

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：34419

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893309

研究課題名(和文) ヒストン脱メチル化酵素による乳腺上皮分化、乳癌発症の制御機序の解明

研究課題名(英文) Histone demethylase regulate mammary gland development and breast cancer development

研究代表者

岡田 斉 (OKADA, Hitoshi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：20280620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：エストロゲンは、生理的に、或いは乳癌、骨粗鬆症をはじめとするヒト疾患の発症および進展において重要な役割を果たすことが知られている。我々は、エピジェネティクス制御因子、KDM4B/JMJD2B、がエストロゲンの機能制御に重要な役割を果たす事を見出した。現在まで、エピジェネティクス制御因子がどの様に乳腺上皮の発達を制御し、乳がん発症に影響を与えるかは個体レベルでは十分に解明されておらず、我々の知見は、KDM4B信号伝達経路が新規治療標的となる可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The estrogen receptor (ER) signaling pathway is the established therapeutic target of Luminal A breast cancer, thus determining the molecular basis of the ER signaling pathway is crucial for understanding the biology of breast cancer and overcoming hormone therapy resistance. We have identified that an H3K9 histone lysine demethylase, KDM4B/JMJD2B, regulates estrogen signaling pathway by acting as a transcriptional co-activator for promoting ER-dependent cell proliferation. In addition, further cell biological, biochemical, and epigenomic analyses of human cancer cell lines and our tissue-specific Kdm4b knockout mice have uncovered the full spectrum of activities of KDM4B in regulating critical oncogenic signaling pathways and mammary gland development. We thus propose that KDM4B signaling pathway is a potential target for cancer treatment.

研究分野：生化学、がん

キーワード：エピジェネティクス 乳がん エストロゲン受容体

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 乳腺組織は思春期、妊娠期において性ホルモンの影響を受け、非常に動的にその形態を変化させることが知られている。乳腺上皮細胞は大きく基底上皮細胞と管腔上皮細胞に分類され、これら2つの系譜に分類される上皮細胞は乳腺幹細胞に由来することが知られている (*Nature* 439 84; *Nature* 439, 993)。乳腺幹細胞は細胞表面マーカーを用いて基底上皮細胞の一部として FACS 上で分離される (野生型マウス乳腺上皮細胞の CD24 と CD49f で行った FACS 例を示す: 図 1)。非常に興味深いことに、近年、エストロゲン受容体を介する信号伝達系が、パラクラインシグナルを介して、乳腺幹細胞の増殖を促進させることが報告された (*Nature* 465, 803; *Nature* 465, 798)。実際、妊娠時には、乳腺幹細胞の活性が 5~10 倍増加する。また、マウス遺伝学を用いた細胞系譜の追跡により、成体マウスでは前駆細胞が乳腺組織の維持に重要な役割を果たすことが示された (*Nature* 479, 189)。これらの報告は、ホルモン環境と呼応して、乳腺幹細胞と前駆細胞の分化と増殖を協調的に制御する機序が存在することを示唆している。

(2) KDM4B はヒストン H3K9 と K36 のトリメチル、ジメチル基を基質とする KDM4 サブファミリーに属する脱メチル化酵素として報告されたが、生体内での機能の詳細はまだ十分に解明されてはいない。しかしながら、我々が報告した様に、① KDM4B はエストロゲン受容体とエストロゲン依存的に核内で結合し、② KDM4B がエストロゲン依存性乳癌細胞 (MCF7、ZR-75-1、T47-D) の増殖に必須であり、③ KDM4B をノックダウンした MCF7 細胞を用いた網羅的遺伝子発現解析では、エストロゲン受容体の標的遺伝子が有意に影響

を受ける (Kawazu M. et al, *PLoS One*. 6:e17830 (2011))。これらの知見と他グループからの報告を合わせ、Kdm4b はエストロゲン信号伝達系で重要な役割を果たしていると考えられる。

(3) エストロゲンの血中濃度が乳癌発症リスクと正相関することが、動物実験、ヒト疫学的研究から示唆されているが、その機序の詳細は明らかではない。また、エストロゲン信号伝達系を介した乳腺幹細胞の増殖がヒトでも同様に起こり得るか否か、あるいは、制御を失った乳腺幹細胞の増加が直接的に乳癌の発症リスクを上昇させるか否か、という点については今後の更なる研究が必要であろう。しかしながら、これまでの報告は、エストロゲン信号伝達系、乳腺幹細胞の制御機序と乳癌の発症リスクの間に何らかの機能的関連があることを強く示唆している。また、共通の下流遺伝子発現調節により、KDM4B が乳腺以外の組織の発達と他のがん種の発症・進展に寄与する可能性があると予想される。

## 2. 研究の目的

エストロゲン受容体を介する信号伝達系は、生理的に、或いは乳癌、骨粗鬆症をはじめとするヒト疾患の発症および進展において重要な役割を果たすことが知られている。

本研究では、申請者らが発見し報告したエストロゲン受容体共役因子であるヒストン脱メチル化酵素、KDM4B (JMJD2B) の更なる機能解析を行う。申請者が新規作成した Kdm4b 組織特異的ノックアウトマウスの表現系解析と乳腺上皮の遺伝子発現解析等を組み合わせ、Kdm4b の欠損がどの様に乳腺上皮の分化、他の組織での機能、がんの発症・進展に影響を及ぼすのかを明らかにする。将来

的には KDM4B 信号伝達経路を標的とした治療応用を視野に入れた研究を展開することを目標とする。

### 3. 研究の方法

本研究計画では、我々が報告したエストロゲン受容体共役因子である Kdm4b に焦点を当てる。

(1) 先ず、Kdm4b が乳腺上皮細胞を制御する分子基盤を明らかにし、更に、Kdm4b の欠損が乳癌発症、進展、転移およびその組織型に及ぼす影響を解明する。申請者らが新規作成した乳腺上皮特異的 Kdm4b 欠損マウスを用いた詳細な表現系解析、網羅的遺伝子発現解析、細胞培養系を組み合わせることで Kdm4b がどの系譜の乳腺上皮細胞の分化増殖に必要であるか明らかにできると考える。

(2) データベースサーチによりヒトがんにおける KDM4B 発現パターンを検索し、KDM4B 機能ががんの発症・進展に寄与することが示唆された種々のがんにおける KDM4B の機能解析を行う。

(3) 乳腺以外の組織における KDM4B の機能解析のため、我々が作成した組織特異的ノックアウトマウスを用いて解析を行う。その際、エストロゲン信号伝達経路の抑制が加齢性変化で起こることを念頭に置く。

### 4. 研究成果

(1) KDM4B の乳腺上皮発達における機能を解析した。培養系、エピゲノム解析、マイクロアレイの結果から、KDM4B が MYC を含めた、細胞増殖を司る遺伝子制御に深く関わっているという知見を得た。エストロゲン受容体信号伝達系路で重要な役割を果たしていることが示唆された。本知見は、第 74 回日本癌学会年会コアシンポジウム、第 38 回日本

分子生物学会年会、第 88 回日本生化学学会合同大会で報告した。

(2) KDM4B の代謝における機能解析を行い、KDM4B 欠損により個体レベルで肥満が誘導されることを見出した。この知見は KDM4B がエネルギー代謝を活性化する機能を有することを強く示唆している。また、KDM4B がエストロゲン信号伝達系に重要な役割を果たすことを考慮すると、老化に伴う肥満発症機序を担っていると考えられる。本知見は、第 87 回日本生化学学会にて発表した。

(3) 脳腫瘍における KDM4B の働きに関する国際共同研究を行い、KDM4B が MYC と協調し、脳腫瘍の進展に関わることを明らかにした。実際、KDM4B を MYC の増幅のある脳腫瘍細胞株あるいは他のがん細胞株でノックダウンすると、その増殖は有意に抑制された。これらの知見は、KDM4B 信号伝達系が新規がん治療の標的となる可能性を強く示唆している。本知見は学術論文として発表した。

(4) KDM4B の脳神経系に対する機能解析を行った。共同研究を行い、KDM4B が中枢神経系ニューロンの樹状突起の成熟に必須であり、KDM4B 欠損マウスは記憶障害、行動異常を引き起こすことを学術論文として報告した。

### 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 3 件)

(1) Deletion of JMJD2B in neurons leads to defective spine maturation, hyperactive behavior and memory deficits in mouse.

YT Fujiwara K, Fujita Y, Kasai A, Onaka Y,

Hashimoto H, Okada H, Yamashita T.

**Transl Psychiatry**. 6 (e766) (2016) 査読あり

DOI: 10.1038/tp02016031

(2) Loss of Survivin in Intestinal Epithelial Progenitor Cells Leads to Mitotic Catastrophe and Breakdown of Gut Immune Homeostasis

Martini E, Wittkopf N, Gunther C, Leppkes M, Okada H, Watson AJ, Pdstawa E, Backert I, Amann K, Neurath MF, Becker C

**Cell reports** 14 (5), 1062-1073 (2016) 査読あり

DOI: 10.1016/j.celrep.2016.01.010

(3)

The Role of Histone Demethylase KDM4B in Muc Signaling in Neuroblastoma

J Yang, A Altahan, D Hu, Y Wang, PH Cheng, CL Morton, C Qu, AC Nathwani, JM Shoheit, T Fotsis, J Koster, R Versteeg, H Okada, AL Harris and AM Davidoff

**JNCI** djv080 (2015) 査読あり

DOI: 10.1093/jnci/djv080

[学会発表] (計 3件)

(1) 岡田 斉 ヒストン脱メチル化酵素による乳腺発達調節 第38回日本分子生物学会、第88回日本生化学学会 2015年12月3日、神戸国際会議場(神戸)

(2) Hitoshi Okada Histone demethylase KDM4B/JMJD2B, constitutes a key component of oncogenic signaling pathways 第74回日本癌学会年会コアシンポジウム 2015年10月8日、名古屋国際会議場(名古屋)

(3) 岡田 斉 ヒストン脱メチル化酵素 KDM4B 欠損による肥満誘導、第87回日本生化学学会、2014年10月7日、京都国際会館(京都)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 斉 (OKADA, Hitoshi)  
近畿大学・医学部・教授

研究者番号: 20280620

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: