

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430136

研究課題名(和文) がん細胞におけるヒストンメチル化酵素EZH2の新規機能と制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Identification of novel EZH2 mechanism and its network in cancer cells

研究代表者

新城 恵子 (SHINJO, Keiko)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：40641618

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)：ヒストン修飾酵素のうちEZH2は多くの悪性腫瘍で高発現しており、特に悪性度に関わることが知られている。本研究では大腸がんにおいてEZH2発現を制御しているリン酸化酵素同定を試みた。大腸がん細胞株でEZH2プロモーター活性をアッセイ可能なスクリーニングシステムを構築した。既知ヒトリン酸化酵素709種を標的とするsiRNAライブラリーを用いてスクリーニングを行い、そのうち大腸がん発現の高いIKBKEを同定した。複数の大腸がん細胞株でIKBKE遺伝子のノックダウンや、阻害剤の投与でEZH2発現が抑制された。IKBKEが大腸がんNF- $\kappa$ B経路を介してEZH2過剰発現をきたしていることを示した。

研究成果の概要(英文)：Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) is overexpressed in many types of cancer and associated with poor prognosis. However, the underlying mechanism of EZH2 overexpression is not fully understood. Using an EZH2 promoter inhibition assay with an siRNA library targeting known human kinases in colorectal cancer cell lines, we identified a novel role for the IKBKE - NF- $\kappa$ B pathway in upregulating EZH2 expression. IKKe a kinase, was observed to be highly expressed in colorectal cancer tissue. Further validation revealed that inhibiting IKBKE caused a significant reduction in EZH2 expression. These data suggest that the IKKe; - NF- $\kappa$ B pathway may play an important role in regulation of EZH2 expression in colorectal cancer.

研究分野：がんエピジェネティクス

キーワード：EZH2 IKBKE

### 1. 研究開始当初の背景

ヒストン修飾酵素のうち EZH2 (enhancer of zeste homolog 2) は PRC2 (ポリコム複合体 2) の構成タンパクで、ヒストン H3 リジン 27 番をトリメチル化 (H3K27me3) 修飾することにより遺伝子発現抑制に関わる。EZH2 は、幹細胞性の維持、細胞の増殖の他、がん細胞の可塑性の制御にも深く関与しており、発がん過程において様々な事象に関わっている。多くの悪性腫瘍で高発現しており、特に悪性度が高くなるほど発現が高いことが知られている。

EZH2 をノックダウンすると多くのがん細胞は細胞老化もしくはアポトーシスに陥ることから、EZH2 ががんにおける重要な治療標的である可能性が高い。これまでに EZH2 の酵素活性を標的とした阻害剤が複数開発されてきたが、予測以上に著効するがん種は限られていることも明らかとなってきた。我々は固形がん細胞株で、EZH2 阻害剤投与後 H3K27me3 レベルは低下しているのにも関わらず、細胞増殖抑制を受けない細胞を複数確認している。その理由の一つとして、がん細胞の中には EZH2 が高発現しているが、EZH2 の H3K27 メチル化酵素活性には生存が依存しておらず、EZH2 が他の機能を担っている可能性が考えられる。実際に EZH2 はアンドロゲンレセプターと複合体を形成し遺伝子活性化作用を持つことも報告されており (Kexin X et al. Science 2012) H3K27 メチル化酵素活性のみを標的としても治療効果は得られない可能性があると考えられる。

### 2. 研究の目的

EZH2 は様々なリン酸化修飾により機能制御を受けていることが報告されている (Cha TL et al. Science 2005)。EZH2 の発現制御においてもリン酸化が影響を与えていることが予測されるため、キナーゼを中心に EZH2 発現に関わるシグナルを解析する。同定したキナーゼを標的とすることで、EZH2 の発現制御を目指した新規がん治療薬の開発につながることを考える。

本研究では、EZH2 の機能に多様性を与えているリン酸化修飾とそれによるエピゲノム修飾への影響、すなわち EZH2 - リン酸化 - エピゲノムネットワークを明らかにすることを目標とした。

### 3. 研究の方法

(1) EZH2 遺伝子の発現制御に関わる領域を含む転写開始点から上流 -3183 ~ +1238 領域にレポーター遺伝子を組み込んだコンストラクトを大腸がん細胞株 RKO で発現させ、EZH2 プロモーター活性に影響を与える分子を同定する系を構築した。このアッセイ系を用いて、様々なキナーゼを標的とした siRNA ライブラリーを投与し、EZH2 プロモーター活性に影響を与えるキナーゼのスクリーニングを行った。siRNA 投与後 48 時間でルシフェラー

ゼ活性を測定し、コントロール siRNA に比べてルシフェラーゼ活性を低下させる siRNA を同定した。

(2) siRNA ライブラリーでは 1 つのキナーゼに対して 3 種類の siRNA が設計されているため、3 種類の siRNA で再現性を持ってルシフェラーゼ活性を低下させる siRNA を選択することで、最終的に EZH2 発現制御キナーゼを同定した。さらに公共のデータベースである TCGA の RNA-seq のデータを解析し、同定したキナーゼの発現と EZH2 の発現を正常組織とがん組織とで発現の比較を行い、がん組織で特異的に発現上昇しているキナーゼを最終的にがん関連 EZH2 発現制御キナーゼとした。

(3) 絞り込んだキナーゼに対する siRNA を用いて大腸がん細胞株 SW480, RKO で候補キナーゼのノックダウンを行った場合の EZH2 の発現を解析し、最終的に大腸がん EZH2 発現を制御するキナーゼを決定した。

(4) 同定したキナーゼの上流、下流に存在するタンパクレベルを siRNA を用いてノックダウンし、同定したキナーゼに関するシグナルと EZH2 への関与について検討する。

(5) 同定したキナーゼが実際の大腸がんサンプルで高発現しており、EZH2 高発現と関連があるかを臨床サンプルで確認する。

### 4. 研究成果

(1) 既知ヒトリン酸化酵素 709 種を標的とする siRNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った。コントロールと比較して、EZH2 プロモーター活性を抑制したキナーゼは 181 種類存在した。これらのキナーゼの大腸がんでの発現を公共データベース TCGA (The Cancer Genome Atlas) の RNA-seq のデータを用いて解析し、正常と比較して大腸がん発現が増加している 41 種のキナーゼを同定した。その中で siRNA で発現抑制率の最も高かった I-Kappa-B Kinase Epsilon (IKK-ε) は TCGA のデータから大腸がん発現が高く、

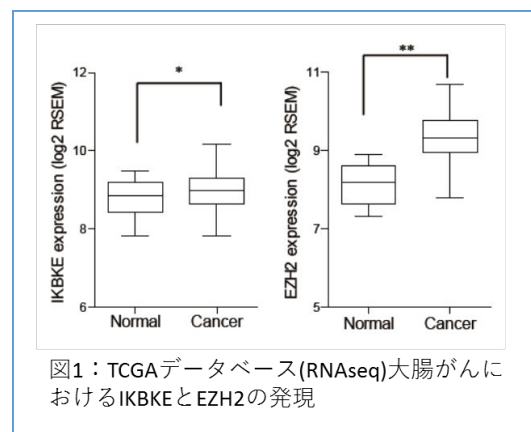


図1: TCGAデータベース(RNAseq)大腸がんにおけるIKKεとEZH2の発現

また大腸がん細胞株 RKO で siRNA 処理を行うことで EZH2 発現が低下することを確認し、大腸がんにおける EZH2 発現を制御するキナーゼとして同定した (図 1)。

(2) IKK-ε は NF-κB シグナル経路内のリン酸化酵素の 1 つである。IKK-ε をコードする

IKBKE 遺伝子は大腸がん細胞株 (RK0, SW480) で正常線維芽細胞 (WI-38) に比較し有意に高発現していた ( $P < 0.01$ )。更に IKBKE を標的とする3種の異なる siRNA を用いて RK0, SW480 細胞でノックダウンを行った結果、すべてにおいて EZH2 の mRNA、蛋白質量を抑制した (図2)。IKK- $\epsilon$  ホモログ TANK Binding Kinase 1 (TBK1) は、IKK- $\epsilon$  とヘテロダイマーを形成し RelA/p65 をリン酸化して NF- $\kappa$ B 経路を活性化することが知られている。siRNA を用いて TBK1 をノックダウンすると、EZH2 の mRNA、蛋白質量を抑制した (図3)。IKK- $\epsilon$ 、TBK1 とともに阻害する BX795 は RelA/p65 のリン酸化を抑制し NF- $\kappa$ B 経路を阻害する。BX795 (25  $\mu$ M) 処理においても EZH2 の発現抑制を認めた。IKK- $\epsilon$  抑制による細胞増殖への影響について

(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2件)

1. Aberrant activation pathway for EZH2 by IKK- $\epsilon$  - NF- $\kappa$ B in colorectal cancer. Natsuki Dohi, Keiko Shinjo, Akira Hatanaka, Norihisa Ichimura, Keisuke Katsushima, Yasuhiro Shimizu, Yutaka Kondo. *Nagoya Medical Journal*. 査読有 in press (2017)
2. Targeting cancer epigenetics: Linking basic biology to clinical medicine. Keiko Shinjo, Yutaka Kondo. *Adv Drug Deliv Rev*. 査読有 95 巻 56-64(2015) doi: 10.1016/j.addr.2015.10.006.

[学会発表](計4件)

3. Keiko Shinjo, Natsuki Dohi, Keisuke Katsushima, Tetsuo Ohnuki, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Yutaka Kondo, Development of a novel inhibitor against EZH2/PRC2, 第75回日本癌学会学術総会、2016年10月6日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)
4. Keiko Shinjo, Natsuki Dohi, Keisuke Katsushima, Tetsuo Ohnuki, Akihiro Ito, Minoru Yoshida, Yutaka Kondo, Development of a new anti EZH2/PRC2 inhibitor, The 35th Sapporo International Cancer Symposium、2016年6月24-25日、ロイトン札幌(北海道、札幌市)
5. 趙娟、畑中彬良、勝島啓佑、大岡史治、出口彰一、市村典久、金子寛生、新城恵子、近藤豊、がん細胞における EZH2 の細胞内局在制御機構の解明、第9回日本エピジェネティクス研究会年会、2015年5月25日、学術総合センター橋講堂(東京都、千代田区)
6. 新城恵子、近藤豊、がんの可塑性に関わるポリコムタンパク複合体を標的とした治療薬の開発、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月26日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

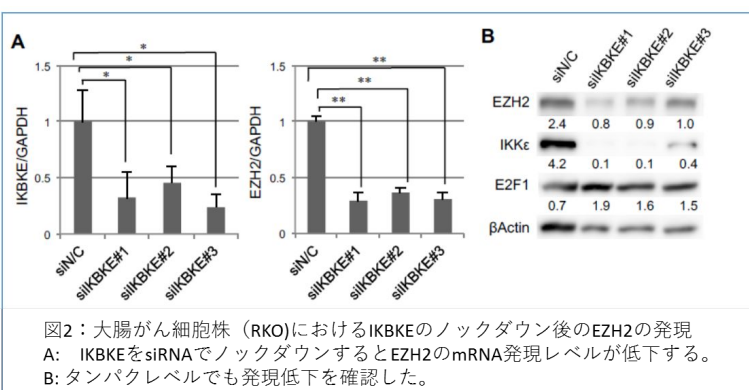


図2: 大腸がん細胞株 (RK0) におけるIKBKEのノックダウン後のEZH2の発現  
A: IKBKEをsiRNAでノックダウンするとEZH2のmRNA発現レベルが低下する。  
B: タンパクレベルでも発現低下を確認した。

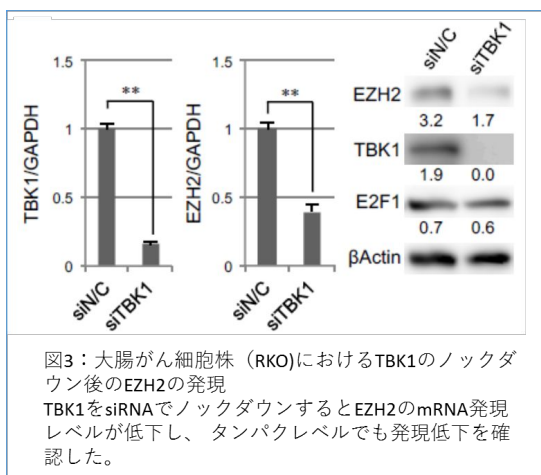


図3: 大腸がん細胞株 (RK0) におけるTBK1のノックダウン後のEZH2の発現  
TBK1をsiRNAでノックダウンするとEZH2のmRNA発現レベルが低下し、タンパクレベルでも発現低下を確認した。

検討を行った結果、IKK- $\epsilon$  に対する siRNA 処理により SW480 細胞 ( $P=0.02$ ) と RK0 細胞で増殖抑制効果を認めた。また BX795 処理では SW480 細胞、RK0 細胞において著明な増殖抑制を認めた ( $P < 0.01$ )。

(3) 臨床検体において大腸がん部と同一患者由来の正常大腸粘膜 ( $n=50$ ) の IKBKE、EZH2 遺伝子発現の検討を行った。両者は大腸がん組織で、強い相関 ( $r=0.6081$ ) が見られた。

本研究結果より、大腸がんにおいて IKK- $\epsilon$  を介する NF- $\kappa$ B 経路が EZH2 の過剰発現に寄与していることが明らかとなった。

〔図書〕(計2件)

7. 脳腫瘍におけるエピゲノム異常と治療への展望, 新城恵子 他、羊土社, 34 巻 1599-1604(2016)
8. エピゲノム制御と癌の最前線, 新城恵子 他、**Frontiers in Gastroenterology**, メディカルレビュー社, 20 巻 45-52(2015)

6. 研究組織

(1)研究代表者

新城 恵子 (SHINJO, Keiko)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：40641618

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

近藤 豊 (KONDO, Yutaka)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号： 00419897