

# がん細胞における *EZH2* 遺伝子 高発現機構の解析

東京大学大学院 新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

2008 年度 修士論文

076539 常田啓太

指導教員 落合淳志

# 目次

	ページ
． 要旨	1
． Summary	3
． 略語表	5
． 序論	7
． 実験材料および方法	11
(1) 細胞培養	
(2) 阻害剤処理	
(3) 定量的 PCR	
(4) RNA 干渉	
(5) コンストラクトレポータープラスミド作製	
(6) ルシフェラーゼアッセイ	
(7) ウェスタンブロッティング	
． 結果	19
(1) 各種阻害剤による <i>EZH2</i> mRNA の発現変化	
(2) <i>EZH2</i> 遺伝子上流のプロモーター解析	
(3) Elk-1 による <i>EZH2</i> 発現量への影響	
(4) Elk-1 のリン酸化状態と <i>EZH2</i> タンパク質発現量の解析	
． 考察	23
(1) がんにおける <i>EZH2</i> 高発現をもたらしているシグナル伝達機構は細胞株の種類ごとに異なる	
(2) <i>EZH2</i> 遺伝子転写開始点より - 696 ~ - 9 bp の間に主なプロモーター活性がある	
(3) Elk-1 は <i>EZH2</i> の発現調節に関与する	
(4) 総論	
． 図表	28

. 参考文献	46
. 謝辞	49

# がん細胞における EZH2 遺伝子高発現機構の解析

2009 年 3 月修了 先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野

学生証番号 47-076539 常田 啓太

指導教員 落合 淳志

キーワード： EZH2, がん, 遺伝子発現調節, Elk-1

## < 序論 >

がん細胞は正常細胞と比べ多くの遺伝子の発現が変化している。遺伝子の発現が変化する仕組みには点突然変異によっておこる発現変化と、塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現パターンを変化させるエピジェネティクスによる制御機構があり、細胞のがん化においてはその両方が働いている。エピジェネティクスによる制御機構の主要なものとして DNA のメチル化やヒストンタンパク質のメチル化・アセチル化等のヒストン残基修飾が知られている。DNA のメチル化やヒストン修飾によってクロマチン構造が変化してヘテロクロマチンが形成されると、その領域にプロモーター配列が存在する遺伝子は転写が抑制され、DNA・ヒストンの修飾が変えられ、ユークロマチンとならない限り発現が抑えられ続ける。こうして細胞の分化やがん化において遺伝子発現が制御され、その形質は細胞分裂後も維持され続ける。

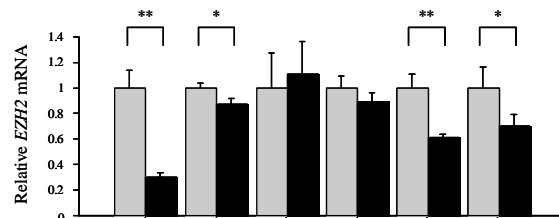
EZH2 はポリコムタンパク質と呼ばれる遺伝子発現調節タンパク質複合体の一員としてエピジェネティックな遺伝子発現調節に関与している。EZH2 はヒストン H3 コアタンパク質の 27 番目のリジンをメチル化し、その領域にある遺伝子の転写を抑制する。これまでに EZH2 は胚の発生に関わる遺伝子や細胞増殖に関わる遺伝子などを発現調節していることが分かっている。さらに種々のがんで EZH2 の発現が高くなっているとともに、がん患者の予後の悪さと EZH2 の高発現が相関するという報告が数多くなされている。しかしながら、EZH2 の発現調節の機構についてはあまり報告されておらず、がん細胞における EZH2 の高発現のメカニズムは明らかになっていない。本研究ではがん細胞における EZH2 の高発現調節機構を明らかにすることを目的とした。

## < 結果 >

### (1) 各種阻害剤による EZH2 mRNA の発現変化

がんにおける EZH2 の発現変化をもたらす因子を探索するため、がんで活性化することが知られているシグナル伝達経路を阻害し、EZH2 mRNA 発現量を解析した。各種阻害剤処理に対しての EZH2 mRNA 発現量の変化は細胞株ごとに異なっており、このことから EZH2 mRNA の発現は複数のシグナル伝達経路によって調節されることが分かった。中でも MEK を介する経路と PI3K を介する経路は複数のがんで共通して EZH2 の発現亢進に影響を与えていることが示唆された。(図 1)

U0126 : MEK inhibitor



LY294002 : PI3K inhibitor

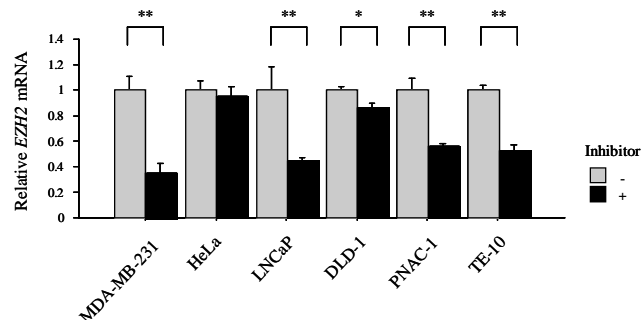


図 1. 各種がん細胞株に対する MEK/PI3K 阻害剤の効果

## (2) *EZH2* 遺伝子上流のプロモーター解析

がんにおける *EZH2* の転写亢進をもたらす因子を特定するため、*EZH2* 遺伝子上流 -2874 ~ +599 bp 領域 (転写開始点を +1 とする) のプロモーター解析を行った。*EZH2* 遺伝子の主なプロモーター活性は -696 ~ -9 bp の間にあることが分かり、その領域を解析すると MAPK 経路下流の転写因子 Elk-1 の結合配列が含まれていた。(図2)

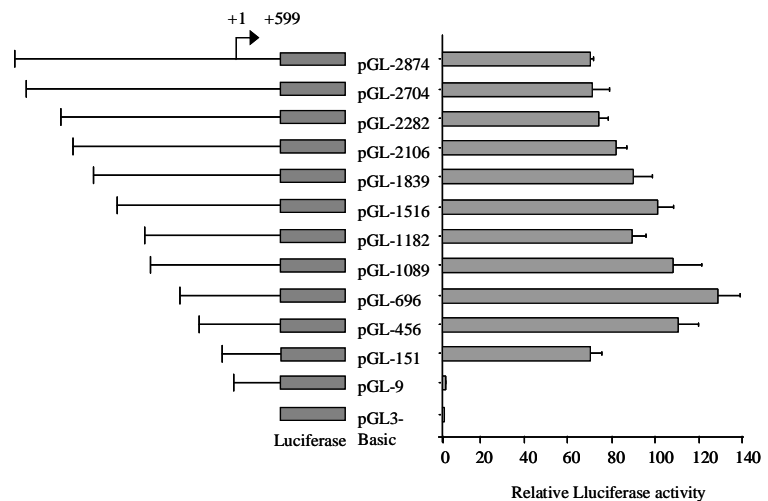


図2. *EZH2* 遺伝子上流のプロモーター解析

## (3) Elk-1 による *EZH2* mRNA 発現量への影響

Elk-1 が *EZH2* mRNA の発現調節に関与するかを調べるため、各細胞株に Elk-1 に対する siRNA を導入し Elk-1 をノックダウンした状態での *EZH2* mRNA 発現量を解析した。MEK 阻害剤により *EZH2* の発現が抑制される細胞株では、Elk-1 ノックダウンによっても *EZH2* の発現が抑制される傾向があることが分かった。(図3)

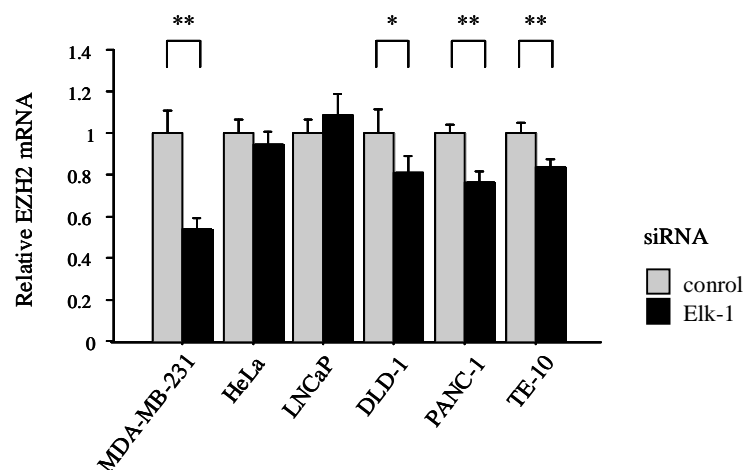


図3. 各種がん細胞株に対する Elk-1 ノックダウンの効果

## < 考察 >

本研究の解析により、*EZH2* 発現量は複数のシグナル伝達経路によって調節されることを明らかにした。このことから *EZH2* は細胞の様々な反応において転写調節がなされ、細胞の形質変化や働きに広く関与していることが推察される。また、*EZH2* 遺伝子の主なプロモーター活性は -696 ~ -9 bp の間にあることを見出し、*EZH2* が MAPK の下流である Elk-1 によって発現調節を受けることを明らかにした。このことから様々な細胞外刺激によっても *EZH2* が発現亢進し得るのではないかと考えられる。これらの結果から、がんにおける *EZH2* 高発現は多数のシグナル伝達経路によって制御されることを示唆するものであり、それらによって細胞の種類を問わず、*EZH2* の高い発現状態を保っているのではないかと考えられる。また、Elk-1 を介し様々な刺激で *EZH2* の発現が亢進すること自体が細胞のがん化をもたらす一つの要因になっているのかもしれない。

## . Summary

Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) is a member of polycomb group proteins that contribute to the epigenetic silencing of target genes. EZH2 functions in a multi-protein complex called polycomb repressive complex 2 which mediates methylation on histone H3 lysine 27. EZH2 is known for its role in maintaining the repression of *HOX* genes during development. Expression of EZH2 rises in various kinds of cancer, and there are many reports showing that high EZH2 transcript and protein expression levels are associated with poor clinical outcome in cancer patients. However, little is known about the mechanism of the expression of EZH2. The aim of this study is to analyze the mechanism which up-regulate EZH2 expression in a cancer cell.

First, to search for the pathway that changes the expression level of EZH2 in the cancer cells, six cancer cell lines were treated with inhibitors that inhibit signals known to be activated in cancers. While some inhibitors gave no effect on the EZH2 expression, each cell lines showed different response to several inhibitor treatment for example MEK, PI3K, p38, JNK, NF- $\kappa$ B. Although the response varied in cell lines, the EZH2 expression were commonly suppressed by MEK and PI3K inhibitors in several cancer cell lines.

To identify a factor that increases *EZH2* transcription in the cancer cells, promoter analysis of upstream region (- 2,874 ~ + 599 bp) of the *EZH2* gene was performed. *EZH2* main promoter activity exists in - 696 ~ - 9 bp region and multiple binding sites of Elk-1, a transcription factor known as downstream of the MAPK (including MEK-ERK) signal transduction pathway, are also in that region.

To test if Elk-1 participates in the expression of EZH2, Elk-1 knockdown using siRNA was performed. In the cell lines, in which the expression of EZH2 was regulated by MEK inhibitor, the result indicated that the expression of EZH2 tended to be suppressed by Elk-1 knockdown.

Furthermore, western blot analysis revealed that the phosphorylated Elk-1 and EZH2 protein expression were correlated with each other.

In this study, inhibitor assay demonstrated that the EZH2 expression was regulated by several signal transduction pathways. In addition, *EZH2* main promoter activity was shown to exist in - 696 ~ - 9 bp region. Furthermore, this region consists of multiple binding sites of Elk-1, the downstream of MEK-ERK pathway, that was found to up-regulate the EZH2 expression. Taken together, this suggests that transcription of *EZH2* is regulated by the extracellular stimulation through MAPK pathway.

## . 略語表

BSA	Bovin serum albumin
cDNA	Complementary DNA
c-fos	Cellular FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homologue
c-Myc	Cellular myelocytomatosis oncogene
DHMEQ	Dehydroxymethylepoxyquinomicin
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
Dnmt	DNA methyltransferase
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EED	Embryonic ectoderm development
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
ERK	Extracellular regulated MAP kinase
EZH2	Enhancer of zeste homologue 2
FBS	Fetal bovine serum
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
HAT	Histone acetyltransferase
HDAC	Histone deacetylase
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMG	High mobility group protein
HP1	Heterochromatin protein 1
HRP	Horseradish peroxidase
JNK	c-jun N-terminal kinase
LB	Lysogeny broth
MAPK	Mitogen-actiated protein kinase
MBP	Methylated DNA binding protein
MEK	MAP kinase-ERK kinase
mRNA	Messenger RNA
NF-κB	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
PBS	Phosphate-buffered saline
PcG	Polycomb group
p-Elk-1	Phospho-Elk-1



PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
pol II	RNA polymerase II
PRC	Polycomb repressive complex
PVDF	Polyvinylidene difluoride
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Revolution per minute
RUNX3	Runt-related transcription factor 3
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
siRNA	Small interfering RNA
SOC	Super optimal broth + catabolite repression effect
SRF	Serum response factor
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
SUMO	Small ubiquitin-related modifier
SUZ12	Suppressor of zeste 12
TAE	Tris-acetate-EDTA
TBS-T	Tris-buffered saline + tween20
TE	Tris-EDTA
TF	Transcription factor
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
TrxG	Trithorax group
UTX	Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X

## ． 序論

一個体内の細胞は基本的に同一のゲノムを有しているが、細胞の種類によって遺伝子の発現は大きく異なっている。一つの細胞から連続的な細胞分裂、分化を繰り返す中で、DNA の塩基配列の変化を伴わずに様々な遺伝子発現パターンを有する細胞へと分化していく。また、それぞれの遺伝子発現パターンは細胞世代を超えて継承される必要があり、この発現制御に関わるメカニズムはエピジェネティクスの制御機構とよばれている。

エピジェネティックな遺伝子発現調節の機構には、DNA のメチル化やクロマチン構造変化、ヒストンタンパク質の翻訳後修飾が含まれている (図 1)。DNA のメチル化による発現調節の機構には、DNA メチル化酵素とメチル化 DNA 結合タンパク質が関わっている。DNA メチル化酵素によってゲノム中の 5'-CpG-3' 配列のシトシンがメチル化され、そこへメチル化 DNA 結合タンパク質が特異的に結合して、ヘテロクロマチン化を誘導することにより転写不活性化をもたらす[1]。クロマチン構造変化に関わる因子としては、クロマチンリモデリング因子やヘテロクロマチンタンパク質 1 (HP1) 、 High mobility group (HMG) タンパク質などが知られている。クロマチンリモデリング因子は ATP 依存的にヘテロクロマチンからユークロマチンを形成したり、逆にユークロマチンからヘテロクロマチンに変換する[2]。HP1 はメチル化ヒストンに結合し、DNA メチル化酵素とヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 、 ヒストンメチル化酵素を誘導することでヘテロクロマチンを広げていく[3]。HMG タンパク質はヒストンアセチル化酵素 (HAT) を誘導してクロマチンを緩和させ、さらにクロマチンリモデリング因子を誘導してクロマチンの再構成を起こす[4]。ヒストンタンパク質の翻訳後修飾としてはメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、などが知られており (図 2) 、特に HAT・HDAC によるアセチル化状態の変化やポリコーム (PcG) 複合体およびトライソラックス (TrxG) 複合体によるメチル化状態の変化はクロマチン制御によるエピジェネティクス機構をもたらす重要な因子となっている[5, 6]。

ヒストンタンパク質にはコアとなる H2A、H2B、H3、H4 と、リンカーヒストン H1 がある。コアヒストンに DNA が巻きつき、そこへリンカーヒストンが結合することでヌクレオソームを形成する。それらがさらに高次構造をとることでクロマチンを形成するが、それぞれのヒストンタンパク質に修飾が行われることでその高次構造が変化する。ヒストンタンパク質が受ける修飾の種類と場所は決まっており、特にアセチル化とメチル化修飾についての研究が進んでいる。ヒストンのリジン残基がアセチル化を受けるとリジン残基側鎖の正の荷電が中和され、ヒストンと DNA との結合が緩むことによりユークロマチン状態を誘導する[5]。ヒストンのメチル化は、各種のメチルトランスフェラーゼにより、ヒストンの特定のアルギニン残基とリジン残基がメチル化される事によって起こる (表 1) [6]。これらのメチル化状態を認識するタンパク質がそれぞれ転写活性化あるいは抑制化に働くことにより遺伝子の発現を制御している。例えば、ヒストン H3 の 9 番目のリジンがメチル化されると、HP1 がこのヒストン H3 に高親和性を示すようになり、ヘテロクロマチン化を誘導する[7, 8]。一方、同じ H3 のリジン残基でも、27 番目のリジンがメチル化を受けると、PcG 複合体の構成因子がこのヒストンに高親和性を示すようになり、その結果この領域の転写が抑制される[9]。このようにヒストンの異なるリジン残基のメチル化修飾が、異なる機能分子をリクルートすることによりクロマチン機能を制御している。アセチル化・メチル化といったヒストン修飾のバランスによって転写の開始と停止が調整されていると考えられており、ヒストン修飾の状態が生命情報を示しているという “ヒストンコード” が提唱された[10]。ヒストンコードは細胞分裂後も維持されるため、X 染色体不活性化のような長期間発現抑制が維持されることが必要な遺伝子の発現調節にも重要な役割を果たしていると考えられている[1, 11]。一方で、これらの修飾が細胞外刺激によって可逆的に付加されて遺伝子発現を変化させることも報告されており[12]、短期間で変動する発現調節にも関与し得ることが分かった。

Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2)は PcG タンパク質の一員であり、様々な遺伝子の

エピジェネティックな発現調節を行う。EZH2 は細胞内において Suppressor of Zeste 12 (SUZ12)、Embryonic Ectoderm Development (EED) などの PcG タンパク質と Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) を形成することで遺伝子発現調節を行う[9, 13]。PRC2 はヒストン H3 コアタンパク質の 27 番目のリジン (H3K27) を認識し、メチル基を 3 つまで付加することができ、このトリメチル化 H3K27 はヒストンコードにおいて遺伝子発現の抑制標的として働く[14]。最近では PRC2 とは逆に H3K27 の脱メチル化に働く JMJD3 や UTX といった TrxG タンパク質が同定されており、この修飾が可逆的に遺伝子発現を制御していることが分かった[15]。EZH2 にはメチル基転移活性を有する SET ドメインが存在し、PRC2 のヒストンメチル化活性を担うタンパク質として存在する。EZH2 によって発現抑制される遺伝子としては胚の発生に関わるホメオボックス遺伝子が知られており、他にも X 染色体不活性化や幹細胞の多能性の維持、筋組織・神経組織の細胞分化などにも EZH2 が関与することが分かっている[11, 16]。

EZH2 とがんとの関わりは、がん原遺伝子である *Vav* の産物と EZH2 が相互作用することから着目された[17]。その後多くのがん組織で正常組織と比較して EZH2 の発現が高くなっていることが確認され、乳がん、前立腺がん、膀胱がん、胃がん、子宮内膜がん、メラノーマ、リンパ腫において予後の悪さと EZH2 の高発現が相関するという報告がなされた[18-23]。当研究室においても、食道がんの予後と EZH2 高発現との相関について現在研究が進められており、各種がん細胞株においても正常組織由来の細胞株と比較して EZH2 の発現が高いことを確認している (図 3)。EZH2 を過剰発現させた細胞では *in vitro* において増殖能、浸潤能、コロニー形成能が亢進し、マウス移植系ではがん細胞の増殖が促進される[18, 19, 24, 25]。また、がん細胞に対して EZH2 のノックダウンを行うと増殖が抑制されることが分かっている[19, 25]。当研究室の藤井らの研究により EZH2 は DNA メチル化状態を変化させずに RUNX3 や E-cadherin の発現を抑制することも明らかにされた[26, 27]。このように EZH2 のがん増殖促進機構については多くの研究がなされ、がんにおける

EZH2 の重要性が明らかになりつつある。しかし、がんにおける EZH2 の高発現がどのようなメカニズムによって引き起こされているかという研究はこれまで殆ど報告されていない。EZH2 の発現調節機構については、過去に細胞周期に関わる転写因子である E2F が EZH2 の発現亢進に関与することが報告された[24]。また正常な細胞では EZH2 が microRNA による発現抑制を受け、がん細胞ではその microRNA コード領域の欠失と EZH2 の高発現化が相関していることが示されている[28]。しかし、E2F による発現亢進だけでは説明がつかないほど様々ながんで EZH2 が高発現していることや、microRNA コード領域の欠失ではがん組織において観察される不均一な EZH2 の発現状態を説明できないことなど、EZH2 の発現調節機構については依然として十分に解明されてはいないと思う。このことからこれまで報告されてきたもの以外の因子が EZH2 の発現調節機構に関与していることが予想されたため、EZH2 発現調節機構における未知の部分を解き明かすことを本研究の目的とした。

本研究ではがんにおける EZH2 の発現変化をもたらす因子を探索するため、がんで活性化することが知られているシグナル伝達経路を阻害し、EZH2 の発現量を解析した。また、3 kb 長にわたる EZH2 上流領域 ( -2874 bp ~ +599 bp) のクローニングを初めて試みた。そして、シグナル伝達阻害剤の結果と合わせることで EZH2 の発現量に関するシグナルの一つとして MEK-ERK の経路を同定し、さらにその下流の機能分子とされる Elk-1 が EZH2 の発現亢進に関与していることを明らかにした。

## ． 実験材料および方法

### (1) 細胞培養

使用した細胞株については表 2 に示した。DLD-1、LNCaP、MDA-MB-231、TE-10 は RPMI 1640 medium に 10% Fetal bovine serum (FBS) 、1% Penicillin/Streptomycin、1% L-Glutamin を加えた培地で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。PANC-1 は Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) に 10% FBS、1% Penicillin/Streptomycin、1% L-Glutamin を加えた培地で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。HeLa は 50% DMEM 、50% McCoy's 5A Medium に 10% FBS、1% Penicillin/Streptomycin、1% L-Glutamin を加えた培地で 37℃、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

### (2) 阻害剤処理

DLD-1、LNCaP、PANC-1 は  $3.0 \times 10^5$  個ずつ、HeLa、MDA-MB-231、TE-10 は  $2.0 \times 10^5$  個ずつの細胞を 6-well plate の各 well に播き、24 時間培養した細胞に対して阻害剤処理を行った。各阻害剤は DMSO に溶解し、終濃度がそれぞれ 30  $\mu$ M 10058-F4 (Merck) 、50  $\mu$ M LY294002 (Merck) 、25  $\mu$ M SB203580 (Merck) 、50  $\mu$ M SP600125 (Merck) 、10  $\mu$ M Stattic (Merck) 、40  $\mu$ M U0126 (Promega) 、100  $\mu$ M DHMEQ (慶應義塾大学 梅澤一夫先生に頂いた) となるようにそれぞれの細胞を培養する培地に加えた。コントロールには阻害剤溶液と同量の DMSO を用いた。細胞の培地に阻害剤を加えて 24 時間培養することで阻害剤処理とした。

### (3) 定量的 PCR

6-well plate で培養した細胞を 1 well あたり Phosphate-Buffered Saline (PBS) 1 ml で 2 回洗浄した後、TRIzol reagent (Invitrogen) 1 ml を用いて細胞を溶解した。室温で 5 分間

静置した後、クロロホルム 200  $\mu$ l を加えてボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した。

3 分間静置した後、15000 rpm で 10 分間遠心して、上層を回収してイソプロパノール 500  $\mu$ l に加えた。ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した後、15000 rpm で 10 分間遠心して、上清を取り除いた。沈殿に 75% エタノール 1 ml を加えて転倒混和を行い、15000 rpm で 5 分間遠心した。上清を除いて 10 分間乾燥させてから水を加えて、これを total RNA とした。cDNA 合成には PrimeScript RT reagent Kit (Takara) を用いた。5X Prime Script Buffer 2  $\mu$ l, Prime Script RT Enzyme Mix 0.5  $\mu$ l, Random 6 mer 0.5  $\mu$ l, Total RNA 500 ng を混合して反応液とし、PCR Thermal Cycler (Takara) を用いて 37 15 分、85 5 秒の条件で PCR 反応を行った。Real-Time PCR には SYBR Premix Ex Taq (Takara) と表 3A のプライマーを用いた。SYBR Premix Ex Taq 12.5  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Forward Primer 0.5  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Reverse Primer 0.5  $\mu$ l, cDNA 2  $\mu$ l, 水 9.5  $\mu$ l を混合して 1 サンプルの反応液とし、Smart Cycler (Cepheid) を用いて 95 10 秒、(95 5 秒、60 30 秒)  $\times$  37 cycles の条件で PCR 反応を行った。定量値は各サンプルの *GAPDH* mRNA の値により補正し、それを各遺伝子の発現量とした。

#### (4) RNA 干渉

Elk-1 に対する siRNA とコントロール siRNA は Ambion (Elk-1: siRNA ID 114510) から購入した。Elk-1 siRNA またはコントロール siRNA を終濃度が 375 nM となるように OPTI-MEN I (Gibco) 200  $\mu$ l に溶かし、さらに 20  $\mu$ l/ml DharmaFECT transfection reagent (Dharmacon) / OPTI-MEN I 200  $\mu$ l と混合して 20 分間室温でインキュベートし、これを反応液とした。各種細胞を阻害剤処理と同様の条件で播いてから 24 時間後のものを OPTI-MEN I で 2 回洗浄した後、1 well 当たり 1.6 ml の OPTI-MEN I を加え、そこへ上述の反応液 400  $\mu$ l を滴下して siRNA を導入した。siRNA 導入開始後 12 時間で通常の増殖培地と交換し、さらに 36 時間後に回収して mRNA の発現量を測定した。方法は定

量的 PCR の箇所で書かれている通りである。

#### (5) コンストラクトレポータープラスミド作製 (図 4)

##### i) PCR 法

PCR には Prime STAR HS DNA Polymerase with GC Buffer (Takara) を用いた。 2X Prime STAR GC Buffer ( $Mg^{2+}$  plus) 25  $\mu$ l, dNTP Mixture 4  $\mu$ l, PrimeSTAR HS DNA Polymerase 0.5  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Forward Primer 0.5  $\mu$ l, 10  $\mu$ M Reverse Primer 0.5  $\mu$ l, Template DNA 1  $\mu$ l, 水 18.5  $\mu$ l を混合して 1 サンプルの反応液とし、PCR Thermal Cycler (Takara) を用いて (98 10 秒、68 1 分/kb)  $\times$  30 cycles の条件で PCR 反応を行った。

##### ii) フェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈降

DNA 溶液を 300  $\mu$ l にメスアップし、同量の Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25:24:1) (Wako) の混合液を加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間攪拌した後、8000 rpm、室温で 5 分間遠心した。中間層が出現した場合は上層を回収し同様の工程を繰り返した。中間層が出現しなくなったら、上層を回収し同量のクロロホルムを加え、ボルテックスミキサーで 30 秒間攪拌した後、8000 rpm、室温で 5 分間遠心した。上層を回収し 1/10 量の 3M NaOAc (pH 5.2) を加えて混合し、2.5 倍量のエタノール (-20 ) を加えて混合した。液体窒素に入れて凍結させた後、室温で融解してから 15000 rpm、4 で 10 分間遠心した。上清を捨て、70% エタノール (-20 ) 1 ml を加えて転倒混和した後、15000 rpm、4 、5 分間遠心した。上清を捨て乾燥させた後、TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0) に溶解した。

##### iii) 制限酵素処理

0.5 units/ $\mu$ l 制限酵素, 200 ng/ $\mu$ l DNA, 1X H buffer (Takara) を反応液とし、37



で 2 時間インキュベートした。

#### iv) アガロースゲル電気泳動

DNA サンプルに 1/5 倍量の 6X Loading buffer (Takara) を加えたものを 0.8% アガロースゲルにアプライし、泳動バッファ ( 1X TAE buffer ( 40 mM Tris, 40 mM 酢酸, 1 mM EDTA, pH 8.0 ), 500 ng/ml 臭化エチジウム ) 中で 100 V の電圧をかけて電気泳動を行った。バンドの検出には Molecular Imager ChemiDoc XRS (Biorad) を用いた。

#### v) アガロースゲルからの DNA バンドの切り出し

泳動したアガロースゲルに 312 nm 波長の紫外光をあててバンドを確認し、メスで目的のバンド部分を切り取った。切り取ったゲルの重量を測定し、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて DNA を精製した。

#### vi) ライゲーション

0.03 pmol Vector DNA, 0.3 pmol Insert DNA となるように DNA 溶液 5  $\mu$ l を調製し、そこへ DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (Takara) I 液 5  $\mu$ l を加えて 16 で 8 時間インキュベートした。

#### vii) 形質転換

プラスミド DNA 5  $\mu$ l に DNA Ligation Kit Ver. 2.1 III 液 0.5  $\mu$ l を加えた後、XL1-Blue Competent Cells (Stratagene) 50  $\mu$ l と混合し、氷上で 30 分間インキュベートした。その後 42 で 90 秒間インキュベートし、さらに氷上で 2 分間インキュベートした。42 の SOC medium ( 2% トリプトン、0.5% yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM グルコース ) 200  $\mu$ l を加え、37 で 1 時間振盪した。

LB 寒天培地 (20 mg/ml LennoxXL Broth Base、15 mg/ml Agar、4 µg/ml Ampicillin) に 25 µl または 225 µl の菌液を播き、37 °C で一晩培養してコロニーを形成させた。

#### viii) ミニプレップ

LB 寒天培地上で形成させた大腸菌コロニー 1 つずつを採取して 2 ml LB 液体培地 (20 mg/ml LennoxXL Broth Base、4 µg/ml Ampicillin) で 37 °C で 12 時間振盪培養し、Plasmid Mini Kit (Qiagen) を用いてプラスミドを精製した。

#### ix) シークエンシング

シークエンシングには BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems) を用いた。Terminator Ready Reaction Mix 8 µl, プラスミド DNA (ミニプレップしたもの) 2 µl, 1 µM プライマー 3.2 µl, 水 6.8 µl を混合し、PCR Thermal Cycler (Takara) を用いて 96 °C 1 分、(96 °C 10 秒、50 °C 5 秒、60 °C 4 分) × 25 cycles の条件で PCR 反応を行った。反応液に 3M NaOAc (pH 5.2) 2 µl, 95% エタノール 50 µl を加えて室温で 15 分間インキュベートし、15000 rpm、室温で 20 分間遠心した。上清を捨て、70% エタノール 250 µl を加えて軽く攪拌し、15000 rpm、室温で 5 分間遠心した。上清を捨て、DNA ペレットを乾燥させた後、Hi-Di Formamide (Applied biosystems) 40 µl を加え、ボルテックスミキサーで 10 秒間攪拌した後、95 °C で 2 分間インキュベートした。氷上で 5 分間冷却した後、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied biosystems) を用いてシークエンスを確認した。

#### x) プラスミド精製

コロニーから採取した大腸菌または前培養した菌液を 100 ml LB 液体培地に加え、37 °C で一晩振盪培養して Plasmid Maxi Kit (Qiagen) を用いてプラスミドを精製した。

*EZH2* 遺伝子上流 -2874 ~ +599 bp (転写開始点を +1 とする) を i) PCR 法で増幅した。PCR 法には各プライマー(表 3B *EZH2* -2874, *EZH2* +599R)と Template DNA としてヒト胎盤 genomicDNA (50 ng/μl) を用いた。増幅した DNA 溶液 (300 μl) を ii) フェノール/クロロホルム抽出後にエタノール沈降によって精製し、*Bgl*III、*Mlu*I (Takara)で iii) 制限酵素処理した後、iv) アガロースゲル電気泳動を行い、目的の長さのバンドの v) 切り出しを行った。pGL3 Basic reporter vector (Promega) についても同様に iii) 制限酵素処理・v) 切り出しを行い、*EZH2* 遺伝子上流から得た DNA 断片と vi) ライゲーションを行った。組み換えプラスミドを大腸菌へ vii) 形質転換し、viii) ミニプレップを行った。精製した組み換えプラスミドを *Bgl*III、*Mlu*I で iii) 制限酵素処理して目的のバンドが得られるプラスミドを選択し、その DNA 配列を ix) シークエンシングを行って確認した。導入した *EZH2* 遺伝子上流領域の DNA 配列に変異のないプラスミドを選出し、このプラスミドを含む菌株を用いて x) プラスミド精製を行った。このプラスミドをさらに ii) フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈降によって精製し、1 μg/μl DNA となるように TE buffer に溶かして pGL-2874 プラスミドとした。この pGL-2874 プラスミドを鋳型として各プライマー (表 3 *EZH2* -2704 ~ *EZH2* -9, *EZH2* -2704R) を用いて i), ii) を行い、*Mlu*I で iii) 制限酵素処理した後、上記と同様の方法で各種の長さのプロモーターのコンストラクトレポータープラスミドを作製した。

#### (6) ルシフェラーゼアッセイ

1.6 μg コンストラクトレポータープラスミドと 0.16 μg pGL-TK Vector (Promega) を OPTI-MEN I (Gibco) 100 μl に溶かし、さらに 40 μl/ml Lipofectamin 2000 (Invitrogen) / OPTI-MEM I 100 μl と混合して 20 分間室温でインキュベートし、これを反応液とした。12-well plate の各 well に  $1.5 \times 10^5$  個ずつ MDA-MB-231 を播いて 24 時間培養したのも

のを OPTI-MEN I で 2 回洗浄した後、1 well 当たり 1 ml の OPTI-MEN I を加え、そこへ反応液 200  $\mu$ l を滴下してプラスミドを導入した。導入開始後 4 時間で通常の増殖培地と交換し、さらに 20 時間後に回収した。回収方法は 1 well あたり PBS 0.5 ml で 2 回洗浄した後、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) のプロトコルに準じて 1X Passive Lysis Buffer 250  $\mu$ l を加えて 15 分間室温で振盪した。回収した溶液 20  $\mu$ l を蛍光測定用 96-well plate に入れ、同 Assay System の LAR II 100  $\mu$ l を Luminescence JNR (Atto) を用いて加え、Firefly luciferase の発光強度を測定した。そこへさらに Stop & Glo Reagent を 100  $\mu$ l を同様に加え、Renilla luciferase の発光強度を測定した。ルシフェラーゼ活性値は Firefly luciferase の発光強度と Renilla luciferase の発光強度の比(Firefly luciferase 発光強度/Renilla luciferase 発光強度)によって求めた。

#### (7) ウェスタンブロッティング

細胞は溶出バッファー ( 50 mM HEPES、150 mM NaCl、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 mM EDTA、10% glycerol、1% Triton X-100、10 mM NaF、1 mM DTT、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) によって溶出した後、細胞膜を破壊する為 -80 °C での凍結と融解を 3 回繰り返した。核溶出のため 30 分間氷上でインキュベートし、8900  $\times$  g、4 °C で遠心し上清を回収した。ブラッドフォード法でタンパク質量を測定し、1 サンプル当たりタンパク質量が 20  $\mu$ g となるよう調整した後、12% SDS-polyacrylamide gel で電気泳動を行い、Immobilon-P PVDF membrane (Millipore) に転写した。メンブレンは 1 時間、室温で blocking buffer ( 5% skim milk / TBS-T) に浸した後、4 °C で一晩一次抗体処理を行った。使用した一次抗体は以下の通りに希釈した ; Elk-1 ( 1 : 200 ) 、 p-Elk-1 ( 1 : 200 ) 、 Actin ( 1 : 1000 ) (Santa Cruz)。TBS-T で 10 分間  $\times$  3 回洗浄した後、1 時間、室温で二次抗体処理を行った。使用した二次抗体は以下の通りである ; HRP-goat anti-rabbit IgG ( 1 : 3000 ) 、 HRP-rabbit anti-mouse IgG ( 1 : 3000 ) 、 HRP-rabbit anti-goat IgG ( 1 : 3000 )

(Zymed)。TBS-T で 10 分間 × 3 回洗浄した後、ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) をメンブレンにかけて 1 分間インキュベートし、Molecular Imager ChemiDoc XRS (Biorad) を用いて化学発光を検出した。

## ． 結果

### (1) 各種阻害剤による *EZH2* mRNA の発現変化

がんにおける *EZH2* の高発現化が何によってもたらされているかを調べるため、がんにおいて活性化することが知られているシグナル伝達経路の機能分子を対象とした各種阻害剤を乳癌細胞株 (MDA-MB-231)、子宮頸癌細胞株 (HeLa)、前立腺癌細胞株 (LNCaP) に対して作用させ、*EZH2* mRNA の発現量の変化を解析した (図 5-7)。阻害剤として c-Myc 阻害剤 (10058-F4)、NF- $\kappa$ B 阻害剤 (DHMEQ)、PI3K 阻害剤 (LY294002)、p38 阻害剤 (SB203580)、JNK 阻害剤 (SP600125)、STAT3 阻害剤 (Stattic) 及び MEK 阻害剤 (U0126) を用いた。細胞株の種類ごとに *EZH2* mRNA 発現量に影響を与える阻害剤は異なっており、MDA-MB-231 では PI3K、p38、MEK の阻害剤処理により 2 倍以下に発現量が減少し (図 5)、HeLa では JNK 阻害剤処理により 2 倍以上発現量が亢進した (図 6)。LNCaP では NF- $\kappa$ B、PI3K 阻害剤処理により 1/2 倍以下に発現量が減少した (図 7)。このことから、がんにおける *EZH2* 高発現をもたらしているシグナル伝達機構は細胞ごとに異なり、複数の機構により *EZH2* の発現量は調節されていることが示唆された。

図 5-7 で *EZH2* 発現変化をもたらした阻害剤のうち最も大きな変化が見られた MEK 阻害剤と二つの細胞株で 2 倍以上の変化を示した PI3K 阻害剤について、他の細胞株に対しても同様に阻害剤処理を行った (図 8,9)。用いた細胞株は大腸癌細胞株 (DLD-1)、膵臓癌細胞株 (PANC-1)、食道癌細胞株 (TE-10) である。MEK 阻害剤処理では 1/2 倍以下に発現量が減少した細胞株はなかったが、DLD-1、TE-10 で有意に *EZH2* mRNA 発現量が減少した ( $P < 0.05$ ) (図 8)。興味深いことに、PI3K 阻害剤処理においても同様の傾向が見られ、DLD-1、TE-10 において有意に *EZH2* mRNA 発現が減少していた ( $P < 0.01$ ) (図 9)。これらの結果より、がん細胞には MEK を介した経路及び PI3K を介した

経路によって *EZH2* の発現が亢進されているものがあることが示された。

## (2) *EZH2* 遺伝子上流のプロモーター解析

がんにおける *EZH2* の転写亢進をもたらす因子を特定するため、*EZH2* 遺伝子上流領域のプロモーター解析を行った。ヒト胎盤組織由来の genomic DNA から *EZH2* 遺伝子の転写開始点から数えて - 2874 bp ~ + 599 bp の領域を PCR 法によって増幅し、ルシフェラーゼベクターに組み込んだ。作製したコンストラクトレポータープラスミドを MDA-MB-231 に導入してルシフェラーゼ活性を測定することにより、組み込んだ領域のプロモーター活性の程度を解析した (図 10) 。 - 696 bp までの領域を用いたものが最も高いプロモーター活性を示し、それより短いものでは段階的にプロモーター活性が低くなった。 - 9 bp ~ + 599 bp を組み込んだものでは殆ど活性は見られず、この領域にはプロモーター活性がないことが確認できた。以上より *EZH2* 遺伝子転写開始点より - 696 bp ~ - 9 bp の間に主なプロモーター活性があることが分かった。

この領域に結合し得る転写因子を調べるため、上記の領域の DNA 配列を既存のソフトウェアである TRANSFAC 6.0 を用いて解析した (図 11) 。コア領域が一致する転写因子として Elk-1, NF- $\kappa$ B, c-Myb, STAT1 などが *EZH2* の上流域に結合し得ることが分かった。その中で、Elk-1 と結合配列が一致する領域は *EZH2* の上流域上に 3 箇所あり、さらに Elk-1 と結合して転写の活性化に寄与する serum response factor (SRF) の結合配列も転写開始点から - 696 bp までの領域に存在することが分かった。Elk-1 は MAPK の下流に存在する転写因子であり、MEK-ERK 経路シグナルによる活性化を受け、機能分子として働く。阻害剤処理実験において MEK 阻害剤が多くのがん細胞株で *EZH2* の発現を抑制した (図 8) ことから、MEK-ERK-Elk-1 の経路が *EZH2* の発現調節機構に関与する可能性が示された。

### (3) Elk-1 による *EZH2* 発現量への影響

Elk-1 が *EZH2* の発現調節に関与するかを調べるため、各細胞株に Elk-1 に対する siRNA を導入し Elk-1 をノックダウンした状態での *EZH2* mRNA 発現量を解析した (図 12)。Elk-1 のノックダウン効率は 65% ~ 88%であった。MDA-MB-231 では Elk-1 ノックダウンにより *EZH2* mRNA 発現量が約 1/2 倍にまで減少し、MDA-MB-231 と同様に MEK に対する阻害剤処理で *EZH2* 発現減少が見られた PANC-1、TE-10 についても有意に *EZH2* の発現を減少させた ( $P < 0.01$ )。一方、HeLa、LNCaP については MEK に対する阻害剤処理した場合と同様に *EZH2* mRNA 発現量は変化しなかった。以上の結果から MEK 阻害剤により *EZH2* の発現が抑制される細胞株では、Elk-1 ノックダウンによっても *EZH2* の発現が抑制される傾向があることが分かった。

次に、予想した Elk-1 結合領域が転写調節に関わっていることを確かめるため、プロモーター解析で用いた各長さのルシフェラーゼレポーターコンストラクトと Elk-1 siRNA を MDA-MB-231 に共に形質導入してルシフェラーゼ活性の変化を解析した (図 13)。siRNA を導入すると pGL-456 までの長さのルシフェラーゼレポーターコンストラクトを導入した場合は有意にルシフェラーゼ活性が減少する ( $P < 0.05$ )。しかし、pGL-151 ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを導入した場合では Elk-1 siRNA 導入による活性の変化は見られなかった。この結果から、Elk-1 は *EZH2* 遺伝子の転写開始点から -456 ~ -151 bp の間の領域に作用することが示唆された。

### (4) Elk-1 のリン酸化状態と *EZH2* タンパク質発現量の解析

Elk-1 の活性化が *EZH2* タンパク質発現量と相関することを確認するため、ウェスタンブロットティングで Elk-1 のリン酸化状態と *EZH2* タンパク質の発現量を解析した。



MDA-MB-231 細胞を MEK 阻害剤 (U0126) 、JNK 阻害剤 (SP600125) 、p38 阻害剤 (SB203580) 及び全てを加えたもの (U+SP+SB) で処理を行うと、Elk-1 全量、リン酸化 Elk-1 及び EZH2 がそれぞれ減少していることが分かった (図 14) 。また、その他の各種がん細胞株でも同様に Elk-1 全量、リン酸化 Elk-1、EZH2 がそれぞれ相関していることが分かった (図 15) 。

## ． 考察

本研究では、各種がん細胞株を用いて EZH2 の発現変化をもたらすシグナル伝達経路を明らかにした。各種阻害剤処理に対しての *EZH2* mRNA 発現量の変化は細胞株ごとに異なっており、このことから EZH2 の発現は複数のシグナル伝達経路によって調節されることが分かった。中でも MEK 経路と PI3K 経路は複数のがん細胞で共通して EZH2 の発現亢進に関与していることを明らかにした。さらに、*EZH2* のプロモーター領域には MEK 経路下流の転写因子である Elk-1 の結合配列が存在することを示し、Elk-1 を siRNA を用いてノックダウンすることにより Elk-1 が EZH2 の発現亢進に関与することを示し、ウェスタンブロッティングによりリン酸化 Elk-1 量と EZH2 タンパク質量が相関することも示した。

### (1) がんにおける EZH2 高発現をもたらしているシグナル伝達機構は細胞ごとに異なる

各種がん細胞株への阻害剤処理実験により、がんににおける EZH2 発現量を変化させ得るシグナル伝達分子を特定できた。しかも、それらの分子の中には多くのがん細胞株で共通して EZH2 の発現を変化させ得るものと、細胞株間では共通していないが特異的に EZH2 の発現を変化させるものがあることが分かった。例えば、PI3K の阻害剤である LY294002 は 6 細胞株中 4 細胞株でほぼ 1/2 倍まで EZH2 発現量を抑えることが分かった (図 9)。由来のそれぞれ異なるがん細胞株のうち 2/3 の細胞株で EZH2 の発現を変化させたことから、多くのがんににおいて PI3K-Akt のシグナル伝達経路が EZH2 の高発現に関わっていると考えられる。MEK の阻害剤である U0126 についても同様のことがいえ (図 8)、この二つのシグナル伝達経路は EZH2 の発現調節に深く関与していることが示唆された。

一方、JNK の阻害剤である SP600125 は今回調べた 3 細胞株の中では HeLa にしか効

果を示さなかったものの、予想に反して EZH2 の発現量を亢進させた (図 6) 。この結果は、ある細胞株では MEK 経路が EZH2 発現亢進に働くのに対し、同様に MAP キナーゼ経路に属する JNK 経路が別の細胞株では EZH2 発現抑制に働いていることを示唆する。HeLa と同様の反応を示す細胞があるのか、それともこの反応が HeLa 特異的なものであるのかは現段階では分からないが、この JNK 経路による EZH2 の発現調節を解析すれば、新たな EZH2 発現制御機構の解明に繋がる可能性がある。

他にも、EZH2 の発現は c-Myc、NF- $\kappa$ B、p38 を含む多種類の経路の阻害により変動することが示され、これらの変動を受ける阻害剤は細胞株の種類によって明らかに異なった (図 5-7) 。このような現象が起こる理由としては次の二つのことが考えられる。ひとつは、細胞株の種類によって活性化しているシグナル伝達経路が異なっている為に阻害剤による EZH2 発現への影響が違うということが考えられる。もう一つは、がん細胞では *EZH2* プロモーター領域に変異が起きていて、その変異パターンが細胞株の種類ごとに異なっている為に細胞内シグナルに対する反応が違うことが考えられる。しかし、後者の可能性はルシフェラーゼアッセイに阻害剤を併用した実験によって否定された。即ち、遺伝子変異のないコンストラクトレポータープラスミド (pGL-2874) を導入した MDA-MB-231、HeLa の 2 種類の細胞株へ MEK の阻害剤処理を行うと、MDA-MB-231 では *EZH2* mRNA 発現量が減少し、ルシフェラーゼ活性も低下した。一方、MEK 阻害剤処理したにも関わらず HeLa では *EZH2* mRNA 発現量は変化せず、ルシフェラーゼ活性も変化しなかった(データ示さず) 。このことから EZH2 の発現は複数のシグナル伝達経路によって影響を受け、プロモーター領域の遺伝子変異ではなく、がん細胞ごとに EZH2 の高発現をもたらしているシグナル伝達機構が異なっているということが示唆された。

今回 EZH2 の発現量に影響を与えることが明らかになった経路が、先に示された E2F 経路と比較して、どの程度それぞれのがん細胞株において EZH2 発現量に寄与している

のかということについては今後検討の必要があると考える。また、それぞれの経路は独立して EZH2 の発現を制御しているのか、あるいは経路間に cross talk が存在するのかについても今後の検討課題である。特に、MEK 阻害と PI3K 阻害では LNCaP を除いた細胞株で類似した *EZH2* mRNA 発現量変化傾向が見られた (図 8,9) ことから、EZH2 発現制御において 2 つの経路間に関係があるのか解析したい。

(2) *EZH2* 遺伝子転写開始点より -696 ~ -9 bp の間に主なプロモーター活性がある

プロモーター解析では *EZH2* 遺伝子転写開始点より 696 bp 上流までの領域を組み込んだコンストラクトレポータープラスミドが最もルシフェラーゼ活性を示し、そこを頂点とする山型のグラフとなった (図 10)。この傾向は MDA-MB-231 以外の細胞 (293T、HeLa) を用いたときも同様であった (データ示さず)。そして、転写開始点より 9 bp 上流までのものでは殆ど活性が無くなることから、*EZH2* 遺伝子の主要なプロモーター活性は転写開始点より -696 ~ -9 bp の間に存在することが明らかになった。一方、-2874 ~ -697 bp の領域では挿入した配列が長くなるごとにプロモーター活性が減少していた。これについては、この領域内に発現抑制性の転写因子が結合するということと、配列が長くなりプラスミドが大きくなった為に導入効率が低くなったということが考えられる。前者である場合、更なる *EZH2* 発現調節機構の解明が期待できるため今後検討していきたい。

*EZH2* 転写開始点から 696 bp 上流までの領域を解析すると、まず *EZH2* 遺伝子のプロモーターには TATA box が存在しないことが分かった。さらに解析の結果から、プロモーター活性の約 50% を占めている転写開始点から -151 ~ -9 bp の領域には CCAAT box や GC box が存在しており、それらがコアプロモーターとして *EZH2* の転写開始に関わっていると推察される (図 11)。また、過去の報告では E2F の結合サイトが *EZH2*

転写開始点から -442 ~ -151 bp の間に存在するとされているが[24]、今回調べた中では E2F の結合し得る配列はその領域内に確認できず、その論文上にも詳しい配列情報は記載されていなかったためこの領域を示しているのかは不明である。

結合サイトが確認された転写因子の中で阻害剤実験で得られた結果と対応するものは NF- $\kappa$ B と Elk-1 であった。NF- $\kappa$ B については今回の研究では対象としなかったが、NF- $\kappa$ B も *EZH2* プロモーターに直接結合して発現調節に関わっているかもしれない。Elk-1 については結合サイトが 3 箇所確認され、MEK-ERK-Elk-1 のシグナル伝達経路によって *EZH2* の発現調節が行われていることが推察された。これら以外にも、STAT1, c-Myb などが結合し得る配列が *EZH2* 転写開始点から 696 bp 上流までの領域に存在することが示された。これらの転写因子の中から実際に *EZH2* の発現調節に関わるものを見つけることが出来れば、新たな *EZH2* 発現制御機構を示せるかもしれない。

### (3) Elk-1 は *EZH2* の発現調節に関与する

転写因子である Elk-1 は Ets ファミリーに属し、MAPK シグナルによって活性化される[29]。Elk-1 は helix-turn-helix 構造の DNA 結合ドメインと、MAP キナーゼ結合ドメイン、SRF 結合ドメイン、転写活性化ドメインからなる。キナーゼ結合ドメインに MAP キナーゼカスケードの ERK、JNK、p38 が結合し、転写活性化ドメインがリン酸化を受けることで構造変化がおき、DNA への結合と転写活性が亢進する。Elk-1 によって発現が亢進する遺伝子として *c-fos* が知られており、他にも細胞の生存に関わる遺伝子の発現への関与や、細胞の増殖、アポトーシスの抑制などに寄与することが知られている[29-31]。Elk-1 は MAPK の下流として細胞の生存に重要な因子であると考えられ、このことはがん細胞の増殖・進展に関わる *EZH2* の機能とも矛盾しない。

MDA-MB-231 において p38 の阻害処理で有意に *EZH2* 発現が抑制された (図 5)。

このことは Elk-1 が p38 経路による活性化も受けることに起因するのではないかと考える。一方、Elk-1 は ERK、JNK、p38 のいずれによってもリン酸化を受けるはずであるが、各種の細胞株にそれらの阻害剤処理を行っても EZH2 発現が抑制されない細胞が存在した。この理由としては、もともとそれらの細胞株ではそのシグナル伝達経路が活性化していないことや、他の経路によって Elk-1 がリン酸化を受け続けていることが考えられる。また、MDA-MB-231 に対して JNK 阻害剤 (SP600125) 処理を行うと、*EZH2* mRNA 発現量は変化しないが EZH2 タンパク質量は減少した (図 5, 14)。以前に報告された microRNA による転写後の EZH2 発現制御がこの現象に関与しているかもしれない。

#### (4) 総論

本研究の解析結果より、EZH2 発現量は多数のシグナル伝達経路によって調節されることを明らかにした。今回の結果に加えて既に報告されている E2F や microRNA による制御を受けることも考えると、EZH2 は細胞の様々な反応において転写調節がなされ、細胞の形質変化や働きに広く関与していることが推察される。また、多くのがんで EZH2 の高発現が見られることも、EZH2 が多数のシグナル伝達経路によって発現調節されていることの裏づけであると考ええる。特定の経路によってではなく様々な経路によって EZH2 の発現が高められるからこそ、がん細胞の種類を問わず高い発現状態を維持できるのではないだろうか。

EZH2 が MAPK の下流である Elk-1 によって発現調節を受けることが明らかになったことで、様々な細胞外刺激によっても EZH2 が発現亢進し得るのではないかと考えられる。EZH2 は Elk-1 以外にも様々な刺激に応答して発現が亢進し、細胞の刺激応答反応の多くに関わっているのではないだろうか。また、がんにおける EZH2 高発現の意義については、様々な刺激で EZH2 の発現が亢進すること自体が細胞のがん化をもたらす一つの要因になっているのかもしれない。

## 図表

表 1. ヒストン H3/H4 のメチル化修飾部位とメチル化酵素及び関連する反応

メチル化部位	メチル化酵素	関連する反応
H3K4	Set1	転写開始・伸長
	Trx/MLL	
	ALL	
	Set9	
	ALR	
H3K9	Suv39	ヘテロクロマチン形成
	G9a	H4K20のメチル化誘導
	EuHMTase	DNA メチル化
	ESET	
	SETBD1	
H3K27	EZH2	ヘテロクロマチン形成
	G9a	
H3K36	NSD1	転写伸長
H3K79	Dot1L	クロマチン境界の形成
H4K20	PR-Set7	ヘテロクロマチン形成
	Suv4-20h1	
	Suv4-20h2	
H3R2/17/26	CARM1	転写活性化
H4R3	PRMT1	転写活性化
		H4のアセチル化誘導

表 2. 使用した細胞株と培地組成

細胞株名	癌種	培地組成
DLD-1	胃癌	88% RPMI 1640 medium
LNCaP	前立腺癌	10% FBS
MDA-MB-231	乳癌	1% Penicillin/Streptomycin
TE-10	食道癌	1% L-Glutamin
PANC-1	膵臓癌	88% DMEM
		10% FBS
		1% Penicillin/Streptomycin
		1% L-Glutamin
HeLa	子宮頸部癌	44% DMEM
		44% McCoy's 5A Medium
		10% FBS
		1% Penicillin/Streptomycin
		1% L-Glutamin



表 3. プライマー

(A) 定量的 PCR に用いたプライマー

Gene symbol	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
EZH2	CCCTGACCTCTGTCTTACTTGTGGA	ACGTCAGATGGTGCCAGCAATA
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	ATGGTGGTGAAGACGCCAGT
ELK1	CACTTCTGGAGCACCTGAGTC	AGAGGCCATCCACGCTGATA

(B) ルシフェラーゼアッセイ用コンストラクトレポータープラスミド作成時に用いたプライマー

Primer name	Forward primer (5'-3')
EZH2 -2874	GAACGCGTAGGCTGGAGCACAGTGATGT
EZH2 -2704	GAACGCGTCCAGGCTGGTCTCGGAGCTT
EZH2 -2282	GAACGCGTTCACATCTCAGCTGCATAACC
EZH2 -2106	GAACGCGTTTTAGGAAAGGCGGGAAAAT
EZH2 -1839	GAACGCGTGCTTGACAGTGAGCTGAGATG
EZH2 -1516	GAACGCGTTTCCTCTGGGTTGAGGTAGC
EZH2 -1182	GAACGCGTCGCCTTGCAAATATCCTCAC
EZH2 -1089	GAACGCGTACGAACAGTGGAAGGGTCTG
EZH2 -696	GAACGCGTGACAACCAGAGCGAAACTCC
EZH2 -456	GAACGCGTGGTTCAAACCTGGCTTCCAG
EZH2 -151	GAACGCGTACGCGCTGCCAGTGCCCG
EZH2 -9	GAACGCGTGGGGGGGCCAAATAAAAGC
	Reverse primer (5'-3')
EZH2 +599R	GAAGATCTGGTCCCACCAACTTGTGTCT
EZH2 -2704R	GAAGTCGAGGTGGGAAGCTC

(C) シークエンス解析用プライマー

Primer name	(5'-3')
RVprimer3	CTAGCAAAATAGGCTGTCCC
GLprimer2	CTTTATGTTTTTGGCGTCTTCCA

(D) EMSA 用プライマー

Primer name	Forward primer (5'-3')
Biotin-EZH2 -456	Biotin-GGTTCAAACCTGGCTTCCAG
	Reverse primer (5'-3')
EZH2 -151R	CGGGCACTGGCAGCGCGT

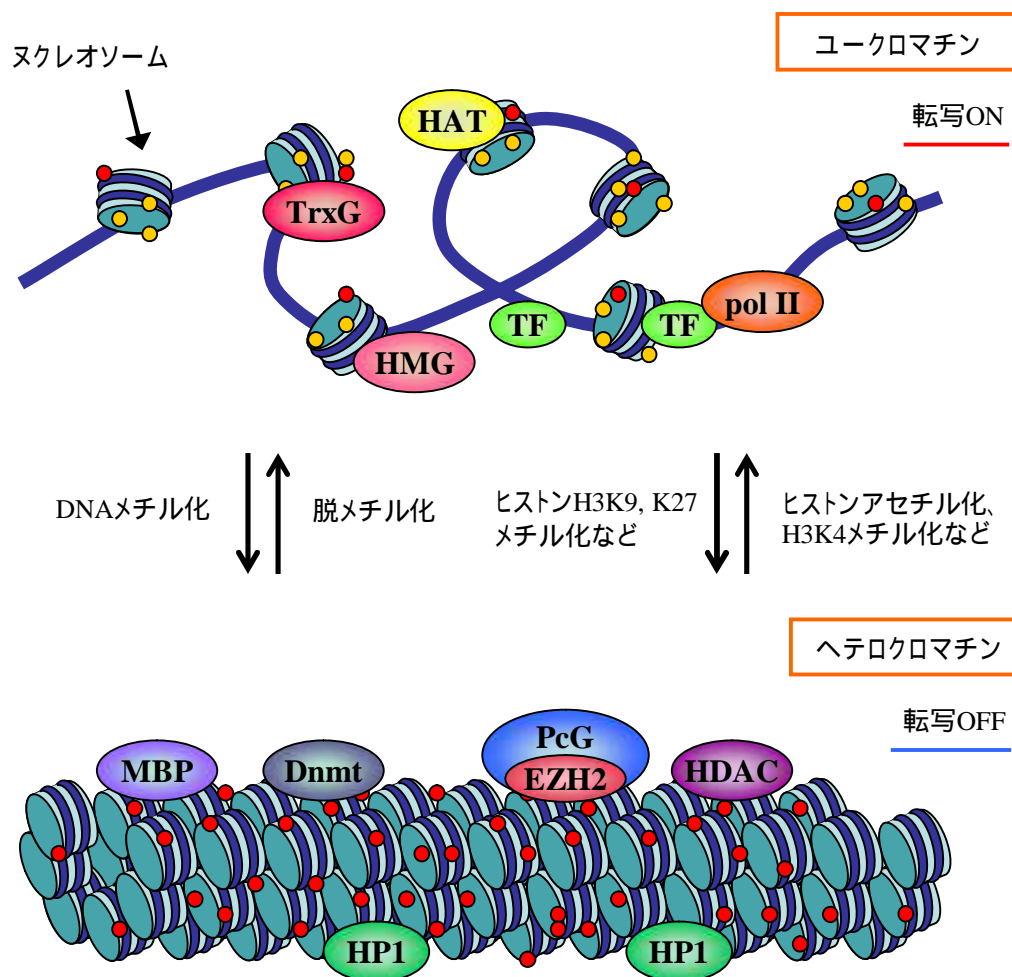


図 1. クロマチン構造変化とそれに関わる因子

Dnmt : DNAメチル化酵素、EZH2 : Enhancer of zeste homologue 2、HAT : ヒストンアセチル化酵素、HDAC : ヒストン脱アセチル化酵素、HMG : High mobility group タンパク質、HP1 : ヘテロクロマチンタンパク質1、MBP : メチル化DNA結合タンパク質、PcG : ポリコームタンパク質、pol II : RNAポリメラーゼII、TF : 転写因子、TrxG : トライソラクスタンパク質、赤丸 : メチル基、黄丸 : アセチル基

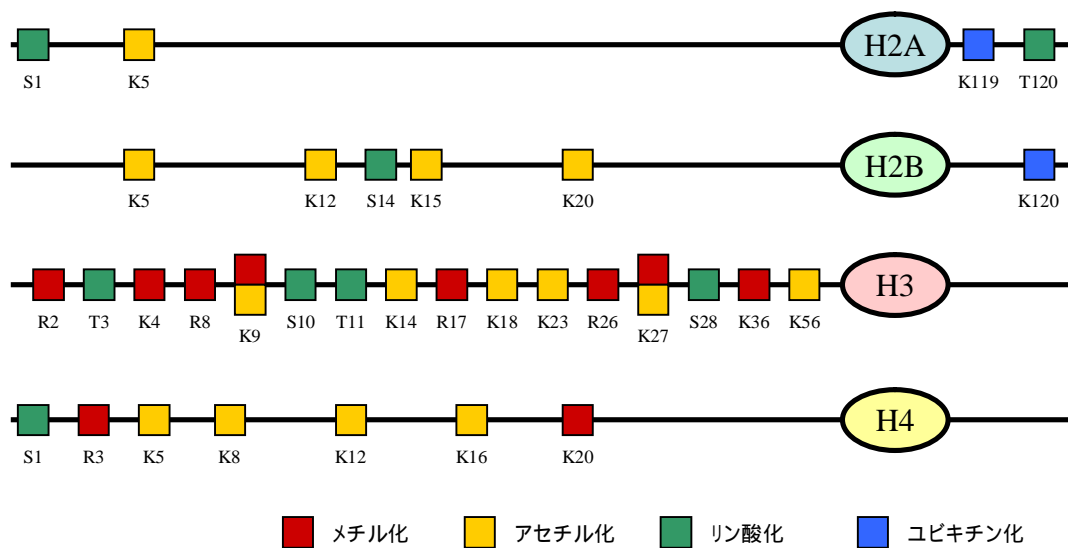


図 2. ヒストンテールの修飾

各ヒストンタンパク質のN末端側(左側)及びC末端側(右側)のコアから遊離したテール部分に受ける修飾を示した。

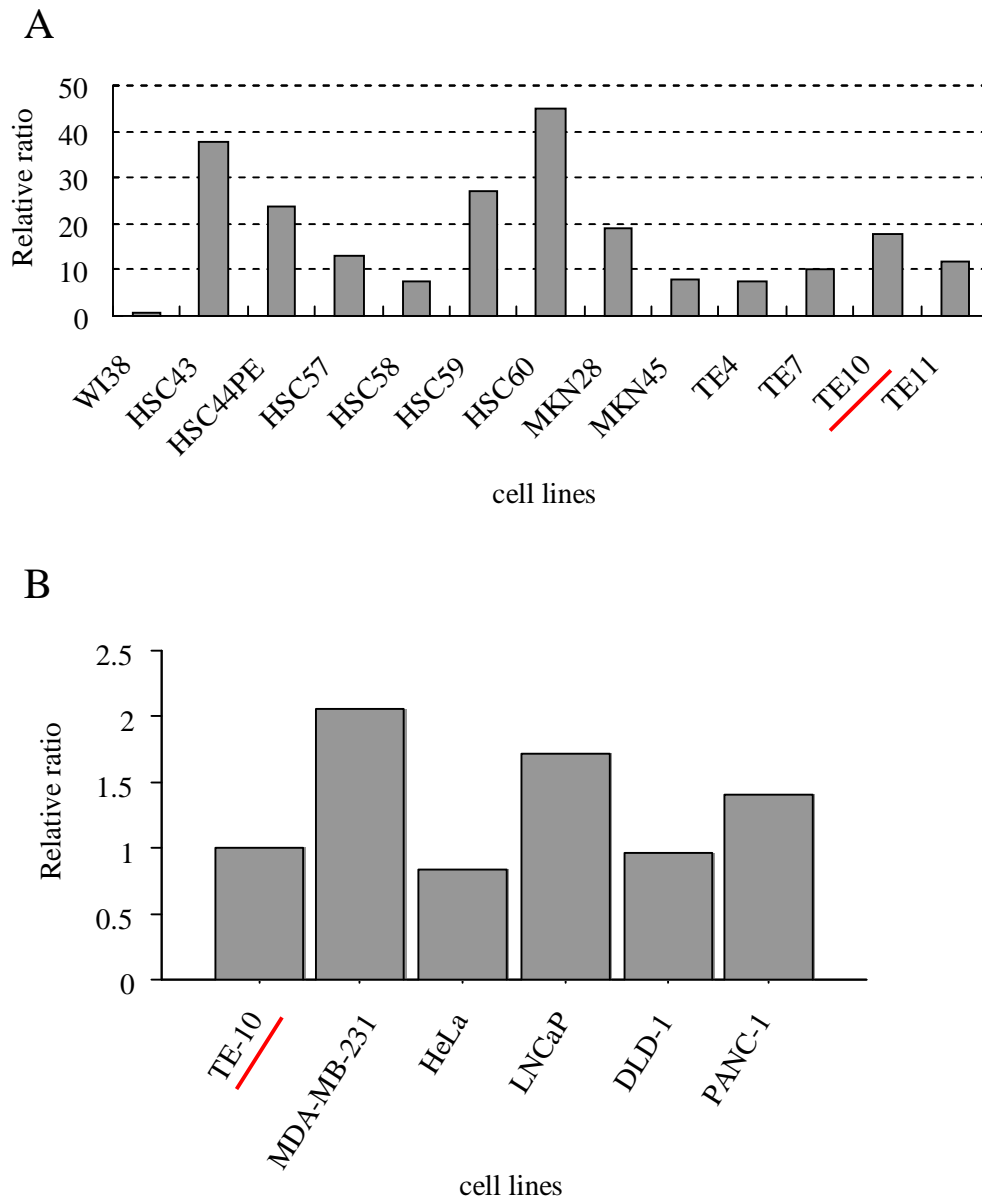


図 3. 正常細胞とがん細胞株における*EZH2* mRNA発現量の比較

A) ヒト胎児肺繊維芽細胞 (WI38) と各種がん細胞株の*EZH2* mRNA発現量。各種細胞株の*EZH2*/*GAPDH*値を求め、WI38における発現量を1としたときの比を表した。 B) 各種がん細胞株の*EZH2*/*GAPDH*値を求め、TE-10における発現量を1としたときの比を表した。

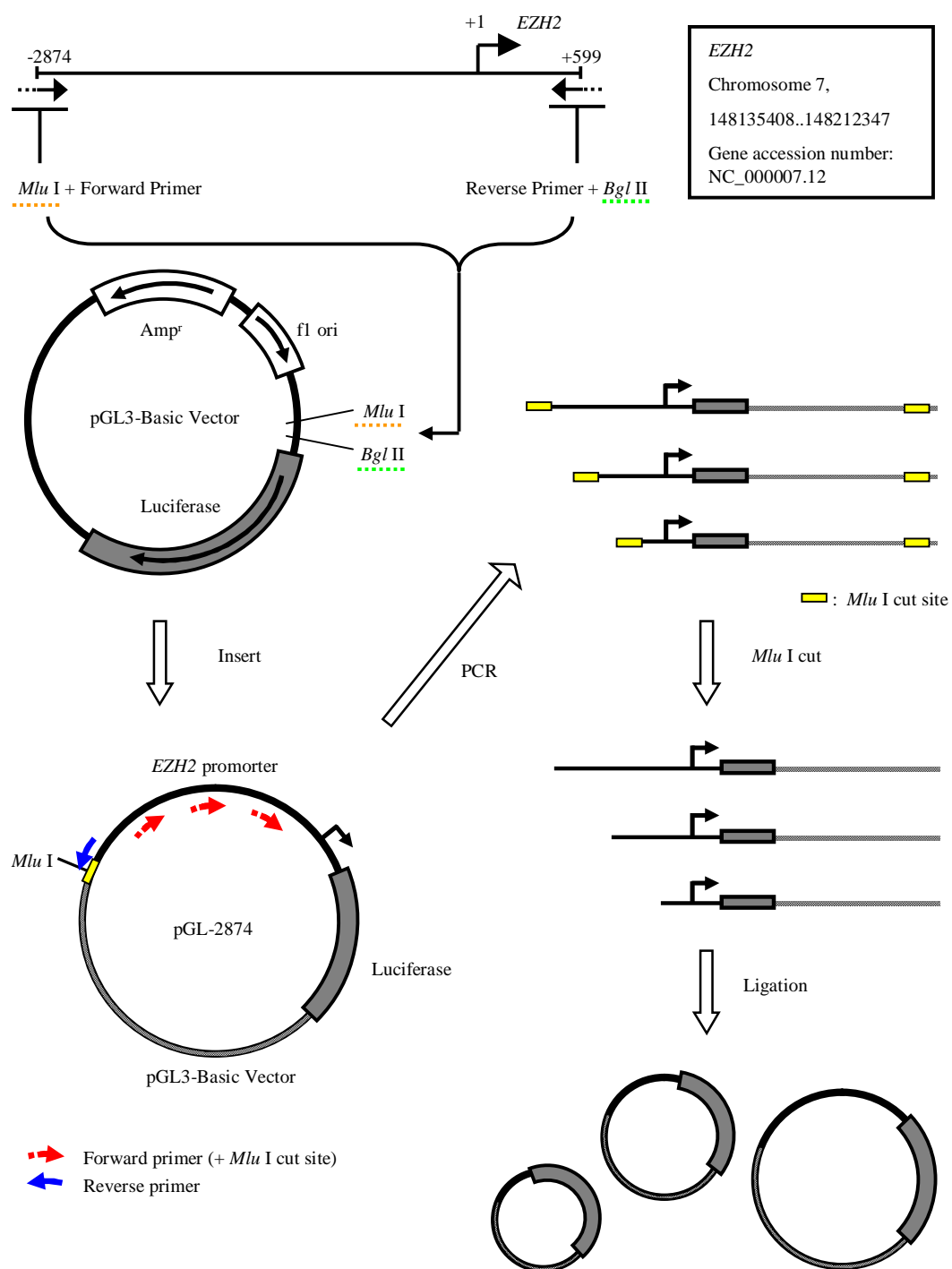


図 4. コンストラクトレポータープラスミド作製

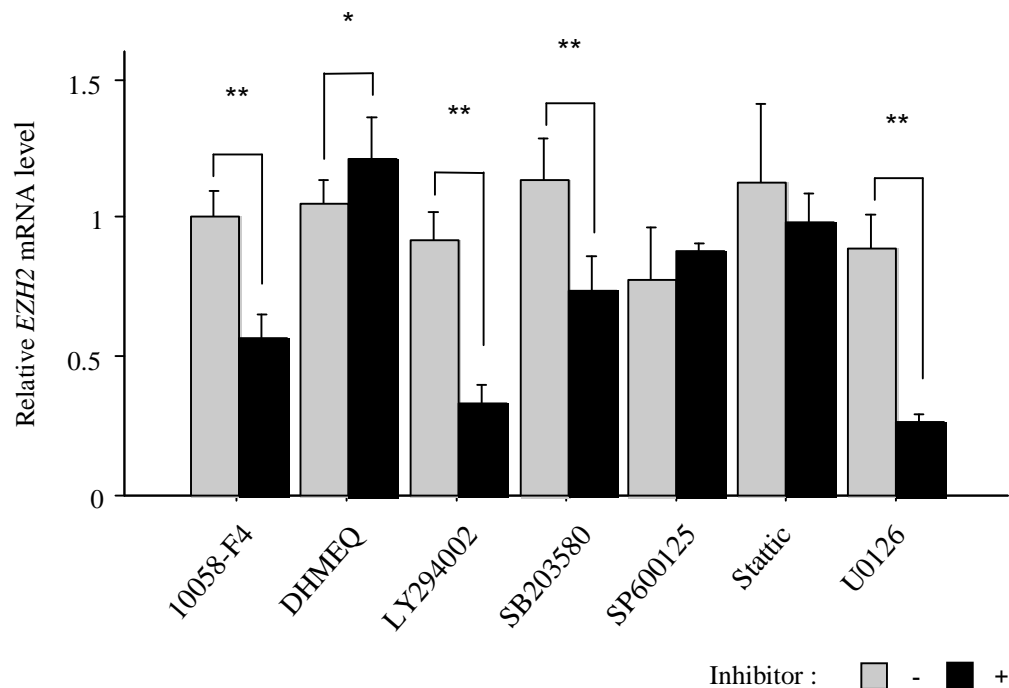


図 5. MDA-MB-231細胞の各種阻害剤による*EZH2* mRNAの発現変化

MDA-MB-231 細胞を24 時間培養した後に30  $\mu$ M 10058-F4 (c-Myc阻害剤)、100  $\mu$ M DHMEQ (NF- $\kappa$ B阻害剤)、50  $\mu$ M LY294002 (PI3K阻害剤)、25  $\mu$ M SB203580 (p38阻害剤)、50  $\mu$ M SP600125 (JNK阻害剤)、10  $\mu$ M Stattic (STAT3阻害剤)、40  $\mu$ M U0126 (MEK阻害剤) となるように各種阻害剤を加えた。コントロールには阻害剤溶液と同量のDMSOを用い、24 時間阻害剤処理した後にmRNA発現量を測定した。*EZH2* mRNA発現量は*EZH2/GAPDH*によって求めた。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , Error bar :  $\pm$  S.D. ,  $n = 3$

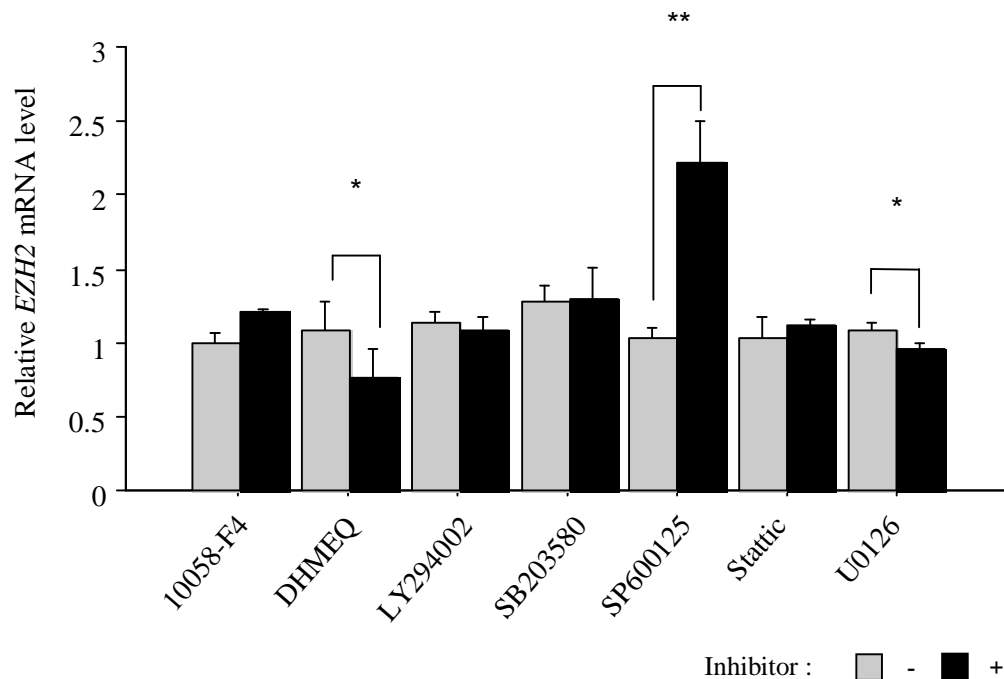


図 6. HeLa細胞の各種阻害剤による*EZH2* mRNAの発現変化

HeLa 細胞を24 時間培養した後に30  $\mu$ M 10058-F4 (c-Myc阻害剤)、100  $\mu$ M DHMEQ (NF- $\kappa$ B阻害剤)、50  $\mu$ M LY294002 (PI3K阻害剤)、25  $\mu$ M SB203580 (p38阻害剤)、50  $\mu$ M SP600125 (JNK阻害剤)、10  $\mu$ M Stattic (STAT3阻害剤)、40  $\mu$ M U0126 (MEK 阻害剤) となるように各種阻害剤を加えた。コントロールには阻害剤溶液と同量の DMSOを用い、24 時間阻害剤処理した後にmRNA発現量を測定した。*EZH2* mRNA発現量は*EZH2*/*GAPDH*によって求めた。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , Error bar :  $\pm$  S.D. , n = 3

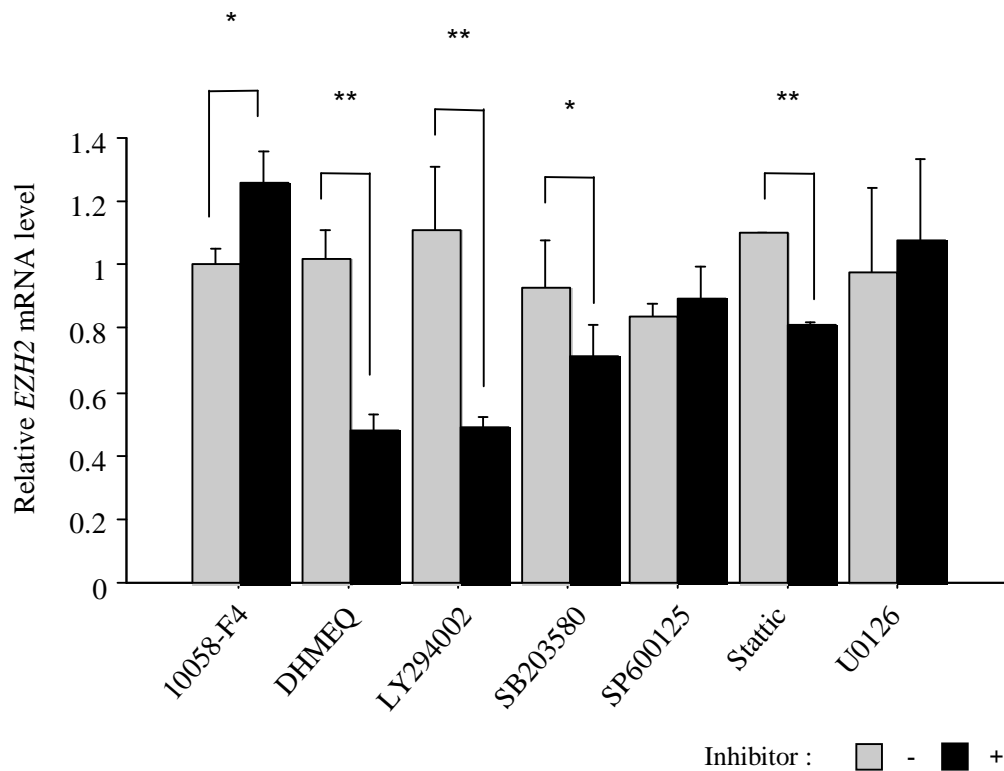


図 7. LNCaP細胞の各種阻害剤による*EZH2* mRNAの発現変化

LNCaP 細胞を24 時間培養した後に30  $\mu$ M 10058-F4 (c-Myc阻害剤)、100  $\mu$ M DHMEQ (NF- $\kappa$ B阻害剤)、50  $\mu$ M LY294002 (PI3K阻害剤)、25  $\mu$ M SB203580 (p38阻害剤)、50  $\mu$ M SP600125 (JNK阻害剤)、10  $\mu$ M Stattic (STAT3阻害剤)、40  $\mu$ M U0126 (MEK阻害剤)となるように各種阻害剤を加えた。コントロールには阻害剤溶液と同量のDMSOを用い、24 時間阻害剤処理した後にmRNA発現量を測定した。*EZH2* mRNA発現量は*EZH2/GAPDH*によって求めた。\* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , Error bar :  $\pm$  S.D. , n = 3



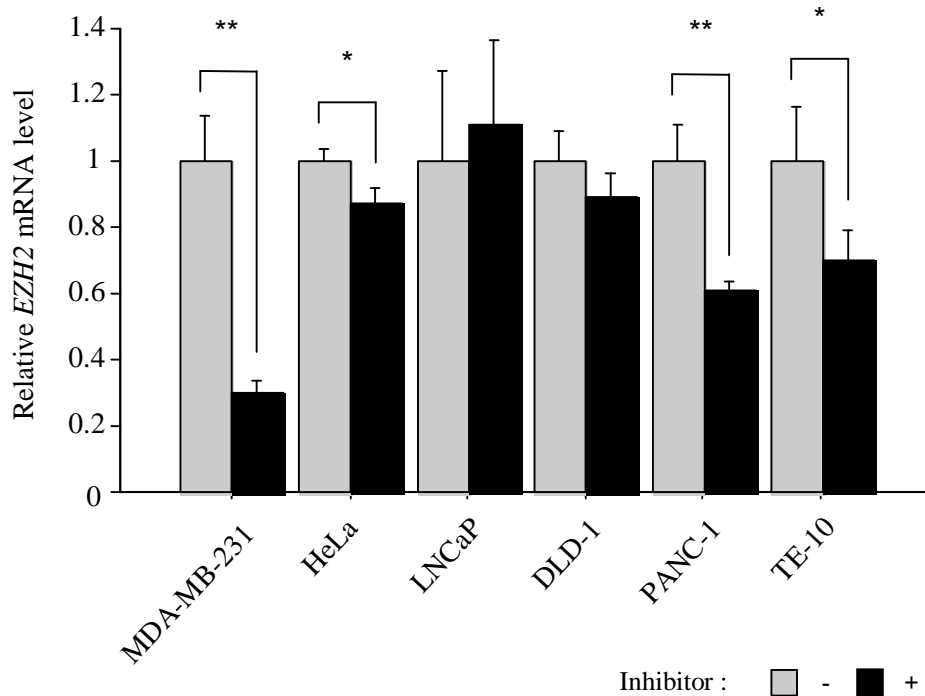


図 8. 各種癌細胞株に対するMEK阻害剤の効果

MDA-MB-231、HeLa、LNCaP、DLD-1、PANC-1、TE-10の各種がん細胞株を24 時間培養した後に 40  $\mu$ M U0126 (MEK阻害剤) となるように阻害剤を加えた。コントロールには阻害剤溶液と同量のDMSOを用い、24 時間阻害剤処理した後にmRNA発現量を測定した。EZH2 mRNA発現量はEZH2/GAPDHによって求めた。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , Error bar :  $\pm$  S.D. ,  $n = 4$

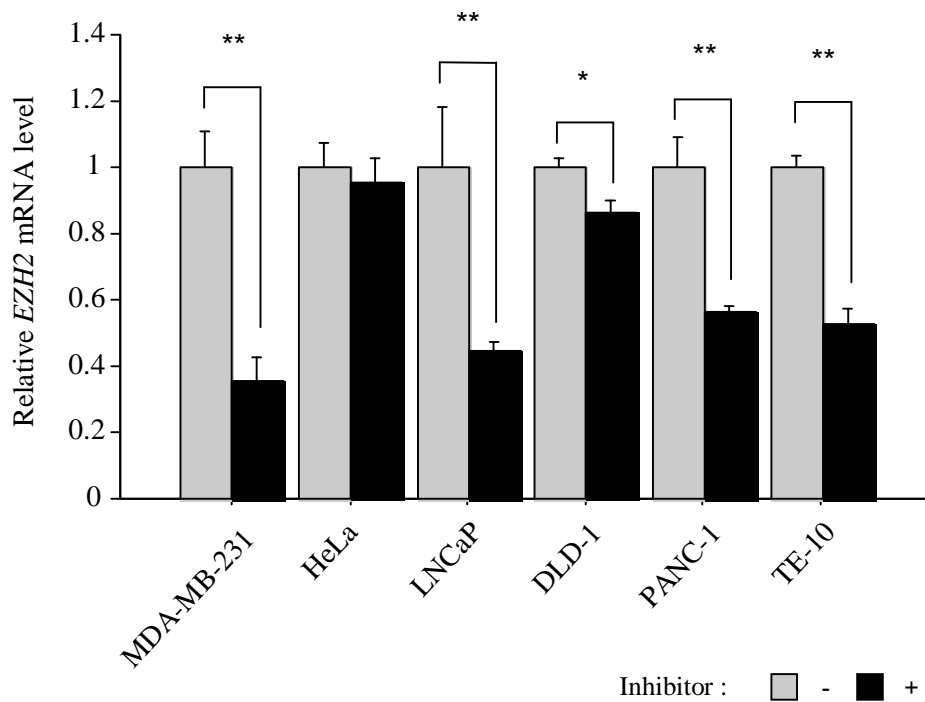


図 9. 各種癌細胞株に対するPI3K阻害剤の効果

MDA-MB-231、HeLa、LNCaP、DLD-1、PANC-1、TE-10の各種がん細胞株を24 時間培養した後に 50  $\mu$ M LY294002 (PI3K阻害剤) となるように阻害剤を加えた。コントロールには阻害剤溶液と同量のDMSOを用い、24 時間阻害剤処理した後にmRNA発現量を測定した。*EZH2* mRNA発現量は*EZH2/GAPDH*によって求めた。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , Error bar :  $\pm$  S.D. ,  $n = 4$

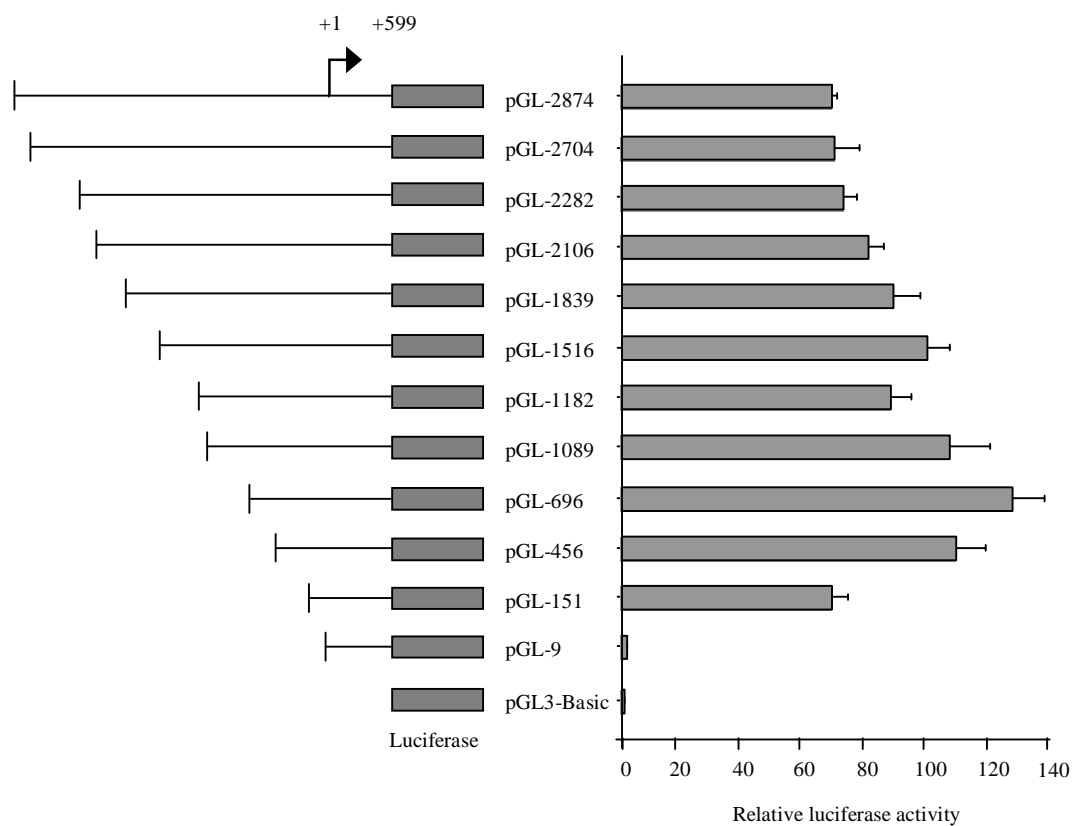


図 10. *EZH2*遺伝子上流のプロモーター解析

MDA-MB-231を24 時間培養した後にコンストラクトレポータープラスミドとpGL-TK Vectorを導入し、24 時間後に発光強度を測定した。ルシフェラーゼ活性値はFirefly luciferase発光強度/*Renilla* luciferase発光強度によって求めた。図の左側が組み込んだプロモーター領域の長さを表し、右側がルシフェラーゼ活性値を表す。Error bar :  $\pm$  S.D. , n = 3

-696 GACAACCAGA GCGAAACTCC GTCTCAGGAG AAAAAAAAAA AAGTAGTAAC  
 -646 GGGTCCGGCG GCAGCGCGCG GGCCGGGCGA GCGTCTCCCG GCAAACGCGG  
 -596 CGCCACAGCT GAGCCGACCT CC**GGGGCCCC** **CGCCCTCCCC** TCCCCGGGCA  
 -546 CCACTAGGAG CGGCCAGCCC GGGCCTCGGC TCCGCGCGCG GGGAAACGAG  
 -496 CGCGGC**GGTT** <sup>SRF</sup> **AAAACC**GTTA CCACCCCGA GTT**TTGAACT** **GGT**TCAAAC <sup>c-Myb</sup>  
 -446 TGG**CTTCCAG** <sup>Elk-1</sup> CACCCGCCCC GCCCTCCCC CGCCCGGGAA CTCTGCGGCG  
 -396 CCGG**TTCCCG** <sup>STAT1</sup> **CCA**AGAGCCG CCGGCGCTTC GTCCCGCCCT TCGGCCGG**TT**  
 -346 **CCCCCA**CCT <sup>STAT1</sup> ATCCTCCCCG CCTCCCGTCC GCGGCGGGCT CCGGGCCCCC  
 -296 GCGATGTCTC CCGGTCCCCG CGTGCCTGCA CACCGC**CTTC** **CTG**AGAGGCG <sup>Elk-1</sup>  
 -246 CCGTGTGTTC AGCGAAAGAA CAAAGAGACG GCGGCGGCGC **TTCCAC**ACGG <sup>Elk-1</sup>  
 -196 CCAGTGGCGT CCCTTAC**AGC** <sup>NF-κB</sup> **GAACCCCGCC** GCCGCCCGCG CGCGCACGCG  
 -146 CTGCCAGTGC CCGCCCGCCC ACGAGCCCTG AGCGCACTCT GCGT**GGGGCT** <sup>NF-κB</sup>  
 -96 **GGCT**CGGCGC CTCCGAGCCC GGC GGCCCT GTGATTGGAC GGGCGCCCGC  
 -46 CTCGCGTCCC <sup>CCAAT box</sup> **GCCAATCGGG** <sup>GC box</sup> **GCGG**CGCTTG ATTGGGCTGG GGGGGCC**AAA** <sup>→ +1</sup>

図 11. *EZH2*プロモーター領域に存在する転写因子の結合配列

*EZH2*遺伝子転写開始点より - 696 ~ - 9 bpの領域のDNA配列をTRANSFAC 6.0を用いて解析し、転写因子結合配列の存在を確認した。

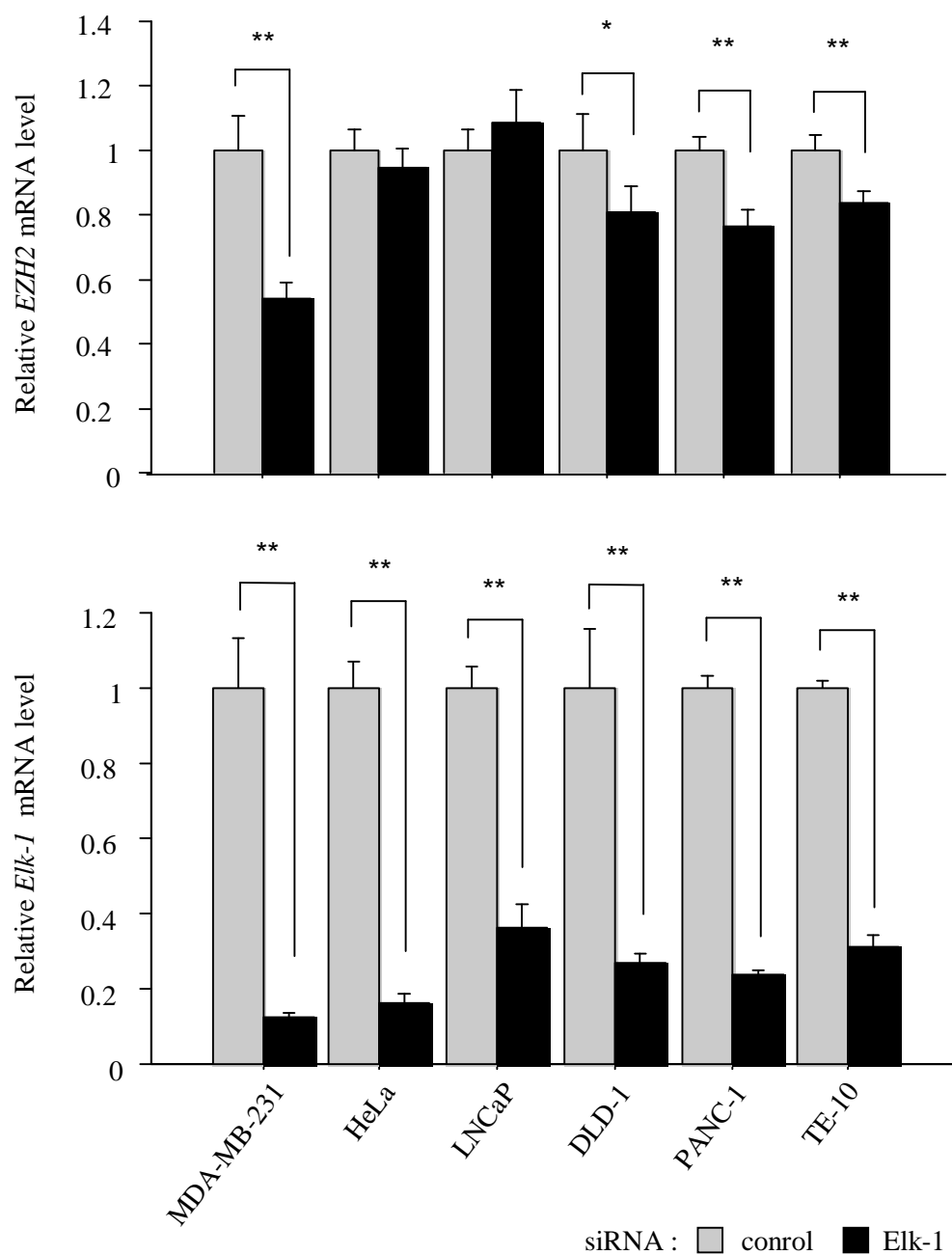


図 12. 各種癌細胞株に対するElk-1ノックダウンの効果

MDA-MB-231、HeLa、LNCaP、DLD-1、PANC-1、TE-10細胞を24時間培養した後に、Elk-1 siRNAまたはコントロールsiRNAを導入した。導入後48時間で回収しmRNA発現量を測定した。*EZH2* mRNA及び*Elk-1* mRNAの発現量は*EZH2/GAPDH* 及び *Elk-1/GAPDH* によって求めた。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , Error bar :  $\pm$  S.D. , n = 4

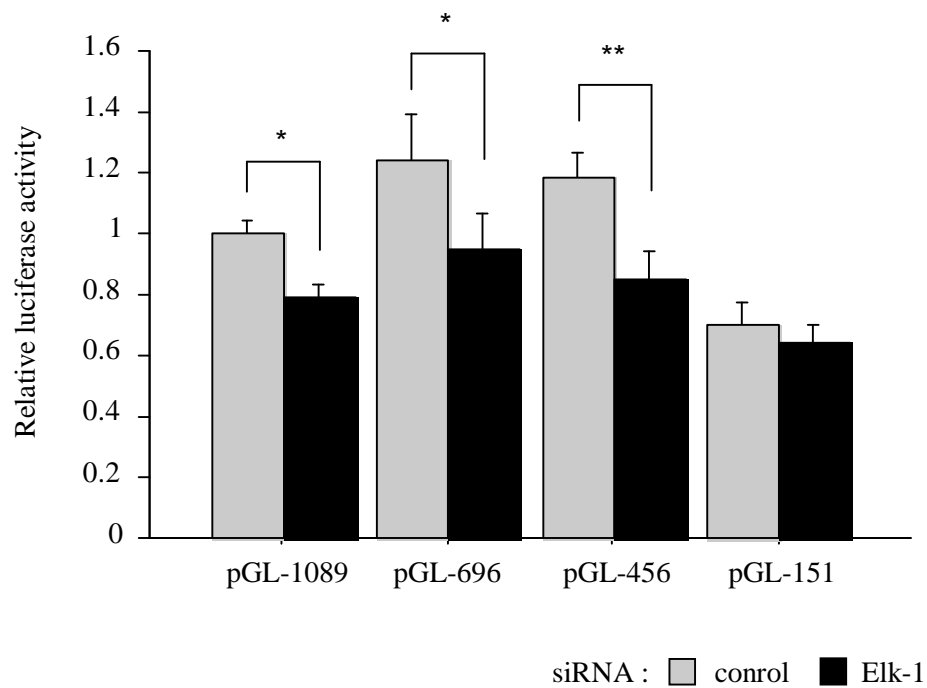


図 13. *EZH2*プロモーターにおけるElk-1作用領域の解析

MDA-MB-231細胞を 24 時間培養した後にElk-1 siRNAまたはコントロールsiRNAを導入した。さらに 24 時間培養した後にコンストラクトレポータープラスミドとpGL-TK Vectorを導入し、24 時間後に発光強度を測定した。ルシフェラーゼ活性値はFirefly luciferase発光強度/*Renilla* luciferase発光強度によって求めた。\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , Error bar :  $\pm$  S.D. , n = 6

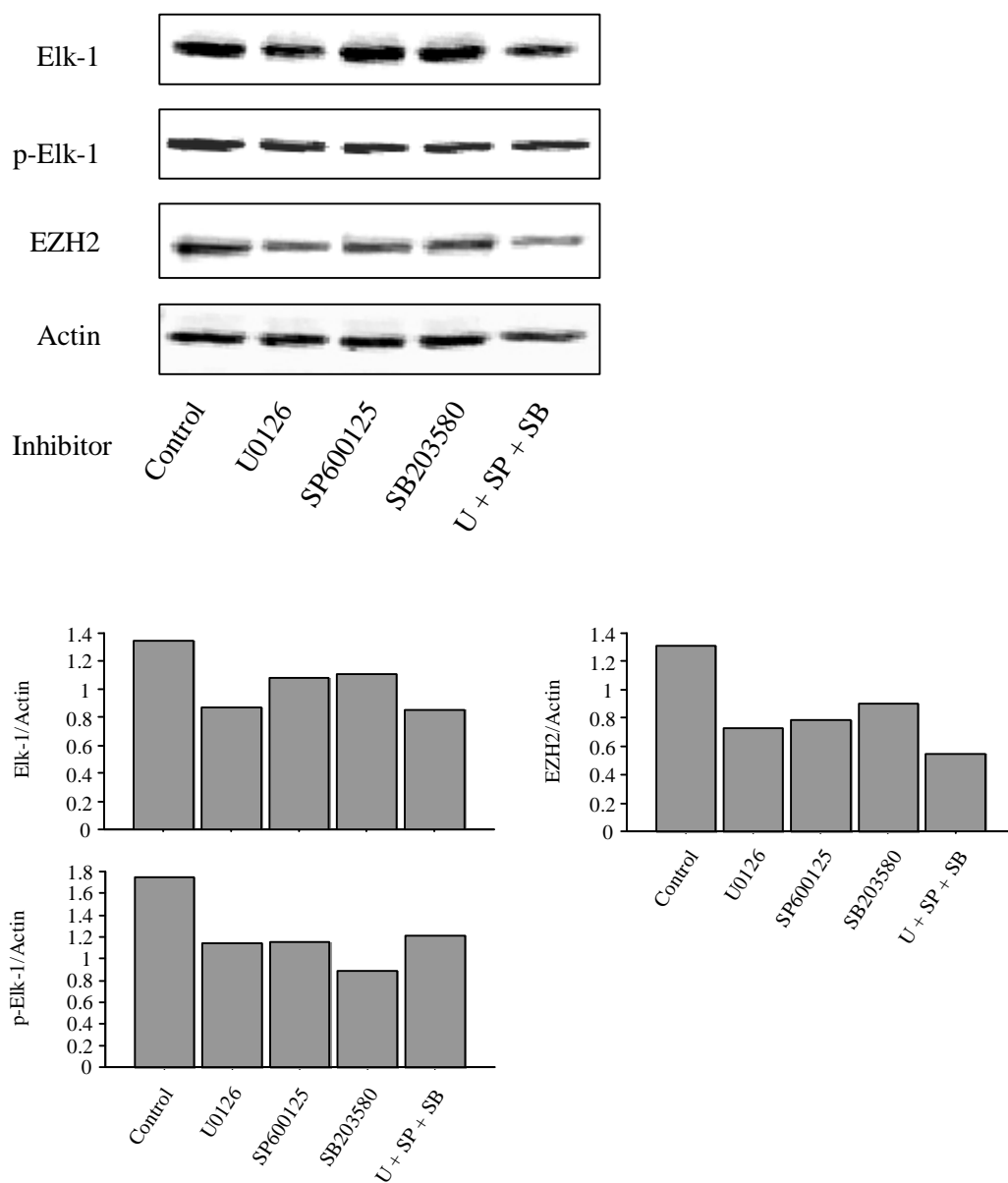


図 14. 各種阻害剤処理後のElk-1リン酸化状態とEZH2タンパク質の発現解析

MDA-MB-231細胞を 24 時間培養した後に 40 mM U0126、50 mM SP600125、25 mM SB203580 およびそれらを併せたものとなるように各種阻害剤を加えた。コントロールには阻害剤溶液と同量のDMSOを用い、24 時間阻害剤処理した後にウェスタンブロットティングを行った。ウェスタンブロットティングのバンドからタンパク質量を解析し、Actin量によって値を補正した。

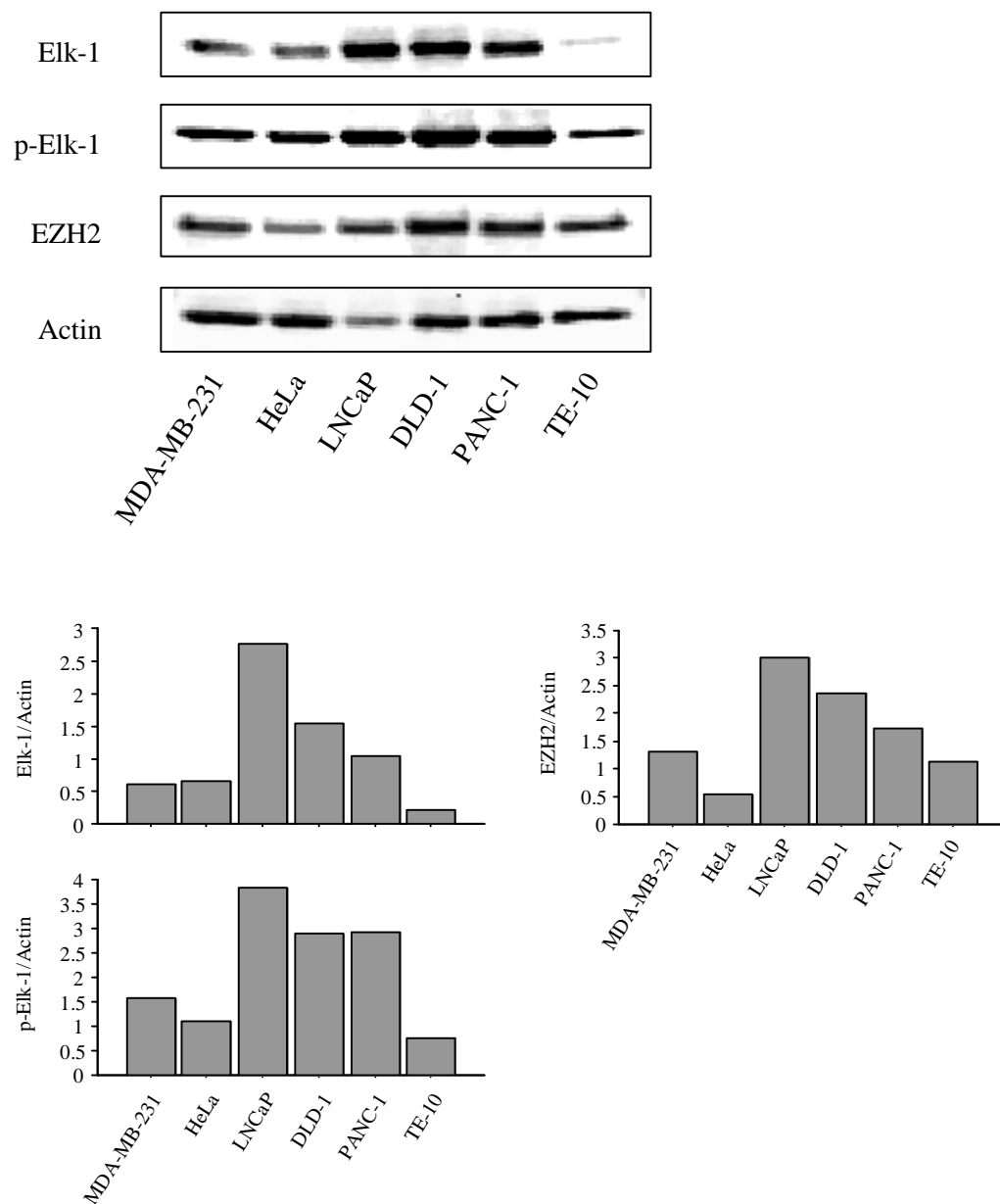


図 15. 各種細胞株のElk-1リン酸化状態とEZH2タンパク質の発現解析

MDA-MB-231、HeLa、LNCaP、DLD-1、PANC-1、TE-10細胞からタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングを行った。ウェスタンブロッティングのバンドからタンパク質量を解析し、Actin量によって値を補正した。



## . 参考文献

1. Lopez-Serra, L. and M. Esteller, *Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words*. Br J Cancer, 2008. **98**(12): p. 1881-5.
2. Sif, S., *ATP-dependent nucleosome remodeling complexes: enzymes tailored to deal with chromatin*. J Cell Biochem, 2004. **91**(6): p. 1087-98.
3. Maison, C. and G. Almouzni, *HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(4): p. 296-304.
4. Bianchi, M.E. and A. Agresti, *HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(5): p. 496-506.
5. Mottet, D. and V. Castronovo, *Histone deacetylases: target enzymes for cancer therapy*. Clin Exp Metastasis, 2008. **25**(2): p. 183-9.
6. Schuettengruber, B., et al., *Genome regulation by polycomb and trithorax proteins*. Cell, 2007. **128**(4): p. 735-45.
7. Bannister, A.J., et al., *Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 120-4.
8. Lachner, M., et al., *Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 116-20.
9. Cao, R., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing*. Science, 2002. **298**(5595): p. 1039-43.
10. Strahl, B.D. and C.D. Allis, *The language of covalent histone modifications*. Nature, 2000. **403**(6765): p. 41-5.
11. Plath, K., et al., *Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation*. Science, 2003. **300**(5616): p. 131-5.

12. Santos-Rosa, H. and C. Caldas, *Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer*. Eur J Cancer, 2005. **41**(16): p. 2381-402.
13. Kuzmichev, A., et al., *Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein*. Genes Dev, 2002. **16**(22): p. 2893-905.
14. Yu, J., et al., *Integrative genomics analysis reveals silencing of beta-adrenergic signaling by polycomb in prostate cancer*. Cancer Cell, 2007. **12**(5): p. 419-31.
15. Agger, K., et al., *UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development*. Nature, 2007. **449**(7163): p. 731-4.
16. Cao, R. and Y. Zhang, *The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3*. Curr Opin Genet Dev, 2004. **14**(2): p. 155-64.
17. Hobert, O., B. Jallal, and A. Ullrich, *Interaction of Vav with ENX-1, a putative transcriptional regulator of homeobox gene expression*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(6): p. 3066-73.
18. Kleer, C.G., et al., *EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11606-11.
19. Varambally, S., et al., *The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer*. Nature, 2002. **419**(6907): p. 624-9.
20. Weikert, S., et al., *Expression levels of the EZH2 polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas*. Int J Mol Med, 2005. **16**(2): p. 349-53.
21. Matsukawa, Y., et al., *Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer*. Cancer Sci, 2006. **97**(6): p. 484-91.
22. Bachmann, I.M., et al., *EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast*. J Clin Oncol, 2006. **24**(2): p. 268-73.

23. Raaphorst, F.M., et al., *Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb group genes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease*. Am J Pathol, 2000. **157**(3): p. 709-15.
24. Bracken, A.P., et al., *EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer*. Embo J, 2003. **22**(20): p. 5323-35.
25. Croonquist, P.A. and B. Van Ness, *The polycomb group protein enhancer of zeste homolog 2 (EZH 2) is an oncogene that influences myeloma cell growth and the mutant ras phenotype*. Oncogene, 2005. **24**(41): p. 6269-80.
26. Fujii, S., et al., *Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates RUNX3 by increasing histone H3 methylation*. J Biol Chem, 2008. **283**(25): p. 17324-32.
27. Fujii, S. and A. Ochiai, *Enhancer of zeste homolog 2 downregulates E-cadherin by mediating histone H3 methylation in gastric cancer cells*. Cancer Sci, 2008. **99**(4): p. 738-46.
28. Varambally, S., et al., *Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer*. Science, 2008. **322**(5908): p. 1695-9.
29. Wasylyk, B., J. Hagman, and A. Gutierrez-Hartmann, *Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway*. Trends Biochem Sci, 1998. **23**(6): p. 213-6.
30. Gille, H., et al., *Phosphorylation-dependent formation of a quaternary complex at the c-fos SRE*. Mol Cell Biol, 1996. **16**(3): p. 1094-102.
31. Yordy, J.S. and R.C. Muise-Helmericks, *Signal transduction and the Ets family of transcription factors*. Oncogene, 2000. **19**(55): p. 6503-13.

## ． 謝辞

本研究を行うにあたり、日頃より熱心な御指導と御高配を賜りました 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野 落合淳志 教授に心より御礼を申し上げます。

また、終始に亘り丁寧なご指導と御助言を賜りました国立がんセンター東病院 臨床開発センター 臨床腫瘍病理部 細胞動態室長 藤井誠志 先生に心より感謝致します。

本研究についての有益な御助言、御指導を賜りました 東京大学大学院 新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻 がん先端生命科学分野 江角浩安 教授、松村保広 准教授、ならびに国立がんセンター東病院 臨床開発センターの諸先生方に厚く御礼を申し上げます。

本研究を遂行する上で、親身に御指導、御協力を頂いた国立がんセンター東病院 臨床開発センター 臨床腫瘍病理部の皆々様に深く感謝致します。

2009 年 春