

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06941

研究課題名(和文) 乳がん悪性化におけるHistone demethylaseの役割と治療法の探索

研究課題名(英文) Role of histone demethylase in breast cancer progression and finding new therapeutic approaches for breast cancer

研究代表者

古室 暁義 (KOMURO, Akiyoshi)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：50512274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱メチル化酵素が乳がんを与える影響を調べるため、ヒストン脱メチル化酵素であるUTXおよびKDM4Bの乳腺組織特異的ノックアウトマウスを用いて、乳がん発症マウス(MMTV-PyMTマウス)に及ぼす影響を検討した。その結果、Utx欠損とMMTV-PyMTの複合変異を持つ乳がん発症マウスでは腫瘍増殖や肺転移、浸潤能が促進していた。一方、Kdm4b欠損とMMTV-PyMTの複合変異を持つ乳がん発症マウスでは腫瘍増殖が抑制される結果を得た。KDM4Bの欠損は乳がん細胞の発生もしくは増殖を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリプルネガティブタイプ乳がんや転移性乳がんに対しては効果的な治療法が無いのが現状である。本研究によって、ヒストン脱メチル化酵素であるUTXの欠損は浸潤性の高い乳がん細胞を発生することが明らかとなった。UTXの欠失や発現の低下は乳がんの悪性化を促進し、乳がんの治療または診断におけるUTXの臨床的関連性があることが示唆された。一方、KDM4Bの欠損によって乳がんの発生・増殖が抑えられることから、KDM4Bの阻害剤が乳がんに対する新たな治療法となることが期待された。

研究成果の概要(英文)：UTX is a histone demethylase that targets di- and tri-methylated histone H3 lysine 27 (H3K27me2/3) and KDM4B is a histone H3K9me2/3 demethylase. To study the effect of histone demethylase UTX and KDM4B loss on breast cancer in vivo, we have generated the mouse mammary tumor virus-polyoma middle T antigen (MMTV-PyMT) model of breast cancer lacking Utx or Kdm4b. We found that Utx deficiency accelerates tumor development and lung metastasis. Furthermore, breast tumor organoids isolated from Utx-deficient MMTV-PyMT mice showed highly invasive phenotype in 3D culture. These results suggested that deletion or decreased expression of UTX may promote human breast cancer progression, implicating clinical relevance of UTX in breast cancer treatment and/or diagnosis. On the other hand, loss of KDM4B suppressed the growth of mouse mammary tumor and prolonged the survival of MMTV-PyMT breast cancer mice. The inhibitor of KDM4B may have the therapeutic effect on breast cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：エピジェネティクス 乳がん

1. 研究開始当初の背景

2000年以降より、Histone demethylase が多数同定され、その後の精力的な研究により、エピジェネティックな遺伝子発現制御のメカニズムが明らかになってきた。がんへの影響についても悪性を促進するものや抑制するものなど様々な報告がなされてきた。

Histone demethylase である Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome (UTX) はヒストン H3 の 27 番目のリジン(H3K27)のメチル基を取り除き転写を制御する。乳がんとの関連では、ホルモン感受性の乳がんにおいて、高発現している UTX が、がんの増殖に促進的に働くという報告がある⁽¹⁾。しかし、他方では、UTX の発現の欠如が上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT)を誘導し転移を促進するという報告もあり⁽²⁾、依然として UTX と乳がんの関連性は不明な部分がある。H3K27 のメチル化はがん幹細胞の未分化性維持に寄与していることが分かってきた⁽³⁾。当研究室においても、Utx のノックアウトマウスの検討から、ES 細胞の分化の制御に Utx が深く関わっていることを明らかにした⁽⁴⁾。Utx のノックアウトマウスでは H3K27 のメチル化が維持され、がん幹細胞の生存が強まり、悪性が促進する可能性があった。

同じく Histone demethylase の 1 つである KDM4B はヒストン H3 の 9 番目のリジン(H3K9)のメチル基を取り除き、転写を正に制御する。乳がんとの関連には、hypoxia で発現が誘導され、KDM4B が高発現する乳がんは予後が不良であることが報告されている⁽⁵⁾。我々は KDM4B の乳腺特異的ノックアウトマウスを作成し、このマウスは乳腺発育異常を起こすことを明らかにした。また、KDM4B が Luminal type 乳がん細胞株でエストロゲン依存的に発現誘導されることを見出した⁽⁶⁾。KDM4B の機能を阻害することで乳がんの悪性を抑える可能性があった。

これまでに乳がん発症マウスにおいて、Utx や Kdm4b の欠損がどのような影響を与えるかを個体レベルで検証した報告はなかった。

2. 研究の目的

Histone demethylase が乳がん発症マウスに及ぼす影響を、2 種類の Histone demethylase (Utx, Kdm4b)のコンディショナルノックアウトマウスを用いて検討した。乳がんの発症・増殖・転移の各ステージにおいて、個体レベルで悪性化への影響（発症なのか腫瘍増殖なのか転移なのか？がん微小環境に違いがあるのか？）を明らかにし、さらに、乳がん悪性化に関与する因子を同定、阻害することで治療効果があるか検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 乳がんを発症するマウス (mouse mammary tumor virus-polyoma middle T antigen (MMTV-PyMT マウス)に、乳腺特異的な Utx コンディショナルノックアウトマウスと交配したマウス(Utx KO; PyMT マウス)、または KDM4B コンディショナルノックアウトマウスとを交配したマウス(KDM4B KO; PyMT マウス)において、乳がんの発症・悪性化に影響を与えた。

(2) 乳がんの発生・悪性化にどのように影響を与えたか、原発腫瘍の形成、腫瘍増殖、肺転移の有無・増減について評価した。

(3) Utx KO; PyMT マウス、または KDM4B KO; PyMT マウスの原発腫瘍から、乳がん細胞を

採取し、同系の FVB マウスの乳腺に移植して腫瘍形成能を評価した。また、ヌードマウスの尾静脈より移植して肺転移を評価した。

(4) がん組織の特性を反映したオルガノイド培養法を用いて、乳がんオルガノイドを使った検討を行った。Utx KO; PyMT マウス、または KDM4B KO; PyMT マウスの原発腫瘍から、乳がんオルガノイドを樹立した。

(5) 乳がんオルガノイドを I 型コラーゲン内に包埋し浸潤能を評価した。浸潤能が観察された乳がんオルガノイドに対して、ヒストンアセチル化阻害剤や BRD4 阻害剤を用いて、浸潤能に影響を与えるかを評価した。

(6) I 型コラーゲン内で浸潤能を示した状態と阻害剤により浸潤能を阻害した条件で、細胞から RNA を回収し、RNA-Seq を行った。RNA-Seq の遺伝子発現解析から、がんの増殖・浸潤・転移といった悪性化に関与する因子を同定した。

4 . 研究成果

(1) Utx 欠損と MMTV-PyMT の複合変異を持つ乳がん発症マウス (Utx KO; PyMT マウス) では、腫瘍増殖や肺転移が促進し、Utx KO; PyMT マウス由来の乳がん細胞を同系 FVB マウスへ同所移植を行うと、PyMT マウス由来の乳がん細胞よりも腫瘍形成能が促進し、ヌードマウスへの尾静脈移植では肺転移が促進した。さらに、Utx KO; PyMT マウス由来の乳がんオルガノイドを樹立して、FACS 解析を行ったところ、Basal type の細胞が増えていることが分かった。そして、乳がんオルガノイドを I 型コラーゲン内に包埋すると浸潤形態を強く伴いながら増殖したが、この浸潤形態は BET 阻害剤である JQ1 で完全に阻害されることを見出した。RNA-Seq の発現解析から EMT や乳がんの悪性化にかかわる様々な因子についての関与が明らかになった。このうち、Basal-like 乳がんにおいて高発現しており転移を促進する原因因子として報告がある転写因子 X について着目したところ、この転写因子 X の発現には、UTX と BRD4 によるスーパーエンハンサー領域での発現制御が起きていることを示唆する新たな結果を得た。

(2) Kdm4b 欠損と MMTV-PyMT の複合変異を持つ乳がん発症マウス (Kdm4b KO; PyMT マウス) では腫瘍増殖が抑制される結果を得た。さらに、Kdm4b KO; PyMT マウス由来の乳がんオルガノイドは、I 型コラーゲン内での浸潤性が抑制されていた。Kdm4b KO; PyMT マウスから乳がん細胞を採取し、さらに同系 FVB マウスの乳腺に同所移植をしたところ、Luminal type 様の乳がんが発症することが観察された。Kdm4b KO; PyMT マウスの乳がんは、MMTV-Cre により Kdm4b が欠損されるはずであるが、Kdm4b が欠損している乳がん細胞の集団は減少傾向であった。このことから、ほとんどが Kdm4b の欠損を起こしていない乳がん細胞集団になっていることが予想された。KDM4B の欠損は乳がん細胞の発生もしくは生存維持を抑制する可能性が示唆された。

<引用文献>

Xie G, Liu X, Zhang Y, Li W, Liu S, Chen Z, Xu B, Yang J, He L, Zhang Z, Jin T, Yi X, Sun L, Shang Y, Liang J. (2017). UTX promotes hormonally responsive breast carcinogenesis through feed-forward transcription regulation with estrogen receptor. *Oncogene*, 36(39), 5497-5511.

Choi HJ, Park JH, Park M, Won HY, Joo HS, Lee CH, Lee JY, Kong G. (2015). UTX

inhibits EMT induced breast CSC properties by epigenetic repression of EMT genes in cooperation with LSD 1 and HDAC 1. *EMBO reports*, 16(10), 1288-1298.

van Vlerken LE, Kiefer CM, Morehouse C, Li Y, Groves C, Wilson SD, Yao Y, Hollingsworth RE, Hurt EM. (2013). EZH2 is required for breast and pancreatic cancer stem cell maintenance and can be used as a functional cancer stem cell reporter. *Stem cells translational medicine*, 2(1), 43-52.

Ota K, Tong KI, Goto K, Tomida S, Komuro A, Wang Z, Nishio K, Okada H. (2017). The H3K27 demethylase, Utx, regulates adipogenesis in a differentiation stage-dependent manner. *PloS one*, 12(3), e0173713.

Yang J, Jubb AM, Pike L, Buffa FM, Turley H, Baban D, Leek R, Gatter KC, Ragoussis J, Harris AL. (2010). The histone demethylase JMJD2B is regulated by estrogen receptor α and hypoxia, and is a key mediator of estrogen induced growth. *Cancer research*, 70(16), 6456-6466.

Kawazu M, Saso K, Tong KI, McQuire T, Goto K, Son DO, Wakeham A, Miyagishi M, Mak TW, Okada H. (2011). Histone demethylase JMJD2B functions as a co-factor of estrogen receptor in breast cancer proliferation and mammary gland development. *PloS one*, 6(3), e17830.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Oka N, Komuro A, Amano H, Dash S, Honda M, Ota K, Nishimura S, Ueda T, Akagi M, Okada H	4. 巻 8(4)
2. 論文標題 Ascorbate sensitizes human osteosarcoma cells to the cytostatic effects of cisplatin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pharmacology research & perspectives	6. 最初と最後の頁 e00632
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/prp2.632	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ota K, Komuro A, Amano H, Kanai A, Ge K, Ueda T, Okada H	4. 巻 9
2. 論文標題 High fat diet triggers a reduction in body fat mass in female mice deficient for Utx demethylase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10036
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-46445-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古室暁義、上田 健、天野恭志、岡田 斉
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素KDM6Aの機能欠損は乳がんの増殖と転移を促進する。
3. 学会等名 第24回 日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akiyoshi Komuro, Takeshi Ueda, Hitoshi Okada
2. 発表標題 Effect of loss of histone demethylase UTX on breast cancer development
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古室暁義、上田 健、岡田 斉
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素UTXの機能阻害による乳がん悪性化への影響
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古室暁義、上田 健、天野恭志、岡田 斉
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素KDM6Aの機能欠損は乳がんの増殖と転移を促進する
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古室暁義、上田 健、天野恭志、岡田 斉
2. 発表標題 乳がん悪性化におけるヒストン脱メチル化酵素の役割
3. 学会等名 第23回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akiyoshi Komuro, Takeshi Ueda, Hitoshi Okada
2. 発表標題 Inhibition of histone demethylase KDM6A promotes breast cancer progression
3. 学会等名 第78回 日本癌学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 斉、古室暁義、天野恭志、上田 健
2. 発表標題 Utx欠損は高脂肪食により誘導される肥満を雌マウス特異的に抑制する
3. 学会等名 第48回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古室暁義、上田 健、天野恭志、岡田 斉
2. 発表標題 乳がん悪性化におけるヒストン脱メチル化酵素KDM6Aの役割
3. 学会等名 第22回 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 太田 一成、古室 暁義、上田 健、天野恭志、岡田 斉
2. 発表標題 ヒストン脱メチル化酵素Utxによる脂質代謝制御の解明
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Akiyoshi Komuro, Takeshi Ueda, Hitoshi Okada
2. 発表標題 Effect of inhibition of histone demethylase KDM6A on breast cancer development
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------