

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570213

研究課題名(和文)クロマチンシグナリングによる細胞極性の形成機構の解明

研究課題名(英文)The chromatin signaling regulates the formation of cell polarity.

研究代表者

檜枝 美紀(Hieda, Miki)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00380254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞において細胞極性の形成は細胞運動や細胞分化、癌の発生など様々な細胞機能の鍵を握る。私達は本研究において、細胞核による細胞極性形成機構の解明に取り組んできた。その結果、ヒストン修飾状態というクロマチンからの情報(クロマチンシグナリング)が核膜に局在するタンパク質複合体 LINC complexを介して、細胞極性の形成・細胞運動能制御に機能するメカニズムを明らかにした。さらに、癌におけるヒストン修飾異常が果たす役割を明らかにし、LINC complexの発現が乳癌発生初期に顕著に低下することも見出した。

研究成果の概要(英文)：Formation of cell polarity plays fundamental roles in cell migration, cell differentiation, and carcinogenesis etc. The mammalian Golgi apparatus has important function in the formation of cell polarity. In this study, we showed that histone methylation enzyme is required for proper Golgi structure via LINC (linker of nucleoskeleton and cytoskeleton) complex, a nuclear envelope protein complex consisting mainly of the SUN and nesprin protein families. In addition, we demonstrated global loss of a nuclear lamina component, lamin A/C and LINC complex components SUN1, SUN2, and nesprin-2 in breast cancer.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：核膜 細胞極性 乳癌 LINC complex 癌転移 SUN1 nesprin

1. 研究開始当初の背景

高等真核生物では細胞膜を介して細胞間の情報交換を行い個体の恒常性を維持している。細胞外より受け取った情報は、多くの場合、遺伝情報発現の場である核へと伝えられる。このような情報の流れに対して私達は、クロマチンの構造変化が細胞極性形成、細胞運動等様々な細胞機能に重要な役割を果たしていることを示唆する結果を得ていた。

2. 研究の目的

本研究は、クロマチン構築がどのようにその情報を細胞質に伝え、細胞極性形成、細胞運動制御に機能しているのか、クロマチンシグナリングの詳細な分子メカニズムを明らかにし、癌組織で見られるような、ヒストン修飾異常の病理的意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

上記目的のために、下記3方向から本研究に取り組んだ。

(1) LINC complex 複合体による細胞極性形成機構の解析

ヒストン修飾あるいはそれに伴うクロマチン構造変化を細胞質へ伝える分子として、LINC complex (linkers of nucleoskeleton and cytoskeleton)に着目し、細胞極性形成への寄与を解析した。LINC complex は核膜に局在するタンパク質複合体であり、細胞骨格とクロマチンを繋ぐ分子である。LINC complex 複合体構成因子への結合因子を網羅的に解析し、LINC complex とゴルジ体を繋ぐ因子を探索した。さらにゴルジ体構築を指標として、細胞極性形成機構を解析した。

(2) 癌におけるクロマチンシグナリング

癌の発生・進展において極性の喪失、再構築は非常に重要な意義を持つ。そこで、クロマチンシグナリングにより制御される細胞極性の意義を明らかにするため、癌細胞におけるクロマチンシグナリングの実態の解明に取り組んだ。そのため、ヒト乳癌および大腸癌臨床検体を、ヒストン修飾を特異的に認識する抗体により免疫組織化学的染色により染色した。また、癌細胞特異的に観察されるヒストン修飾状態を見出した後、そのヒストン修飾異常が、どのように、細胞極性に影響を与え、さらにどのように癌病態へ寄与するのか、in vitroでの解析を行った。

4. 研究成果

(1) 乳癌における H4K20me3 レベルの低下

ヒストンH4の20番目リジンのトリメチル化 (H4K20me3) は肺癌や大腸癌など様々な癌で低下していることが報告されていた。乳癌ではH4K20me3に働くヒストンメチル化酵素 SUV420H2 の発現が低下するという報告がある一方で、H4K20me3の染色の低下は観察されないという報告もあり議論の余地の残るものであった。私達はH4K20me3を特異的に認識する抗体を用いてヒト乳癌臨床検体を染色したところ、癌部においてのみH4K20me3レベルの特異的な低下を観察した(図1)。さらにその減少はluminal subtypeなどの臨床病理学的分類と有意に相関したが、HER2 expressionとは相関がみられなかった。さらに多変量解析を行ったところ、H4K20me3の低下は無病生存率と有意に逆相関することが明らかになり、乳癌においてH4K20me3レベルの低下は独立した予後予測因子になり得る事を示した(Yokoyama et al., 2014, Breast Can. Res.)。

(2) 乳癌における H4K20me3 レベルの低下は転写制御に關与する

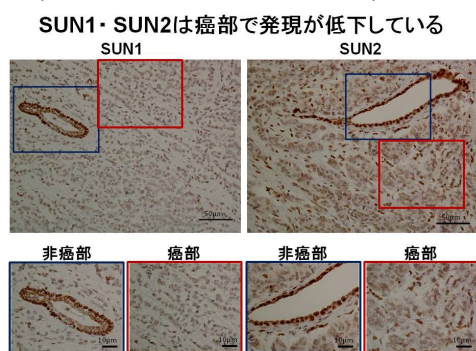
H4K20me3が乳癌の進展に与える影響を解析するため、乳癌培養細胞株MDA-MB-231にSUV420H2を恒常発現させた細胞を作製した。SUV420H2強制発現細胞は、親株と比較して、細胞浸潤能が著明に低下していた。逆に正常乳腺上皮細胞株MCF10AにおいてSUV420H2の発現をsiRNAにより抑制すると浸潤能の亢進が観察された。そこで、DNAマイクロアレイにより、遺伝子発現の解析を行ったところ、SUV420H2を強制発現させた細胞では、乳癌を含む癌への関与が報告されている様々な遺伝子の発現が大きく変動していた。中でも細胞浸潤能に深く関与することが知られており、細胞接着に關与するtensin-3の発現が大きく低下していた。そこで、SUV420H2強制発現により引き起こされるtensin-3遺伝子の発現低下の分子メカニズムを探ったところ、SUV420H2により誘導されるH4K20me3がtensin-3遺伝子のプロモーター領域に蓄積し、転写を抑制した可能性が明らかになった(Shinchi et al., 2015, Exp. Cell Res.)。

これまで、癌細胞において観察されるH4K20me3の低下はゲノム構築の不安定性をもたらし、癌の進展に寄与すると考えられてきた。これに対して、私達の結果は癌細胞において、一連の遺伝子のプロモーター領域上のH4K20me3が低下すること

により、浸潤能の活性化に寄与する遺伝子発現を活性化することを示している。このことは、様々な癌でみられる H4K20me3 レベルの低下がゲノムの不安定性を招くだけでなく、積極的に遺伝子発現を調節することにより癌の進展に寄与していることを示しており、今後更に細胞レベルでの解明を進めていきたい。

(3) ヒト乳癌組織では核膜タンパク質複合体 LINC complex の発現が顕著に低下する

がん細胞では正常細胞と比較して核形不整、核/細胞質比 (N/C 比) の増大、核小体の腫大、クロマチンの増量や不均等分布などが見られ、細胞診断・組織診断の根拠となっている。しかしがん細胞でこれらの変化が生じるメカニズムは未だ明らかとなっていない。また、このような核異型の持つ病理学的意義は、ほとんど解析されていない。本研究では、核膜に局在化する LINC complex に着目した。そして核の異型度と予後との相関が臨床的に知られている乳癌で、核異型が生じる分子メカニズムを解明することを目的とした。乳癌組織標本を用いて、LINC complex の構成要素である lamin A/C, SUN1, SUN2, nesprin2 の発現を免疫組織化学染色により検討した。その結果、4 種類全てのタンパク質が、非癌部と比較して癌部で発現が著明に低下していた (Matsumoto et al., submitted)。

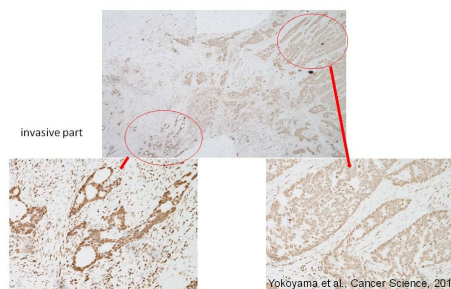


(4) 大腸癌浸潤部では H3K9me3 レベルが亢進し、H3K9me3 は細胞運動に関与する

ヒト大腸癌臨床検体を用いてヒストン修飾状態を免疫組織化学染色により解析したところ、(i) 大腸癌組織の浸潤部においてヒストン H3、9 番目のリジンのトリメチル化 (H3K9me3) が有意に亢進していること、(ii) 大腸癌患者におけるリンパ管侵襲と臨床検体の H3K9me3 の量に正の相関性が認められることを見出した。次に H3K9me3 レベル亢進の意義を探るために、in vitro において H3K9 のメチル化酵素 SUV39H1 を強制発現したところ、細胞の遊走能、浸潤能が顕著に亢進し、SUV39H1

をロックダウンすることにより細胞の遊走能、浸潤能が抑制された。さらに、モデルマウスを用いた実験では、SUV39H1 の過剰発現により腫瘍形成能が亢進し、生存率が顕著に低下した。これらの結果は異常な H3K9me3 が細胞運動能の活性化を介して大腸癌の進行に重要な役割を果たしていることを示している (Yokoyama et al., 2013, Cancer Sci.)。

H3K9me3は浸潤部により多く存在する



(5) ヒストン修飾変化は LINC complex を介してゴルジ体構築制御に関与する

SUV39H1 は核内に限局して発現し、ヒストン H3、9 番目リジンのトリメチル化 (H3K9me3) を引き起こす。私達はこれまでに SUV39H1 が細胞の運動能に影響を与えることを見出してきた。そこで細胞核内でおこる“クロマチン構造変化”がどのように細胞質へ伝わり“細胞運動活性”を調節するのか、その分子メカニズムの解明に取り組んだ。その結果 SUV39H1 の不活性化に反応して、細胞は運動活性を失うわけではなく、細胞極性形成に必要なゴルジ体が細胞質にミニスタックとして散在化し、方向性を持った細胞遊走が抑制されることを明らかにした。この時 ER からゴルジ体への膜輸送、或いは微小管構造への影響は観察されない。さらに、ゴルジ体構造の散在化は SUV39H1 阻害剤の存在下において 2~3 時間で起こること、SUV39H1 のロックダウンにより、ゴルジ体構築に関与する遺伝子の発現変化が観察されないこと等から、転写制御を介さず、SUV39H1 の活性化状態あるいは、ヒストン H3K9 のメチル化状態に反応した、ゴルジ体構築制御機構の存在が考えられる。ゴルジ体の構造や細胞内における位置は、細胞分化、細胞周期、細胞運動等、細胞のおかれている状態に反応してダイナミックに制御されている。そのためゴルジ体構築の制御は、細胞核機能と厳密にリンクしていると予想される。しかし、そのような制御機構は、その存在も含めてほとんど解析されていない。それに対して私達は SUV39H1 は核膜内膜タンパク質 SUN1 および SUN2 の適切な局在化に必要であり、SUN1/SUN2 は核近傍へのゴ

ルジ体構築に必須であることを見出した。SUN1/SUN2、核膜外膜タンパク質 nesprin は LINC complex 複合体を形成する。私達は SUN2 に対する特異的抗体を用いた IP-MS/MS により SUN2 タンパク質が、ある微小管モータータンパク質に結合すること、SUV39H1 の発現抑制によるゴルジ体構築のフラグメンテーション化が、この微小管モータータンパク質の非存在化では抑制されることを明らかにした。これらの結果は SUV39H1 によるクロマチン構築制御が SUN1/SUN2 タンパク質を含む LINC complex の活性を制御することにより、細胞質においてゴルジ体構造の調節に機能している事を示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

1. Shinchi, Y., Hieda, M.*, Nishioka, Y., Matsumoto, A., Yokoyama, Y., Kimura, H., Matsuura, S., Matsuura, N. (2015). SUV420H2 suppresses breast cancer cell invasion through down regulation of the SH2 domain-containing focal adhesion protein tensin-3. *Experimental Cell Research* (査読有) 334, 90-99. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.03.010.
2. Hieda, M., Matsuura, N., and Kimura, H.* (2015). Histone modifications associated with cancer cell migration and invasion. *Methods in Molecular Biology* (査読有) 1238, 301-317. doi: 10.1007/978-1-4939-1804-1_16.
3. Kurono, S., Kaneko, Y., Matsuura, S., Niwayama, S. (2015). Quantification of proteins using ¹³C₇-labeled and unlabeled iodoacetanilide by nano liquid chromatography/nanoelectrospray ionization and by selected reaction monitoring mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (査読有) 25, 1110-1116. doi: 10.1016/j.bmcl.2014.12.090.
4. Yokoyama Y, Matsumoto A, Hieda M.*, Shinchi Y, Ogihara E, Hamada M, Nishioka Y, Kimura H, Yoshidome K, Tsujimoto M, Matsuura N. (2014). Loss of histone H4K20 trimethylation predicts poor prognosis in breast cancer and is associated with invasive activity. *Breast Cancer Res.* (査読有) 16, R66. doi: 10.1186/bcr3681.
5. Kwon, H. J., Kurono, S., Kaneko, Y., Ohmiya, Y., Yasuda, K. (2014). Analysis of proteins showing differential changes during ATP oscillations in chondrogenesis. *Cell Biochem. Funct.* (査読有) 32, 429-437. doi: 10.1002/cbf.3033.
6. Nishibu, T., Hayashida, Y., Tani, S., Kurono, S., Kojima-Kita, K., Ukekawa, R., Kurokawa, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Inoue, K., Honda, S. (2012). Identification of MIWI-associated Poly(A) RNAs by immunoprecipitation with an anti-MIWI monoclonal antibody. *Biosci. Trends.* (査読有) 6, 248-261.
7. Kurono, S., Kaneko, Y., Niwayama, S. (2013). Quantitative protein analysis using ¹³C₇-labeled iodoacetanilide and d₅-labeled N-ethylmaleimide by nano liquid chromatography/nanoelectrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (査読有) 23, 3111-3118. doi: 10.1016/j.bmcl.2013.02.112.
8. Yokoyama, Y., Hieda, M.*, Nishioka, Y., Matsumoto, A., Higashi, S., Kimura, H., Yamamoto, H., Mori, M., Matsuura, S., and Matsuura, N. (2013). Cancer associated up-regulation of H3K9 methylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo. *Cancer Science* (査読有) 104, 889-895 doi: 10.1111/cas.12166.
9. Hieda, M.*, Koizumi, M., Higashi, C., Tachibana, T., Taguchi, T., and Higashiyama, S. (2012). The cytoplasmic tail of Heparin-binding EGF like growth factor regulates bidirectional intracellular trafficking between the plasma membrane and ER. *FEBS Open Bio.* (査読有) 4, 721-726. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.045.
10. Tanaka, H., Nishioka, Y., Yokoyama Y., Higashiyama S., Matsuura, N., Matsuura, S., Hieda, M.*. (2012). Nuclear envelope-localized EGF family protein amphiregulin activates breast cancer cell migration in an EGF-like domain independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有) 420, 721-726. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.045.

〔学会発表〕(計 28 件)

1. 檜枝美紀、西岡 優、木村宏、松浦成昭、ヒストン修飾酵素SUV39H1は核膜タンパク質SUN1/SUN2の機能を介してゴルジ体構築を制御する。第87回日本生化学会大会、2014年 10月 15~18日 (18日) 京都府京都市
2. Kurono, S. Exploratory Research on Potential Tumor Markers that are Useful for Cancer Diagnosis, and Development of a

- Simplified Assay System. Environmental Organic Chemistry Class, 2014年10月16日、北海道室蘭市 (招待講演)
3. Shinchi Y, Matsumoto A, Yokoyama Y, Matsuura N, and Hieda M. SUV420H2 expression suppresses breast cancer cell invasion through expression of the SH2 domain-containing focal adhesion protein tensin-3 熊本医学・生物科学国際シンポジウム「幹細胞制御と臓器再建」, 2014年9月4~5日、熊本県熊本市
 4. Hieda M. Cancer-associated aberrant histone modification promotes cell motility and invasion in several ways. Seventh international Epigenomics & Metabolomics, 2014 meeting, 2014年8月25~26日(26日), Boston, MA, USA (招待講演)
 5. Kurono, S., Kobayashi, N., Nakajima, T., Matsuura, S., Matsuura, N., Oishi, H. Proteome and Glycoproteome Analyses for Breast Cancer Biomarker Discovery with Nipple Discharge Using Two-Dimensional Nano LC/Nano-ESI-MS. 62ND Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics, 2014年6月15~19日(18日), Baltimore, MD, USA
 6. Matsumoto A, Hieda M, Matsumura N. The down-regulation of SUN-KASH nuclear envelope bridges in breast cancer The 2nd International Symposium of Training Plan for Oncology Professionals, 2014年1月18~19日(18日), Osaka, Japan (招待講演)
 7. Hieda M, Matsumoto A, Yokoyama Y, Nishioka Y, Shinchi Y, Matsuura N. Aberrant histone H4K20 trimethylation predicts poor prognosis in breast cancer and is associated with cancer cell invasion. Annual Meeting for the American Society for Cell Biology, 2013年12月14~18日(16日), New Orleans, Louisiana, USA
 8. 横山雄起、檜枝美紀、新地純美、松本彩花、西岡優、松浦成昭、ヒストンメチル化酵素 SUV420H2の発現は乳癌細胞浸潤能を抑制する 第31回染色体ワークショップ・第11回核ダイナミクス研究会 2013年11月25~27日(26日) 神奈川県足柄下郡箱根町
 9. 横山雄起、檜枝美紀、松本彩花、新地純美、西岡優、木村宏、吉留克英、辻本正彦、松浦成昭、ヒストンメチル化酵素 SUV420H2の発現は乳癌細胞浸潤能を抑制する 2013年12月3~6日 第36回分子生物学会年会、兵庫県神戸市
 10. 檜枝美紀、松浦成昭、Cancer associated up-regulation of H3K9 methylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3~5日(2日) 神奈川県横浜市
 11. 檜枝美紀 細胞膜と核膜のコミュニケーション。第86回日本生化学会大会、2013年9月11日~13日,(12日) 神奈川県横浜市 (招待講演)
 12. Yokoyama, Y., Hieda M, Higashi, S., Nishioka, Y., Matsumoto, A., Kimura, H., Matsuura, S., Matsuura N. H3 lysine 9 methylation promotes cell motility *in vitro* and drives tumor formation *in vivo*. Keystone Symposia, Epigenetic Marks and Cancer Drugs (C8) 2013年3月20日~25日, Santa Fe, NM, USA
 13. Kurono, S., Nakajima, T., Kobayashi, N., Matsuura, S., Matsuura, N., Oishi, H. A Study of Protein and Glycoprotein Biomarker Discovery in Nipple Discharges from Breast Cancer by Nano-LC-ESI-Mass Spectrometry. HUPO 12th Annual World Congress, 2013年9月14~18日(15日), Yokohama, Kanagawa, Japan
 14. 黒野 定、中嶋智之、小林則文、松浦脩治、松浦成昭、大石晴樹、二次元 Nano LC/nano-ESI-MS による乳頭分泌液中の乳癌マーカー探索研究。2013年9月10日~12日(12日)、第61回質量分析総合討論会、茨城県つくば市
 15. 黒野 定 乳頭分泌液を用いた乳癌バイオマーカー探索における二次元 LC/MS の活用とその効果。2013年11月18日、第238回生存圏シンポジウム、京都府宇治市 (招待講演)
 16. Hieda M, Nishioka, Y., Yokoyama, Y., Matsuura, N., Matsuura, S. H3 lysine 9 methylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo; a possible explanation for the cancer-associated. Annual Meeting for the American Society for Cell Biology, 2012年12月15~19日(17日), San Francisco, CA, USA
 17. 檜枝美紀、横山雄起、西岡優、木村宏、松浦脩治、松浦成昭、ヒストンH3K9のメチル化は細胞遊走を活性化し、腫瘍形成を促進する。第85回日本生化学会大会、2012年12月14~16日(15日)、福岡県福岡市、(招待講演)
 18. 新地純美、西岡優、横山雄起、檜枝美紀、松浦脩治、松浦成昭、HiedaヒストンH4K20メチル化酵素 SUV420H2の過剰発現は細胞浸潤能を抑制する。第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日~14日(12日)、

福岡県福岡市

19. Hieda, M., Yokoyama, Y., Nishioka, Y., Kimura, H., Matsuura, S., Matsuura, S., Histone H3 lysine 9 methylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo, Cold Spring Harbor Laboratory meeting, Epigenetics & Chromatin, 2012年9月11~15 (12日), Cold Spring Harbor, NY, USA
20. Hieda, M., Nishioka, Y., Yokoyama, Y., Matsuura, N., Matsuura, S., Chromatin signaling relays to the Golgi structure via SUN/KASH protein, 第45回日本発生物学会/第64回細胞生物学会合同大会、2012年5月29~31日 (30日)、兵庫県神戸市
21. Kurono, S., Kaneko, Y., Matsuura, S., Niwayama, S. Quantitative Analysis for Clinical Proteomics by nano LC-nano-ESI-SRM-MS Using Stable Isotope-labeled Iodoacetanilide. The 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry, 2012年5月20~24日 (22日), Vancouver, Canada
22. Kaneko, Y., Kurono, S., Matsuura, S., Proteomic Analysis of Potential Breast Cancer Markers in Nipple Discharge by Two-dimensional Nano-LC-ESI-Mass Spectrometry. The 60th ASMS Conference on Mass Spectrometry, 2012年5月20~24日 (22日), Vancouver, Canada
23. Kaneko, Y., Kurono, S., Matsuura, S., Matsuura, N., Protein Profile Analysis for Potential Breast Cancer Markers in Nipple Discharge by Nano-LC-ESI-Mass Spectrometry. HUPO 11th Annual World Congress, 2012年9月9~13日 (10日), Boston, MA, USA
24. Kurono, S., Kaneko, Y., Matsuura, S., Niwayama, S., An Attempt to Quantitative Analysis for Clinical Proteomics by Nano LC-nano-ESI-SRM-MS Using Stable Isotope-labeled Iodoacetanilide as well as N-Ethylmaleimide. 19th International Mass Spectrometry Conference, 2012年9月15~21日 (20日), Kyoto, Japan
25. Hieda, M., Nishioka, Y., Yokoyama, Y., Matsuura, N., Matsuura, S. H3 lysine 9 methylation promotes cell motility in vitro and drives tumor formation in vivo; a possible explanation for the cancer-associated up-regulation of H3K9 methylation. Annual Meeting for the American Society for Cell Biology, 2012年12月15~19日 (17日), San Francisco, CA, USA

26. 黒野 定, 腫瘍 (診断) マーカー探索における二次元 LC/MS の活用とその効果。第1回教育研究推進セミナー講演会、2012年7月11日、北海道旭川市、(招待講演)
27. 黒野 定, 金子有香, 松浦脩治, 腫瘍 (診断) マーカー探索における二次元 LC/MS の活用とその効果。第5回日本質量分析学会北海道談話会・講演会 (招待講演) 2012年7月12日、北海道札幌市
28. Hieda, M., Nishioka, Y., Yokoyama, Y., Matsuura, N., Matsuura, S., Chromatin signaling relays to the Golgi structure via SUN/KASH protein, 第45回日本発生物学会/第64回細胞生物学会合同大会、2012年5月29~31日 (30日)、兵庫県神戸市

【図書】(計 2 件)

1. M. Hieda, Heparin structure, drug delivery applications and clinical outcomes, Chapter IV, Nova Biomedical, edited by N. B. Wilkinson, 2014
2. 黒野 定 関西談話会の歴史。 *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 2013, 61, 69-75.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

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

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

檜枝 美紀 (HIEDA Miki)

研究者番号：00380254

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

黒野 定 (KURONO Sadamu)

研究者番号：20271554