

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591009

研究課題名(和文)膵がん細胞の悪性度を制御するヒストン修飾経路の同定と標的治療への戦略

研究課題名(英文)Identification of a histone modifier that affects pancreatic cancer progression

研究代表者

立石 敬介 (TATEISHI, Keisuke)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20396948

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)：膵がん細胞の悪性度に関わるエピジェネティクス関連分子を探索する目的で、膵がん細胞で様々なクロマチン修飾因子に対するshRNAの安定発現株を樹立し表現型の変化をスクリーニングした。結果としてヒストン修飾分子KDM6Bのノックダウンにより膵がん細胞の浸潤能および腫瘍形成能が増強することを見出した。さらには発現アレイの解析からKDM6Bの標的遺伝子としてCEBPAを同定した。CEBPAのノックダウンはKDM6Bとほぼ同じ表現型を呈し、その遺伝子発現調節領域へのKDM6Bの結合も確認された。以上からヒストン修飾経路の異常が膵がん細胞の悪性度に影響する分子機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a deadly disease where virtually all tumors harbor mutations in KRAS and other tumor suppressor genes. Though recent studies provide evidence that epigenetic changes, as well as genetic mutations, are involved in the initiation and progression of cancer, the impact of epigenetic alteration in PDAC is yet to be determined. Here we focused on the histone H3 Lys 27 (H3K27) demethylase KDM6B. KDM6B is a putative tumor suppressor and previous reports have shown that KDM6B is upregulated under oncogenic KRAS mutations and activates tumor suppressor p16/CDKN2A, thus inducing oncogene-induced senescence (OIS) in premalignant lesions. In this work, we identified a novel tumor suppressive mechanism by KDM6B, distinct from the KRAS-KDM6B-p16 mediated induction of OIS. We provide evidence that loss of KDM6B-C/EBP axis enhances tumorigenesis in PDAC cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：膵がん ヒストン修飾 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

膀胱がんは、*K-ras* 遺伝子の活性型変異に様々な腫瘍抑制遺伝子の異常が加わる多段階膀胱がんの寄与が考えられ、それは様々な遺伝子改変マウスモデルの交配でヒト膀胱がん類似の腫瘍発生を再現できることでも裏付けられている (Hingorani et al., Cancer Cell 2003 & 2005; Aguirre et al., Genes Dev 2003; Bardeesy et al., PNAS 2006; Ijichi et al., Genes Dev 2006)。一方、膀胱がんの悪性度については、影響を与える様々な候補遺伝子が報告されているが、それらの発現変化の原因としてはジェネティックな異常よりむしろエピジェネティックな異常であることが多い。そのエピジェネティックな転写制御については2006年にヒストン脱メチル化酵素の発見という大きなブレイクスルーがあり、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化からなるヒストンの主たる翻訳後修飾のすべてが可逆性であることが示された。いわゆるエピジェネティックな遺伝子発現制御はDNAメチル化のみならずこの可逆的なヒストン修飾パターンが重要であることが明らかになってきた。

申請者は過去の論文で、ヒストンH3の27番目リジンのメチル化に結合するポリコム複合体の構成因子Bmi1が、消化器がん病変の悪性度に比例してその発現量を増すことを報告した (Tateishi et al. Clin.Cancer.Res. 2006;12(23):6960-6.)。またJARID1bがH3の4番目リジンの脱メチル化酵素であると明らかにするとともに、その分子と乳がん細胞の増殖との関連を報告した (Yamane, et al. Mol Cell 2007;25(6):801-12.)。またがんに限らず肥満及びエネルギー代謝においてH3の9番目リジンの脱メチル化酵素が重要であることを報告し (Tateishi et al. Nature 2009;458(7239):757-61) 様々な細胞系譜におけるヒストン可逆性の意義についても発表してきた。

本来、がんは不均一で多様な細胞集団であるといわれている。昨今、がん組織中の“がん幹細胞”の可能性が提唱されているが、これもがん細胞のheterogeneityから発した概念と想像される。例えば治療抵抗性を引き起こす細胞群に“がん幹細胞性”が関与する、という考えもそのひとつであろう。面白いことに、がん細胞集団中の抗がん剤抵抗性クローンの維持にヒストン脱メチル化酵素RBP2が重要な役割を持つと報告され、またヒストン脱メチル化酵素JARID1bの発現の不均一性がメラノーマの腫瘍形成能に関与する報告もなされた。同時にこの数年間にヒストン修飾因子群のがんにおける変異が次々に報告された。さらには転座や増幅、LOHなども様々な癌で報告され、食道がんではJMJD2Cの遺伝子増

幅が認められる。これらの知見はいずれも、ヒストン修飾調節の破綻ががん細胞の特性に関わる可能性を強く示唆するものである。しかしながらヒストン修飾が、がんの特性に重要な役割を持つという、その具体的な分子メカニズムは、いまだ明らかになっていない。今回のプロジェクトにおいて申請者は、数十にもおよぶヒストンメチル化、脱メチル化酵素群などから順次そのshRNA搭載レンチウイルスを作成し、それらを用いて膀胱がん細胞株で安定ノックダウン株を樹立してきた。その上で、がん細胞の形質変化をもたらすヒストン修飾酵素をスクリーニングしたところ、いくつかの分子のノックダウンによる表現型の変化を同定した。なかでも本研究ではKDM6Bノックダウン膀胱がん細胞の表現型に焦点を当てる。

2. 研究の目的

膀胱がん細胞の悪性度に関わるエピジェネティックな遺伝子制御異常を探索する目的でヒストン修飾酵素群のshRNAパネルを作成、膀胱がん細胞株でその安定発現株を樹立して表現型の変化をスクリーニングしてきた。その結果、ノックダウンにて膀胱がん細胞の浸潤能、腫瘍形成能を明らかに増加させるヒストン修飾分子を同定した。本研究ではその分子の下流の標的遺伝子を含めたメカニズムを明らかにし、新たな治療標的としての可能性を追求する。さらには、臨床検体におけるその分子の発現状態と病態との関係についても解析する。

3. 研究の方法

(1) KDM6Bノックダウン細胞の表現型解析
KDM6Bノックダウン膀胱がん細胞の表現型を二つの異なるノックダウン配列から樹立し、複数の消化器がん細胞株において表現型が再現されるかどうかを検討する。

(2) 網羅的発現アレイによる表現型関連転写因子の同定

KDM6Bノックダウン細胞の表現型に関与する転写因子の決定

KDM6Bノックダウンによって獲得された形質に関与する分子群を抽出するため、これまでにKDM6Bノックダウン細胞とランダムコントロール細胞との間で、網羅的な遺伝子発現プロファイルを行う。

KDM6Bと転写因子との相関関係の検討

抽出された標的遺伝子のプロモーター領域のヒストン修飾プロファイルおよびKDM6Bの結合についてChIP assayによって検討する。

(3) 臨床検体を用いたKDM6B発現の検討と標的遺伝子発現および組織所見との相関の検討

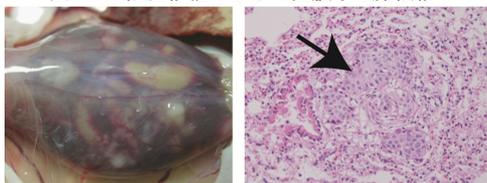
実際の臨床膀胱がん腫瘍検体においてKDM6B発現をRT-PCR、ウエスタンブロット、免疫染

色によって検討する。浸潤能や転移能との関連が実験から示唆されることを踏まえ、原発巣内での発現パターンを比較するのみならず腹膜播種や転移巣での発現とも比較する。

4. 研究成果

- (1) KDM6B ノックダウン細胞の表現型解析
 KDM6B ノックダウン膵がん細胞では *in vitro* での遊走能や浸潤能が増加した。また *in vivo* の検討でも皮下移植されたノックダウン細胞はコントロールでは見られない著明な腹膜播種や血性腹水をきたし、膵への同所移植では肝・肺転移を引き起こした。さらにはコントロール細胞においては見られなかった単一細胞からの sphere 形成能を獲得していた。希釈系列の細胞群を用いた *in vivo* 腫瘍形成能においても明らかなその増加を示していた。これらの表現型は二つの異なるノックダウン配列から樹立された細胞株に共通してみられており、KDM6B に特異的なものと考えられる。さらに複数の膵がん細胞株においても同様の表現型が再現された。

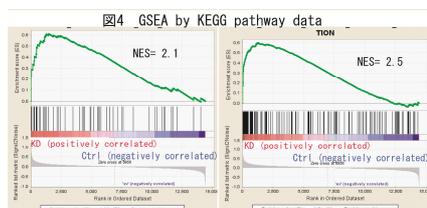
図2 KD細胞移植による血性腹水と肺転移



- (2) 網羅的発現アレイによる表現型関連転写因子の同定

KDM6B ノックダウン細胞の表現型に 関与する転写因子の決定

発現アレイデータを基にした GSEA 解析によると、ノックダウン細胞では転写因子 C/EBP の下流遺伝子セットが高い NES と有意差をもって誘導されていた。



C/EBP を KDM6B ノックダウン細胞 (Puromycin 選別) に、レトロウイルスで過剰発現 (Hygromycin 選別) した株を樹立したところ、KDM6B ノックダウンでみられた表現型がその過剰発現によりレスキューされた。次に C/EBP のノックダウン細胞を樹立し、KDM6B ノックダウン細胞の表現型が再現されるかどうかを検討したところ、複数の種類の細胞株において再現された。

KDM6B と転写因子との相関関係の 検討

C/EBP のプロモーター領域に対してヒ

ストン修飾抗体および KDM6B などの抗体を用いて ChIP アッセイを行った結果、プロモーターへの KDM6B の結合およびヒストン修飾が確認され、またノックダウンで影響を受けることが確認された。これにより C/EBP が KDM6B による発現制御を受けることが示唆された。

- (4) 臨床検体を用いた KDM6B 発現の検討と
標的遺伝子発現および組織所見との相関
の検討

ヒト臨床検体の検討では KDM6B の発現は前がん病変で高い一方、膵がんでは低分化ながん組織ほど発現が低下することがわかった。このことはノックダウンにより浸潤能や転移能が増加することと矛盾しないと考えられた。さらに重要なことに、KDM6B と C/EBP の発現が性の相関を示していた。このことから、ヒト膵がんにおいても両者の発現の相関が膵がん細胞の生物学的表現型に関わっている可能性が示唆された。

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20件)

Nakai Y, Isayama H, Sasaki T, Takahara N, Hamada T, Uchino R, Mizuno S, Miyabayashi K, Yamamoto K, Mohri D, Kogure H, Yamamoto N, Hirano K, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Koike K. A retrospective analysis of early CA19-9 change in salvage chemotherapy for refractory pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013 Oct 12.

Takahara N, Isayama H, Nakai Y, Sasaki T, Hamada T, Uchino R, Mizuno S, Miyabayashi K, Kogure H, Yamamoto N, Sasahira N, Hirano K, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Koike K. A retrospective study of S-1 and oxaliplatin combination chemotherapy in patients with refractory pancreatic cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2013 Nov;72(5):985-90.

Kawakubo K, Tada M, Isayama H, Sasahira N, Nakai Y, Takahara N, Uchino R, Hamada T, Miyabayashi K, Yamamoto K, Mizuno S, Mohri D, Kogure H, Sasaki T, Yamamoto N, Hirano K, Ijichi H, Tateishi K, Koike K. Disease-Specific Mortality Among Patients With Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm of the Pancreas. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013 Jul 25. 2014 Mar;12(3):486-91. doi: 10.1016/j.cgh.2013.06.032

Mizuno S, Nakai Y, Isayama H, Takahara N, Miyabayashi K, Yamamoto K, Kawakubo K, Mohri D, Kogure H, Sasaki T, Yamamoto N, Sasahira N, Hirano K, Tsujino T, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Koike K. Diabetes is a useful diagnostic clue to improve the prognosis of pancreatic cancer. *Pancreatology.* 2013 May-Jun;13(3):285-9.

- Yamamoto S, Tateishi K, Kudo Y, Yamamoto K, Isagawa T, Nagae G, Nakatsuka T, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Aburatani H, Omata M, Koike K. Histone 3) demethylase KDM4C regulates sphere formation by mediating the cross talk between Wnt and Notch pathways in colonic cancer cells. *Carcinogenesis*. 2013 Oct;34(10):2380-8. doi: 10.1093/carcin/bgt174
- Nakai Y, Isayama H, Ijichi H, Sasaki T, Takahara N, Ito Y, Matsubara S, Uchino R, Yagioka H, Arizumi T, Hamada T, Miyabayashi K, Mizuno S, Yamamoto K, Kogure H, Yamamoto N, Hirano K, 4) Sasahira N, Tateishi K, Tada M, Koike K. A multicenter phase II trial of gemcitabine and candesartan combination therapy in patients with advanced pancreatic cancer: GECA2. *Invest New Drugs*. 2013 Oct;31(5):1294-9.
- Miyabayashi K, Ijichi H, Mohri D, Tada M, Yamamoto K, Asaoka Y, Ikenoue T, Tateishi K, Nakai Y, Isayama H, Morishita Y, Omata M, 5) Moses HL, Koike K. Erlotinib prolongs survival in pancreatic cancer by blocking gemcitabine-induced MAPK signals. *Cancer Res*. 2013 Apr 1;73(7):2221-34. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1453.
- Kawakubo K, Tada M, Isayama H, Sasahira N, Nakai Y, Takahara N, Miyabayashi K, Yamamoto K, Mizuno S, Mohri D, Kogure H, Sasaki T, Yamamoto N, Tateishi R, Hirano K, Ijichi H, 6) Tateishi K, Koike K. Risk for mortality from causes other than pancreatic cancer in patients with intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. *Pancreas*. 2013 May;42(4):687-91. doi: 10.1097/MPA.0b013e318270ea97.
- Nakai Y, Isayama H, Sasaki T, Mizuno S, Sasahira N, Kogure H, Kawakubo K, Yamamoto N, Hirano K, Ijichi H, Tateishi K, Tada M, Koike K. Clinical outcomes of chemotherapy for diabetic and nondiabetic patients with pancreatic cancer: better prognosis with statin use in diabetic patients. *Pancreas*. 2013 Mar;42(2):202-8.
- Mizuno S, Nakai Y, Isayama H, Yanai A, Takahara N, Miyabayashi K, Yamamoto K, Kawakubo K, Mohri D, Kogure H, Sasaki T, Yamamoto N, Sasahira N, Hirano K, Tsujino T, Ijichi H, Tateishi K, Akanuma M, Tada M, Koike K. Risk factors and early signs of pancreatic cancer in diabetes: screening strategy based on diabetes onset age. *J Gastroenterol*. 2013 Feb;48(2):238-46.
- Nakai Y, Isayama H, Ijichi H, Sasaki T, Kogure H, Yagioka H, Miyabayashi K, Mizuno S, Yamamoto K, Mouri D, Kawakubo K, Yamamoto N, Hirano K, Sasahira N, Tateishi K, Tada M, Koike K. Phase I trial of gemcitabine and candesartan combination therapy in normotensive patients with advanced pancreatic cancer: GECA1. *Cancer Sci*. 2012 Aug;103(8):1489-92.
- Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci*. 2012 Apr;103(4):670-6.
- Mohri D, Asaoka Y, Ijichi H, Miyabayashi K, Kudo Y, Seto M, Ohta M, Tada M, Tanaka Y, Ikenoue T, Tateishi K, Isayama H, Kanai F, Fukushima N, Tada M, Kawabe T, Omata M, Koike K. Different subtypes of intraductal papillary mucinous neoplasm in the pancreas have distinct pathways to pancreatic cancer progression. *J Gastroenterol*. 2012 Feb;47(2):203-13.
- Ijichi H, Chytil A, Gorska AE, Aakre ME, Brier B, Tada M, Mohri D, Miyabayashi K, Asaoka Y, Maeda S, Ikenoue T, Tateishi K, Wright CV, Koike K, Omata M, Moses HL. Inhibiting Cxcr2 disrupts tumor-stromal interactions and improves survival in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Invest*. 2011 Oct;121(10):4106-17.
- Kudo Y, Tanaka Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Mohri D, Isomura Y, Seto M, Nakagawa H, Asaoka Y, Tada M, Ohta M, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Maeda S, Shiina S, Yoshida H, Nakajima O, Kanai F, Omata M, Koike K. Altered composition of fatty acids exacerbates hepatotumorigenesis during activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Hepatol*. 2011 Dec;55(6):1400-8.
- Kawakubo K, Tada M, Isayama H, Sasahira N, Nakai Y, Yamamoto K, Kogure H, Sasaki T, Hirano K, Ijichi H, Tateishi K, Yoshida H, Koike K. Incidence of extrapancreatic malignancies in patients with intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Gut*. 2011 Sep;60(9):1249-53.
- Tada M, Nakai Y, Sasaki T, Hamada T, Nagano R, Mohri D, Miyabayashi K, Yamamoto K, Kogure H, Kawakubo K, Ito Y, Yamamoto N, Sasahira N, Hirano K, Ijichi H, Tateishi K, Isayama H, Omata M, Koike K. Recent progress and limitations of chemotherapy for pancreatic and biliary tract cancers. *World J Clin Oncol* 2011;2(3):158-163.
- Hayakawa Y, Hirata Y, Nakagawa H, Sakamoto K, Hikiba Y, Kinoshita H, Nakata W, Takahashi R, Tateishi K, Tada M, Akanuma M, Yoshida H, Takeda K, Ichijo H, Omata M, Maeda S, Koike K. Apoptosis signal-regulating kinase 1 and cyclin D1 compose a positive feedback loop contributing to tumor growth in gastric cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 11;108(2):780-5.
- Seto M, Ohta M, Ikenoue T, Sugimoto T, Asaoka Y, Tada M, Mohri D, Kudo Y, Ijichi H, Tateishi K, Otsuka M, Hirata Y, Maeda S, Koike K, Omata M. Reduced expression of RAS protein activator like-1 in gastric cancer. *Int J Cancer*. 2011 Mar 15;128(6):1293-302.

【学会発表】(計12件)

山本信三、立石敬介、工藤洋太郎、山本恵介、砂河孝行、永江玄太、中塚拓馬、浅岡良成、伊地知秀明、小俣政男、油谷浩幸、小池和彦

ヒストン修飾酵素JHDM3CはWnt-Notchシグナルのメデイエーターとして大腸腫瘍形成能を制御する 第72回日本癌学会学術総会 横浜 2013年10月4日

山本信三、立石敬介、工藤洋太郎、山本恵介、砂河孝行、永江玄太、油谷浩幸、小池和彦 KDM4C regulates sphere formation by mediating the crosstalk between Wnt and Notch pathways in colonic cancer cells. Cell symposia. Spain. 2013年10月6-8日

工藤洋太郎、立石敬介、池上恒雄、山本恵介、永江玄太、米澤理人、関元昭、白井、油谷浩幸、小池和彦 Contribution of TET1 to malignant characteristics in digestive cancer cells. Cell symposia. Spain. 2013年10月6-8日

伊地知秀明、宮林功至、多田素久、浅岡良成、池上恒雄、立石敬介、小俣政男、小池和彦 Pancreatic ductal adenocarcinoma can arise from Nestin-positive progenitor cells in the adult pancreas. 第71回日本癌学会学術総会 2012 札幌

工藤洋太郎、立石敬介、山本恵介、山本信三、浅岡良成、伊地知秀明、永江玄太、油谷浩幸、小池和彦 Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. 第71回日本癌学会学術総会 2012 札幌

工藤洋太郎、立石敬介、山本恵介、山本信三、浅岡良成、伊地知秀明、永江玄太、油谷浩幸、小池和彦 悪性形質転換におけるヒドロキシメチル化シトシンの低下 ポスター討論 第6回日本エピジェネティクス研究会年会 2012/05/15 東京

宮林弘至、伊地知秀明、毛利大、多田素久、山本恵介、浅岡良成、池上恒雄、立石敬介、中井陽介、伊佐山浩通、多田稔、小池和彦 膵発癌モデルマウスを用いたゲムシタピンとエルロチニブの効果・メカニズムの検討 膵癌：基礎研究 第43回日本膵臓学会大会 2012/06/29 山形

山本信三、立石敬介、工藤洋太郎、山本恵介、浅岡良成、伊地知秀明、砂河孝行、油谷浩幸、小池和彦 大腸癌におけるH3K9脱メチル化酵素 KDM4C の発現異常とその意義の検討 第5回日本エピジェネティクス研究会 201/5/19-20 熊本

山本恵介、立石敬介、宮林弘至、山本信三、工藤洋太郎、浅岡良成、伊地知秀明、小俣政男、小池和彦 ヒストン脱メチル化酵素 JMJD3 の発現低下は膵癌の進展を促進する エピジェネティクスと消化器癌 2011 第19回 JDDW 福岡

浅岡良成、池上恒雄、多田素久、後藤絵理子、建石良介、伊地知秀明、立石敬介、金井文彦、椎名秀一朗、吉田晴彦、小俣政男、小池和彦 肝細胞癌における Hippo シグナルの異常に関

する検討 肝発癌研究の新展開 第47回日本肝臓学会総会 2011/06/03 東京

浅岡良成、池上恒雄、多田素久、建石良介、伊地知秀明、立石敬介、金井文彦、椎名秀一朗、吉田晴彦、小俣政男、小池和彦 Hippo シグナル異常を伴う肝細胞癌における受容体型チロシンキナーゼに関する検討 第19回 JDDW/第15回日本肝臓学会大会 2011/10/20 福岡

伊地知秀明、多田素久、宮林弘至、浅岡良成、立石敬介、池上恒雄、小俣政男、小池和彦 膵癌微小環境における CXC ケモカイン/CXCR2 Axis 阻害の重要性 Intercellular Interaction and Tumor Microenvironment 第70回日本癌学会学術総会 2011/10/03 名古屋

多田素久、伊地知秀明、宮林弘至、浅岡良成、毛利大、池上恒雄、立石敬介、石原武、金井文彦、今関文夫、Moses Harold L.、小俣政男、横須賀収 The exploration of novel strategy for treatment of pancreatic ductal adenocarcinoma using genetically engineered mouse Novel target molecule 第70回日本癌学会学術総会 2011/10/04 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立石 敬介 (TATEISHI Keisuke)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20396948

(2) 研究分担者

木暮 宏史 (KOGURE Hirofumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60568921

佐々木 隆 (SASAKI Takashi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：10569106

山本 夏代 (YAMAMOTO Natsuyo)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40599578