

論文の内容の要旨

論文題目 大腸癌におけるヒストン脱メチル化酵素 GASC1 の発現異常とその意義の検討

氏名 山本 信三

【背景・目的】

大腸癌は発生機序や治療法が比較的良好に研究された癌でありながら欧米のみならず我が国でも頻度が高く、最も重要な悪性腫瘍のひとつに挙げられる。近年分子標的薬を代表とする薬剤治療が目覚ましい発展をとげているが、いまだ完全切除が困難な進行大腸癌症例においては局所再発・遠隔転移等の理由により多くの症例で治療抵抗性を示し、完全治癒が難しいのが現状である。それゆえ大腸癌診断・治療における新たなバイオマーカーの開発、治療標的となる molecule の探索が強く望まれている。近年遺伝子異常に加えエピジェネティックな異常も発がんのみならずがんの進展に寄与することが明らかとなっており、エピジェネティクス関連分子も治療標的となりうると考えられる。

エピジェネティクスとは DNA の塩基配列の変化を伴わずに、遺伝子の表現を調節する仕組みのことをいう。エピジェネティクスの異常の一つにヒストン修飾異常が挙げられる。真核生物の細胞核内では DNA はクロマチンと呼ばれる高次構造に収納されているが、DNA はクロマチン構造の最小単位であるヌクレオソームに巻きついて存在する。アミノ酸末端 (N 末端) はヌクレオソームの外側に露出されておりヒストンテイルと呼ばれる。このヒストンテイルはメチル化、アセチル化、リン酸化といった翻訳後修飾を受けることが知られているが、これらのヒストン修飾により DNA とヒストンの複合体であるクロマチン構造に変化が生じ、再構成されたクロマチン構造が遺伝子転写・発現に重要な役割を果たしている。これらのヒストン修飾に関わる酵素の異常が発がんの進展に寄与しているという報告が相次いでいる。本研究ではヒストン H3 の 9 番目のリシン残基を脱メチル化する酵素である GASC1 (Gene Amplified in squamous cell carcinoma1, 別名 JMJD2C, JHDM3C, KDM4C) に着目した。GASC1 は元来食道癌細胞での増幅から同定された遺伝子であり、この遺伝子によってコードされる分子がヒストン脱メチル化活性をもち、その抑制が食道癌細胞の増殖を抑制するという知見が報告されている。一方で大腸癌における GASC1 の発現異常およびその意義に関する報告はまだない。予備検討により大腸癌手術検体の癌部・非癌部における GASC1 発現を解析すると非癌部に比し癌部で GASC1 発現が高い症例が多いことが見出された。そこで本研究では GASC1 のがんにおける生物学的役割を検討した。

【方法】

1. 大腸癌手術検体癌部・非癌部における GASC1 発現の解析

2. 大腸癌における GASC1 発現を制御する上流シグナルの解析
 3. 大腸癌細胞株を用いた GASC1 ノックダウン細胞株の樹立及びその表現型解析
 4. cDNA アレイを用いた GASC1 の標的遺伝子の探索 (クロマチン免疫沈降法)
- なお得られたデータは各群の平均値±標準誤差(SE)として示し、2 群間の比較は Student-t test、Fisher's exact probability test を用い、 $p < 0.05$ を統計学的有意と判定した。

【結果】

大腸癌手術検体 20 例の癌部・非癌部組織より RNA を抽出し GASC1 発現レベルを解析したところ、癌部において GASC1 発現の高い症例が約半数の 11 症例 (55%) で存在しそのほとんどの症例で非癌部における GASC1 発現を認めなかった。以前に当研究室で行われた大腸癌細胞株を用いた SNP アレイによる LOH 解析の結果を参照すると大腸癌では同部位の Gene amplification を認めず、大腸癌癌部における GASC1 高発現のメカニズムとして GASC1 発現を促進する上流シグナルが存在する可能性を検討した。大腸癌細胞株を用いて β -catenin をノックダウンすることで大腸癌で重要な Wnt シグナルを抑制すると GASC1 発現が抑制されたため、大腸癌において GASC1 発現は Wnt シグナルに制御される可能性が示唆された。

次に GASC1 の大腸癌における生物学的役割を検討するために、比較的 GASC1 発現の高い大腸癌細胞株 WiDr においてレンチウイルスを用いて GASC1 の安定ノックダウン細胞株を樹立し、その表現型を解析した。食道癌細胞と異なり GASC1 発現抑制による増殖能への影響は認めず、同時に遊走能・浸潤能にも変化を示さなかった。In vitro における腫瘍形成能を評価するため sphere formation assay を施行した。具体的には単一細胞になるよう十分ほぐした 500 個の細胞を 24 ウェルプレートに播いたのち 10 日間浮遊状態で細胞を培養後、形成された sphere の内径が 100 μ m 以上のものの大きさおよび数を検討した。GASC1 ノックダウン細胞株ではコントロール細胞株に比し有意に小さく、また少数の sphere しか形成されず GASC1 ノックダウンにより sphere 形成が抑制されることが示唆された (GASC1 コントロール:78.2 \pm 16.0 個、GASC1 ノックダウン 15.0 \pm 3.51 個、 $p=0.0186$: 100 μ m 以上の sphere の個数を計測)。ノックダウン細胞に Gasc1 を発現させることでこの表現型が回復すること、また膀胱癌細胞株で GASC1 をノックダウンすることでも同様の表現型がみられたことから、この表現型は GASC1 に特異的な現象であると考えられた。

次に大腸癌における GASC1 の標的遺伝子の探索を行った。具体的には WiDr コントロール細胞株・GASC1 ノックダウン細胞株を用いて sphere を作成し RNA を抽出後、cDNA アレイを用いて GASC1 により発現が制御される遺伝子群の網羅的探索を施行した。大腸癌の腫瘍形成に Wnt シグナル・Notch シグナルが関与している報告があることより、cDNA アレイの結果をもとに Wnt シグナル・Notch シグナルの遺伝子群を用いて GSEA 解析を行った。GASC1 ノックダウンにより Wnt シグナル・Notch シグナルの遺伝子群全体としては有意な変動は認めなかったが、その中で Wnt シグナルの下流に位置し Notch シグナルの一つである JAG1 の発現が低下していることに着目した。JAG1 が GASC1 の標的遺伝子であることを確認するためにクロマチン免疫沈降法を施行したところ GASC1 は H3K9me3 メチル化レベルとは独立して Wnt シグナ

ルの key molecule である β -catenin の JAG1 プロモーター領域へのリクルートを制御することで JAG1 発現を制御することが示された。また実際大腸癌細胞で JAG1 の安定ノックダウン細胞株を樹立し sphere assay を施行したところ *in vitro* における腫瘍形成能が抑制することが確認できた。

【考察】

① 大腸癌手術検体における GASC1 発現について

食道癌・乳癌・前立腺癌細胞株において *GASC1* の存在する染色体 9p23-24 に amplification が存在し、食道癌細胞株において *GASC1* 発現が高いことが知られている。今回大腸癌手術検体における *GASC1* の発現を解析したが、約半数の症例で癌部における *GASC1* 発現が高いことが確認できた。大腸癌における *GASC1* の発現増加に関しては Wnt シグナルが関与していることが示唆され、Gene Amplification 以外の理由で *GASC1* 発現が亢進することは本研究が初めての報告となる。

② GASC1 は癌細胞の腫瘍形成能に必要である

以前より *GASC1* が癌遺伝子として機能していることが食道癌・乳癌等で報告されている。今回大腸癌細胞株を用いた *GASC1* 表現型解析においては同じ消化管癌である食道癌と異なり growth には関与を認めなかったが、一方で乳癌と同様 *GASC1* が sphere 形成に関与していることを見出した。*In vivo* において高い腫瘍形成能をもつ細胞は *in vitro* で単一細胞から sphere を形成しうることが知られ、sphere assay は癌細胞の腫瘍形成能の指標として用いられている。従って形成された大腸癌 sphere には大腸癌幹細胞の性質に富む細胞が含まれている可能性があり、このことは *GASC1* が未分化な胚性肝細胞に発現し幹細胞維持に関わっていることにも矛盾しないのかもしれないと考えた。

③ Wnt 下流遺伝子 JAG1 は GASC1 により制御され、腫瘍形成能低下の責任遺伝子のひとつである

今回 cDNA アレイを用いて *GASC1* により発現が制御される遺伝子群の網羅的探索を行った。GSEA 解析により Wnt シグナルの下流に位置し、また Notch シグナルのリガンドの一つである JAG1 に着目したところ確かに JAG1 発現が *GASC1* に制御されており、また JAG1 が大腸癌における sphere 形成に関与していることが示された。

そもそも JAG1 は Notch シグナルの 5 種類あるリガンド (JAG1, JAG2, Delta1, Delta3, Delta4) のうちの 1 つであり細胞表面に発現する蛋白である。隣接する細胞の表面に発現する 4 種類のレセプター (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4) との間で細胞間シグナル伝達を担い、大腸癌において高発現していることが知られている。また大腸腫瘍の発生、発育、進展に重要である Wnt シグナルの下流にも位置し、Wnt シグナルの key molecule である β -catenin の標的遺伝子であることが知られている。すなわち JAG1 は Wnt シグナルと Notch シグナルのクロストークを媒介する molecule である可能性がある。

大腸癌の腫瘍形成に関しては①大腸癌 sphere で Wnt シグナルが活性化している ②Notch シグナル抑制により大腸癌の腫瘍形成能が低下し逆に Notch1 過剰発現により腫瘍形成能が促

進する ③Notch リガンドの一つである Jag1 欠失による Notch シグナル抑制で ApcMin マウスにおける腺腫の腫瘍形成が抑制される等 Wnt シグナル・Notch シグナルが関与するという報告がなされている。Wnt シグナル・Notch シグナルの両者に関わり GSEA 解析でも着目された JAG1 に対して検討をすすめていくと、GASC1 が β -catenin の JAG1promoter 領域へのリクルートを制御することで JAG1 発現を制御していた。また JAG1 が大腸癌における sphere 形成に関与しており、大腸癌で重要とされている Wnt シグナルによる sphere 形成に GASC1 が関与している可能性を今回示すことができた。

【結論】

本研究ではヒストン H3 の 9 番目のリシン残基を脱メチル化する酵素 GASC1 が大腸癌細胞の腫瘍形成能を制御することを見出した。その過程で Wnt シグナルの下流で発現する Notch リガンド JAG1 を GASC1 の標的遺伝子として同定し、同時に β -catenin による JAG1 の発現に GASC1 を介した転写制御が必須であることを見出した。このことはヒストン修飾因子 GASC1 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、腫瘍形成能獲得に寄与している可能性を示唆した。実際に大腸癌手術検体において GASC1 発現と JAG1 発現との間に有意な相関があることが確認できた。本研究結果は大腸がんにおいてもエピジェネティック修飾機構の異常ががんの性質の変化をもたらすその進展に寄与する可能性を示唆するものと考えられる。