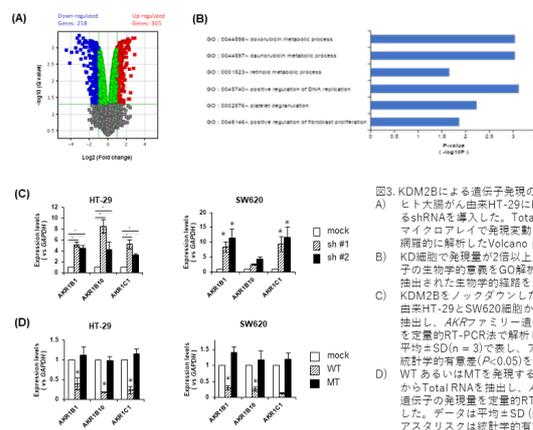


図3. KDM2Bによる遺伝子発現の変化
 A) ヒト大腸がん由来HT-29にKDM2Bに対するshRNAを導入した。Total RNAを精製し、マイクロアレイで発現変動した遺伝子を網羅的に解析したVolcano plotを示す。
 B) KD細胞で発現量が2倍以上上昇した遺伝子の生物学的意義をGO解析で検討した。抽出された生物学的経路を示す。
 C) KDM2Bをノックダウンしたヒト大腸がん由来HT-29とSW620細胞からTotal RNAを抽出し、AKRファミリー遺伝子の発現量を定量的RT-PCR法で解析した。データは平均±SD (n=3)で表し、アスタリスクは統計学的有意差 (P<0.05)を示す。
 D) WTあるいはMTを過剰発現する大腸がん細胞からTotal RNAを抽出し、AKRファミリー遺伝子の発現量を定量的RT-PCR法で解析した。データは平均±SD (n=3)で表し、アスタリスクは統計学的有意差 (P<0.05)を示す。

の H3K4me3 レベルは mock 細胞および MT 発現細胞に比べて著しく低下していた (図 4C)。その一方で、エクソン 1 上流の遠位領域 (アンプリコン 1) とエクソン 1 の下流領域 (アンプリコン 4) での H3K4me3 レベルは 3 つの細胞間で変化はなかった。興味深いことに、抗 KDM2B 抗体での免疫沈降で得られたクロマチン領域は、エクソン 1 上流領域 (アンプリコン 2 と 3) で強く検出され、反対に遠位領域 (アンプリコン 1) とエクソン 1 の下流 (アンプリコン 4) ではほとんど検出されなかった (図 4D)。同様に、図 4E に示す *AKRIC1* 遺伝子のエクソン 1 周辺領域を標的するように設計した PCR プライマーを用いて ChIP-qPCR 法を行うと、WT 発現細胞におけるエクソン 1 を中心とする 1kb 領域 (アンプリコン 2 から 4) の H3K4me3 レベルは mock 細胞および MT 発現細胞に比べて著しく低下していた (図 4H)。その一方で、エクソン 1 上流の遠位領域 (アンプリコン 1) での H3K4me3 レベルは 3 つの細胞間で変化はなかった。また、抗 KDM2B 抗体での免疫沈降で得られたクロマチン領域は、エクソン 1 上流領域

(アンプリコン 1 から 4) 特にアンプリコン 3 と 4 では多くのクロマチン DNA が検出され、反対にエクソン 1 の下流 (アンプリコン 5) ではほとんど検出されなかった (図 4F)。これらの結果から、KDM2B は *AKR1B1* および *AKRIC1* 遺伝子の TSS 周辺に結合し当該領域は H3K4me3 レベルを制御している可能性が示唆された。

3) KDM2B-AKR axis は薬剤耐性獲得の中心的役割を担う

最後に、KDM2B による薬剤抵抗性の獲得が AKR ファミリー遺伝子の発現による可能性を検討した。具体的には、*KDM2B* 遺伝子をノックダウンし薬剤耐性を獲得した大腸がん細胞に、すでに市販される AKR 阻害剤 (HCCFA あるいは 5-PBSA) の存在下で、抗がん剤 5-FU を作用させたときの細胞生存率を WST 法で測定した。なお、当該化合物は、それらを単独で投与しても大腸がん細胞株に対してほとんど毒性を示さない濃度で用いた。その結果、当該化合物の添加は mock 細胞の 5-FU に対する感受性にはほとんど影響しなかった一方で、KD 細胞には 5-FU に対する感受性を上昇させた (図 5)。

以上の結果から、ヒストン脱メチル化酵素 KDM2B によるエピゲノムの薬剤耐性の獲得機構の一端が解明された。特に、KDM2B の新たな標的遺伝子群として AKR ファミリー遺伝子の一部が見出され、がん細胞の薬剤抵抗性獲得の新たな仕組みとして KDM2B-AKR axis の存在が示唆された。

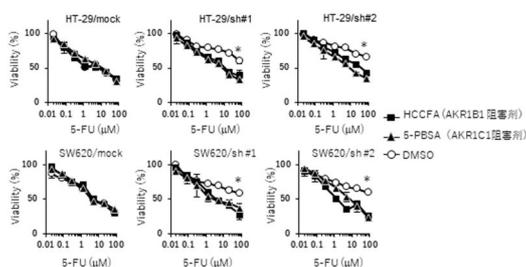
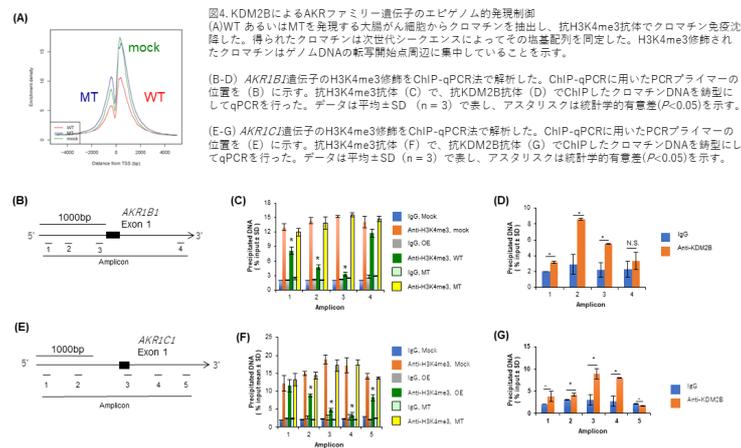


図5. AKR阻害剤によるKDM2B依存的薬剤耐性の無効化
KDM2Bをノックダウンしたヒト大腸がん由来HT-29とSW620細胞をAKR阻害剤とともに抗がん剤5-FUの存在下で3日間培養し、生存率を解析した。データは平均±SD (n = 3) で表し、アスタリスクは統計学的有意差 (P<0.05) を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 A. Takeuchi, (他3名), O. Shimozato
2. 発表標題 新規 KDM2B-AKR1B1経路は大腸がん細胞の多剤耐性獲得に寄与する
3. 学会等名 日本分子生物学会年会（第43回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 A. Takeuchi, (他3名) O. Shimozato
2. 発表標題 Histone demethylase KDM2B epigenetically counteracts multidrug resistance in colon cancer cells
3. 学会等名 日本癌学会学術総会（第79回）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 A. Takeuchi, (他3名) O. Shimozato
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素KDM2Bによる大腸がん細胞のFOLFOX療法耐性獲得
3. 学会等名 日本癌病態治療研究会（第29回）
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
研究分担者	下里 修 (Shimozato Osamu) (30344063)	千葉県がんセンター(研究所)・がん予防センター 腫瘍ゲノム研究室・室長 (82504)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	石毛 文隆 (Ishige Fumitaka) (60815801)	千葉県がんセンター（研究所）・肝胆膵外科・医員 (82504)	

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