

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590932

研究課題名(和文)大腸癌細胞の腫瘍形成能を促進するヒストン修飾酵素の同定と機能解析

研究課題名(英文)Identification of a histone demethylase promoting colon tumor formation

研究代表者

山地 裕(Yutaka, Yamaji)

東京大学・医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号：40376455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：癌におけるエピジェネティクス制御およびその異常の重要性が明らかになっている。本研究では大腸癌におけるエピジェネティクス、とくにヒストン修飾制御の重要性を検討した。KDM4C遺伝子は、ヒストンH3の9番目リジンの脱メチル化酵素KDM4Cをコードし、その増幅が食道癌や乳癌で報告されている。この遺伝子が大腸癌組織の腫瘍部で高発現し、そのノックダウンが大腸がん細胞の腫瘍形成能を抑制していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Histone modification is related to malignant features of neoplastic cells. We found that the knockdown of a histone demethylase KDM4C eliminated colonosphere formation. β -catenin upregulated KDM4C expression in colonospheres. Microarray analysis identified the JAG1 gene that codes for a notch ligand Jagged1 responsible for sphere formation as a target of KDM4C. KDM4C knockdown suppressed the expression of JAG1 gene, and the downregulation recapitulated the impaired colonosphere formation. JAG1 is also a target of β -catenin, and chromatin immunoprecipitation analysis showed the binding of β -catenin and KDM4C onto the JAG1 promoter during colonosphere formation. KDM4C knockdown inhibited the binding of β -catenin on the JAG1 promoter and blunted JAG1 expression in colonospheres. These data indicate that KDM4C maintains the sphere forming capacity in CRCs by mediating the β -catenin-dependent transcription of JAG1 in a feed-forward manner.

研究分野：消化器内科学

キーワード：大腸がん ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

大腸がん細胞の様々な形質における核内ヒストン修飾経路の意義は明らかにされてはいない。

大腸癌の発生について、多段階発癌仮説/adenoma-carcinoma sequence が広く受け入れられている。分子生物学的には、腺腫から癌、そして転移などの悪性化の増加に従い、APC、KRAS、TP53、DCC、といった遺伝子変異が蓄積していくことが知られている。中でも大腸腫瘍の発生、発育、進展に関わる細胞内シグナルの異常として APC と β -catenin の遺伝子変異が報告されている Wnt シグナルの異常は重要である。

一方、近年では発癌および癌の進展にはこのような遺伝子変異に加え、エピジェネティックな変化の関与が明らかになりつつある。

実際にこれまでに大腸癌においては異常な DNA メチル化が明らかとなり、それによる遺伝子発現の異常が発がんに関与することが豊田らによって報告されている。提唱されたいわゆる CIMP 陽性大腸癌の存在はエピジェネティック制御の破綻が大腸癌発生および進展において重要であることを示していた。一方で多様なヒストン修飾の変化による遺伝子発現の変化が、複雑な細胞応答の一手段なのであるとすれば、逆にヒストン修飾機構の破綻も癌細胞の多様な形質に寄与していることが推測される。

2. 研究の目的

APC や β -catenin などの異常による Wnt シグナルの活性化が大腸癌の発生・進展において重要であることはよく知られている。一方で大腸癌の腫瘍形成能などの悪性形質に Notch シグナルの活性化の関与が示唆されつつある。申請者らはこれまでに大腸癌細胞の腫瘍形成能を促進するヒストン修飾酵素 KDM4C を同定した。その過程で Wnt シグナルの下流で発現する Notch 受容体を KDM4C の標的遺伝子として同定し、同時に β -catenin によるその Notch 受容体遺伝子の発現に KDM4C を介した転写制御が必須であることを見出した。面白いことに KDM4C とその Notch 受容体は共にヒトの正常大腸ではほとんど発現が見られず、大腸癌組織特異的に発現していた。このことはヒストン修飾因子 KDM4C が大腸癌における Wnt と Notch シグナルのクロストークを媒介し、悪性形質獲得に寄与している可能性を示唆した。本研究ではこのヒストン修飾因子 KDM4C の機能解析とともにその大腸癌の悪性化におけるメカニズム及び生物学的意義を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

これまでに KDM4C を大腸がん細胞でノック

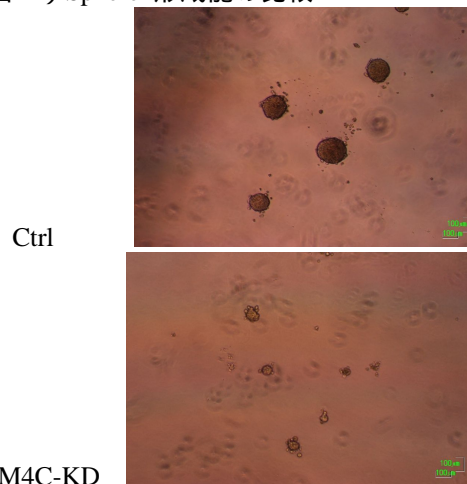
ダウンした結果、腫瘍形成能が抑制される知見を見出し、複数の大腸癌細胞株でも再現性を確認している。今回は *in vivo* モデルでもそれを検証する。ノックダウン細胞を用いた網羅的発現アレイデータから Notch 受容体遺伝子を抽出し、ノックダウンによる表現型の責任遺伝子候補のひとつと考えている。その Notch 受容体の過剰発現およびノックダウンを行うことでその関与を裏付ける。同時に Notch 受容体と KDM4C 発現の相関についても検討する。KDM4C および Notch 受容体の大腸がん細胞における発現調節機構を *in vitro* の実験系で検討する。この Notch 受容体が Wnt シグナルの下流でもあることから Wnt シグナルとのクロストークの可能性も調べる。また Notch 受容体が KDM4C の直接の標的遺伝子であるかどうかについてヒストン修飾特異的抗体を用いて ChIPassay によって検討する。

4. 研究成果

a. KDM4C ノックダウン細胞の表現型解析

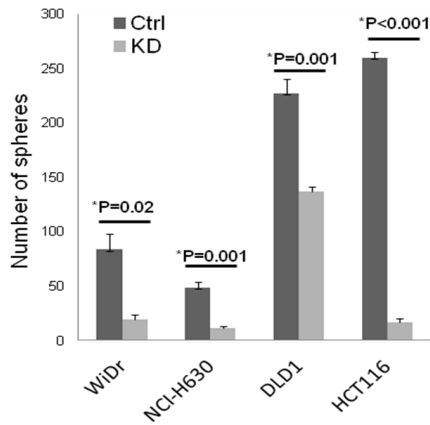
KDM4C ノックダウン大腸がん細胞では *in vitro* での単一細胞からの sphere 形成能、いわゆる腫瘍形成能が消失した (図 1)。複数の大腸がん細胞株においても同様のノックダウン細胞を樹立したところ、やはりこれらの表現型は再現された (図 2)。さらにこれらの表現型は二つの異なるノックダウン配列から樹立された細胞株に共通してみられており、KDM4C ノックダウンに伴う特異的な影響と考えられた。

(図 1) Sphere 形成能の比較



KDM4C-KD

(図 2)

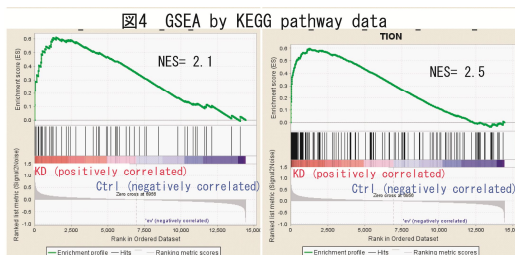


それを裏付けるために、KDM4C ノックダウン細胞 (Puromycin 選別) に、マウス KDM4C をレトロウイルスで過剰発現 (Hygromycin 選別) した株を樹立し、KDM4C ノックダウンでみられた表現型がその過剰発現によりレスキューされるかどうかを検討したところ、確かに KDM4C の発現によりノックダウン細胞の腫瘍形成能が回復された。

b. 網羅的発現アレイによる表現型関連転写因子の同定

KDM4C ノックダウン細胞の表現型に関連する責任遺伝子候補の決定

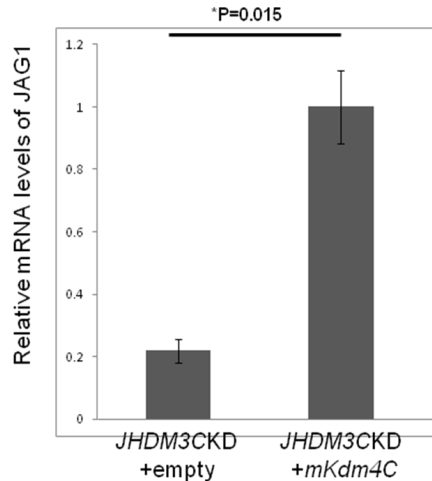
KDM4C ノックダウンによって獲得された形質に関連する分子群を抽出するため、KDM4C ノックダウン細胞とランダムコントロール細胞との間で、網羅的な遺伝子発現プロファイルを行った。その発現アレイデータを基にした解析から、ノックダウン細胞では数種類の転写因子群の下流遺伝子セットが高い NES と有意差をもって発現変化していた (図 3)。



(図 3)

中でも発現変化の大きな遺伝子群などについて RT-PCR によってアレイ結果の validation を行った結果、Notch 受容体のひとつ JAG1 遺伝子の発現量が大きく変化を受けていることが明らかとなった。JAG1 遺伝子の発現は KDM4C ノックダウン細胞にマウス KDM4C を発現されるとレスキューされた (図 4)。

(図 4)

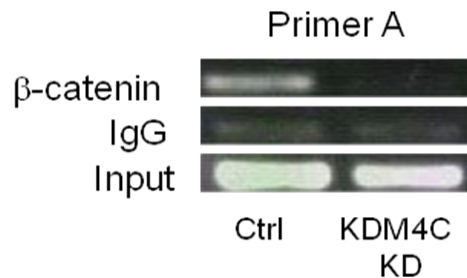


この JAG1 遺伝子を KDM4C ノックダウン細胞に、レトロウイルスで過剰発現した株を樹立したところ、KDM4C ノックダウンでみられた腫瘍形成能の低下が部分的に改善していた。また JAG1 遺伝子のノックダウン細胞を樹立したところ、KDM4C ノックダウン細胞でみられた腫瘍形成能の低下の表現型が再現された。

KDM4C と下流遺伝子との相関関係の検討

JAG1 遺伝子が KDM4C の直接標的であるかどうかを明らかにするために、ChIP assay によって KDM4C がその遺伝子プロモーターに結合するかどうかを検討したところ、KDM4C は大腸癌細胞が接着培養状態では結合しないが、Sphere 状態になると JAG1 遺伝子に結合することが明らかとなった。また JAG1 については Wnt シグナル、β-catenin の下流であるとの報告もあり、β-catenin による JAG1 遺伝子への結合も解析したところ、β-catenin も Sphere 状態になると JAG1 遺伝子に結合し、さらに重要なことにその結合が KDM4C のノックダウンにより減少することが明らかとなった (図 5)。

(図 5)



In vivo 実験を用いた KDM4C と腫瘍形成能の関与の検討

in vitro の実験から KDM4C が腫瘍形成能に関連するデータが得られているが、最近の報告によれば in vitro の sphere 形成能ががん細

胞の転移巣形成に重要な関連性を示すという知見が示唆されている。よってKDM4C ノックダウン細胞とコントロールとを用いて免疫不全マウスへの移植実験を行った。実験系としてはヒトの大腸癌の転移形式にできるだけ近似した検討を行うため、大腸への同所移植を行った。解析の結果ではいずれも転移性腫瘍の形成は見られなかったが、野生型と比較してノックダウンでは同所での腫瘍数および大きさが低下しており、*in vivo* の腫瘍形成が減少することが示された。

以上の研究成果につき学術論文として報告した (Carcinogenesis. 2013Oct;34(10):2380-8)。

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1件)

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 demethylase KDM4C regulates sphere formation by mediating the cross talk between Wnt and Notch pathways in colonic cancer cells. Carcinogenesis. 2013Oct;34(10):2380-8.

[学会発表](計2件)

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

2. 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 2011/5/19-20 熊本

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山地 裕 (YAMAJI, Yutaka)

東京大学医学部附属病院・臨床登録医

研究者番号: 40376455

(2)研究分担者

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

(3)連携研究者

() 研究者番号: