

令和元年6月18日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08987

研究課題名(和文) 肝癌治療抵抗性を規定する幹細胞特性のエピゲノム制御解析

研究課題名(英文) Epigenomic analysis of stem cell characteristics defining therapeutic resistance of liver cancer

研究代表者

永江 玄太 (NAGAE, GENTA)

東京大学・先端科学技術研究センター・講師

研究者番号：10587348

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：FACSにより濃縮した肝細胞癌幹細胞様分画の遺伝子解析を行い、幹細胞様分画の特徴的な遺伝子発現プロファイルを明らかにした。すでに他癌種の癌幹細胞に高発現している特徴的な表面マーカー遺伝子は必ずしも発現しておらず、本細胞株での幹細胞様分画に特徴的な表面マーカーが存在することも明らかとなった。シングルセル解析では、個々の細胞の発現レベルにはかなり不均一性が存在することが明らかになり、細胞周期による発現変動が最も大きなファクターであった。少量細胞によるエピゲノム修飾解析ではプロモーターおよびエンハンサーマーカーの解析により、細胞周期関連遺伝子で転写制御の違いが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌組織の不均一性の要因の一つである幹細胞特性の分子生物学的特徴を明らかにした。遺伝子発現レベルに加えて発現制御に関するエピゲノムプロファイルを取得した。ゲノム変異と異なり、エピゲノム制御異常は可逆的な治療介入が理論的に可能であり、新たな治療戦略につながる基盤的情報となることが期待される。また、本研究で候補にあがった新規の細胞表面マーカーは、治療中の癌細胞集団を流血細胞中から間接的にモニターできる可能性を潜在的に有しており、分子生物学的層別化に基づく個別化医療戦略に、あらたな情報を与えることができると思われる。

研究成果の概要(英文)：I enriched the stem cell-like fraction in liver cancer by FACS sorting and clarified the character of their transcriptome profiles. The typical surface marker genes that are already known in cancer stem cells of other cancer types were not necessarily expressed but the novel markers for this fraction were newly identified. Single-Cell analysis revealed remarkable molecular heterogeneity in this population with the cell cycle variability as being the largest factor. Epigenome analysis including promoter/enhancer marks uncovered the differential statuses of promoter/enhancer marks in cell cycle related genes.

研究分野：消化器内科学、癌ゲノム医学

キーワード：肝細胞癌 幹細胞性 シングルセル解析 エピゲノム解析

## 1. 研究開始当初の背景

肝癌細胞は、その発癌過程においてゲノム変異・ゲノム構造変異・エピゲノム変異などさまざまな遺伝子異常を伴いながら進展する。次世代シーケンサーの高速化は、肝癌症例の分子生物学的層別化を可能にし、シグナル異常に基づいた個別化医療戦略へ展開する重要な基盤情報を提供する。その一方で、既存の治療法を選択するのみでは、進行した肝癌組織の治療抵抗性を克服するのは困難である。血管浸潤や遠隔転移を伴う進行症例では、5FU やプラチナ製剤などの細胞傷害性抗癌剤の効果は十分でなく、増殖シグナルを標的にした分子標的治療薬でも奏功例は少ない。肝動脈塞栓治療もしばしば行われるが腫瘍抑制効果はしだいに減弱する。このような肝癌にみられる治療抵抗性の背景には、細胞周期が休眠期にある薬剤耐性細胞の残存や、血流低下に適応する低酸素耐性獲得などの細胞形質変化など、いわゆる「幹細胞特性」が関与していると考えられている。腫瘍が内在的に有する幹細胞形質がどのような機序により制御されているかは今後の重要な課題と考えられる。

そこで、本研究課題では、幹細胞特性を有する肝癌細胞株を用いて、さまざまな細胞環境における動的な形質変化を分子生物学的に評価することで、肝癌の幹細胞特性を規定する制御メカニズムを解明できないかと考え、本研究課題の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肝癌の治療抵抗性に関与する幹細胞特性をエピゲノム制御の観点より明らかにすることである。肝癌組織内に見られる細胞の不均一性は、腫瘍細胞の周辺の外的環境のみならず腫瘍のもつ内在的幹細胞性にも起因すると考えられる。さらに臨床的には、このような幹細胞性が組織全体としての治療抵抗性に深く関与している。幹細胞特性の観点から考えると、細胞の分子進化を伴う適応には、ゲノム変異よりむしろエピゲノム制御異常が重要な意味をもつと考えられる。そこで、以下の2項目を明らかにすることを目的とする。

(1) 肝癌幹細胞様分画の細胞特性を分子生物学的に定義し、その動的な細胞挙動を明らかにする。

(2) 肝癌幹細胞様分画のエピゲノムプロファイルを明らかにすることで、その遺伝子発現様式を規定しているエピゲノム制御因子を探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 肝癌細胞株幹細胞様分画の細胞特性解析および遺伝子発現解析

幹細胞特性を有する肝癌細胞株を FACS にて濃縮し、可塑的な細胞形質のダイナミクスを定量的に評価する。具体的には、ゼノグラフトモデルによる腫瘍原性、抗がん剤に対する薬剤耐性、低酸素耐性、スフェロイド形成能および細胞周期解析を行う。

上記の方法で評価した肝癌細胞株幹細胞様分画について他癌腫（白血病、脳腫瘍、大腸癌、乳癌など）の癌幹細胞に特徴的な表面マーカー遺伝子の発現状況も評価する。成熟肝細胞の分化形質に近い細胞分画と比較することにより、幹細胞特性と関連する遺伝子群および、これらの分画を分けるのに有効なサロゲートマーカーの探索も行う。

### (2) 肝癌細胞株幹細胞様分画の遺伝子発現解析（シングルセル解析）

幹細胞特性が確認できた肝細胞株について、幹細胞様分画と非幹細胞様分画におけるシングルセル遺伝子発現解析を行う。シングルセルの単離・捕捉はフリーダグタイム C1 システムを用いて行い、マイクロ流路中で mRNA から cDNA 合成を行い、その後に回収した cDNA は 96 細胞ごとに異なるバーコード配列を内蔵したアダプターを付加して PCR 増幅を行い、大量並列型シーケンサーによる RNA-seq 解析を行う。

### (3) 肝癌細胞株幹細胞様分画のエピゲノム修飾解析

エピゲノム修飾解析の対象としては、転写開始点近傍のプロモーター領域だけでなく、遠位に存在するエンハンサー領域も遺伝子発現の活性化に重要とされている。そこで、活性化プロモーターの指標となる H3K4 トリメチル化、活性化エンハンサーの指標となる H3K27 アセチル化および H3K4 モノメチル化、抑制状態にある領域の指標である H3K27 トリメチル化の修飾情報をゲノムワイドに検出する。プロモーターの活性化情報は、遺伝子発現状態と比較参照する。また、活性化エンハンサー領域は、転写因子などの DNA 結合タンパクの認識配列（モチーフ）を多く含むことが知られているため、活性化エンハンサー領域の配列情報を用いて、幹細胞特性に関連する重要な転写因子探索もあわせて行う。

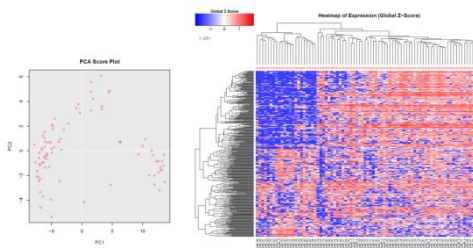
## 4. 研究成果

### (1) 肝癌細胞株幹細胞様分画の細胞特性解析および遺伝子発現解析

FACS により濃縮した幹細胞様分画の遺伝子解析を行った。幹細胞様分画には上皮細胞分化の関連因子、接着因子が多数含まれるのに対して、非幹細胞様分画にはさまざまな転写因子や発生分化に関わる経路の遺伝子群、サイトカインやクロマチン修飾因子が含まれていた。すでに他癌種の癌幹細胞に高発現している特徴的な表面マーカー遺伝子は必ずしも発現しておらず、本細胞株での幹細胞様分画に特徴的な表面マーカーが存在することも明らかとなった。

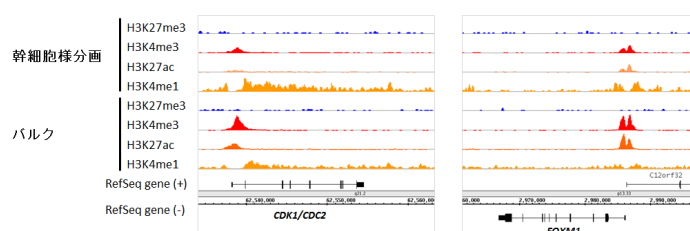
## (2) 肝癌細胞株幹細胞様分画の遺伝子発現解析 (シングルセル解析)

上記の幹細胞様分画は依然多様な形質をもつ細胞集団の集合体であることが予想されたため、シングルセルの単離・捕捉を目的としてフリーダム C1 システムによる一細胞解析を行った。マイクロ流路中で細胞溶解、cDNA 合成を行い、1 細胞ごとに異なるバーコード配列を内蔵したアダプターを付加して PCR を行い、大量並列型シーケンサーによる RNA-seq 解析を行うことで、96 細胞の遺伝子発現プロファイルを得ることができた。幹細胞様分画で発現が上昇・低下する遺伝子群の発現変動は 1 細胞レベルでも再現されたが、個々の細胞の発現レベルにはかなり不均一性が存在することが明らかになった。1 細胞あたりに同定できる発現遺伝子数は 5000 個程度であり、細胞形質によりサブグループを決定するには十分と考えられた。細胞周期による発現変動が最も大きなファクターであったが、それ以外にもさまざまなパスウェイに関する因子に発現の不均一性が見られた。



## (3) 肝癌細胞株幹細胞様分画のエピゲノム修飾解析

一細胞レベルでの発現の多様性は確認できたが、こうした発現制御を決めるエピゲノム修飾のプロファイルを得るには、まだ技術的な課題が多く存在する。そこで、少量細胞を用いてエピゲノム解析を進めた。1000 細胞のサンプルを用いて少量細胞でのヒストン修飾のプロファイルを行った。プロモーターおよびエンハンサーマークの解析により、細胞周期関連遺伝子で転写制御の違いが確認できた。



## 5. 主な発表論文等

1. Murakami N, Okuno Y, Yoshida K, Shiraishi Y, Nagae G, Suzuki K, Narita A, Sakaguchi H, Kawashima N, Wang X, Xu Y, Chiba K, Tanaka H, Hama A, Sanada M, Ito M, Hirayama M, Watanabe A, Ueno T, Kojima S, Aburatani H, Mano H, Miyano S, Ogawa S, Takahashi Y, Muramatsu H. Integrated molecular profiling of juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 2018 Feb 2. pii: blood-2017-07-798157. doi: 10.1182/blood-2017-07-798157. [Epub ahead of print]
2. Uchida K, Tanaka Y, Ichikawa H, Watanabe M, Mitani S, Morita K, Fujii H, Ishikawa M, Yoshino G, Okinaga H, Nagae G, Aburatani H, Ikeda Y, Susa T, Tamamori-Adachi M, Fukusato T, Uozaki H, Okazaki T, Iizuka M. An Excess of CYP24A1, Lack of CaSR, and a Novel lncRNA Near the PTH Gene Characterize an Ectopic PTH-Producing Tumor. *J Endocr Soc*. 2017 May 3;1(6):691-711. doi: 10.1210/js.2017-00063. eCollection 2017 Jun 1.
3. Watanabe A, Marumo T, Kawarazaki W, Nishimoto M, Ayuzawa N, Ueda K, Hirohama D, Tanaka T, Yagi S, Ota S, Nagae G, Aburatani H, Kumagai H, Fujita T. Aberrant DNA methylation of pregnane X receptor underlies metabolic gene alterations in the diabetic kidney. *Am J Physiol - Renal Physiol*. 2017 Dec 6. doi: 10.1152/ajprenal.00390.2017. [Epub ahead of print]
4. Nomura M, Mukasa A, Nagae G, Yamamoto S, Tatsuno K, Ueda H, Fukuda S, Umeda T, Suzuki T, Otani R, Kobayashi K, Maruyama T, Tanaka S, Takayanagi S, Nejo T, Takahashi S, Ichimura K, Nakamura T, Muragaki Y, Narita Y, Nagane M, Ueki K, Nishikawa R, Shibahara J, Aburatani H, Saito N. Distinct molecular profile of diffuse cerebellar gliomas. *Acta Neuropathol*. 134(6):941-956, 2017
5. Matsushita T, Moriyama Y, Nagae G, Aburatani H, Okamoto A. DNA-friendly Cu(ii)/TEMPO-catalyzed 5-hydroxymethylcytosine-specific oxidation. *Chem Commun (Camb)*. 53(42):5756-5759, 2017
6. Aihara K, Mukasa A, Nagae G, Nomura M, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Shibahara J, Takahashi M, Momose T, Tanaka S, Takayanagi S, Yanagisawa S, Nejo T, Takahashi S, Omata M, Otani R, Saito K, Narita Y, Nagane M, Nishikawa R, Ueki K, Aburatani H, Saito N. Genetic and epigenetic stability of oligodendrogliomas at recurrence. *Acta Neuropathol Commun*. 5(1):18, 2017
7. Hayashi G, Koyama K, Shiota H, Kamio A, Umeda T, Nagae G, Aburatani H, Okamoto A. Base-Resolution Analysis of 5-Hydroxymethylcytosine by One-Pot Bisulfite-Free Chemical Conversion with Peroxotungstate. *J Am Chem Soc*. 138(43):14178-14181, 2016.
8. Fujimoto A, Furuta M, Totoki Y, Tsunoda T, Kato M, Shiraishi Y, Tanaka H, Taniguchi H, Kawakami Y, Ueno M, Gotoh K, Ariizumi S, Wardell CP, Hayami S, Nakamura T,

- Aikata H, Arihiro K, Boroevich KA, Abe T, Nakano K, Maejima K, Sasaki-Oku A, Ohsawa A, Shibuya T, Nakamura H, Hama N, Hosoda F, Arai Y, Ohashi S, Urushidate T, Nagae G, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Ojima H, Hiraoka N, Okusaka T, Kubo M, Marubashi S, Yamada T, Hirano S, Yamamoto M, Ohdan H, Shimada K, Ishikawa O, Yamaue H, Chayama K, Miyano S, Aburatani H, Shibata T, Nakagawa H. Whole-genome mutational landscape and characterization of noncoding and structural mutations in liver cancer. *Nat Genet.* 48(5):500-9, 2016.
9. Saito Y, Nagae G, Motoi N, Miyauchi E, Ninomiya H, Uehara H, Mun M, Okumura S, Ohyanagi F, Nishio M, Satoh Y, Aburatani H, Ishikawa Y. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype in surgically resected small cell lung carcinoma. *Cancer Sci.* 107(3):320-5, 2016.
  10. Uchi R, Takahashi Y, Niida A, Shimamura T, Hirata H, Sugimachi K, Sawada G, Iwaya T, Kurashige J, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Chiba K, Shiraishi Y, Nagae G, Yoshida K, Nagata Y, Haeno H, Yamamoto H, Ishii H, Doki Y, Iinuma H, Sasaki S, Nagayama S, Yamada K, Yachida S, Kato M, Shibata T, Oki E, Saeki H, Shirabe K, Oda Y, Maehara Y, Komune S, Mori M, Suzuki Y, Yamamoto K, Aburatani H, Ogawa S, Miyano S, Mimori K. Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution. *PLoS Genet.* 12(2):e1005778, 2016.
  11. Kataoka K, Nagata Y, Kitanaka A, Shiraishi Y, Shimamura T, Yasunaga J, Totoki Y, Chiba K, Sato-Otsubo A, Nagae G, Ishii R, Muto S, Kotani S, Watatani Y, Takeda J, Sanada M, Tanaka H, Suzuki H, Sato Y, Shiozawa Y, Yoshizato T, Yoshida K, Makishima H, Iwanaga M, Ma G, Nosaka K, Hishizawa M, Itonaga H, Imaizumi Y, Munakata W, Ogasawara H, Sato T, Sasai K, Muramoto K, Penova M, Kawaguchi T, Nakamura H, Hama N, Shide K, Kubuki Y, Hidaka T, Kameda T, Nakamaki T, Ishiyama K, Miyawaki S, Yoon SS, Tobinai K, Miyazaki Y, Takaori-Kondo A, Matsuda F, Takeuchi K, Nureki O, Aburatani H, Watanabe T, Shibata T, Matsuoka M, Miyano S, Shimoda K, Ogawa S. Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet.* 47(11):1304-15, 2015.
  12. Seki M, Nishimura R, Yoshida K, Shimamura T, Shiraishi Y, Sato Y, Kato M, Chiba K, Tanaka H, Hoshino N, Nagae G, Shiozawa Y, Okuno Y, Hosoi H, Tanaka Y, Okita H, Miyachi M, Souzaki R, Taguchi T, Koh K, Hanada R, Kato K, Nomura Y, Akiyama M, Oka A, Igarashi T, Miyano S, Aburatani H, Hayashi Y, Ogawa S, Takita J. Integrated genetic and epigenetic analysis defines novel molecular subgroups in rhabdomyosarcoma. *Nat Commun.* 3;6:7557, 2015
  13. Truong TP, Sakata-Yanagimoto M, Yamada M, Nagae G, Enami T, Nakamoto-Matsubara R, Aburatani H, Chiba S. Age-Dependent Decrease of DNA Hydroxymethylation in Human T Cells. *J Clin Exp Hematop.* 55(1):1-6, 2015

〔雑誌論文〕(計3件)

1. 永江玄太、がん研究におけるシングルセル遺伝子解析、*実験医学* 2015年1月号 Vol.33 No.1、*シングルセル生物学*、ISBN 978-4-7581-0135-6
2. 永江玄太、MeDIP-Seq法：メチルシトシン抗体による免疫沈降法、*実験医学別冊 エピジェネティクス実験スタンダード*、ISBN 978-4-7581-0199-8
3. 永江玄太、肝癌の分子機構、*がん転移学(上)ーがん転移のメカニズムと治療戦略：その基礎と臨床ー 日本臨牀 75巻増刊号8(通巻1131号)* pp186-191

〔学会発表〕(計7件)

1. Nagae G, Ota S, Umeda T, Midorikawa S, Aburatani H, Feasibility and clinical usefulness of detecting aberrant methylation in cell-free DNA, The 77th Japan Cancer Association Annual Meeting, The 77th Japan Cancer Association Annual Meeting, 2018
2. Nagae G, Yamamoto S, Tatsuno K, Clare Renard-Guillet, Umeda T, Tsutsumi S, Fujita M, Nakagawa H, Hiyama E, Aburatani H, Comprehensive profiling of hepatoblastoma revealed the clinically useful methylation patterns and the ectopic enhancers, The 76th Japan Cancer Association Annual Meeting, 2017
3. Nagae G, Yamamoto S, Tatsuno K, Clare Renard-Guillet, Umeda T, Tsutsumi S, Fujita M, Nakagawa H, Hiyama E, Aburatani H, Comprehensive profiling of hepatoblastoma revealed the clinically useful methylation patterns and the ectopic enhancers, The 72th Fujiwara Conference, 2017
4. Nagae G, Renard-Guillet C, Tatsuno K, Yamamoto S, Ueda H, Midorikawa Y, Nakagawa H, Shibata T, Aburatani H Aburatani H., Epigenomic dysregulation of hepatic

enhancers in liver cancer., The 75th Japan Cancer Association Annual Meeting, 2016

5. Nagae G, Shirai K, Seki M, Kamio A, Midorikawa Y, Tateishi K, Ichinose M, Aburatani H., The TET1 promotes malignant characteristics by aberrant enhancer hydroxymethylation in hepatocellular carcinoma., 41st Naito Conference, 2016
6. Nagae G, Renard-Guillet C, Tatsuno K, Yamamoto S, Ueda H, Midorikawa Y, Nakagawa H, Shibata T, Aburatani H., Epigenomic dysregulation of hepatic enhancers in liver cancer., The 74th Japan Cancer Association Annual Meeting, 2015
7. Nagae G, Shirai K, Seki M, Kamio A, Midorikawa Y, Tateishi K, Ichinose M, Aburatani H., The TET1 promotes malignant characteristics by aberrant enhancer hydroxymethylation in hepatocellular carcinoma., The 11th International Workshop on Advanced Genomics, 2015.

〔図書〕該当なし

〔産業財産権〕該当なし

〔その他〕該当なし

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：神尾明日香

ローマ字氏名：KAMIO ASUKA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。