

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590085

研究課題名(和文) 発がん初期に発現上昇するクロマチン関連因子の細胞がん化・防御に与える影響

研究課題名(英文) Roles epigenetics regulatory factors induced hepatocarcinogenesis in malignant transformation and defense against cancer.

研究代表者

長田 茂宏 (Osada, Shigehiro)

名古屋市立大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40263305

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)： ヒトを含む真核生物の遺伝情報の担い手であるDNAは、ヒストンタンパク質に巻きついてクロマチンを形成して核内に貯蔵されている。クロマチンからの遺伝子発現にはヒストンの化学修飾やヒストンに類似のヒストンバリエントが関与する。このヒストンの化学修飾やヒストンバリエントの発現異常はがんを含めた様々な疾病に関与する。本研究により、ヒストンメチル化酵素が発がん化に関与する転写に関連する因子と相互作用することが明らかとなった。また、がんの促進・防御の両面の作用を持つオートファジー誘導過程において、ヒストンバリエントの発現が減少することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： Nuclear DNA wraps around histone proteins and is packaged into chromatin. Gene expression is regulated by structure changes of chromatin mediated by the chemical modification of histone, the replacement of canonical histone by histone variants, etc. Dysregulation of histone modification and expression of histone modification enzymes and histone variants leads to diseases including cancer. In this study, we revealed that histone methyltransferase interacted with transcription factors in concerned with carcinogenesis. Further, we found that expression of histone variants was decreased during autophagy, which is involved in promotion and suppression of cancer.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：エピジェネティクス 細胞がん化 ヒストン クロマチン アセチル化 メチル化 ヒストンバリエント

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の核内 DNA はヒストンタンパク質にまきついたヌクレオソームを形成し、それが連なった高次構造であるクロマチンに存在している。生命現象の基本となる遺伝子の発現はこのクロマチンから起きる。ヒストンは DNA を核内に収納する機能を持つだけでなく、クロマチンの弛緩・収縮の制御にも関与する。そして、このクロマチンの弛緩・収縮は、遺伝子の配列によらずに、ヒストンの化学修飾変化などから制御されている。このような DNA の配列変化を伴わない、娘細胞や次世代に継承可能な遺伝子発現制御は、エピジェネティクス制御といわれ、生命現象の理解に最も重要な制御のひとつと考えられている。

エピジェネティクスの制御には、ヒストンのアセチル化やメチル化などの化学修飾に加え、DNA メチル化、ATP 依存的クロマチンリモデリング因子、ヒストンに類似のヒストンバリエーションなどが関与する。エピジェネティクスは遺伝子発現制御に関わることから、多くの生命現象に関与し、この異常はがんを含めた多くの疾患に影響を与える。

がんは遺伝子の変異により生じることが明らかにされている。それに加えて、最近の研究により、エピジェネティクスの異常もがん化に関与することが明らかにされている。がん組織におけるヒストン修飾の変化が解析されており、実際にヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤ががん治療に用いられている。しかし、発がん初期におけるエピジェネティクス制御に関わる因子については不明な点が多い。また、これまでのがん研究により、発がん機構の解明にはがん化促進機構の解明だけでなく、発がん防御機構の破綻についても解析することが必要とされている。

発がん初期に発現変化するクロマチン関連因子を同定するために、研究代表者はこれまでに、ラットに肝化学発がんを誘導させ、腫瘍マーカータンパク質 glutathione-S-transferase placental form (GST-P) が発現上昇している肝臓を用いた解析を行った。そして、そこで発現上昇しているクロマチン関連因子を複数単離している。これらの中には、ヒストンアセチル化酵素 histone acetyltransferase binding to ORC (HBO1)、monocytic leukemia zinc-finger protein (MOZ)、ヒストンメチル化酵素 coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (CARM1)、SET domain containing lysine methyltransferase 8 (SETD8/PR-SET7)、ヒストンバリエーション H2A histone family, member Z (H2A.Z) などが含まれる。そして、これらの因子は、発がんに対して促進にも防御にも働くことを示している。

## 2. 研究の目的

本課題においては、発がん初期に発現上昇するクロマチン関連因子が細胞のがん化、防御に与える影響、およびこれらの因子の発現制御機構を明らかにすることを目的としている。そして、その成果をがん治療、がんの予防や進行の予測に役立てるための基盤研究とする。

これまでに CARM1 が肝がん由来細胞の増殖促進に関与することを明らかにしている。また、CARM1 が転写因子 Nrf2 related factor 2 (Nrf2) を介して MOZ と協調的に、腫瘍マーカーである GST-P のプロモーター活性を上昇させることを明らかにしている。そこで、CARM1 のプロモーター活性化機構を解明することを目的に相互作用因子との関係を検討した。

恒常性の維持、その破綻ががん化に関与する現象として、オートファジー（自食作用）があげられる。オートファジーはタンパク質やオルガネラなどの分解システムのひとつで、飢餓状態におけるエネルギー確保や細胞成分の品質管理に関与する。その破綻は酸化ストレスや DNA 不安定化から細胞がん化を導く。すなわち、オートファジーは細胞がん化の防御機構として働く。一方で、高い代謝活性を必要とするがん細胞では、オートファジーによるエネルギー供給はがん細胞の生存に役立つ。すなわち、オートファジーはがん化の促進と防御の両方の役割を示す。クロマチン関連因子がオートファジーに与える影響を明らかにするために、オートファジー誘導時におけるクロマチン関連因子の発現変化を検討した。

上記解析により、オートファジー誘導時に H2a.z.1、H2a.z.2 の発現が減少することが明らかとなった。H2a.z.1、H2a.z.2 は異なる遺伝子として存在するが、そのアミノ酸配列は哺乳類においては、2 アミノ酸もしくは 3 アミノ酸異なるのみである。しかし、ノックアウトマウスの表現型が異なることなどから、これらの因子の機能は異なると考えられている。しかし、これらの因子についての解析は、H2a.z.1 のみが行われているか、区別なく行われている場合が多い。そこで、これらの因子の違いを明らかにするために、発現制御機構の面から検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) CARM1 相互作用因子に関する解析

CARM1 が Nrf2 と協調的に Gst-p のプロモーター活性を上昇させることから、これらの因子が相互作用する可能性が考えられたので、GST プルダウン法により相互作用を検討した。大腸菌により発現させた GST-Nrf2 融合タンパク質と in vitro 転写翻訳系により蛍光標識した CARM1 を用いて行った。また、Nrf2 とヘテロ二量体を形成する v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K (MafK) についても同様

に行った。

ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞に Flag-CARM1 もしくは Myc-PR-SET7 発現プラスミドを導入し、抗 Flag 抗体、抗 Myc 抗体、抗 $\beta$ -カテニン抗体を用いた免疫沈降実験により、これらの因子の相互作用を検討した。

#### (2) CARM1 がプロモーター活性に与える影響

HeLa 細胞に Flag-CARM1 もしくは Myc-PR-SET7 発現プラスミドを、 $\beta$ -カテニンを介したプロモーター活性を測定できるレポータープラスミドとともに導入し、これらの因子の相互作用がプロモーター活性に与える影響を検討した。

#### (3) CARM1 細胞内局在に関する解析

DNA 損傷薬剤存在下における CARM1 の局在を、ラット肝がん由来細胞 Morris5123D-TC に Flag-CARM1 を導入し、抗 Flag 抗体を用いた免疫染色法により検討した。

#### (4) オートファジー誘導時の遺伝子発現変化の解析

オートファジーの誘導にはラット胎仔肝臓由来細胞 RLC-18、ラット肝がん由来細胞 H4IIE を用いた。オートファジーの抑制に関わる mammalian target of rapamycin (mTOR) の阻害剤であるラパマイシンの添加、もしくは血清除去培地を用いてオートファジーの誘導を行った。オートファジーの誘導は、microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) のタイプ (LC3-I) からタイプ (LC3-II) への変換をウエスタンブロット解析により検出することにより行った。

オートファジー誘導細胞およびコントロール細胞から RNA および cDNA を調製し、定量 PCR により各因子の発現量を定量した。

#### (5) H2a.z のプロモーター解析

ラットおよびヒト H2a.z のプロモーター領域を単離し、各種欠損変異体をルシフェラーゼレポータープラスミドに組込んだ。ヒトについては、H2a.z.1 および H2a.z.2 のプロモーターを単離した。ラットレポータープラスミドについては、ラット肝がん由来細胞株 H4IIE、Morris、ラット線維芽細胞 3Y1、ラット胎仔肝臓由来細胞 RLC-18 に導入し、ヒトレポータープラスミドについては、HeLa 細胞およびヒト肝がん由来 HepG2 細胞に導入した。

### 4. 研究成果

#### (1) CARM1 相互作用因子とプロモーター活性に関する解析

GST-Nrf2 および GST-MafK を用いた GST プルダウン法の結果、GST-Nrf2 は CARM1 と相互作用することが示された。ま

た、非常に弱いながらも GST-MafK にも結合する可能性が示された。これらの相互作用の検討を Nrf2/MafK 結合配列存在下において行ったが、結合配列の存在は CARM1 との相互作用に影響を与えなかった。

CARM1、PR-SET7 とともに発がん初期で発現上昇する因子として単離したが、その機能的相互作用については明らかにされていない。がんの促進に関わる因子として知られている $\beta$ -カテニンは様々なシグナルの情報伝達分子として働き、転写共役因子として機能する。異なる研究グループから、 $\beta$ -カテニンが CARM1、PR-SET7 と相互作用することが最近報告された。実際に HeLa 細胞においても $\beta$ -カテニンは CARM1、PR-SET7 と相互作用することを明らかにした。しかし、CARM1 と PR-SET7 の相互作用は検出されなかった。また、これらの因子を用いたレポーターアッセイの結果、協調的作用は検出されなかった。 $\beta$ -カテニンは glycogen synthase kinase-3 (GSK-3 $\beta$ ) を介した系により分解されることが知られていることから、GSK-3 $\beta$  阻害剤存在下における解析も試みたが、同様に協調作用は検出されなかった。これらのことから、CARM1 と PR-SET7 は同一の複合体には存在しないで、 $\beta$ -カテニンとともにがん化の制御に寄与していると考えられた。

#### (2) CARM1 細胞内局在に関する解析

CARM1 は核内において転写共役因子として機能することが知られている。がん進行部位においては核のみではなく細胞質においても発現していることが明らかとなった。しかし、CARM1 局在変化の分子機構は明らかにされていない。CARM1 によるがん促進機構を解明するために、DNA 損傷誘発時における CARM1 の局在変化を検討した。エトポシドにより DNA 損傷を誘発させた状況下において、CARM1 の局在に顕著な変化は観察されなかった。また、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 存在下においても大きな変化は観察されなかった。

#### (3) オートファジー誘導時におけるクロマチン関連因子の発現に関する解析

RLC-18 細胞にラパマイシンを添加し、オートファジーを誘導させた際のヒストン修飾酵素の発現変化を検討したところ、HBO1、MOZ、CARM1、PR-SET7 とともに顕著な発現変化が観察されなかった。しかし、ヒストンバリエーションである H2a.z.1 および H2a.z.2 とともに、ラパマイシン添加 6 時間後には発現が減少した。肝がん由来細胞 H4IIE においても同様に減少することが示された。

血清除去により、オートファジーを誘導させた際に、血清除去 6 時間では H2a.z.1、H2a.z.2 とともに発現に変化が観察されなかったが、48 時間後には発現が減少した。この現象は H4IIE 細胞、RLC-18 細胞ともに観察された。

(4) H2a.z の発現制御領域に関する解析  
がん化の防御と促進の両面の役割を示す  
オートファジーの過程において、H2a.z.1、  
H2a.z.2 の発現が減少したことなどから、こ  
れらの遺伝子の発現制御機構を解析する必  
要がある。

ラットについては、H2a.z.1 の制御領域に  
ついての解析を行った。調べた4種類の細胞  
において、ともに転写開始点上流230塩基ま  
での領域に基礎的なプロモーター活性が存  
在した。非肝がん細胞においては、上流約1.8  
kbまでの領域と上流230塩基までの領域の  
活性はほぼ同程度であったが、肝がん由来細  
胞においては、上流約1.8kbまでの領域の活  
性は上流230塩基までの領域に比べて高い活  
性を示した。このことから、230塩基から-1.8  
kbまでの領域には、肝がんにおいて発現を上  
げるシスエレメントが存在する可能性が考  
えられた。この領域にはがん遺伝子産物  
c-Myc の結合可能な配列が三か所存在し、そ  
の配列の変異はプロモーター活性を減少さ  
せた。

H2a.z.1 の発現は HeLa 細胞と HepG2 細  
胞で同程度であったが、H2a.z.2 については  
HepG2 細胞の方が高い傾向を示した。  
H2a.z.1、H2a.z.2 ともに約250塩基までの  
領域に基礎的なプロモーター活性が存在し  
た。H2a.z.1 の上流約2kbまでの領域がプロ  
モーター活性に与える影響は HeLa 細胞と  
HepG2 細胞においてはほぼ同様であったが、  
H2a.z.2 の上流約2kbが与える影響はこれら  
二つの細胞で異なっていた。これらのことか  
ら、少なくともこれらの細胞の間において、  
H2a.z.1、H2a.z.2 の発現制御機構が異なるこ  
とが明らかとなった。

#### (5) まとめ

本研究により、発がん初期に発現上昇する  
ヒストンメチル化酵素 CARM1 が転写因子  
Nrf2 と相互作用することが明らかとなった。  
また、CARM1 はβ-カテニンとも相互作用し  
たことから、β-カテニンを介したがん促進に  
影響を与えることが考えられた。CARM1 は  
がん進行に伴い、核のみではなく細胞質にお  
いても発現が上昇する。DNA 損傷時におけ  
る顕著な局在変化は観察されなかったが、細  
胞質における発現に影響を与える候補分子  
を発見した。今後、この分子を介した細胞質  
発現機構の解明がCARM1を介したがん化促  
進機構の解明につながると考えられる。

発がんの促進と防御の両面の役割を果た  
すオートファジー誘導過程において、ヒスト  
ンバリエントH2a.zの発現が減少することが  
示された。クロマチン関連因子がオートファ  
ジーに与える影響は不明な点が多く残され  
ているので、H2a.zがオートファジーに与え  
る影響を明らかにすることは、新たながん化  
の促進・防御の制御機構の解明につながると  
考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2件)

Osada, S., Suzuki, S., Yoshimi, C.,  
Matsumoto, M., Shirai, T., Takahashi,  
S., and Imagawa, M. Elevated  
expression of coactivator-associated  
arginine methyltransferase 1 is  
associated with early  
hepatocarcinogenesis.

***Oncol. Rep.***, 査読有、  
Vol. 30, No. 4, 2013, pp. 1669-1674.

Osada, S., Kageyama, K., Ohnishi, Y.,  
Nishikawa, J., Nishihara, T., and  
Imagawa, M. Inositol phosphate kinase  
Vip1p interacts with histone chaperone  
Asf1p in *Saccharomyces cerevisiae*.

***Mol. Biol. Rep.***, 査読有、  
Vol. 39, No. 4, 2012, pp. 4989-4996.

[学会発表](計 8件)

長谷川郁恵、ヒストンメチル化酵素  
CARM1 と転写調節因子 Nrf2 の相互作用、  
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学  
会東海支部合同学術大会 2013  
(2013年11月10日、鈴鹿)

芝田裕一、オートファジー誘導時における  
ヒストンバリエント H2A.Z 発現量の解析、  
日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学  
会東海支部合同学術大会 2013  
(2013年11月10日、鈴鹿)

新海大智、ラット肝がん細胞株を用いたヒ  
ストンバリエント H2A.Z のプロモーター  
解析、日本病院薬剤師会東海ブロック・日  
本薬学会東海支部合同学術大会 2012  
(2012年11月18日、岐阜)

新海大智、肝化学発がん過程で発現上昇す  
るヒストンバリエント H2A.Z のプロモ  
ーター解析、  
第132年会 日本薬学会  
(2012年3月29日、札幌)

長田茂宏、肝化学発がん過程において発現  
上昇するヒストンメチル化酵素 CARM1  
の機能解析、  
第84回日本生化学会大会  
(2011年9月23日、京都)

長田茂宏、Identification of factors  
interacting with histone chaperon Asf1p.  
第2回高次クロマチン研究会  
(2011年8月9日、蒲郡)

[図書](計 1件)

長田茂宏、化学同人、  
第7章 がん転写因子、  
『がん増殖と悪性化の分子機構』

(宮澤恵二・伊東進 編) 2012、pp. 93-102.

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長田 茂宏 (OSADA, Shigehiro)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・  
准教授  
研究者番号：40263305

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし