

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22300344

研究課題名(和文)がん細胞の可塑性を担うエピジェネティクス機構を標的とした新規治療法の開発

研究課題名(英文)Epigenetic plasticity as a novel target for cancer treatment

研究代表者

近藤 豊 (Kondo, Yutaka)

愛知県がんセンター(研究所)・ゲノム制御研究部・部長

研究者番号：00419897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円、(間接経費) 3,660,000円

研究成果の概要(和文)：固形腫瘍が治療感受性や転移能の異なる細胞集団を獲得する背景に、がん幹細胞の存在とそのエピジェネティクス制御機構が鍵となると考え、ヒト膠芽腫のがん幹細胞の分化誘導モデルを樹立し、がん細胞におけるエピゲノム可塑性およびその分子機構について解析した。さらにその分子基盤を標的とする小分子化合物の同定を試みた。本研究により、EZH2-H3K27me3を介したエピジェネティック機構は、がん幹細胞の分化過程で重要な働きを示し、がん組織内に多様な組織像を形成に寄与していることを見出した。またEZH2による遺伝子抑制を阻害する小分子化合物のスクリーニング法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is the most common and deadly primary brain tumor, which is characterized by intratumoral and intertumoral heterogeneity with histologically different types of cells. Such multiple distinct subpopulations of cancer cells within tumors link to the existence of cells that survive surgery and chemotherapy to form recurrent lesions that are resistant to further treatments. Elucidating the molecular mechanisms underlying tissue heterogeneity of glioblastoma is a fundamental requirement for the development of effective treatments for this dreadful disease. We revealed that H3K27me3 mediated by EZH2/PRC2, which controls tumor cell plasticity, may provide a target to restrict the functional heterogeneity in tumors, a core challenge to all cancer cell-centric drugs given the huge reservoir of resistance mechanisms which such heterogeneity confers. In order to identify the EZH2/PRC2 inhibitor, we developed a high-throughput screening for chemicals and assayed 15,000 compounds.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：分子標的治療 分子標的治療 がん幹細胞 ポリコム グリオブラストーマ

### 1. 研究開始当初の背景

可塑性を持ったがん細胞は、周囲環境に適応し巧みに生体防御機構をくぐり抜け、増殖・進展していくと考えられるが、そのプロセスに関わるエピジェネティクス機構についてはほとんど明らかにされていない。がん細胞の可塑性は“がん組織の不均一性”や“多様性”に関わり、腫瘍内に転移能・浸潤能を伴った細胞集団を形成することにつながると予測される。がん周囲環境との相互作用から、異なった形質を獲得するがん細胞のエピジェネティックな分子基盤を明らかにし、その分子基盤を標的とした新たなエピジェネティクス治療薬を開発することは、がん治療戦略を展開する上で重要な課題となる。

我々の研究グループではこれまでポリコームタンパクを介した H3K27me3 修飾による遺伝子不活化機構について解析を行ってきた。H3K27me3 機構は可塑性が高くエピゲノム・ネットワークを形成し、がんの発育・進展を制御している可能性が推測される。

最近の研究から胚性幹細胞 (ES 細胞) の分化制御に H3K27me3 が深く関係しており、また iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) の誘導の際にも H3K27me3 と DNA メチル化のリプログラミングが重要な鍵となっていることが明らかとなってきた。さらに近年、がん幹細胞の概念が提唱され、ES 細胞や体性幹細胞などの幹細胞に共通して見られる自己複製能と多分化能という二つの特徴を持つ腫瘍細胞、すなわちがん幹細胞が、がん組織の中に存在すると考えられている。

本研究では、固形腫瘍が“腫瘍内組織不均一性”を獲得する背景に、がん幹細胞の存在と、可塑性のあるエピジェネティックな制御機構が関与していると考え、その機序を明らかにすることを旨とする。

### 2. 研究の目的

がん細胞は周囲環境に適応しながら増殖・浸潤・転移をする。エピジェネティクスはその制御基盤のひとつと考えられる。本研究はがん細胞におけるエピジェネティクスの可塑性と固定化の機序を明らかにすることを目的とする。我々が樹立したがん幹細胞を用いて、その維持・分化過程に関わるエピジェネティクス変化を網羅的に解析し分子機構の解明を試みる。さらにその分子基盤を標的とした、小分子化合物によるエピジェネティクス的人為的な制御を目指す。がん細胞の可塑性を担うエピジェネティクス制御機構を明らかにすることは、がん細胞が生体防御機構をくぐり抜け生き残るプロセスの解明につながることを期待でき、将来のがん治療戦略を展開する上で重要な課題である。

### 3. 研究の方法

本研究では、我々が膠芽腫 (グリオブラス

トーマ) から樹立した複数のがん幹細胞を用いて、がん幹細胞の形質変換を制御するエピジェネティクス・ネットワークの解明を試みる。さらにその制御機構を標的とした小分子化合物の開発を目指す。

#### 1) がん細胞の可塑性に関わるエピジェネティクス機構の網羅的解析

我々がこれまで蓄積したエピジェネティクスの知見と、マイクロアレイおよび次世代シーケンス技術を駆使し、脳腫瘍がん幹細胞の形質変化制御に関わる、抑制型ならびに活性型ヒストン修飾、DNA メチル化、非翻訳 RNA によって構成されるエピジェネティクス・ネットワークを明らかにする。

#### 2) エピジェネティクス可塑性を制御する非翻訳 RNA の機能解析

1) で同定した非翻訳 RNA (miRNA) の、がんの組織不均一性への関与について解析を行なう。

#### 3) がんの進展過程に関わるエピジェネティクスを標的とした小分子化合物の開発

ヒストンメチル化酵素 EZH2 の遺伝子不活化作用を阻害する化合物のスクリーニング系の構築を行う。

### 4. 研究成果

#### 1) がん細胞の可塑性に関わるエピジェネティクス機構の網羅的解析

脳がん幹細胞 (GSC) から分化型脳がん細胞 (S-BTC) で変化する過程におけるエピジェネティクス変化について、3 患者から樹立した 3 株の GSC を用いて解析を行なった。クロマチン免疫沈降 - マイクロアレイ法 (ChIP-chip 法) により H3K27me3 の標的遺伝子を、また methylated CpG island amplification and microarray 法で DNA メチル化標的遺伝子 (プロモーター領域) を解析した。その結果、GSC 特異的 H3K27me3 標的 24 遺伝子 (Nanog, Wnt1 etc.)、S-BTC 特異的 H3K27me3 標的 111 遺伝子 (BMP5 etc.) を同定した (GSC 3 株で共通)。一方でプロモーター領域の DNA メチル化標的遺伝子は GSC と S-BTC で再現性のある変化は見られなかった (図 1)。

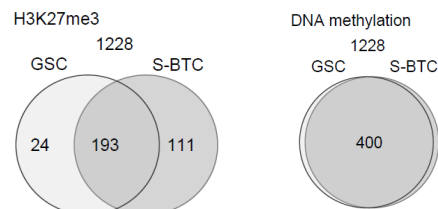


図 1 脳がん幹細胞 (GSC) と分化型脳がん細胞 (S-BTC) のエピゲノム修飾変化

次にこれらの H3K27me3 標的遺伝子が GSC のがん形質に及ぼす影響を観察するため、3つの細胞株で共通して H3K27me3 標的となることを確認した遺伝子について解析を行なった(図2)。3つの GSC 株で特異的に H3K27me3 により抑制されていた Wnt1 および、分化後の S-BTC で特異的に H3K27me3 により抑制されていた BMP5 について解析を行なった結果、GSC において Wnt1 の抑制もしくは BMP5 の過剰発現は、血清刺激による GSC の分化誘導および Brain Slice Culture による GSC の浸潤能を阻害した。

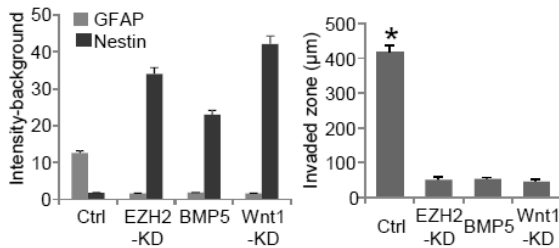


図2 H3K27me3 標的遺伝子および EZH2 による GSC 浸潤能の変化。EZH2、Wnt1 の RNA 干渉法による阻害、および BMP5 の強制発現は、GSC の分化誘導を阻害する (Nestin 高値、GFAP 低値；左図)。さらに Brain Slice Culture 切片上での周囲組織への浸潤が抑制される (右図)

さらに EZH2 阻害による抗腫瘍効果は、NOD-scid マウスを用いた xenograft モデルでも観察された。

以上の結果からがん幹細胞が周囲環境に適応して浸潤する際に、PRC2-H3K27me3 によるエピジェネティック機構は必須であり、その際に EZH2 が重要な役割を演じていると考えた。

## 2) エピジェネティクス可塑性を制御する非翻訳 RNA の機能解析

GSC の 2 株を用いて血清存在下に S-BTC に分化誘導を行い、その際に共通して増減する miRNA をそれぞれ 12、63 個同定した。公共データベースによる insilico 標的遺伝子検索を行ない、神経分化に関わる遺伝子を標的とし、且つ PRC2-H3K27me3 で制御される miR-1275 を同定した (図3)。

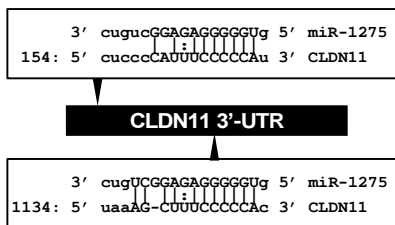


図3 miR-1275 と CLDN11。miR-1275 は CLDN11 遺伝子の 3' -UTR に相補的配列を有する。

miR-1275 は、神経髄鞘の形成に必須なタンパクである Oligodendrocyte Specific

Protein (OSP/CLDN11) の発現制御に関わっており、GSC の分化誘導時には H3K27me3 による miR-1275 の発現抑制と OSP/CLDN11 の発現上昇が誘導されることを見出した (図4)。

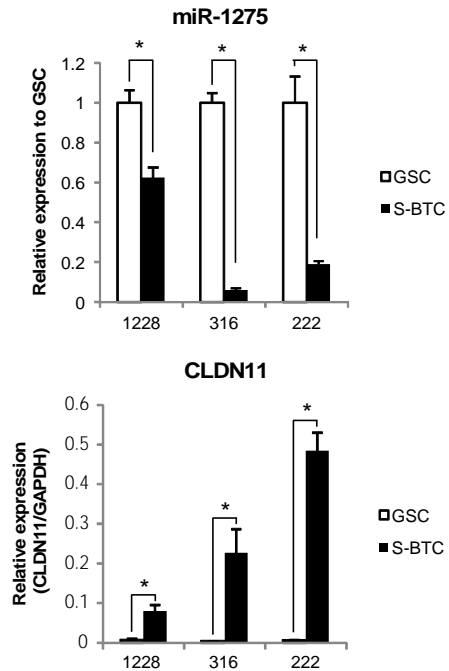


図4 GSC の分化誘導後 (S-BTC) における miR-1275 およびその標的遺伝子 CLDN11 の発現。GSC の分化誘導時には miR-1275 の発現抑制と OSP/CLDN11 の発現が上昇する。

## 3) がんの進展過程に関わるエピジェネティクスを標的とした小分子化合物の開発

EZH2 による遺伝子抑制を阻害する小分子化合物のスクリーニング法を開発し、京都大学化学研究所上杉志成教授から供与された 15,000 化合物ライブラリーにつきスクリーニングを終了した。残念ながら EZH2 の抑制機構を阻害する化合物は得られなかった。

## 4) 結語

本研究により、EZH2-H3K27me3 を介したエピジェネティック機構は、がん幹細胞の分化過程で重要な働きを示し、がん組織内に多様な組織像を形成に寄与していることを見出した。これらの結果を纏め論文報告を行った (Natsume A. *Oncogene* 2012, Katsushima K. *J. Biol Chem.* 2012, Natsume A et al. *Can Res* 2014)。

## 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 19 件)

1. Kishida Y, Kondo Y, 12 名, 11 番目, Correlation between quantified promoter methylation and enzymatic activity of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in glioblastomas. *Tumour Biol*, 査読有,

- 33, 2012,373-381,  
10.1007/s13277-012-0319-1
2. Murata T, Kondo Y, 8 名, 2 番目, Epigenetic Histone Modification of Epstein-Barr virus BZLF1 Promoter during Latency and Reactivation in Raji Cells. *Journal of Virology*, 査読有, 86, 2012, 4752-4761, 10.1128/JVI.06768-11
  3. Shinjo K, Kondo Y, 14 名, 14 番目, Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 査読有, 33, 2012, 1277-1285, 10.1093/carcin/bgs154
  4. Katsushima K, Kondo Y, 8 名, 8 番目, Contribution of microRNA-1275 to Claudin11 suppression via a polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells. *J Biol Chem*, 査読有, 287, 2012, 27396-27406, 10.1074/jbc.M112.359109
  5. Xue X, Kondo Y, 15 名, 15 番目, Vasohibin 2 is transcriptionally activated and promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 査読有, 32,2012,1724-1734, 10.1038/onc.2012.177
  6. Oki Y, Kondo Y, 17 名, 2 番目, A phase I/II study of decitabine in patients with myelodysplastic syndrome: a multi-center study in Japan. *Cancer Sci*, 査読有, 103, 2012, 1839-1847, 10.1111/j.1349-7006.2012.02386.x
  7. Shinjo K, Kondo Y, 2 名, 2 番目, Clinical implications of epigenetic alterations in human thoracic malignancies: epigenetic alterations in lung cancer. *Methods Mol Biol*, 査読有, 863, 2012,221-239, 10.1007/978-1-61779-612-8\_13
  8. Kishida Y, Kondo Y, 12 名, 3 番目, Epigenetic subclassification of meningiomas based on genome-wide DNA methylation analyses. *Carcinogenesis*, 査読有, 33,2012, 436-441, 10.1093/carcin/bgr260
  9. Nagashio R, Kondo Y, 6 名, 5 番目, Carcinogenetic risk estimation based on quantification of DNA methylation levels in liver tissue at the precancerous stage. *Int J Cancer*, 査読有, 129, 2011, 1170-1179, 10.1002/ijc.26061
  10. Cheng AS, Kondo Y, 17 名, 4 番目, EZH2-mediated concordant repression of Wnt antagonists promotes- -catenin-dependent hepatocarcinogenesis. *Cancer Res*, 査読有, 71, 2011,4028-4039, 10.1158/0008-5472.CAN-10-3342
  11. Ohka F, Kondo Y, 16 名, 5 番目, The Global DNA Methylation Surrogate LINE-1 Methylation Is Correlated with MGMT Promoter Methylation and Is a Better Prognostic Factor for Glioma. *PLoS One*, 査読有, 6, 2011, e23332, 10.1371/journal.pone.0023332
  12. Konishi K, Kondo Y, 17 名, 6 番目, DNA methylation profiles of primary colorectal carcinoma and matched liver metastasis. *PLoS One*, 査読有, 6, 2011, e27889, 10.1371/journal.pone.0027889
  13. Okamoto Y, Kondo Y, 20 名, 20 番目, Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumour. *Gut*, 査読有, 61, 2011, 392-401, 10.1136/gut.2011.241034 10.1093/carcin/bgr260
  14. Motomura K, Kondo Y, 10 名, 5 番目, Benefits of interferon- and temozolomide combination therapy for newly diagnosed primary glioblastoma with the unmethylated MGMT promoter: a multicenter study. *Cancer*, 査読有, 117, 2011, 1721-1730, 10.1002/cncr.25637
  15. Murakami H, Kondo Y, 13 名, 10 番目, LATS2 is a tumor suppressor gene of malignant mesothelioma. *Cancer Res*, 査読有, 71, 2011, 873-883, 10.1158/0008-5472.CAN-10-2164
  16. Ju H, Kondo Y, 19 名, 19 番目, Distinct profiles of epigenetic evolution between colorect cancers with and without metastasis. *Am J Pathol*, 査読有, 178, 2011, 1835-1846, 10.1016/j.ajpath.2010.12.045
  17. Shen L, Kondo Y, 16 名 11 番目, DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol*, 査読有, 28, 2010, 605-613, 10.1200/JCO.2009.23.4781
  18. An B, Kondo Y, 20 名, 2 番目, Characteristic methylation profile in CpG island methylator phenotype-negative distal colorectal cancers. *Int J Cancer*, 査読有, 127, 2010, 2095-2105, 10.1002/ijc.25225
  19. Estécio MR, Kondo Y, 15 名, 8 番目, Genome architecture marked by retrotransposons modulates predisposition to DNA methylation in cancer. *Genome Res*, 査読有, 20, 2010, 1369-1382, 10.1101/gr.107318.110

〔学会発表〕(計 30件)

1. 近藤 豊, DNAメチル化異常の検出を利用した高精度がん診断法の開発, 分子・物質プラットフォーム 平成24年度 成果報告会, 2013年3月13日, 愛知県岡崎市
2. Kondo Y, Epigenetic Plasticity and its clinical implications in human neoplasia. Ninth AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference, 2013年2月23日, Hawaii, USA
3. 近藤 豊, マウスモデルを用いた脳腫瘍の発生に関わるエピゲノム異常の解析, 平成24年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ, 2013年2月6日, 滋賀県大津市
4. 近藤 豊, エピジェネティクスから迫るがんの診断と治療, 平成24年度 次世代バイオナノ研究会「次世代シーケンサーとがん診断の最前線」, 2013年1月18日, 香川県高松市
5. Kondo Y, Mechanistic Link between Hepatitis Viral Infection and Induction of Aberrant DNA Methylation in Human Hepatocyte Chimeric Mice. The 17th Japan-Korea Cancer Research Workshop, 2012年12月1日, Busan, Korea
6. Kondo Y, Study of Aberrant DNA Methylation in Human Hepatocyte Chimeric Mice. International Symposium on Genetic Regulation and Targeted Therapy of Cancer and 3rd Symposium of A3 Foresight Program, 2012年11月10日, Guangzhou, China
7. 近藤 豊, がん細胞の動的制御に関わるエピゲノム, 平成24年度 遺伝研研究会「染色体ドメインの形成と機能発現機構」, 2012年10月18日, 静岡県三島市
8. 近藤 豊, 大腸腫瘍の病態に関わるエピゲノム異常, 第20回 日本消化器関連学会週間, 2012年10月11日, 兵庫県神戸市
9. 近藤 豊, がん幹細胞を制御するエピゲノム修飾機構の解明と治療への展望, 第71回 日本癌学会学術総会, 2012年9月21日, 北海道札幌市
10. 近藤 豊, エピゲノムから見た新たながん治療への挑戦, 第22回 日本サイトメトリー学会 学術集会, 2012年6月30日, 大阪府豊中市
11. 近藤 豊, がん細胞のエピゲノム異常を標的とした新しい治療戦略, 第16回 学術集会 日本がん分子標的治療学会, 2012年6月29日, 福岡県北九州市
12. Kondo Y, Translational Implications of Epigenetic Changes in Human Malignancies. 10th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society, 2012年6月13日, Seoul, Korea
13. 近藤 豊, 発がん過程における環境因子とエピゲノム異常, 環境エピゲノミクス研究会 第7回 定例会, 2012年5月12日, 東京都三鷹市
14. Kondo Y, Polycomb repressive complex 2-mediated epigenetic plasticity contributing to establishment of tissue heterogeneity in glioblastoma. The 3rd Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Diseases, 2012年4月21日, Shanghai, China
15. Kondo Y, Epigenetic plasticity contributing to establishment of tissue heterogeneity in glioblastoma. The 15th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference. Epigenetics in Cancer, 2012年2月23日, Maryland, USA
16. 近藤 豊, 「がんの基礎研究からTRへ」がん細胞のエピゲノム異常を標的とした新しい治療戦略, 第3次対がん10か年総合戦略(平成16年~25年度) 文部科学省新学術領域研究「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」, 2012年1月31日, 東京都千代田区
17. Kondo Y, Epigenetic regulatory network in plastic interconvertibility between tumor-initiating cells and non-tumor-initiating cells, US-Japan Cancer Genomics Workshop, 2011年10月26日, 京都府京都市
18. 近藤 豊, 「Cancer epigenetics: Breakthroughs in basic research and clinical application」Epigenetic regulation of plastic cancer-initiating cell function. 第70回日本癌学会学術総会, 2011年10月4日, 愛知県名古屋市
19. Kondo Y, Epigenetic networks regulate plasticity of cancer stem cell in glioblastoma. 13th Japanese-German Cancer Workshop, 2011年9月18日, 広島県広島市
20. Kondo Y, Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with clinical outcome of lung adenocarcinoma. Sapporo Cancer Epigenetics Seminar of the A3 Foresight Program, 2011年6月9日, 北海道札幌市
21. Kondo Y, Epigenetic switch regulates plasticity of cancer stem cell in human glioblastoma. 6th Asian Epigenomics Meeting, 2011年5月17日, 熊本県熊本市
22. Kondo Y, 「Cancer Epigenetics」Plastic but Stable Epigenetic Regulation in Human Cancers. Center for Cancer

- Epigenetics-Weekly Meeting, 2011年4月1日, Texas, USA
23. 近藤 豊, エピジェネティクスとがん分子標的創薬, 日本がん分子標的治療学会第7回トランスレーショナルリサーチワークショップ, 2011年1月28日, 東京都千代田区
  24. 近藤 豊, エピジェネティクスを標的としたがん治療の実際とその可能性, 第48回日本癌治療学会学術集会, 2010年10月29日, 京都府京都市
  25. 近藤 豊, がんの組織多様性に関わるエピジェネティクス可塑性とその制御機構, BMB2010 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会, 2010年12月10日, 兵庫県神戸市
  26. 近藤 豊, がん細胞におけるエピジェネティクス可塑性とその制御機構, 第69回日本癌学会学術総会, 2010年9月23日, 大阪府大阪市
  27. 近藤 豊, エピジェネティクス制御機構を標的とした新規がん治療戦略, 第14回日本がん分子標的治療学会, 2010年7月7日, 東京都江戸川区
  28. Kondo Y, Clinical implications of DNA Methylation in Gastrointestinal Malignancies. 5th Asian Epigenomics Meeting and A3 Symposium, 2010年6月21日, Jeju, Korea
  29. Kondo Y, Epigenetic Plasticity Regulated by Polycomb Repressive Complex-mediated Histone H3 Lysine 27 Trimethylation as a Novel Target for Human Glioblastoma Treatment. Japan Society for Promotion of Science (JSPS) Sweden-Japan Joint Colloquium, 2010年9月7日, Stockholm, Sweden
  30. Kondo Y, Epigenetic Plasticity Regulated by Polycomb Repressive Complex Contributes to Tissue Heterogeneity in Human Glioblastoma. The 41st International Symposium of The Princess Takamatsu Cancer Research Fund, 2010年11月18日, 東京都千代田区

〔図書〕(計 3件)

1. Okamoto Y, Kondo Y. World Scientific Publishing, From Inflammation to Cancer, 2012, 20
2. Kondo Y. Nova Science Publishers, Field Cancerization: Basic Science and Clinical Applications, 2010, 15
3. 新城恵子, 近藤 豊, 羊土社, エピジェネティクスのがん診断への応用, 2010, 10

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称: 悪性消化管間質腫瘍の診断用組成物および方法

発明者: 近藤 豊、関戸好孝  
権利者: 近藤 豊、関戸好孝  
種類: 特願  
番号: 2011-095447  
出願年月日: 平成23年4月21日  
国内外の別: 国内

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/10genom\\_seigyoo/index.html#hajimeni](http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/10genom_seigyoo/index.html#hajimeni)

6. 研究組織

(1)研究代表者

近藤 豊 (KONDO, Yutaka)

愛知県がんセンター(研究所)・分子腫瘍学部・室長

研究者番号: 00419897

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

豊田 実 (TOYOTA, Minoru)

札幌医科大学医学部・生化学・教授

研究者番号: 70270676

夏目敦至 (NATSUME, Atsushi)

名古屋大学大学院・脳神経外科学・准教授

研究者番号: 30362255

上杉志成 (UESUGI, Motonari)

京都大学物質-細胞統合システム拠点・教授

研究者番号: 10402926