

対象研究テーマ：がんの発症・悪性化におけるヒストンのメチル化制御に関する研究

研究期間：2012年4月1日～2013年3月31日

研究題目：がんの発症・悪性進展過程におけるヒストン脱メチル化酵素 JMJD3 の役割の解析

研究代表者：広島大学原爆放射線医科学研究所 教授 本田浩章

研究成果の概要：

ヒストンのメチル化修飾状態の制御異常は、がんの発症や悪性進展を引き起こす重要な要因のひとつと考えられている。我々は、ヒストン脱メチル化酵素のメンバーである JMJD3 遺伝子について、がんとの関連を調べるために、JMJD3 ノックダウン細胞の表現型を解析した。JMJD3 の発現を恒常的にノックダウンした細胞では、細胞運動能の亢進と上皮・間葉転換 (EMT) の促進が観察された。遺伝子の発現解析から、E-Cadherin など EMT マーカー遺伝子や EMT 誘導転写制御因子の発現変化に JMJD3 が関与することがわかった。さらに、これらの遺伝子も含めて、JMJD3 酵素が直接発現制御する標的遺伝子を探索するために、ChIP 解析に使用する JMJD3 特異的モノクローナル抗体の作製を現在進行している。

研究分野：分子生物学

キーワード：がん, エピジェネティクス, ヒストン, 翻訳後修飾, 上皮・間葉転換

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスは、遺伝子の塩基配列が変化することなく、遺伝子発現の多様性を生み出し、異なる表現型を誘導するしくみであり、生物の発生や分化の過程において重要なシステムのひとつである。がんは、正常な細胞の分化・維持機構の破綻が原因であり、エピジェネティクス制御機構の異常もまた、がんの発症・悪性進展を引き起こす要因と考えられる。例えば、ゲノム DNA のメチル化の異常は、古くから様々なタイプの悪性腫瘍の発がん過程で検出されている。さらに近年、ヒストンの翻訳後修飾やそれに関与する酵素の異常が、様々なかたちで発がん過程に関わっていることが報告されている。こうしたエピジェネティクス制御の異常は、次世代のがん治療の標的として特に注目されている。これまでに、ウイルス感染発がんモデルマウスを用いた挿入変異の標的として、ヒストンのメチル化酵素 (SET ドメインタンパク質) と脱メチル化酵素 (JmjC ドメインタンパク質) の多くが同定されてきた。現在、ヒストンのメチル化の制御は、がん研究の分野において注目されている研究領域であり、新しいエピジェネティック医薬の臨床開発への貢献が期待されている。

2. 研究の目的

我々の研究グループは、ヒストンの脱メチ

ル化酵素のひとつである JMJD3 遺伝子について、その個体における機能や発がんとの関連を調べるために、JMJD3 コンディショナル・ノックアウトマウスを作製して、研究を進行している。本共同研究では、JMJD3 ノックアウト細胞や JMJD3 ノックダウン細胞を利用して、JMJD3 脱メチル化酵素によって発現制御される標的遺伝子および遺伝子ネットワークを明らかにすることを目的とする。さらに、得られた情報をもとに、がんの発症・悪性進展過程における JMJD3 酵素の新しい役割とその作用メカニズムを解明することを目指す。

3. 研究の方法

JMJD3 ノックアウトおよびノックダウン細胞について、細胞の増殖、運動能、刺激応答性、薬剤感受性などをコントロール細胞と比較して解析し、JMJD3 の新しい細胞生物学的機能を見いだす。これらの細胞で、発現の変化する遺伝子、すなわち JMJD3 酵素が発現制御する標的遺伝子の候補を探索する。JMJD3 タンパク質を特異的に認識する高力価のモノクローナル抗体を作製し、その抗体を用いた ChIP 解析を行なって、JMJD3 酵素によってエピジェネティックに発現調節される標的遺伝子を同定する。

4. 研究成果

shRNA 発現ウイルスを用いて、JMJD3 の発現を恒常的にノックダウンした細胞では、細胞の増殖には顕著な変化が見られないものの、細胞の運動能が有意に亢進することが観察された。上皮・間葉転換 (EMT) を観察しやすい肺がん細胞 A549 において、同様のノックダウン実験を行なうと、EMT の促進効果が示された。遺伝子発現変化の解析から、JMJD3 のノックダウンは、上皮系マーカー E-Cadherin の発現低下や、間葉系マーカー Fibronectin の発現上昇などを誘導することが示された。さらに、EMT 誘導に關与する転写制御因子 ZEB1 や ZEB2 の発現変化にも關与することがわかった。こうした遺伝子が、JMJD3 酵素の直接の標的遺伝子かどうか調べるために、ChIP 解析に使用する JMJD3 モノクローナル抗体の作製を進行している。得られた抗体は、cDNA 発現ベクターで発現させた JMJD3 タンパク質を検出できるが、内在性の JMJD3 タンパク質については、まだ明確な結論が出ておらず、抗体の精製も含めて、現在対策を検討している。

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 7 件)

Akimoto T, Okuhira K, Aizawa K, Wada S, Honda H, Fukubayashi T, and Uchida T. Skeletal muscle adaptation 1 in response to mechanical stress in p130Cas^{-/-} mice. *Am J Physiol Cell Physiol* 304, C541-547, 2013

Nagamatsu G, Kosaka T, Saito S, Honda H, Takubo K, Kinoshita T, Akiyama H, Sudo T, Horimoto K, Oya M, and Suda T. Induction of pluripotent stem cells from primordial germ cells by single reprogramming factors. *Stem Cells* 31, 479-487, 2013

Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda Zi, Shih LY, Mori H, Inaba T, Ogawa S, and Honda H. *EED* mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. *Leukemia* 26, 2557-2560, 2012

Zhang X, Kinuko Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna H, Kagami K, Goi K, Nakamura K, Kobayashi M, Yagita H, Kurosawa H, Look AT, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K, Endo M, and Inukai T. Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17;19)-positive acute

lymphoblastic leukemia to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors. *Leukemia* 26, 2483-2493, 2012

Ozaki Y, Matsui H, Asou H, Nagamachi A, Aki D, Honda H, Yasunaga S, Takihara Y, Yamamoto T, Izumi S, Ohsugi M, and Inaba T. Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation. *Mol Cell* 47, 694-706, 2012

Li Q, Guo H, Matsui H, Honda H, Inaba T, Sundberg JP, Sprecher E, and Uitto J. Mouse Samd9l is not a functional paralogue of the human SAMD9, the gene mutated in normophosphataemic familial tumoral calcinosis. *Exp Dermatol* 21, 554-556, 2012

Sugihara E, Shimizu T, Kojima K, Ohishi N, Kai K, Ishizawa J, Nagata K, Hashimoto N, Honda H, Kanno M, Miwa M, Okada S, Andreeff M, and Saya H. Ink4a and Arf are crucial factors in the determination of the cell of origin and the therapeutic sensitivity of Myc-induced mouse lymphoid tumor. *Oncogene* 31, 2849-2861, 2012

[学会発表] (計 3 件)

Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda Z, Shih YH, Mori H, Inaba T, Ogawa S, Honda H. Functionally defective mutants of *EED*, a non-catalytic subunit of PRC2, identified in MDS patient. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012, 10, 京都

Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Nagamachi A, Takubo K, Ebihara Y, Inaba T, Sanada M, Tsuji K, Suda T, Ogawa S, Honda H. Acquired expression of c-Cbl Q367P mutation induces myeloid cell proliferation. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012, 10, 京都

Nagamachi A, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Sanada M, Tsuji K, Inaba T, Ogawa S, Honda H. A20, a ubiquitin-modifying enzyme for NF-kappaB, plays an important role in normal hematopoiesis. 第 74 回日本血液学会学術集会, 2012, 10, 京都

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広島大学原爆放射線医科学研究所・教授
本田浩章

(2) 研究分担者

なし

(3) 本研究所担当者

機能ゲノミクス・教授 鈴木健之