

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590453

研究課題名（和文） ヒストン修飾蛋白のクロマチンリモデリング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 chromatin remodeling by histone modifier protein in carcinogenesis and progression.

研究代表者

藤井 誠志 (FUJII SATOSHI)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・室長

研究者番号：30314743

研究成果の概要（和文）：ヒストン修飾蛋白の一つである EZH2 のがん細胞における高発現は MEK-ERK-Elk-1 経路の活性化によって誘起されることを見出した。この MEK-ERK-Elk-1-EZH2 の経路は乳癌の高悪性度亜型である、ERBB2 過剰発現亜型、トリプルネガティブ亜型の高い増殖能に関係していることが判明した。さらにヒト RAS 変異体を導入すると膵癌が発生するトランスジェニックラットモデルにおいても、MEK-ERK 経路の下流にある EZH2 による遺伝子発現改変が重要な役割を果たすことを見出した。

研究成果の概要（英文）：It is demonstrated that MEK-ERK1/2-Elk-1 pathway leads to EZH2 overexpression. The triple-negative and ERBB2-overexpressing subtypes of breast cancer are known to contain more rapidly proliferating breast cancer cells. The signaling pathway connected to EZH2 overexpression was associated with both aggressive subtypes of breast cancer, showing one of the clinicopathological significance of overexpression of histone modifier protein. The oncogenic role of EZH2, a histone modifier protein that is induced by oncogenic mutant *RAS* is also defined in pancreatic carcinogenesis, using pancreatic cancers of transgenic rats exogenously expressing human mutant *RAS*. That is, EZH2 was found to be a real effector protein in the downstream of the MEK-ERK pathway in pancreatic carcinogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍、ヒストン、クロマチン

1. 研究開始当初の背景

がんで発現の高いヒストン修飾蛋白の一つである EZH2 が、がん抑制遺伝子である E-cadherin、RUNX3 遺伝子をヒストン H3K27 のトリメチル化を介して転写を抑制することを見出していた。しかしながら、がん細胞での EZH2 の高発現機構は解明されていなかった。

2. 研究の目的

個々の遺伝子異常のみでは、正常細胞からがん細胞への劇的な表現型の変化を説明し得るには不十分であり、多数の遺伝子の発現がまとめて変化する機構が形質転換に必要と考える。クロマチンリモデリングを引き起こすヒストン修飾蛋白が、クロマチン構造を変化させることによって細胞表現型に関わる遺伝子の発現を変化させる機構について、がんの発生及び進展に着目して解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) EZH2 の転写開始点から上流約 3kb をクローニングし、種々の長さのコンストラクトを作製した。デュアルルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性の差を見出せる部位の配列を同定し、その意義を検討した。

(2) RAS 変異体を導入すると MAP kinase が活性化した結果、膀胱癌が発生するトランスジェニックラットモデルを用いて、1) で見出した活性化された MEK-ERK-Elk-1 経路が EZH2 の高発現を誘起すること、発がんにどのように関わっているかについて検討を行った。

4. 研究成果

(1) MAP kinase の下流の Elk-1 の結合部位を欠損させたコンストラクトではルシフェラーゼ活性が著明に低下した (図 1)。

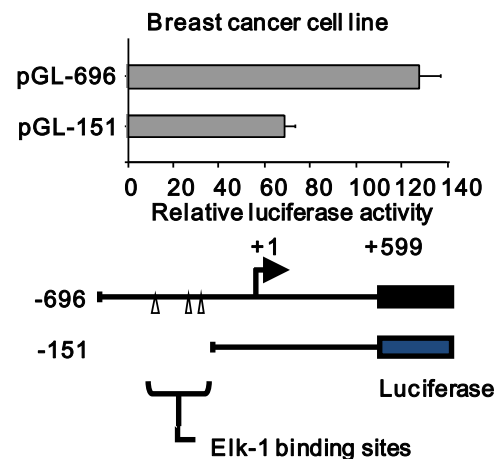


図1 EZH2遺伝子プロモーターのデュアルルシフェラーゼアッセイ (Fujii S, et al. Oncogene 30; 4118-28. 2011. より)

3 箇所の Elk-1 の結合部位に変異をいれて、同様にデュアルルシフェラーゼアッセイを行っても、同部位を欠損させたコンストラクトを用いた場合と同様にルシフェラーゼ活性の低下を認めた。siRNA を用いた Elk-1 ノックダウン、または MEK inhibitor 処理を行って、MEK-ERK-Elk-1 経路を阻害すると、EZH2 mRNA 及び EZH2 蛋白の発現量の低下が認められた。EZH2 プロモーター上の Elk-1 結合配列に pElk-1 が特異的に結合することを ChIP assay で確認した。乳癌のサブタイプ別に検証すると、MAP kinase のシグナルが活性化しているトリプルネガティブ乳癌亜型及び ERBB2 過剰発現亜型では、前述したメカニズムによる EZH2 の高発現機構が確認された。EZH2 は細胞周期を抑制的に制御する RUNX3 遺伝子の転写を抑制することから、MAP kinase を介してヒストン修飾蛋白である EZH2 が過剰発現する機構が悪性度亜型の乳癌細胞の表現型、高い細胞増殖能に関係していることが判明した (図 2)。

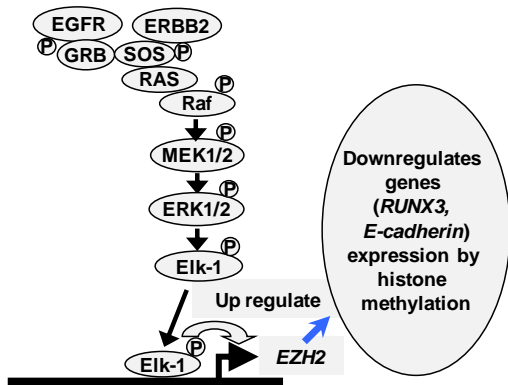


図2 EZH2遺伝子の高発現メカニズム
(Fujii S, et al. Oncogene 30; 4118-28. 2011. より)

(2) ヒトの RAS 変異体を導入したトランスジェニックラットモデルで発生したラット膵癌組織を用いて、免疫組織化学的染色にて検討した結果、非腫瘍性細胞では EZH2 の発現レベルは極めて低く、前癌病変である異形成から浸潤癌では段階的に形態像の変化とともに EZH2 蛋白の発現の上昇が認められた(図3)。

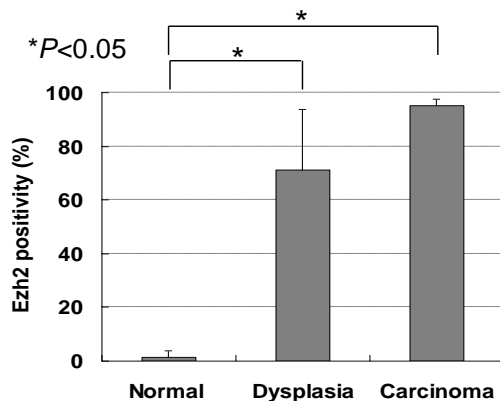


図3 膵癌発生におけるEZH2蛋白発現の変化
(Fujii S, et al. Biochem Biophys Res Commun. 417; 1074-79. 2012.)

このモデルで生じたラット膵癌細胞株を用いた検討では、MEK インヒビター処理或いは Elk-1 のノックダウンにて、MEK-ERK-Elk-1 経路を阻害した結果、Ezh2 mRNA、Ezh2 蛋白の発現低下が認められた。クロマチン免疫沈降法では Ezh2 のプロモーターに pElk-1 が結合すること、Runx3 遺伝子プロモーターに Ezh2 が結合することを確認した。ヒトの膵癌細胞株を用いた検討でも、上記と同様の結果

が得られ、Elk-1 と EZH2 のノックダウンではともに膵癌細胞の増殖能が低下した。以上より、変異体 RAS により活性化された MEK-ERK-Elk-1 経路が EZH2 の高発現を誘導する機構が、膵癌発生に重要な役割を果たしていることを示した。

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 3 件)

- ① Fujii S (他5名、1番目)、RAS oncogenic signal upregulates EZH2 in pancreatic cancer, Biochem Biophys Res Commun、査読有、417、2012、1074-79、DOI: org/10.1016/j.bbrc.2011.12.099.
- ② Fujii S (他 6 名、1 番目)、MEK-ERK pathway regulates EZH2 overexpression in association with aggressive breast cancer subtypes、Oncogene、査読有、30、2011、4118-28、DOI: 10.1038/onc.2011.118.
- ③ Yamada A, Fujii S (他 5 名、2 番目)、Aberrant expression of EZH2 is associated with a poor outcome and P53 alteration in squamous cell carcinoma of the esophagus、Int J Oncol、査読有、38、2011、345-53、DOI: 10.3892/ijo.2010.868.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 藤井誠志、The significance of histone variants in cancer cells. がん細胞におけるヒストン変異体の意義、第70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日、名古屋市。
- ② 藤井誠志、高悪性度亜型の乳癌におけるヒストン修飾蛋白の高発現の意義、第19回日本乳癌学会学術総会、2011年9月2日、仙台市。
- ③ 小林真希、エストロゲンレセプター陽性乳癌におけるEZH2発現機構の解明、第100回日本病理学会総会、2011年4月28日、横浜市。
- ④ 藤井誠志、ヒストン修飾蛋白によるがんの発生及び進展機構の解明、第56回日本

病理学会秋期特別総会 学術研究賞演説 (A演説)、2010年11月26日、北九州市.

- ⑤ 藤井誠志、MEK-ERK pathway regulates overexpression of EZH2, which is associated with aggressive breast cancer subtypes、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪市.
- ⑥ 藤井誠志、Ras変異体導入による腫瘍発生におけるヒストン修飾蛋白の関与、第99回日本病理学会総会、2010年4月27日、東京都.
- ⑦ 小林真季、活性酸素種によるヒストン修飾蛋白の発現誘導、第99回日本病理学会総会、2010年4月27日、東京都.
- ⑧ 藤井誠志、ERK pathway regulates the expression of histone modification protein in cancer cells、第68回日本癌学会総会、2009年10月1日、横浜市.
- ⑨ 藤井誠志、RAS 変異体導入による腫瘍発生におけるヒストン修飾蛋白の関与、第20回日本消化器癌発生学会総会、2009年11月26日、広島市.

〔図書〕(計1件)

藤井誠志、文光堂、腫瘍病理鑑別診断アトラス 食道癌「扁平上皮癌の悪性度評価」、2012年、103-108.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤井 誠志 (FUJII SATOSHI)

独立行政法人国立がん研究センター・臨床開発センター・室長

研究者番号：30314743

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：