

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590346

研究課題名(和文) ウイルス挿入変異法で同定されたエピゲノム制御因子による疾患発症機構の解析

研究課題名(英文) Functional characterization of epigenetic regulatory factors identified by retroviral insertional mutagenesis

研究代表者

鈴木 健之 (SUZUKI, TAKESHI)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号：30262075

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：レトロウイルス挿入変異によってマウスに発症した腫瘍から、ウイルスタギングを用いて新しいがん関連因子群の探索を進め、これまでにヒストンやDNAのメチル化の制御に関与する酵素群を同定した。さらに、これらのエピジェネティクス制御因子が、がんの発症ばかりでなく、がんの転移、薬剤耐性など悪性進展の様々なステップにおいて重要な役割を担っていることを示す新しい知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Retroviral insertional mutagenesis in mice is one of the powerful strategies for high-throughput identification of cancer genes. Using this system, we have frequently identified the genes encoding the enzymes engaged in histone or DNA methylation. We have found that some of the enzymes are involved not only in the tumor initiation but also in the malignant tumor progression such as cell invasion and drug resistance.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス がん遺伝子 レトロウイルス 分子標的

## 1. 研究開始当初の背景

疾患発症の分子メカニズムを理解するためには、関与する遺伝子群を効率よく同定できる手法が必要である。ウイルスやトランスポゾンなどのモバイルエレメントを用いた挿入変異はその重要なひとつと考えられる。マウスレトロウイルスによる血液腫瘍の発症には、ウイルスのゲノムへの挿入が引き起こす遺伝子の変異や発現変化が深く関係するため、ウイルス挿入部位を特定すれば原因遺伝子が同定できる。これまでに私たちは、ウイルス挿入部位の大規模同定によるがん関連遺伝子の網羅的解析を最初に報告し《文献：Suzuki T et al. Nature Genetics, 32, 164-74, 2002.》、ゲノムワイドに分布する3,000箇所以上の挿入部位から構成されるがん関連遺伝子のデータベースを作成し公開してきた《文献：Akagi K, Suzuki T et al. Nucleic Acids Res. 32, D523-7, 2004.》。さらに、分裂組換えを頻発するブルーム症候群モデルマウス (Blm遺伝子変異マウス) を用いて、ウイルス挿入変異を行うことで、両アリルへの変異導入率を高めて、劣性表現系を示す疾患原因遺伝子を効率的に単離する独自の実験系を構築し、従来の挿入変異の問題点を克服した《文献：Suzuki T et al. EMBO Journal, 25, 3411-21, 2006.》。

このようなウイルス挿入変異の大規模解析から、高頻度に単離される標的として、ヒストンのメチル化酵素 (Ezh2, Setd7, Smyd2 など) と脱メチル化酵素 (Fbx110, Jmjd3, Jmjd2c など) を同定した。メチル化、アセチル化、リン酸化などヒストンの翻訳後修飾は、転写制御、DNA複製、X染色体不活性化をはじめとする様々な生物学的現象に関与している。近年、脱メチル化に関与する酵素が次々と発見されたことによって、ヒストンやDNAのメチル化は、可逆的に調節されることで様々な生物学的現象に関与すると理解されるようになった。さらに、ヒトのがんではヒストンのアセチル化の制御異常が観察され、脱アセチル化酵素の阻害剤が抗がん剤として開発されているため、新しい治療標的として、ヒストンのメチル化とがんとの関係性の解明にも期待が集まっている。

## 2. 研究の目的

従来の研究で確立したウイルス挿入変異法や Blm 遺伝子変異のもとでの両アリル変異法を用いて、腫瘍の発症や細胞の不死化に関連する遺伝子の単離を進める。そして、疾患の発症に重要な新しい遺伝子ファミリー

を見だし、その生物学的な機能や疾患における役割を明らかにするための実験を進める。特に、既に単離された重要な候補であるヒストンのメチル化を制御する酵素群に注目し、その細胞生物学的機能を詳細に解析して、がんの発症および様々ながんの悪性進展過程 (細胞の浸潤、上皮・間葉転換、薬剤耐性獲得など) における新しい役割を解明することを目指す。さらに、最近同定した DNA の脱メチル化に関わる酵素 TET ファミリーについてもがんとの関連を明らかにし、がん研究におけるエピジェネティクス研究分野の新たな展開を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) ウイルス挿入変異を利用した疾患関連遺伝子の単離

レトロウイルス感染マウスおよび感染 Blm 遺伝子変異マウスに発症した血液腫瘍を採取する。腫瘍のゲノム DNA を鋳型に Inverse PCR を行い、ウイルス挿入部位を含むゲノム断片を増幅する。この塩基配列を決定し、ゲノム上にウイルス挿入部位をマップして、新規候補遺伝子の探索を行う。複数の腫瘍由来のコモンサイト (共通挿入部位) の遺伝子が、腫瘍の発症に重要であると判断される。特に、遺伝子の翻訳領域の内部にウイルス挿入をもち、両アリルの変異がサザンプロットで確認されたものが、がん抑制遺伝子の候補と定義される。

### (2) 候補遺伝子の機能解析 (全般)

単離された候補遺伝子の発現を恒常的に発現する cDNA 発現レトロウイルスや、ノックダウンできる shRNA 発現ウイルスを構築し、培養細胞に感染させて、細胞増殖、細胞周期制御、アポトーシスなどにおける機能を解析する。また、感染細胞の mutator 表現型や UV・放射線に対する感受性や抵抗性を調べる実験も行う。さらに、がんの悪性化の重要なステップである細胞の運動能、浸潤能、上皮間葉転換、薬剤耐性についても解析する。それに加えて、FLAG および His タグを融合した候補遺伝子産物を発現する細胞株を樹立し、その細胞抽出液から、抗タグ抗体を用いて遺伝子産物を含む複合体を精製する。複合体の構成要素を質量分析で解析して、相互作用する分子を同定し、候補遺伝子の生物学的な役割の解析に活用する。

### (3) ヒストンのメチル化を制御する酵素群の機能解析

候補遺伝子として同定したヒストンのメチル化を制御する酵素 (メチル化酵素と脱メチル化酵素) については、これらの cDNA ま

たは shRNA 発現レトロウイルスを構築し、上記の培養細胞での機能解析、複合体解析の実験を行う。さらに、薬剤の添加で酵素の発現の ON/OFF を調節できる細胞株を樹立し、酵素が転写調節を行う標的遺伝子探索のために、cDNA の大規模シーケンシングによるデジタル発現プロファイリングを進行する。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒストンのメチル化を制御する酵素群のがんにおける重要性

ウイルス挿入変異の大規模な解析から、ヒストンのメチル化酵素 17 種 (Ezh2, Setd7, Smyd2 など) と脱メチル化酵素 13 種 (Fbxl10, Jmjd3, Jmjd2c など) を標的として同定した。ヒストンの翻訳後修飾は、転写制御など様々な生物学的現象に関与している。特に、ヒストンの脱アセチル化酵素の阻害剤が抗がん剤として開発されていることもあり、メチル化と発がんの関係も大変注目される。標的として同定したメチル化を制御する酵素群について、所属研究所のヒトがん組織バンクを利用し、がん組織での発現を調べた結果、酵素の発現異常が高頻度に検出された。また、酵素を高発現する数種類のがん細胞株では、酵素の発現をノックダウンすると、細胞増殖の抑制が観察され、ヒストンのメチル化の脱制御が、がん細胞の増殖に密接に関与していることが確認された。さらに、次のような研究課題を進行してきた。ヒストンのメチル化を制御する酵素によって発現調節される標的遺伝子の探索のため、cDNA シークエンスによるデジタル発現プロファイルを確立し、標的遺伝子のデータベースを作成した。

がんで高発現するヒストン H3 の 9 番目の Lys (H3K9) の脱メチル化酵素 JMJD2C が、MDM2 がん遺伝子の発現上昇と、細胞内の p53 がん抑制遺伝子産物の減少を誘導することを示した。がん抑制遺伝子である UTX 脱メチル化酵素が、細胞増殖を負に制御し、RB がん抑制遺伝子の発現を導くことを示した。H3K4 脱メチル化酵素 PLU1 が、がんの発症だけでなく、がん細胞の浸潤能を亢進することを示し、がんの悪性進展過程における新たな役割を見つけた。

##### (2) ヒストン脱メチル化酵素 PLU1 による上皮・間葉転換 (EMT) の制御

ヒストン H3 の 4 番目の Lys (H3K4) の脱メチル化酵素 PLU1 は、様々な種類のがんで高発現が見られ、がん細胞の浸潤能を亢進する活性をもつが、今回、PLU1 酵素が、がん細胞の上皮・間葉転換 (EMT) を誘導することを新たに見いだした。PLU1 の高発現は、

EMT 誘導に重要な転写制御因子のうち、ZEB1, ZEB2 の発現を上昇させた。これは、ZEB 転写制御因子の発現を抑制している microRNA-200 ファミリーの発現抑制に起因する。PLU1 が miR-200 遺伝子クラスターの発現制御領域にリクルートされ、ヒストン H3K4me3 を脱メチル化する一方、H3K27me3 レベルを増加させ、転写抑制的クロマチン構造を誘導することがわかった。さらに、がん細胞株を用いた実験だけでなく、ヒト肺がん組織において、PLU1 の発現レベルと ZEB1, ZEB2 の発現レベルの間に、正の相関関係があることが示された。また、H3K27 脱メチル化酵素である JMJD3 は、その発現の低下が EMT を促進するが、同様に miR-200 を標的として発現調節を行うことがわかった。すなわち、Bivalent なヒストンのメチル化修飾による microRNA のエピジェネティックな制御が、EMT の可逆的性質に関与している可能性が示された。(発表文献)

##### (3) ヒストンメチル化酵素複合体 PRC2 による上皮・間葉転換 (EMT) の制御

ヒストン H3 の 4 番目の Lys (H3K4) の脱メチル化酵素 PLU1 は、がん細胞の浸潤および上皮・間葉転換 (EMT) を促進する活性をもつことを報告してきた。しかし、PLU1 の発現をノックダウンしても、TGF-beta など外部刺激による EMT の誘導は阻害できないことがわかった。そこで、EMT において H3K4 と同様に重要な H3K27 のメチル化制御に関わる酵素の役割を解析した。PRC2 (Polycomb repressive complex-2) は、H3K27 のメチル化を担う酵素複合体であり、EZH2 メチル化酵素および SUZ12, EED, RBBP4/7 のコアコンポーネントから構成される。私達は、これらの構成因子のうち H3K27me3 修飾を認識する EED タンパク質だけが、TGF-beta 刺激による EMT プロセスで発現誘導されることを見いだした。EED の発現をノックダウンすると、PRC2 の H3K27 メチル化活性が低下し、転写抑制的クロマチン構造の誘導が阻害されることによって、EMT に重要な E-cadherin や microRNA-200 ファミリー遺伝子の発現抑制が解除され、TGF-beta による EMT 誘導がブロックされることが示された。(発表文献) さらに私達は、PRC2 コアコンポーネント以外にも、PRC2 複合体をクロマチンにリクルートする役割を担う JARID2 タンパク質が、TGF-beta 刺激による EMT プロセスで顕著に発現誘導されることを見つけた。JARID2 の発現をノックダウンすると、PRC2 の標的遺伝子へのリクルートが阻害されて、標的遺伝子の発現抑制が解除され、TGF-beta による EMT 誘導がブロックされることが示された。(発表文献) このように、PRC2 によるヒ

ストン H3K27 のメチル化の制御が、TGF-beta などの外部刺激による EMT の進行に極めて重要であることが示された。

(4) がん関連遺伝子候補 Jmjd5 の機能解析  
挿入変異の標的として同定した酵素のうち、JMJD5 の生理機能や発がんにおける役割を解明するために、ノックアウト (KO) マウスを作製した。Jmjd5 null マウスは、胚性致死の表現系を示し、その原因のひとつが、細胞周期制御因子 p21/Cdkn1a の異常な発現亢進であることを見いだした。マウス胚線維芽細胞を用いた解析からも JMJD5 が細胞増殖の制御に重要であることが示された。クロマチン免疫沈降解析の結果、JMJD5 は p21/Cdkn1a 遺伝子の転写領域上のヒストン H3K36 のメチル化状態を変化させて、その発現調節に関与することが明らかになった。(発表文献)さらに、p21/Cdkn1a 以外の p53 によって発現制御される標的遺伝子の解析や、Jmjd5 KO マウスと p53 KO マウスとの交配実験などから、JMJD5 が p53 シグナル経路を Fine-tuning する新しいタイプの制御因子であることを示唆する結果を得ており、JMJD5 複合体の活性と p53 の機能との関係を今後明らかにしていく計画である。

#### 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6件)

Tange S, Oktyabri D, Terashima M, Ishimura A, Suzuki T. JARID2 is involved in Transforming Growth Factor-beta-induced epithelial-mesenchymal transition of lung and colon cancer cell lines. *PLoS One*, 9(12):e115684, 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0115684, 査読有.

Oktyabri D, Tange S, Terashima M, Ishimura A, Suzuki T. EED regulates epithelial-mesenchymal transition of cancer cells induced by TGF-beta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 453, 124-130, 2014. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.082, 査読有.

Suzuki T, Terashima M, Tange S, Ishimura A. Roles of histone methyl-modifying enzymes in development and progression of cancer. *Cancer Science*, 104, 795-800, 2013. doi: 10.1111/cas.12169, 査読有.

Enkhbaatar Z, Terashima M, Oktyabri D, Tange S, Ishimura A, Yano S, Suzuki T. KDM5B histone demethylase controls epithelial-mesenchymal transition of cancer cells by regulating the expression of the microRNA-200 family. *Cell Cycle*, 12, 2100-2112, 2013. doi: 10.4161/cc.25142,

査読有.

Youn MY, Yokoyama A, Fujiyama-Nakamura S, Ohtake F, Minehata K, Yasuda H, Suzuki T, Kato S, Imai Y. JMJD5, a Jumonji C (JmjC) domain-containing protein, negatively regulates osteoclastogenesis by facilitating NFATc1 protein degradation. *J. Biol. Chem.*, 287, 12994-13004, 2012. doi: 10.1074/jbc.M111.32310, 査読有.

Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T, Suzuki T. Jmjd5, an H3K36me2 histone demethylase, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of Cdkn1a expression. *Development*, 139, 749-759, 2012, doi: 10.1242/dev.074138, 査読有.

[学会発表](計15件)

Tange S, Oktyabri D, Terashima M, Ishimura A, Suzuki T. EED regulates epithelial-mesenchymal transition of cancer cells induced by TGF-beta. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日~2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Ishimura A, Tange S, Oktyabri D, Terashima M, Suzuki T. Screening of histone modifying enzymes involved in cancer malignancies. 第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日~2014年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Suzuki T, Tange S, Oktyabri D, Terashima M, Ishimura A. Functional characterization of histone demethylases in the process of epithelial-mesenchymal transition of cancer cells. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月25日~2014年9月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Tange S, Enkhbaatar Z, Terashima M, Suzuki T. A Role for PLU1 on epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. 平成26年度がん若手研究者ワークショップ、2014年9月3日~2014年9月6日、蓼科グランドホテル(長野県・茅野市)

Tange S, Enkhbaatar Z, Terashima M, Suzuki T. A role for KDM5B on epithelial-mesenchymal transition in cancer cells. The 9th International Symposium of Institute Network、2014年6月19日~2014年6月20日、大阪大学銀杏会館(大阪府・吹田市)

Ishimura A, Tange S, Oktyabri D, Enkhbaatar Z, Hara T, Suzuki T. Physiological role of Jmjd5, a novel p53 signal regulator, in embryonic development.

International Symposium in Tumor Biology in Kanazawa & Symposium on Drug Discovery in Academics, 2014年1月23日～2014年1月24日、金沢東急ホテル(石川県・金沢市)

Tange S, Suzuki T. KDM5B histone demethylase controls EMT of cancer cells by regulating the expression of microRNA-200 family. International Symposium on Tumor Biology in Kanazawa & Symposium on Drug Discovery in Academics, 2014年1月23日～2014年1月24日、金沢東急ホテル(石川県・金沢市)

Tange S, Enkhbaatar Z, Terashima M, Oktyabri D, Ishimura A, Suzuki T. がん細胞の上皮間葉転換におけるヒストン脱メチル化酵素の機能解析, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3日～2013年12月6日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Ishimura A, Tange S, Oktyabri D, Enkhbaatar Z, Hara T, Suzuki T. JmjCファミリー遺伝子 Jmjd5 による新しい遺伝子発現制御メカニズムの解析, 第36回日本分子生物学会年会, 2013年12月3日～2013年12月6日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

Suzuki T. Involvement of histone methyl-modifying enzymes in cancer development identified by retroviral insertional mutagenesis. 2013 KUCRI-FUSCC Joint Symposium, 2013年10月11日、金沢大学(石川県・金沢市)

Suzuki T., Tange S, Enkhbaatar Z, Oktyabri D, Terashima M, Ishimura A. Involvement of histone methyl-modifying enzymes in cancer identified by retroviral insertional mutagenesis. 第72回日本癌学会学術総会, 2013年10月3日～2013年10月5日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Suzuki T. Involvement of histone demethylases in cancer identified by retroviral insertional mutagenesis. 2013 SUCRI-KUCRI Joint Symposium, 2013年7月9日～2013年7月10日、ソウル国立大学(ソウル, 韓国)

Ishimura A, Minehata K, Terashima M, Kondoh G, Hara T, Suzuki T. Jmjd5, an H3K36me2 histone demethylase, modulates embryonic cell proliferation through the regulation of p53-target genes expression. 第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日～2012年12月14日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Oktyabri D, Terashima M, Enkhbaatar Z, Tange S, Ishimura A, Suzuki T. Functional analysis of histone demethylases in epithelial-mesenchymal transition of cancer cells. 第35回日本分子生物学会年会、

2012年12月11日～2012年12月14日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

Suzuki T., Terashima M, Enkhbaatar Z, Oktyabri D, Ishimura A. Functional characterization of histone modifying enzymes in the process of malignant progression of cancer. 第71回日本癌学会学術総会, 2012年09月19日～2012年09月21日、札幌市教育文化会館(北海道・札幌市)

〔図書〕(計1件)

鈴木健之. “第5章造血系第1節 自然発症モデル BXH2およびAKxDマウス「疾患モデルの作製と利用 がん」中村卓郎編集, 総ページ数 1-633頁(共著担当 399-408頁), エル・アイ・シー, 2012

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanazawa-u.ac.jp/~ganken/department/mccb/11.html>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

鈴木 健之 (SUZUKI TAKESHI)

金沢大学・がん進展制御研究所・教授

研究者番号: 30262075

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし