

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09017

研究課題名(和文) DNAメチル化とマイクロRNAの統合的エピゲノム解析による肝細胞癌の病態解明

研究課題名(英文) Analysis of DNA methylation and microRNA expression in hepatocellular carcinoma

研究代表者

安居 幸一郎 (Yasui, Kohichiroh)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30323695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌におけるDNAメチル化とマイクロRNA(miRNA)の異常を網羅的に探索し、それぞれのデータを統合的に解析した。その結果、miR-214とmiR-199aが、肝細胞癌で最も有意に発現量が低下しているmiRNAであること、また両者のhost geneであるDNM3OSのプロモーター領域のDNAメチル化によって発現が抑制されているtumor suppressor miRNAであることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) is the third leading cause of cancer death worldwide. MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate gene expression and can act as tumor suppressors or oncogenes. To identify miRNA involved in the development of HCC, a genome-wide miRNA gene expression analysis was performed in paired HCC tumors and non-tumorous liver tissues from patients with primary HCC. We also screened for genes with promoter DNA hypermethylation using a genome-wide DNA methylation microarray analysis in the same samples. We found that miR-214 and miR-199a were significantly down-regulated by aberrant promoter hypermethylation of their host gene, DNMT3A, in HCC tumors compared to the non-tumorous liver tissues.

研究分野：肝臓病学、腫瘍学

キーワード：肝細胞癌 マイクロRNA DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

癌には体細胞変異(ゲノム異常)だけでなく、エピゲノム異常も発生し、両者が協働して癌の表現型を形成する。エピゲノムには DNA メチル化、ヒストン修飾、非翻訳 RNA、クロマチン複合体などが含まれる。エピゲノム異常は、発癌過程の早期に、遺伝子変異に先だって起こるので、癌の早期発見の指標になりえる。さらに、エピゲノム異常は薬物治療によって可逆的であるので、エピゲノム異常を標的とした治療薬が現在、盛んに開発されており、実際、臨床応用にされている。

DNA メチル化異常は多くの悪性腫瘍で見られ、癌抑制遺伝子のプロモーター領域の CpG 部位における過剰な DNA メチル化は遺伝子サイレンシングを引き起こす。

マイクロ RNA (miRNA) は、相補的な配列を有する mRNA と結合することで、mRNA からの翻訳を阻害、または mRNA の分解を引き起こして、その標的となる遺伝子(標的 mRNA)の発現を抑制する。近年、miRNA の異常が癌に深く関与することもよく知られるようになった。癌に関わる miRNA には、癌化を促進する oncogenic miRNA と抑制する tumor suppressor miRNA がある。

肝細胞癌は世界的に 5 番目に発生数が多く、癌による死因の 3 番目を占める予後の悪い癌である。肝細胞癌に対する新規治療法の開発には肝細胞癌の病態解明が不可欠であるが、その発生・進展に関わる DNA メチル化異常と mRNA の発現異常はまだ十分には解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、肝細胞癌に生じた DNA メチル化異常と miRNA 発現異常について網羅的かつ統合的解析を行い、プロモーター領域の DNA メチル化によって発現が抑制されている tumor suppressor miRNA を同定することを目的とした。さらに、その tumor suppressor miRNA の標的 mRNA を明らかにすることで、

肝細胞癌の病態を解明し、エピゲノム異常を標的とした治療シーズを開発することを目指した。

## 3. 研究の方法

肝細胞癌 40 例の手術検体の癌部と非癌部における DNA メチル化レベルと miRNA 発現量をそれぞれアレイで網羅的に解析した。その両方のデータを統合的に解析することで、プロモーター領域の DNA メチル化によって癌部で発現が抑制されている miRNA を探索した。その miRNA のプロモーター領域内の CpG 部位を対象に、methylation-specific PCR (MSP) 法、combined bisulfite and restriction analysis (COBRA)法、bisulfite-sequence 法、および脱メチル化剤(5-aza-2'-deoxycytidine)処理による各種メチル化解析を行った。miRNA の発現量は定量的 real-time RT-PCR 法で検証した。

miRNA の標的 mRNA の探索のためには各種の予測アルゴリズムとアレイによる網羅的 mRNA 発現解析の結果を利用した。そして、選定した標的 mRNA 候補について、miRNA の mimicあるいは inhibitor の細胞内導入実験、ルシフェラーゼ・アッセイ、ウエスタンブロットを行い、標的 mRNA かどうか判定した。

## 4. 研究成果

DNA メチルアレイで、癌部で有意に過剰な DNA メチル化が生じている 875 箇所の CpG 部位を同定した(mean  $\beta$ -value difference >0.15, corrected P value <0.01)。

一方、同一サンプルで、miRNA アレイを用いて miRNA 発現量を網羅的に測定した結果、非癌部に比べて癌部で発現が有意かつ 2 倍以上に亢進している 10 個の miRNA、1/2 以下に低下している 11 個の miRNA を検出した(corrected P value <0.01)。このアレイの結果を miRNA の定量的 RT-PCR で検証したところ、癌部で最も有意に発現量が低下している miRNA として miR-214 と miR-199a を見

出した。

miR-214 と miR-199a は染色体 1q24.3 領域に隣接して座位しており、それらは共通の host gene である DNMT3A のプロモーターにより転写制御を受けていることが判明した。そして、癌部では DNMT3A のプロモーター領域の DNA メチル化によって miR-214 と miR-199a の発現が抑制されていることを各種メチル化解析で確認した。さらに、miR-214 と miR-199a の mimic あるいは inhibitor の細胞内導入実験、アルゴリズム解析、ルシフェラーゼ・アッセイ、ウエスタンブロット実験から miR-214 と miR-199a が標的とする複数の癌遺伝子を同定した。

以上の結果は、肝細胞癌のエピゲノム異常について新しい知見を含んでおり、肝細胞癌の病態解明とエピゲノム異常を標的とした治療法の開発に寄与すると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 26 件)

\*以下すべて査読有り

- (1) Iwai N, Yasui K, Tomie A, et al. (17 名中 2 番目) Oncogenic miR-96-5p inhibits apoptosis by targeting the caspase-9 gene in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol*. 53: 237-245, 2018. doi: 10.3892/ijo.2018.4369.
- (2) Suzuki E, Yasui K, Furuse J, et al. (15 名中 9 番目) A multicenter Phase II study of sorafenib in Japanese patients with advanced hepatocellular carcinoma and Child Pugh A and B class. *Jpn J Clin Oncol*. 2018;48:317-321. doi: 10.1093/jjco/hyy010.
- (3) Kawaguchi T, Yasui K, Okanoue T, et al. (26 名中 9 番目) Risk estimation model for nonalcoholic fatty liver disease in the Japanese using multiple genetic markers. *PLoS One*. 2018;13:e0185490. doi: 10.1371/journal.pone.0185490. eCollection 2018.
- (4) Fujii H, Umemura A, Yasui K, et al. (15 名中 7 番目) Real-world efficacy of daclatasvir and asunaprevir with respect to resistance-associated substitutions. *World J Hepatol*. 2017;9:1064-1072. doi: 10.4254/wjh.v9.i25.1064.
- (5) Seko Y, Sumida Y, Yasui K, et al. (17 名中 15 番目) Insulin resistance increases the risk of incident type 2 diabetes mellitus in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2018;48:E42-E51. doi: 10.1111/hepr.12925.
- (6) Seko Y, Yamaguchi K, Mizuno N, Okuda K, Takemura M, Taketani H, Hara T, Umemura A, Nishikawa T, Moriguchi M, Yasui K, et al. (20 名中 11 番目) Combination of PNPLA3 and TLL1 polymorphism can predict advanced fibrosis in Japanese patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2018;53:438-448. doi: 10.1007/s00535-017-1372-8.
- (7) Gen Y, Yasui K (corresponding author), Kitaichi T, et al. (18 名中 2 番目) ASPP2 suppresses invasion and TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting Smad7 degradation mediated by E3 ubiquitin ligase ITCH in gastric cancer. *Cancer Lett*. 2017;398:52-61. doi: 10.1016/j.canlet.2017.04.002.
- (8) Kitaichi T, Yasui K (corresponding author), Gen Y, et al. (18 名中 2 番目) Loss of PAR-3 protein expression is associated with invasion, lymph node

- metastasis, and poor survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Hum Pathol*. 2017;62:134-140. doi: 10.1016/j.humpath.2017.01.009.
- (9) Mitsuyoshi H, Yasui K, Hara T, et al. (13名中2番目) Hepatic nucleotide binding oligomerization domain-like receptors pyrin domain-containing 3 inflammasomes are associated with the histologic severity of non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2017;47:1459-1468. doi: 10.1111/hepr.12883.
- (10) Seko Y, Sumida Y, Yasui K, et al. (17名中14番目) Effect of sodium glucose cotransporter 2 inhibitor on liver function tests in Japanese patients with non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus. *Hepatol Res*. 2017;47:1072-1078. doi: 10.1111/hepr.12834.
- (11) Seko Y, Sumida Y, Yasui K, et al. (17名中14番目) Effect of 12-week dulaglutide therapy in Japanese patients with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease and type 2 diabetes mellitus. *Hepatol Res*. 2017;47:1206-1211. doi: 10.1111/hepr.12837.
- (12) Seko Y, Sumida Y, Yasui K, et al. (17名中14番目) Development of hepatocellular carcinoma in Japanese patients with biopsy-proven non-alcoholic fatty liver disease: Association between PNPLA3 genotype and hepatocarcinogenesis/fibrosis progression. *Hepatol Res*. 2017;47:1083-1092. doi: 10.1111/hepr.12840.
- (13) Ikeda M, Yasui K, Okusaka T. (18名中14番目) Sorafenib plus Hepatic Arterial Infusion Chemotherapy with Cisplatin vs. Sorafenib for Advanced Hepatocellular Carcinoma: Randomized Phase II Trial. *Ann Oncol*. 2016;27:2090-2096. doi: 10.1093/annonc/mdw323.
- (14) Okajima A, Sumida Y, Yasui K, et al. (15名中13番目) Liver stiffness measurement to platelet ratio index predicts the stage of liver fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res*. 2017;47:721-730. doi: 10.1111/hepr.12793.
- (15) Yamada N, Yasui K (corresponding author), et al. (17名中2番目) Genome-wide DNA methylation analysis in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 35:2228-36, 2016. doi: 10.3892/or.2016.4619.
- (16) Ishiba H, Sumida Y, Yasui K, et al. (19名中18番目) Association of coronary artery calcification with liver fibrosis in Japanese patients with NAFLD. *Hepatol Res*. 2016;46:1107-1117. doi: 10.1111/hepr.12665.
- (17) Kanbayashi Y, Hosokawa T, Yasui K, Hongo F, Yamaguchi K, Moriguchi M, Miki T, Itoh Y. (8名中3番目) Predictive factors for sorafenib-induced hand-foot skin reaction using ordered logistic regression analysis. *Am J Health Syst Pharm*. 2016;73:e18-23. doi: 10.2146/ajhp150129.
- (18) Fujii H, Nishimura T, Yasui K, et al. (21名中20番目) Comparison of peg-interferon, ribavirin plus

- telaprevir vs simeprevir by propensity score matching. *World J Hepatol*. 2015;7:2841-8. doi: 10.4254/wjh.v7.i28.2841.
- (19) Yasui K (corresponding author), Konishi C, et al. (17 名中 1 番目) *EV11*, a target gene for amplification at 3q26, antagonizes transforming growth factor- $\beta$ -mediated growth inhibition in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2015;106:929-937. doi: 10.1111/cas.12694.
- (20) Sumida Y, Kanemasa K, Yasui K, et al. (21 名中 19 番目) Helicobacter pylori infection might have a potential role in hepatocyte ballooning in nonalcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol*. 2015;50:996-1004. doi: 10.1007/s00535-015-1039-2.
- (21) Okajima A, Yasui K, Itoh Y, et al. (15 名中 13 番目) Drug-induced liver injury in a chronic hepatitis C patient treated by peginterferon, ribavirin and simeprevir. *Hepatol Res*. 2015;45:E156-60. doi: 10.1111/hepr.12477.
- (22) Seko Y, Sumida Y, Yasui K, Itoh Y. (16 名中 13 番目) Serum alanine aminotransferase predicts the histological course of non-alcoholic steatohepatitis in Japanese patients. *Hepatol Res*. 2015;45:E53-61. doi: 10.1111/hepr.12456.
- (23) Yasui K, Kawaguchi T, Okanoue T, et al. (10 名中 1 番目) Effect of *PNPLA3* rs738409 variant (I148M) on hepatic steatosis, necroinflammation, and fibrosis in Japanese patients with chronic hepatitis C. *J Gastroenterology*. 2015;50(8):887-93. doi: 10.1007/s00535-014-1018-z.
- (24) Seko Y, Sumida Y, Yasui K, et al. (14 名中 12 番目) Predictors of malignancies and overall mortality in Japanese patients with biopsy-proven nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2015;45:728-38. doi: 10.1111/hepr.12407.
- (25) Sumida Y, Yonei Y, Yasui K, et al. (17 名中 15 番目) Lower levels of insulin-like growth factor-1 standard deviation score are associated with histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Res* 2015;45:771-81. doi: 10.1111/hepr.12408.
- (26) Yamaguchi K, Nishimura T, Yasui K, et al. (15 名中 12 番目) Blockade of Interleukin 6 Signaling Ameliorates Systemic Insulin Resistance through Upregulation of Glucose Uptake in Skeletal Muscle and Improves Hepatic Steatosis in High Fat Diet-fed Mice. *Liver Int* 2015;35:550-61. doi: 10.1111/liv.12645.
- [学会発表](計 10 件)
- (1) Terasaki K, Yasui K, et al. SOX2 promotes cell proliferation of esophageal squamous cell carcinoma through the miR-17-92 cluster /PTEN/AKT/mTORC1 pathway. Annual Meeting 2017 of the American Association for Cancer Research (AACR). 2017 Apr 3; Washington DC, USA.
- (2) Iwai N, Yasui K, et al. miR-96-5p functions as an oncogenic miRNA by inhibiting apoptosis in hepatocellular carcinoma. Annual Meeting 2017 of the American

- Association for Cancer Research (AACR). 2017 Apr 3; Washington DC, USA.
- (3) Yasui K, et al. Epigenetic silencing of miR-214-3p is associated with resistance to p53-induced apoptosis through up-regulation of gankyrin expression in hepatocellular carcinoma. Annual Meeting 2017 of the American Association for Cancer Research (AACR). 2017 Apr 3; Washington DC, USA.
- (4) Iwai N, Yasui K, et al. Up-regulated miR-96-5p inhibits apoptosis by targeting *FOXO1* in hepatocellular carcinoma. Annual Meeting 2016 of the American Association for Cancer Research (AACR). 2016 Apr 18; New Orleans, USA.
- (5) Yasui K, et al. Epigenetic silencing of miR-199a-3p is associated with increased cell survival, enhanced cell motility, and sensitivity to tivantinib through regulation of c-Met expression in hepatocellular carcinoma. Annual Meeting 2016 of the American Association for Cancer Research (AACR). 2016 Apr 18; New Orleans, USA.
- (6) Yasui K, et al. *EVI1* is a target for gene amplification at 3q26 and suppresses growth inhibition by transforming growth factor- in hepatocellular carcinoma. 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Disease (AASLD). 2015 Nov 17; San Francisco, USA.
- (7) Yasui K, et al. Amplification and overexpression of *EVI1* suppresses growth inhibition mediated by TGF-

in hepatocellular carcinoma. Annual Meeting 2015 of the American Association for Cancer Research (AACR). 2015 Apr 20; Philadelphia, USA.

- (8) Yasui K, Tomie T, Iwai N, Kitaichi T, Terasaki K, Dohi O, Gen Y, Itoh Y. Epigenetic silencing of miR-214 and miR-199a is associated with cell survival and motility in hepatocellular carcinoma (HCC). 第75回日本癌学会総会 2016年10月8日, 横浜.
- (9) 安居幸一郎, 伊藤義人. miRNAとDNAメチル化の統合的エピゲノム解析による肝細胞癌の病態解明. 日本人類遺伝学会第60回大会 2015年10月16日 東京.
- (10) Yasui K, Gen Y, Kitaichi T, Iwai N, Tanaka S, Arii S, Itoh Y. *EVI1*, a target gene for amplification at 3q26, antagonizes TGF- mediated growth inhibition in hepatocellular carcinoma. 第74回日本癌学会総会 2015年10月8日, 名古屋

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/syokanai/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

安居 幸一郎 (YASUI Kohichiroh )  
京都府立医科大学・医学研究科・准教授  
研究者番号 : 30323695