

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310137

研究課題名(和文) 統合ゲノム解析による大腸癌におけるヒストンメチル基転移酵素の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of a histone methyltransferase in colorectal cancer by comprehensive genome analysis

研究代表者

古川 洋一 (Furukawa, Yoichi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：20272560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,800,000円、(間接経費) 4,740,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、siRNAを用いた遺伝子発現解析により、SMYD3が直接制御する下流遺伝子群の同定を行った。その結果、SMYD3によって発現増加する1543遺伝子を同定し、それらが126個の転写因子で調節されている可能性を示唆していた。更にSMYD3抗体を用いたChIP on chipデータも加えた統合解析により、SMYD3が直接制御する110個の遺伝子を同定した。またインシリコ解析により、SMYD3の発現は細胞周期調節に深く関わっていることが示された。この結果は、SMYD3ががん細胞の増殖に重要な役割を演ずるとともに、その機能抑制が有望ながん治療戦略になることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Expression profile analysis using colon cancer cells treated with SMYD3-specific siRNA identified a total of 1543 genes (entities) that were significantly upregulated by SMYD3. Subsequent in silico analysis using MetaGP revealed that these genes are potentially controlled by 126 transcription factors. Combined with the data of ChIP on chip analysis using anti-SMYD3 antibody, we identified 110 candidates of target genes of SMYD3. In addition, gene ontology and gene set enrichment analyses elucidated that at elevated SMYD3 expression is associated with cell cycle control. These data suggest that SMYD3 plays a crucial role in proliferation of cancer cells and that inhibition of its function should be a rational strategy to treat human cancers.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム医科学

キーワード：疾患関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

がんの発生・進展には遺伝子の変異やゲノムの構造異常の他、DNA やヒストンのメチル化などエピジェネティックな異常が関与している。以前は不可逆的な反応とされていたメチル化が、メチルトランスフェラーゼとデメチラーゼによってダイナミックに制御されていることが明らかとなった。加えて、ヒストン H3 リジン 27 のメチルトランスフェラーゼである enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) の発現が前立腺癌の悪性化にともなって亢進していることや、ヒストン H3 リジン 4 のメチルトランスフェラーゼ myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (*MLL*) 遺伝子領域の染色体相互転座が高頻度に白血病で認められることなどが報告され、腫瘍の発生・進展におけるメチル化異常が注目を浴びてきた。我々は腫瘍の遺伝子発現プロファイル解析結果から、大腸癌、乳癌、肝癌で高頻度に発現増加している新たな分子 SET and MYND-domain containing 3 (SMYD3) を同定し、そのタンパク質がヒストン H3 の第 4 リジンをメチル化することを見出した。また SMYD3 の発現を抑制すると癌細胞にアポトーシスを誘導できることを発見した。しかしながら、がん細胞における SMYD3 の詳細な役割や増殖に関わるメカニズム、正常組織における機能は解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、がん化に関わる SMYD3 の機能とメカニズムを明らかにすることを主目的とした。また大腸がんや肝がん以外の悪性新生物での SMYD3 の役割や、正常な組織における SMYD3 の機能を解明することも研究目的とした。これらの解析は、SMYD3 を標的とした阻害剤開発および、その臨床応用に役立てることを目指している。

3. 研究の方法

次の 4 つのテーマについて解析を行った。

(1) SMYD3 を抑制する siRNA を合成し、その効果によって発現変動する遺伝子群を、マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析により探索した。さらにインシリコ解析技術を取り入れて、それらの遺伝子群に関わる転写因子群を同定するとともに、発現変化に関連する機能を探索した。

(2) SMYD3 がゲノムのヒストンに結合し、ヒストンのメチル化に変化をきたすことが推察された。そこで、SMYD3 によりヒストン修飾に変化がもたらされるゲノム領域を明らかにするため、ChIP on chip 解析を実施した。前述の発現解析の結果と合わせて、SMYD3 がヒストン修飾を介して調節している遺伝子群の同定を試みた。加えて、SMYD3 が調節す

るパスウェイをシステムバイオロジーの手法で解析した。

(3) 大腸がんや肝がん以外の腫瘍の発生における SMYD3 の役割についても検討した。HTLV-1 ウイルス感染が原因となっている成人 T 細胞白血病について、腫瘍発生に関与する HTLV-1 ウイルスの Tat 遺伝子の機能に対し、SMYD3 がどのような影響を及ぼすか検討した。

(4) ゼブラフィッシュの受精卵を用いて、発生における Smyd3 の役割を解析した。特異的なモルフォリーノを用いて Smyd3 を抑制し、表現型解析を行った。さらに表現型に異常を認められた心臓と骨格筋について、その発生・発達に関わる分子の発現変化を *in situ* hybridization などで行った。

4. 研究成果

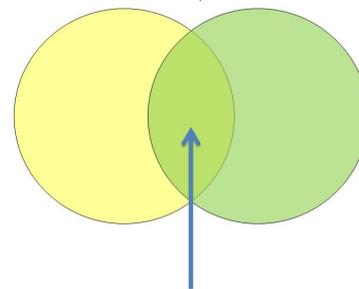
(1) siRNA を用いた発現解析によって、SMYD3 が発現制御する多数の遺伝子群を同定した。その中で、SMYD3 により発現が有意に増加する遺伝子 1543 種類を同定した (図 1)。これら遺伝子群の情報をもとに、パスウェイ解析を行った。その結果、癌抑制遺伝子である VHL 経路 ( $p=1.2 \times 10^{-14}$ )、癌遺伝子である EGFR-Ras 経路 ( $p=5.8 \times 10^{-5}$ )、転写因子である NF- $\kappa$ B の経路 ( $p=7.4 \times 10^{-5}$ ) に関わる分子と相関することが示された。

また発現変動する遺伝子の転写調節領域に存在する転写因子結合配列から、発現変動と関連する 126 種類の候補転写因子が予測された。

(2) SMYD3 抗体を用いた ChIP on chip 解析を行い、SMYD3 が結合するヒストンの存在領域を探索した。ChIP で 2 倍以上の濃縮されたゲノム領域が 4070 箇所 (プローブ) 同定され、それらの領域と遺伝子発現変化が関連する遺伝子を調べたところ、135 プローブ、110 遺伝子が同定された (図 1)。

(図 1)

ChIP-on-chip	Expression
4070 probes:	1543 probes:
Signals > 2-fold	downregulated by SMYD3
(SMYD3 Ab vs w/o Ab)	siRNAs



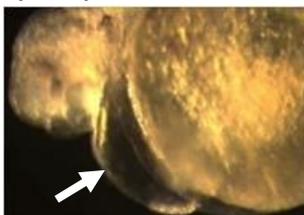
135 probes (110 genes)

これらの遺伝子には、SMYD3 によって直接発現制御される下流遺伝子が多く含まれていると考えられる。さらにこれらの遺伝子の機能やパスウェイをインシリコで解析した結果、細胞周期との関連が示唆された。またパスウェイ解析で Chk1, 2 のとの相関も予測された。今後はこれらの検証を行っていく必要がある。

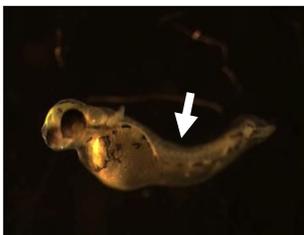
(3) HTLV1 感染による ATL の発症においては、HTLV-1 ウイルスタンパクである Tat が重要な働きを演じている。そこで SMYD3 が Tat の機能や発現に影響するかどうかを調べるため、SMYD3 と Tat が結合するかどうかを調べた。その結果、SMYD3 と Tat と結合し、その細胞内局在と NF- $\kappa$ B シグナルを増強することが示された。この発見は、SMYD3 が大腸がんや肝がんのみならず、ウイルスによる発がんにも関与することを示唆している。

(4) ゼブラフィッシュを用いて、発生期における Smyd3 の発現とその機能を調べた。まず Smyd3 は発生過程の初期からほぼすべての組織で発現をしていた。また、その発現をモルフォリンを用いて抑制したところ、心臓周囲の浮腫(図 2)と、体幹の変形が認められた(図 3)。また心筋の発達に参与する myod、myog の発現に異常を認めた。以上の成果から、Smyd3 が心臓の発達や骨格筋の発達に重要であることが示された。

(図 2)



(図 3)



これらの知見は、SMYD3 ががん細胞の増殖に、特定の遺伝子群の発現を制御することで、特に細胞周期に関わっていることを示唆している。また発生段階で、心臓の形成に関わることから、その機能抑制の際には、心機能の評価を必要であることも意味している。更に詳細な機能解析や評価が必要であるが、本研究で得られた成果は、今後の治療薬開発に役立つものと思われる。

## 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 10 件)

Takahashi N, Yamaguchi K, Ikenoue T, Fujii T, Furukawa Y. Identification of two Wnt-responsive elements in the intron of RING Finger Protein 43 (RNF43) gene. PLoS ONE, 9: e86582, 2014.

Yamaguchi K, Yamaguchi R, Takahashi N, Ikenoue T, Fujii T, Shinozaki M, Tsurita G, Hata K, Niida A, Imoto S, Miyano S, Nakamura Y, Furukawa Y. Overexpression of cohesion establishment factor DSCC1 through E2F in colorectal cancer. PLoS ONE, 9: e85750, 2014.

Shigeyasu K, Tanakaya K, Nagasaka T, Aoki H, Fujiwara T, Sugano K, Ishikawa H, Yoshida T, Moriya Y, Furukawa Y, Goel A, Takeuchi H. Early detection of metachronous bile duct cancer in Lynch syndrome: report of a case. Surg Today. Jul 31, 2013.

Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Michizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K. Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia patient-derived pluripotent stem cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110(8):3023-3028, 2013.

Yamamoto S, Ebihara Y, Mochizuki S, Kawakita T, Kato S, Ooi J, Tojo A, Yusa N, Furukawa Y, Oyaizu N, Watanabe J, Sato K, Kimura F, and Tsuji K. Quantitative PCR detection of CEP110-FGFR1 fusion gene in a patient with 8p11 syndrome. Leukemia & Lymphoma, 54(9): 2068-9, 2013.

Takahashi M, Furukawa Y, Shimodaira H, Sakayori M, Moriya T, Moriya Y, Nakamura Y, Ishioka C. Aberrant splicing caused by a MLH1 splice donor site mutation found in a young Japanese patient with Lynch syndrome. Fam Cancer 11 ( 4 ) :559-64, 2012.

Tanikawa C, Nakagawa H, Furukawa Y, Nakamura Y, Matsuda K. CLCA2 as a p53-inducible senescence mediator. Neoplasia. 14(2):141-9, 2012.

Yamaguchi K, Sakai M, Kim J, Tsunesumi S, Fujii T, Ikenoue T, Yamada Y, Akiyama Y, Muto Y, Yamaguchi R, Miyano S, Nakamura Y, Furukawa Y. MRG-binding protein contributes to colorectal cancer development. Cancer Sci. 102(8):1486-92, 2011.

Fujii T, Tsunesumi S, Yamaguchi K, Watanabe S, & Furukawa Y; Smyd3 is required for the development of cardiac and

skeletal muscle in zebrafish. PLoS One 6(8): e23491, 2011.

Yamamoto K, Ishida T, Nakano K, Yamagishi M, Yamochi T, Tanaka Y, Furukawa Y, Nakamura Y, Watanabe T. SMYD3 interacts with HTLV-1 Tax and regulates sub-cellular localization of Tax. Cancer Science 102: 260-266, 2011.

〔学会発表〕(計 10 件)

家族性腫瘍 基礎と臨床 (第 22 回日本癌学会市民公開講座 2013 年 10 月 5 日 横浜)

患者さんひとりひとりの治療のために (第 22 回日本癌学会市民公開講座 2013 年 10 月 5 日 横浜)

リングフィンガープロテイン 43 の転写調節機構 (第 22 回日本癌学会市民公開講座 2013 年 10 月 3 日 横浜)

Identification of a single nucleotide polymorphism associated with SIAJ2 expression. (第 22 回日本癌学会市民公開講座 2013 年 10 月 4 日 横浜)

次世代シーケンサーがもたらす近未来の医療 (第 19 回日本家族性腫瘍学会 学術集会 2013 年 7 月 27 日 大分)

DSCC1 is a novel biomarker for chemo-resistant colorectal cancer. (The 9<sup>th</sup> AACR-JCA- Joint Conference, 2013 年 2 月 23 日 Hawaii USA)

DSCC1 promotes survival of colorectal cancer cells through the inhibition of BCL2 expression. (The 8<sup>th</sup> Symposium on Cancer Research and Therapy, 2012 年 11 月 10 日 東京)

Identifying the target of histone methyltransferase SMYD3 in colorectal cancer cells. (第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 21 日 札幌)

Smyd3 is required for the development of heart and skeletal muscle in zebrafish (KEYSTONE SYMPOSIA Epigenomics, January 18, 2012, Keystone, Colorado, USA)

Defective in sister chromatoid cohesion 1 homolog (DSCC1), a novel target of E2F1 is overexpressed in colorectal cancer. (第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 4 日 名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/furukawa/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古川 洋一 (FURUKAWA, Yoichi)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号: 20272560

(2) 研究分担者

池上 恒雄 (IKENOUE, Tsuneo)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号: 80396712

(3) 研究分担者

山口 類 (YAMAGUCHI, Rui)

東京大学・医科学研究所・講師

研究者番号: 90380675

(4) 研究分担者

山口 貴世志 (YAMAGUCHI, Kiyoshi)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号: 50466843