

## 肝化学発がん過程において発現変化するヒストン修飾因子と毒性発現

長田 茂宏

**Histone Modification Enzymes Induced during Chemical Hepatocarcinogenesis**

Shigehiro OSADA

*Department of Molecular Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University,  
3-1 Tanabe-dori, Mizuho-ku, Nagoya 467-8603, Japan*

(Received November 17, 2006)

Aberrant methylation patterns of genomic DNA are well-studied epigenetic mutations in cancer. Hypermethylation of CpG islands in tumor-suppressor genes promotes oncogenesis and hypomethylation of global genomic DNA affects genomic stability. Cancer is recognized as a genetic and epigenetic disease. However, it is not clear how epigenetic regulatory factors, including histone modification enzymes, chromatin components and other factors are involved in carcinogenesis. To gain insights into the molecular mechanisms mediated by these factors at the early stage of hepatocarcinogenesis and hepatotoxicity induced by chemicals, we investigated gene expression profiles by DNA microarray and Western blot analyses. We prepared RNA and nuclear extracts from livers with hyperplastic nodules expressing Glutathione S-transferase placental form (GST-P) and compared findings with those of normal liver. GST-P is a phase II detoxification enzyme and a well-known tumor marker. We identified several epigenetic regulatory factors that showed dysregulated expression during chemically induced hepatocarcinogenesis. Here I review the characterization and functions of these factors and discuss the mechanisms of tumor marker gene expression during chemical hepatocarcinogenesis.

**Key words**—histone modification enzyme; epigenetics; hepatocarcinogenesis; chromatin; methylation; acetylation

**1. はじめに**

がんによる死亡率は年々増加しており、悪性新生物は1981年にわが国における死亡原因の第1位になり、現在では約3人に1人ががんで亡くなっている。これまでに多くのがん研究が基礎・臨床面からなされ、がん克服に貢献してきた。そして、発がん機構解明、発がん防御機構解明、がん化細胞排除機構解明などは、がん遺伝子・がん抑制遺伝子などの発見やその機能解明につながった。そして、その成果は「がんは遺伝子の異常によって起きる病気である」という概念を導いている。

真核細胞の生命機能維持の基礎を担う最も重要な因子の1つである核内DNAはクロマチンに存在する。クロマチンはヒストンH2A, H2B, H3, H4それ

ぞれ2分子からなるヒストン8量体に約147塩基対のDNAが巻き付いたヌクレオソームを基本単位としている。このクロマチンはDNAを核内に収納する機能だけではなく、遺伝子発現調節などの遺伝子機能制御にも大きく関与していることが明らかにされている。それゆえ、このクロマチンにおける異常や変異はがんを含む疾病に関与することが容易に想像つく。つまり、DNA配列の変異以外の要因によるがん化機構についても考慮する必要がある。

近年、DNAの配列変化を伴わずに子孫や娘細胞に伝達される遺伝子機能の変化、すなわち「エピジェネティクス」解析が急速に進んでいる。エピジェネティクスにはDNAメチル化やヒストンの化学修飾が関与するが、加えて、ATP依存的に機能するクロマチンリモデリング因子、クロマチン形成に関与するヒストンシャペロン、さらには最近注目されているmicroRNAなどによる制御も含まれる(Fig. 1)。また、これらは単独で機能しているだけでなく、これら制御因子の相互作用も遺伝子機能

名古屋市立大学大学院薬学研究科分子生物薬学分野  
(〒467-8603 名古屋市瑞穂区田辺通3-1)

e-mail: osada@phar.nagoya-cu.ac.jp

本総説は、日本薬学会第126年会シンポジウムS16で発表したものを中心に記述したものである。

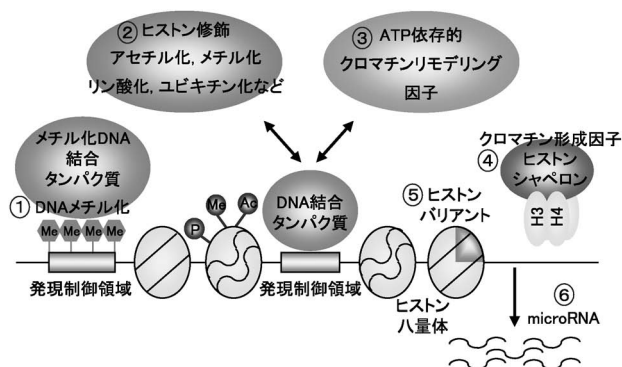


Fig. 1. Representative Epigenetics Regulatory Factors  
Many epigenetics regulatory factors contribute regulation of gene function.

制御に重要であることが明らかにされつつある。<sup>1-3)</sup> 一般にヒストンアセチル化は転写活性化を導き、その逆反応である脱アセチル化は不活性化につながる。それに対して、ヒストンメチル化はそのメチル化されるアミノ酸残基の位置により機能が異なる。例えば、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のメチル化は遺伝子発現の活性化に関与するが、ヒストン H4 の 20 番目のリジン残基のメチル化は不活性化に関与している。このように、ヒストン修飾パターンが遺伝子発現の制御などの情報を含んで機能していることが明らかにされ、ヒストンコード説の概念が定着しつつある。<sup>4,5)</sup>

がんのエピジェネティクスとの関係は、DNA メチル化異常についての解析が進められ、がん抑制遺伝子のプロモーター領域の高メチル化による発現抑制やゲノムの広範囲の低メチル化によるゲノムの不安定化が知られている。<sup>6)</sup> 前述のように、エピジェネティクスには DNA メチル化以外にヒストン修飾などが関与する。それゆえ、DNA メチル化酵素阻害剤だけでなく、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤も抗がん剤として臨床応用に向かっている。<sup>7,8)</sup> ここ数年の解析により、がんのエピジェネティクス異常との関係の知見が蓄積されつつあるが、DNA メチル化以外のエピジェネティクス異常とがん化との関係は不明な点が多く残されている。本総説においては、これまで行ってきた発がん初期過程において発現変化するエピジェネティクス制御に関与する因子の探索と機能解析について概説する。

## 2. 化学発がん過程において発現変化する因子の網羅的解析

発がん過程の早期において発現変化するクロマチン関連因子、エピジェネティクス制御因子を同定する目的で、われわれはラットに肝化学発がんを誘導させた。本章においてはマイクロアレイを用いた RNA レベルの発現変化について説明する。<sup>9)</sup> また、次章においてはヒストンアセチル化酵素 (histone acetyltransferase, HAT) のタンパク質レベルの発現変化について解説する。<sup>10)</sup>

### 2-1. Solt-Farber 法による腫瘍マーカー陽性フォーサイの誘導

第二相解毒酵素であるラット胎盤型グルタチオントランスフェラーゼ (glutathione transferase placental form, GST-P) は、正常肝臓で発現が完全に抑えられている。その発現は化学発がん過程において肝臓特異的に誘導されることから、優れた腫瘍マーカーの 1 つとされている。<sup>11,12)</sup> そして、発がんイニシエーターであるジエチルニトロソアミン (diethylnitrosamine, DEN) 投与により生じる GST-P 陽性単一細胞は、前がん病変の前駆細胞と考えられている。<sup>13)</sup> すなわち、GST-P 陽性フォーサイにおける遺伝子発現変化の解析は早期の細胞がん化機構の解明や化学物質の肝毒性発現機構解明につながる。

そこでわれわれは短期間に前がん病変を起こさせる Solt-Farber 法により GST-P 陽性フォーサイを誘導させた。<sup>14)</sup> この方法では 5 週齢オスラットに 200 mg/ml の DEN を腹腔内投与し、2 週間後に 0.02% 2-アセチルアミノフルオレン (2-acetylaminofluorene, 2-AAF) を加えた餌に変え、DEN 投与後の 3 週間後の部分肝切除により、約 8 週間には前がん病変が誘発される。実際に 70—80% の領域に GST-P 陽性フォーサイが誘導されていることを抗 GST-P 抗体を用いた免疫染色により確認している。

### 2-2. 腫瘍マーカー陽性フォーサイと正常肝臓における遺伝子発現の網羅的解析

DNA マイクロアレイ解析技術の発展に伴い、正常状態とがん状態の遺伝子発現比較のデータが蓄積されている。さらに、近年、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (laser capture microdissection, LCM) を用いて、がん部位の細胞のみから RNA を抽出し、がん部位と非がん部位との比較も行われている。化学発がん過程における GST-P 陽性フォーサイとその

周辺領域の遺伝子発現の差が cDNA マイクロアレイを用いて検討されており、解毒代謝に関与する酵素などの発現上昇が明らかにされている。<sup>15)</sup> われわれは GST-P 陽性フォーサイと正常肝における遺伝子発現の差を詳細に検討するために、Affymetrix 社のオリゴヌクレオチドマイクロアレイ (GeneChip Rat Expression Array 230A) を用いた解析を行った。

Solt-Farber 法により肝前がん病変を誘導させた 3 匹のラットの GST-P 陽性フォーサイ部位、及び対照として、DEN の代わりに生理食塩水を腹腔内投与し、普通食のみを与え、部分肝切除を行っていないラット 3 匹からの肝臓切片から total RNA を調製した。次に、MEGAscript T7 kit (Ambion) 及び Enzo BioArray High Yield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Diagnostics) を用いて、ビオチン標識ターゲット RNA を作成した。3 匹ずつ由来の標識ターゲットを個々のアレイに反応させ、マイクロアレイ解析を行った。コントロールラット 3 匹から得られたシグナル値からスキャッタープロット解析を行い、相関係数の平均値は  $R^2=0.93\pm 0.035$  となり、個体間のばらつきは低いことが示された。同様に、GST-P 陽性フォーサイにおける発現の相関係数の平均値は  $R^2=0.95\pm 0.0068$  であった。一方、GST-P 陽性フォーサイと正常肝を比較すると相関係数の平均値は  $R^2=0.74\pm 0.026$  となり、遺伝子発現に変化があることが示された。

次に個々の搭載 15923 遺伝子の発現変化に注目し、正常肝における発現に対する GST-P 陽性フォーサイにおける発現の割合を log ratio として算出した。その結果、375 遺伝子が 2 倍以上発現上昇 ( $\log \text{ratio} > 1 : p < 0.05$ ) し、199 遺伝子が 1/2 以下に発現減少 ( $\log \text{ratio} < -1 : p < 0.05$ ) していた。顕著に上昇していた遺伝子の中には GST-P を始め、aldehyde dehydrogenase, aflatoxin B1 aldehyde reductase, NAD(P)H dehydrogenase, glutathione peroxidase 2 など、これまでに発現上昇することが報告されている解毒代謝に関与する遺伝子が含まれていた。<sup>11,15)</sup> 一部の遺伝子については、半定量 RT-PCR を行い、アレイの発現変化の結果が正しいことを確認した。

**2-3. 転写に関与する遺伝子発現の変化** 搭載されている遺伝子は Gene Ontology に基づき、様々なカテゴリーに分類される。<sup>16)</sup> カテゴリーの 1 つ

である「transcription, 転写」に分類される遺伝子発現の解析はがん化や化学物質による毒性発現機構を考えるに当たり、有用な情報を与える。そこで転写に分類される遺伝子で発現が 2 倍以上 ( $\log \text{ratio} > 1 : p < 0.05$ ) 若しくは 1/2 以下 ( $\log \text{ratio} < -1 : p < 0.05$ ) に変化している遺伝子を Tables 1 及び 2 にまとめた。これらの遺伝子の多くは肝化学発がん過程における発現上昇が報告されていない遺伝子であった。例えば、Pawr 遺伝子 (prostate apoptosis response gene-4 (Par-4) と呼ばれる) の発現上昇が明らかとなった。PAWR はがん抑制遺伝子産物である DNA 結合型転写因子 Wilms' tumor 1 (WT1) に相互作用し、WT1 のコレプレッサーとして機能する。<sup>17)</sup> WT1 はがん抑制遺伝子としての機能が報告されているが、<sup>18)</sup> 白血病や固形がんにおいてはがん化機能を示すことが知られている。<sup>19)</sup> また、WT1 は抗アポトーシス活性を示す Bcl-2 の発現を制御するが、その活性化/不活性化は細胞の種類、WT1 のアイソフォームにより異なることが知られている。<sup>20,21)</sup> 例えば、精巣がん細胞株において、Pawr 過剰発現は WT1 を介して、Bcl-2 発現抑制を導くことが報告されている。<sup>22)</sup> われわれのアレイの解析においては Bcl-2 の発現は上昇 ( $\log \text{ratio}, 0.776 : p = 0.0330$ ) していたことから、Bcl-2 の発現制御は肝前がん病変と精巣がん細胞株においては異なる予想される。PAWR の詳細な解析は肝前がん病変における WT1 のがん化/がん抑制機能解析につながると考えられる。

一方、コレステロールや脂肪酸合成に関与する転写因子 Sterol-regulatory-element binding factor 1 (Srebf1)/Sterol-regulatory-element binding protein 1 (Srebp1) の発現減少 ( $\log \text{ratio}, -1.57 : p = 0.00424$ ) が明らかとなった。そして、SREBP1 の標的遺伝子である fatty acid synthase ( $\log \text{ratio}, -3.04 : p = 0.00266$ )、apolipoprotein A-II ( $\log \text{ratio}, -2.74 : p = 0.00183$ )、thyroid hormone-responsive protein (Thrsp) ( $\log \text{ratio}, -2.46 : p = 0.000254$ ) の発現は GST-P 陽性フォーサイで減少していた。さらに THRSP 発現抑制により発現が減少する遺伝子が報告されており、<sup>23)</sup> それらの発現減少が以下のように示された。Fatty acid synthase ( $\log \text{ratio}, -3.04 : p = 0.00266$ )、ATP citrate lyase ( $\log \text{ratio}, -1.51 : p = 0.00105$ )、malic enzyme ( $\log \text{ratio}, -0.508 : p =$

Table 1. A List of Genes Involved in Transcription Induced in GST-P-positive Foci

Gene symbol	Gene title	Log ratio	<i>P</i> -value	GenBank accession No.
Rnf30_predicted	Ring finger protein 30 (predicted)	3.54	2.56E-04	NM_001013217
Copeb	Core promoter element binding protein	1.92	2.21E-02	NM_031642
Basp1	Brain acidic membrane protein	1.69	1.50E-02	NM_022300
Copeb	Core promoter element binding protein	1.66	1.70E-03	NM_031642
Htatip2_predicted	HIV-1 Tat interactive protein 2 (predicted)	1.61	6.54E-04	XM_214927
L3mbtl2_predicted	l(3)mbt-like 2 (Drosophila) (predicted)	1.59	1.29E-03	NM_001033695
Ppp2ca	Protein phosphatase 2a, catalytic subunit, alpha isoform	1.58	3.77E-03	NM_017039
Ppp2ca	Protein phosphatase 2a, catalytic subunit, alpha isoform	1.56	2.53E-03	AI009467
Maged1	Melanoma antigen, family D, 1	1.41	9.41E-03	NM_053409
Als2cr3	Amyotrophic lateral sclerosis 2 (juvenile) chromosome region, candidate 3 homolog (human)	1.41	4.83E-02	NM_133560
Hmgb2	High mobility group box 2	1.35	4.16E-02	XM_573272
Npm1	Nucleophosmin 1	1.34	4.18E-02	NM_012992
Pdlim1	PDZ and LIM domain 1	1.27	1.22E-02	NM_017365
Mdm2_predicted	Transformed mouse 3T3 cell double minute 2 (predicted)	1.24	2.64E-02	XM_235169
Sox4_predicted	SRY-box containing gene 4 (predicted)	1.19	2.36E-02	XM_344594
Npm1	Nucleophosmin 1	1.18	3.92E-03	NM_012992
Carm1_predicted	Coactivator-associated arginine methyltransferase 1 (predicted)	1.14	2.07E-02	NM_001030041
Tgif_predicted	TG interacting factor predicted	1.14	3.74E-03	NM_001015020
Ivns1abp_predicted	Influenza virus NS1A binding protein (predicted)	1.09	1.09E-02	XM_213898
Pawr	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	1.07	4.28E-03	NM_033485
RGD1304726_predicted	Similar to RIKEN cDNA 6330509G02 (predicted)	1.06	2.49E-02	NM_001024993
Ets2	V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)	1.03	1.24E-02	XM_239510
Rbbp7	Retinoblastoma binding protein 7	1.02	4.15E-03	NM_031816

Log ratio indicates a logarithm of the fold-change vs the expression level of the control rats. Statistics of differential expression between genes was estimated using the linear modeling features of the limma library of the R. Limma computes *p*-values of moderated *t*-statistics by empirical Bayes shrinkage of the standard error toward a common value.

Table 2. A List of Genes Involved in Transcription Repressed in GST-P-positive Foci

Gene symbol	Gene title	Log ratio	<i>P</i> -value	GenBank accession No.
Thrsp	Thyroid hormone responsive protein	-2.46	2.54E-04	NM_012703
Thrsp	Thyroid hormone responsive protein	-1.82	2.14E-02	NM_012703
Thrsp	Thyroid hormone responsive protein	-1.68	6.14E-03	NM_012703
Srebf1	Sterol regulatory element binding factor 1	-1.57	4.24E-03	XM_213329
Atf5	Activating transcription factor 5	-1.39	8.82E-03	NM_172336
Sec14l2	SEC14-like 2 (S. cerevisiae) protocadherin 1 (cadherin-like 1) (predicted)	-1.36	5.06E-03	NM_053801
		-1.27	8.40E-03	XM_225997
Gls2	Liver mitochondrial glutaminase	-1.22	1.40E-02	NM_138904
Per2	Period homolog 2	-1.14	7.45E-03	NM_031678
Idb4	Inhibitor of DNA binding 4	-1.12	9.70E-03	NM_175582
Clp1	Cardiac lineage protein 1	-1.11	3.12E-02	NM_001025136
Tgfb1i4	Transforming growth factor beta 1 induced transcript 4	-1.10	5.86E-03	L25785
Rxra	Retinoid X receptor alpha	-1.02	1.24E-03	NM_012805
Hes6_predicted	Hairy and enhancer of split 6 (Drosophila) (predicted)	-1.01	5.41E-03	NM_001013179

Log ratio and *p*-value are described in Table 1.

0.00221), pyruvate kinase (log ratio,  $-2.05$ :  $p=0.000531$ ). このように、転写に分類される因子とその標的遺伝子の発現の関係がアレイから考察することが可能であることが示された。

**2-4. クロマチン修飾酵素関連因子をコードする遺伝子の発現変化** DNA 配列を認識して作用する転写調節因子はクロマチンからの遺伝子発現に転写共役因子を必要とする。その転写共役因子はヒストンアセチル化やメチル化などのクロマチン修飾酵素活性を合わせ持つことが多い。<sup>24)</sup> また、近年のタンパク質精製解析により、これらの転写共役因子の多くは複合体の1つのサブユニットとして機能していることが明らかにされている。<sup>25)</sup> 今回のマイクロアレイの解析結果より、coactivator-associated arginine methyltransferase (Carm1) 及び retinoblastoma suppressor-associated protein 46 (RbAp46) と呼ばれる Rbbp7 の発現上昇が明らかとなった (Table 1)。

Carm1 は核内ホルモン受容体の転写共役因子と相互作用するとして機能し、ヒストン H3 の 17 番目のアルギニン残基をメチル化する酵素活性を合わせ持つことが示されている。<sup>26,27)</sup> アルギニン残基はモノメチル化とジメチル化の状態が存在し、ジメチル化はさらに2つの状態、シンメトリック及びアシンメトリックの修飾が存在する。Carm1 はアルギニン残基をモノメチル化及びアシンメトリックジメチル化活性を持つ。Carm1 は核内受容体と相互作用するだけでなく、NF-E2-related factor 2 (Nrf2), p53 などの転写共役因子として機能し、<sup>28,29)</sup> さらにヒストンアセチル化酵素 CBP と協調的に働くことも報告されている。<sup>30)</sup> Nrf2 は塩基性ロイシンジッパー (basic leucine zipper, bZIP) 型の転写調節因子であり、小 Maf 群転写因子とヘテロ 2 量体を形成して DNA に結合し、標的遺伝子の転写を活性化する。Nrf2 の標的遺伝子には第二相解毒酵素に属する遺伝子群が含まれる。第二相解毒酵素に属する GST-P も Nrf2 により発現が制御されることが明らかにされており (後述)、現在、Carm1 が細胞がん化及び GST-P 発現に与える影響を解析中である。

RbAp46 はがん抑制遺伝子産物である retinoblastoma protein (Rb) タンパク質と相互作用するとして単離された因子であるが、<sup>31)</sup> その後の解析により、ヒストン脱アセチル化酵素、クロマチンリモ

デリング因子複合体などクロマチン関連因子複合体のサブユニットとして機能することが報告されている。<sup>32,33)</sup> また、RbAp46 の過剰発現は乳がん上皮細胞の軟寒天培地上におけるコロニー形成能を阻害すること、ヌードマウスにおいて腫瘍形成を阻害することが報告されている。<sup>34)</sup> さらに、RbAp46 の過剰発現はアポトーシスを誘導することにより、腫瘍形成阻害に関与することが報告されている。<sup>34)</sup> このような報告と考え合わせると、GST-P 陽性フォーサイにおいて過剰発現している RbAp46 は、発がん防御因子として機能している可能性が考えられる。

**2-5. クロマチン構成因子の GST-P 陽性フォーサイにおける発現** High mobility group box (HMGB) タンパク質は核内に豊富に存在する非ヒストンタンパク質である。マイクロアレイ解析により、HMGB タンパク質の1つ、Hmgb2 の GST-P 陽性フォーサイにおける発現上昇が明らかとなった。HMGB タンパク質は DNA 結合に必要な2つの HMG-box を含み、塩基配列に非特異的に DNA に結合し、様々な生命機能に関与する核タンパク質複合体のクロマチンへの集合に関与する。<sup>35)</sup> Hmgb2 自身には転写共役因子としての活性はないが、クロマチンからの転写伸長反応におけるヒストンアセチル化酵素の作用の増強に寄与することが明らかにされている。<sup>36)</sup> Hmgb2 の過剰発現は胃腸間質における腫瘍、卵巣がんにおいて報告されており、<sup>37,38)</sup> がん化共通の現象である可能性が考えられる。

上記のように、DNA マイクロアレイ解析により、GST-P 陽性フォーサイにおいて発現変化している転写に関与する遺伝子が新たに明らかになった。これらの中で、いくつかの遺伝子のがん化活性若しくはがん抑制に関与する因子であることが明らかにされている。また、GST-P 発現に関与する可能性を含む遺伝子も存在した。クロマチン修飾、エピジェネティクス制御を介した細胞がん化機構解明及び化学物質の肝毒性発現機構解明のためにこれらの因子の機能解析を進行中である。

### 3. 化学発がん過程において発現変化するヒストンアセチル化酵素の解析

一般に遺伝子が活発に転写されている領域のヒストンのアセチル化の割合は高く、逆にヘテロクロマチンなどの遺伝子が不活性化状態におけるヒストンは脱アセチル化されている。ヒストンのアセチル化

/脱アセチル化の状態はヒストンアセチル化酵素 (histone acetyltransferase, HAT) 及び脱アセチル化酵素 (histone deacetylase, HDAC) による可逆反応により制御されている。アレイの結果からも明らかにされたように、肝前がん病変においては多くの遺伝子に発現変化が起きており、遺伝子発現制御の異常が生じていると考えられる。そこで、Solt-Farber 法により前がん病変が誘発された肝臓における HAT の発現について検討した。

**3-1. 化学発がん過程におけるヒストンアセチル化酵素の発現変化** Solt-Farber 法により肝前がん病変を誘導したラット及びコントロールに加えて、DEN のみ投与群、2-AAF のみ与える群、部分肝切除のみを施した群も対照として、それぞれのラットの肝臓核抽出液を調製した。そして、ウエスタンブロット解析により化学発がん過程における HAT の発現変化を解析した (Fig. 2)。HAT はアミノ酸配列の相同性からいくつかのファミリーに分類される。<sup>24)</sup> 最もよく研究されている HAT のファミリーの 1 つである GNAT (GCN5-related N-acetyltransferase) ファミリーに属する GCN5, PCAF の発現に変化は観察されなかった。一方、多くの DNA 結合型転写調節因子の共役因子である p300, CBP の発現は、生理食塩水のみを与えたコントロールに比べて減少していた。この減少は、DEN 投与のみなどの対照群においては観察されなかったことから、肝前がん病変特異的に起きることが考えられた。2-AAF は肝細胞増殖阻害活性を持つが、GST-P 陽性細胞はその増殖阻害活性から逃れて増殖し続ける。2-AAF は cyclin-dependent kinase inhibitor p21 を誘導することにより、細胞周期の進行を阻害し、細胞増殖を抑制する。<sup>39)</sup> p21 の発現は主にごん抑制遺伝子である p53 により制御されており、その p53 の活性化には p300, CBP が必要である。<sup>40-42)</sup> p300, CBP の発現抑制は p53 の活性を減弱させることにつながり、GST-P 陽性細胞の増殖につながる。これらのことは p300, CBP ががん抑制に働くことを支持し、これらの因子の発現減少ががん化の一部に関与していることを意味している。

GNAT ファミリーと同様によく解析されている因子群として MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, and Tip60) アセチル化酵素ファミリーがある。このファミリーに属する因子は遺伝子発現の活性化に関与

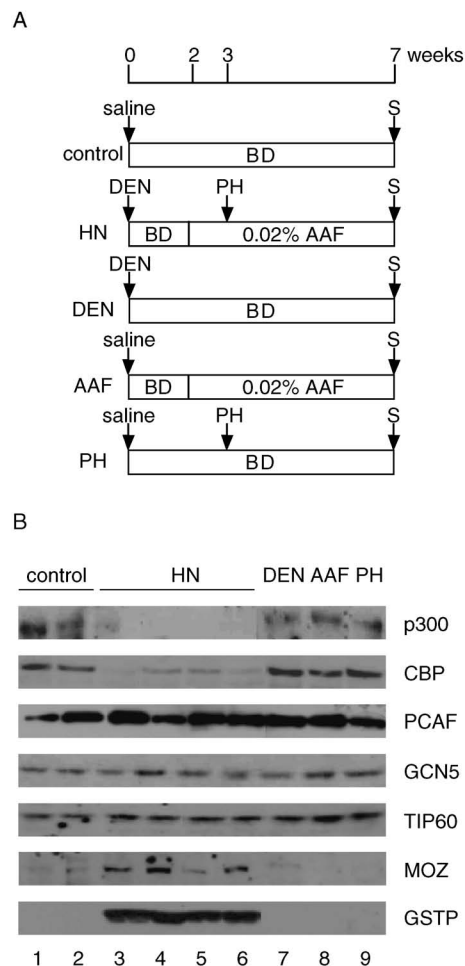


Fig. 2. Expression Profiles of HATs during Hepatocarcinogenesis

(A) The Solt-Farber protocol for chemically induced hepatocarcinogenesis in rats.<sup>14)</sup> HN: hyperplastic nodules, BD: basal diet, DEN: diethylnitrosamine, AAF: 2-aminoacetylfluorene, PH: partial hepatectomy, S: times at which rats were sacrificed. (B) Expression profiles of HATs were investigated in livers with hyperplastic nodules and control.

するだけでなく、遺伝子サイレンシングや DNA 修復や DNA 複製に関与することが明らかにされている。<sup>25)</sup> MYST ファミリーに属する Tip60 は肝前がん病変における発現変化は観察されなかったが、調べた中で唯一 monocytic leukemia zinc finger protein (MOZ) の発現上昇が検出された (Fig. 2)。MOZ に類似の因子 MOZ related factor (MORF) は検出されなかった。

**3-2. ヒストンアセチル化酵素 MOZ の発現上昇** MOZ は急性骨髄性白血病の転座部位から単離された因子で、その融合因子としては p300, CBP, transcriptional intermediary factor (TIF2) が知られている。<sup>43-45)</sup> これらは転写共役因子であり、この融合タンパク質による正常な因子の機能阻害が、細胞が

ん化に関与すると考えられている。<sup>46)</sup>そこで、肝前がん病変においても染色体転座が誘導されているか否かについて検討するために、MOZのN末端及びC末端領域を認識する抗体を作成し、肝前がん病変におけるMOZの発現誘導について検討した (Fig. 3)。その結果、どちらの抗体を用いたときも同じ分子量の因子が誘導されていることが示された。さらに、MYST領域を認識する抗体を用いたときも同様の結果が得られたことから、肝前がん病変においては完全なMOZが誘導されていることが明らかとなった。

**3-3. MOZのGST-P発現に与える影響** 急性骨髄性白血病の転座部位から同定されたMOZはその融合タンパク質の機能解析がなされている。<sup>46)</sup>最近、MOZノックアウトマウスを用いた解析から、MOZは血球系幹細胞の維持に必要であり、赤血球分化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。<sup>47,48)</sup>しかし、MOZの肝前がん病変における役割は不明である。われわれは肝前がん病変特異的遺伝子発現にMOZが与える影響を解析する目的で、腫瘍マーカーGST-P発現に対するMOZの効果を検討した。ラット肝がん由来細胞株H4IIEに一過的にMOZを過剰発現させると、その発現量依存的にGST-Pの発現が上昇した (Fig. 4)。しかし、G3PDHの発現量に変化は生じなかった。このことはMOZが肝前がん病変特異的GST-P発現に関与している可能性を示唆している。

**3-4. MOZによるGST-Pの発現上昇機構の解明** MOZによるGST-P発現上昇の分子機構を明らかにする目的で、GST-P発現制御領域をレポーター遺伝子につないだプラスミドとMOZ発現プラスミドをH4IIE細胞に導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。これまでの解析により、GST-Pの肝前がん病変特異的発現には転写開始点から上流約2.5 kbの領域が必要であることが明らかにされている。<sup>49-51)</sup>まず、その領域を含む-2.5GST-luciferaseを用いて、MOZのGST-Pプロモーター活性に対する影響を検討した。その結果、MOZは-2.5GST-luciferaseの活性を約3倍上昇させることが示された (Fig. 5)。そして、その活性化はMOZの添加量依存的であることが明らかとなった (結果省略)。これまでのGST-P遺伝子の発現制御領域の解析により、この領域にはGST-P enhancer, GPE

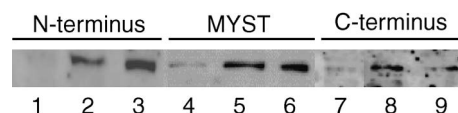


Fig. 3. Induction of the Intact Form of MOZ during Hepatocarcinogenesis

Nuclear extracts were prepared from control (lanes 1, 4, and 7) and livers with hyperplastic nodules (lanes 2, 3, 5, 6, 8, and 9), separated by SDS-PAGE, and immunoblotted using polyclonal antibodies against the amino- (lanes 1-3) or carboxy- (lanes 7-9) terminal region of MOZ or the anti-MYST antibody (lanes 4-6).

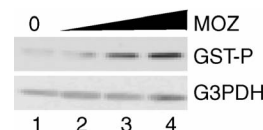


Fig. 4. MOZ Induces Endogenous GST-P Expression

H4IIE cells were transfected with MOZ expression plasmid, and cell lysates were prepared. Endogenous GST-P and G3PDH were detected by immunoblotting.

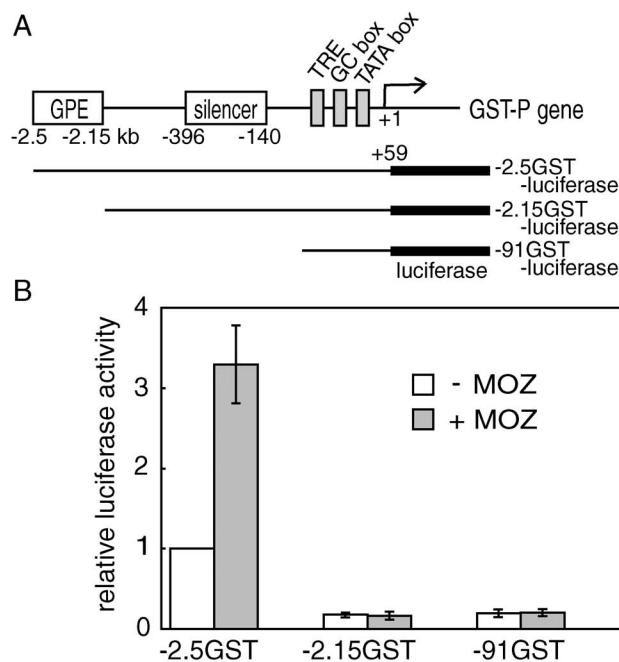


Fig. 5. MOZ Activates the GST-P Promoter Activity through the GPE Enhancer

(A) Diagram of the 5'-flanking region of the rat GST-P gene and the reporter constructs for observing the effect of MOZ on the promoter activity of the GST-P gene. (B) The reporter plasmid was cotransfected with (gray columns) or without (white columns) MOZ expression plasmid into H4IIE rat hepatoma cells. Relative luciferase activity was calculated from mean values relative to the activity of -2.5GST-luciferase in the absence of MOZ.

(-2.5 kb から -2.15 kb) 及びサイレンサー (-396 bp から -140 bp) が存在することが明らかにされている。<sup>49)</sup>そこで、エンハンサーを欠いたプラスミ

ド (-2.15 GST-luciferase), 若しくは, エンハンサー及びサイレンサーを欠いたプラスミド (-91 GST-luciferase) を MOZ 発現プラスミドとともに H4IIE 細胞に導入した (Fig. 5). その結果, MOZ はこれらのレポータープラスミドの活性を上昇させなかったことから, MOZ は GPE を介して GST-P プロモーター活性を上昇させていると考えられた.

この GPE はプロモーター活性化に重要な GPEI を含む. そして, GST-P 発現制御領域を用いたトランスジェニックラットの解析から, この GPEI が GST-P の肝前がん病変特異的発現に重要であることが示されている.<sup>50,51)</sup> この領域の配列は antioxidant response like element (ARE), Maf recognition element (MARE) 及び TPA response element (TRE) に類似している. 最近の研究により, この領域には nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/MafK ヘテロ 2 量体が作用することが示されている.<sup>52)</sup> そこで, MOZ がこれらの因子と相互作用するか否かについて, [<sup>35</sup>S] メチオニンで標識した MOZ を用いた pull down 法により解析した. われわれはこれまでに, MOZ が転写因子 c-JUN の DNA 結合領域である basic region leucine zipper (bZIP) と相互作用することを示している.<sup>53)</sup> Nrf2, MafK とともに bZIP 領域を含む転写調節因子であるが, MOZ は Nrf2 の bZIP 領域とは結合しなかったが (結果省略), [<sup>35</sup>S] 標識 MOZ は GST 融合 MafK タンパク質と相互作用することが示された (Fig. 6(A)). 次に細胞内における MOZ と MafK 相互作用を免疫沈降法により検討した. MOZ 発現プラスミドを HA タグが付加された MafK 発現プラスミド若しくはタグが付加されていない MafK 発現プラスミドとともに HeLa 細胞に導入し, 核抽出液を調製した. 抗 HA 抗体を用いた免疫沈降を行い, 沈降物を電気泳動により分離後, 抗 MOZ 抗体によるウエスタンブロット解析を行った. その結果, HA タグが付加された MafK を発現させたときのみ, 沈降物に MOZ が検出された (Fig. 6(B)). これらの結果から, MOZ は MafK を介して, Nrf2/MafK ヘテロ 2 量体と相互作用可能であることが示された.

MOZ が GST-P のプロモーター活性を上昇させること, 及び MafK と相互作用可能であることを考え合わせると, MOZ が Nrf2/MafK ヘテロ 2 量

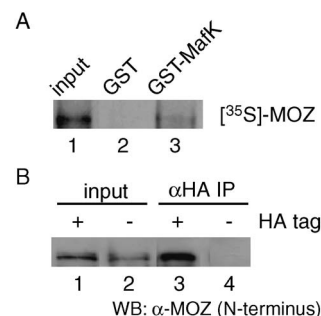


Fig. 6. MOZ Interacts with MafK *in vitro* and *in vivo*

(A) [<sup>35</sup>S]-MOZ protein was incubated with GST (lane 2) or GST-MafK (lane 3). MOZ protein retained on the GST-conjugated beads was detected by autoradiography. The amount of input (lane 1) is equivalent 10% of the reaction volume in the assay. (B) MOZ expression plasmid was cotransfected with HA-tagged MafK (lanes 1 and 3) or nontagged MafK (lanes 2 and 4) into HeLa cells, and nuclear extracts were prepared. Immunoprecipitation (IP) experiments were performed with anti-HA antibody. Immunoprecipitates (lanes 3 and 4) and 5% of input (lanes 1 and 2) were detected by Western blotting using anti-N terminal MOZ antibody.

体のコアクチベーターとして機能する可能性が考えられる. このことを検証するために, Nrf2/MafK ヘテロ 2 量体を介したプロモーター活性化に対する MOZ の影響を検討した. 前述のように GPEI には TRE 様配列が含まれている. GPEI には AP-1 が作用するので, AP-1 活性を欠いた F9 細胞を以下の検討に用いた. これまでの解析により, F9 細胞には MafK が発現しており, Nrf2 のみの導入により, GPEI を介したプロモーター活性化が検出可能であることが示されている.<sup>52)</sup> そこで, GST-P 遺伝子のプロモーターに GPEI をつないだレポータープラスミドを MOZ 若しくは Nrf2 発現プラスミドとともに F9 細胞に導入した. その結果, それぞれを単独にレポータープラスミドとともに導入したときよりも, 両方の発現プラスミドを導入したときの方が高い活性を示し, 相乗効果が示された (Fig. 7). この相乗効果は導入した MOZ 発現プラスミド量に依存した. 上記の解析結果より, MOZ は Nrf2/MafK ヘテロ 2 量体のコアクチベーターとして機能することが明らかとなった. このように, 肝前がん病変において発現上昇した MOZ は腫瘍マーカーの発現に関与することが示された. MOZ は融合タンパク質の発現よりがん化に関与すると考えられていたが, 過剰発現により細胞がん化に関与する可能性も考えられる. 現在, MOZ 過剰発現の遺伝子発現制御に与える影響の詳細な機構を解析するとともに, 細胞がん化に対する影響を検討中である.



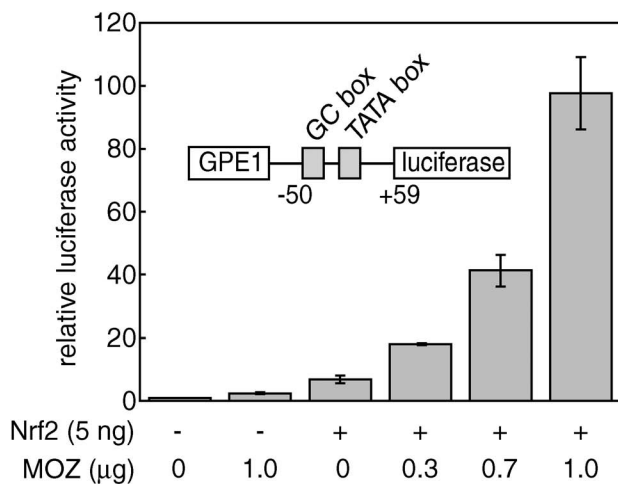


Fig. 7. MOZ is a Coactivator of Nrf2

Nrf2-mediated transactivation by MOZ was examined in mouse embryonic carcinoma F9 cells. The reporter plasmid (GPE1-luciferase, in the panel) was cotransfected with MOZ expression plasmid in the absence (-) or presence (+) of Nrf2 expression plasmid.

#### 4. おわりに

本総説において、これまでに解析してきた前がん病変において発現変化するエピジェネティクス制御因子を概説した。最近、ヒストン H4 の 16 番目のリシン残基のアセチル化、及び 20 番目のリシン残基のトリメチル化の減少がヒトのがん組織において発見された。<sup>54,55)</sup> このことは DNA メチル化以外に、ヒストン修飾の変化もがん組織でグローバルに起きていることを意味している。今後もこのような変化が明らかにされていくであろうが、その原動力となる因子の同定が必要になるとともに、その因子自身に細胞がん化活性があるかについての解析が重要とされる。これまでのがん研究は DNA に変異を加えるジェネティクス異常が中心であった。ジェネティクス異常とエピジェネティクス異常は独立して細胞をがん化に導いているのではなく、互いに影響を与えていることが予想される。例えば、ゲノム全体の低メチル化はゲノムの不安定化をもたらす。また逆に、ヒストンアセチル化酵素をコードする遺伝子の転座などのジェネティクス変異により、異常な融合タンパク質が生じ、誤ったヒストン修飾が起き、エピジェネティクス異常が誘発されると考えられる。このように、今後はジェネティクス異常、エピジェネティクス異常の両面から解析する必要がある。また、エピジェネティクス制御因

子は互いに影響を及ぼしあって機能することが明らかにされている。現在、前がん病変において発現変化するエピジェネティクス制御因子の相互作用を介した細胞がん化機構を検討中である。最近、発がん性/毒性を示す重金属であるニッケル化合物が、ヒストンのアセチル化レベルを減少させるだけでなく、ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基のジメチル化及びヒストン H2A, H2B のユビキチン化を増加させることが明らかにされた。<sup>56,57)</sup> このように重金属を含む化合物の毒性発現がエピジェネティクス変化を介している可能性を示唆する報告がなされている。われわれは解析中の因子の機能解明を創薬の基盤研究とするとともに、化学物質によるエピジェネティクス変化を化学物質の毒性/発がん性予測評価に結び付けることをめざして解析を続けている。

**謝辞** 本総説のわれわれの成果は大阪大学大学院薬学研究科微生物動態学分野及び名古屋市立大学大学院薬学研究科分子生物薬学分野で行われた研究であり、西川淳一助教授、西原 力教授、今川正良教授に深く感謝申し上げます。また、研究を熱心に遂行した多くの学生諸氏、共同研究者の皆様から感謝申し上げます。本研究の一部は日本化学工業協会長期自主計画 (LRI)、笹川科学研究科学助成、三共生命科学研究振興財団の助成金並びに厚生労働省、文部科学省、日本学術振興会の科学研究費補助金により行われたものであり、ここに感謝申し上げます。

#### REFERENCES

- 1) Lund A. H., van Lohuizen M., *Genes Dev.*, **18**, 2315-2335 (2004).
- 2) Hake S. B., Xiao A., Allis C. D., *Br. J. Cancer*, **90**, 761-769 (2004).
- 3) Osada S., Sutton A., Muster N., Brown C. E., Yates 3rd J. R., Sternglanz R., Workman J. L., *Genes Dev.*, **15**, 3155-3168 (2001).
- 4) Strahl B. D., Allis C. D., *Nature*, **403**, 41-45 (2000).
- 5) Jenuwein T., Allis C. D., *Science*, **293**, 1074-1080 (2001).
- 6) Ushijima T., Okochi-Takada E., *Cancer Sci.*, **96**, 206-211 (2005).
- 7) Miyamoto K., Ushijima T., *Jpn. J. Clin. On-*

- col.*, **35**, 293–301 (2005).
- 8) Suzuki T., Miyata N., *Curr. Med. Chem.*, **13**, 935–958 (2006).
  - 9) Osada S., Naganawa A., Misonou M., Tsuchiya S., Tamba S., Okuno Y., Nishikawa J., Satoh K., Imagawa M., Tsujimoto G., Sugimoto Y., Nishihara T., *Toxicol. Lett.*, **167**, 106–113 (2006).
  - 10) Ohta K., Ohigashi M., Naganawa A., Ikeda H., Sakai M., Nishikawa J., Imagawa M., Osada S., Nishihara T., *Biochem. J.*, (in press).
  - 11) Sato K., *Adv. Cancer Res.*, **52**, 205–255 (1989).
  - 12) Satoh K., Kitahara A., Soma Y., Inaba Y., Hatayama I., Sato K., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 3964–3968 (1985).
  - 13) Satoh K., Takahashi G., Miura T., Hayakari M., Hatayama I., *Int. J. Cancer*, **115**, 711–716 (2005).
  - 14) Solt D., Farber E., *Nature*, **263**, 701–703 (1976).
  - 15) Suzuki S., Asamoto M., Tsujimura K., Shirai T., *Carcinogenesis*, **25**, 439–443 (2004).
  - 16) Ashburner M., Ball C. A., Blake J. A., Botstein D., Butler H., Cherry J. M., Davis A. P., Dolinski K., Dwight S. S., Eppig J. T., Harris M. A., Hill D. P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J. C., Richardson J. E., Ringwald M., Rubin G. M., Sherlock G., *Nat. Genet.*, **25**, 25–29 (2000).
  - 17) Johnstone R. W., See R. H., Sells S. F., Wang J., Muthukkumar S., Englert C., Haber D. A., Licht J. D., Sugrue S. P., Roberts T., Rangnekar V. M., Shi Y., *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6945–6956 (1996).
  - 18) Loeb D. M., Sukumar S., *Int. J. Hematol.*, **76**, 117–126 (2002).
  - 19) Sugiyama H., *Int. J. Hematol.*, **73**, 177–187 (2001).
  - 20) Mayo M. W., Wang C. Y., Drouin S. S., Madrid L. V., Marshall A. F., Reed J. C., Weissman B. E., Baldwin A. S., *EMBO J.*, **18**, 3990–4003 (1999).
  - 21) Loeb D. M., *Cell Cycle*, **5**, 1249–1253 (2006).
  - 22) Cheema S. K., Mishra S. K., Rangnekar V. M., Tari A. M., Kumar R., Lopez-Berestein G., *J. Biol. Chem.*, **278**, 19995–20005 (2003).
  - 23) Brown S. B., Maloney M., Kinlaw W. B., *J. Biol. Chem.*, **272**, 2163–2166 (1997).
  - 24) Sterner D. E., Berger S. L., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 435–459 (2000).
  - 25) Carrozza M. J., Utley R. T., Workman J. L., Cote J., *Trends Genet.*, **19**, 321–329 (2003).
  - 26) Chen D., Ma H., Hong H., Koh S. S., Huang S. M., Schurter B. T., Aswad D. W., Stallcup M. R., *Science*, **284**, 2174–2177 (1999).
  - 27) Bauer U. M., Daujat S., Nielsen S. J., Nightingale K., Kouzarides T., *EMBO Rep.*, **3**, 39–44 (2002).
  - 28) An W., Kim J., Roeder R. G., *Cell*, **117**, 735–748 (2004).
  - 29) Lin W., Shen G., Yuan X., Jain M. R., Yu S., Zhang A., Chen J. D., Kong A. N., *J. Biochem. Mol. Biol.*, **39**, 304–310 (2006).
  - 30) Chen D., Huang S. M., Stallcup M. R., *J. Biol. Chem.*, **275**, 40810–40816 (2000).
  - 31) Huang S., Lee W. H., Lee E. Y., *Nature*, **350**, 160–162 (1991).
  - 32) Zhang Y., Sun Z. W., Iratni R., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Hampsey M., Reinberg D., *Mol. Cell*, **1**, 1021–1031 (1998).
  - 33) Zhang Y., Ng H. H., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Bird A., Reinberg D., *Genes Dev.*, **13**, 1924–1935 (1999).
  - 34) Li G. C., Guan L. S., Wang Z. Y., *Int. J. Cancer*, **105**, 762–768 (2003).
  - 35) Thomas J. O., *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 395–401 (2001).
  - 36) Guermah M., Palhan V. B., Tackett A. J., Chait B. T., Roeder R. G., *Cell*, **125**, 275–286 (2006).
  - 37) Koon N., Schneider-Stock R., Sarlomo-Rikala M., Lasota J., Smolkin M., Petroni G., Zaika A., Boltze C., Meyer F., Andersson L., Knuutila S., Miettinen M., El-Rifai W., *Gut*, **53**, 235–240 (2004).
  - 38) Ouellet V., Page C. L., Guyot M. C., Lussier C., Tonin P. N., Provencher D. M., Mes-Masson A. M., *Int. J. Cancer*, **119**, 2119–2126 (2006).
  - 39) Trautwein C., Will M., Kubicka S., Rakemann T., Flemming P., Manns M. P., *Oncogene*, **18**, 6443–6453 (1999).
  - 40) Gu W., Roeder R. G., *Cell*, **90**, 595–606 (1997).
  - 41) Gu W., Shi X. L., Roeder R. G., *Nature*, **387**, 819–823 (1997).

- 42) Liu L., Scolnick D. M., Trievel R. C., Zhang H. B., Marmorstein R., Halazonetis T. D., Berger S. L., *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1202–1209 (1999).
- 43) Borrow J., Stanton Jr. V. P., Andresen J. M., Becher R., Behm F. G., Chaganti R. S., Civin C. I., Distech C., Dube I., Frischauf A. M., Horsman D., Mitelman F., Volinia S., Watsmore A. E., Housman D. E., *Nat. Genet.*, **14**, 33–41 (1996).
- 44) Chaffanet M., Gressin L., Preudhomme C., Soenen-Cornu V., Birnbaum D., Pebusque M. J., *Genes Chromosomes Cancer*, **28**, 138–144 (2000).
- 45) Deguchi K., Ayton P. M., Carapeti M., Kutok J. L., Snyder C. S., Williams I. R., Cross N. C., Glass C. K., Cleary M. L., Gilliland D. G., *Cancer Cells*, **3**, 259–271 (2003).
- 46) Kitabayashi I., Aikawa Y., Nguyen L. A., Yokoyama A., Ohki M., *EMBO J.*, **20**, 7184–7196 (2001).
- 47) Thomas T., Corcoran L. M., Gugasyan R., Dixon M. P., Brodnicki T., Nutt S. L., Metcalf D., Voss A. K., *Genes Dev.*, **20**, 1175–1186 (2006).
- 48) Katsumoto T., Aikawa Y., Iwama A., Ueda S., Ichikawa H., Ochiya T., Kitabayashi I., *Genes Dev.*, **20**, 1321–1330 (2006).
- 49) Sakai M., Okuda A., Muramatsu M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **85**, 9456–9460 (1988).
- 50) Morimura S., Suzuki T., Hochi S., Yuki A., Nomura K., Kitagawa T., Nagatsu I., Imagawa M., Muramatsu M., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 2065–2068 (1993).
- 51) Suzuki T., Imagawa M., Hirabayashi M., Yuki A., Hisatake K., Nomura K., Kitagawa T., Muramatsu M., *Cancer Res.*, **55**, 2651–2655 (1995).
- 52) Ikeda H., Nishi S., Sakai M., *Biochem. J.*, **380**, 515–521 (2004).
- 53) Ohta K., Osada S., Nishikawa J., Nishihara T., *J. Health Sci.*, **51**, 253–256 (2005).
- 54) Fraga M. F., Ballestar E., Villar-Garea A., Boix-Chornet M., Espada J., Schotta G., Bonaldi T., Haydon C., Roper S., Petrie K., Iyer N. G., Perez-Rosado A., Calvo E., Lopez J. A., Cano A., Calasanz M. J., Colomer D., Piris M. A., Ahn N., Imhof A., Caldas C., Jenuwein T., Esteller M., *Nat. Genet.*, **37**, 391–400 (2005).
- 55) Fraga M. F., Esteller M., *Cell Cycle*, **4**, 1377–1381 (2005).
- 56) Chen H., Ke Q., Kluz T., Yan Y., Costa M., *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 3728–3737 (2006).
- 57) Ke Q., Davidson T., Chen H., Kluz T., Costa M., *Carcinogenesis*, **27**, 1481–1488 (2006).