

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10191

研究課題名(和文)胆管癌におけるエピジェネティクスを標的とした新規分子標的治療薬の検討

研究課題名(英文) Drug screening for cholangiocarcinoma targeting the epigenetical mechanism of cancer progression

研究代表者

近本 亮 (CHIKAMOTO, Akira)

熊本大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：10419640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、癌遺伝子であるEZH2が血管抑制因子であるVASH1の発現を介して血管新生を促進し、癌の悪性度に関与している事を明らかにした。臨床検体においてEZH2の発現とVASH1の発現は逆相関を示し、更に、EZH2高発現かつVASH1低発現症例では再発率が高く、全生存率が不良であり、EZH2高発現かつVASH1低発現が予後不良のリスク因子である事が明らかとなった。また、EZH2が制御している他の細胞内シグナルとしてNotch1シグナルを同定し、これが胆管癌の増殖・悪性度の寄与していると考えられた。

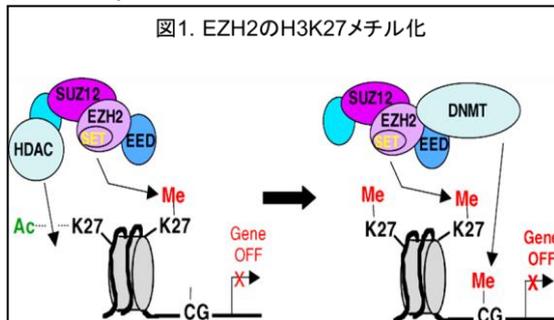
研究成果の概要(英文)：Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) is the catalytic subunit of the polycomb repressive complex 2 (PRC2) and regulate tumor malignancy by gene silencing via histone methylation. In this study, we investigate the role of EZH2 in angiogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC). The influence of EZH2 on tumor angiogenesis and the prognostic significance of EZH2 and VASH1 expression was also examined in ICC cohort by IHC. By bioinformatical analysis, EZH2 was associated with several angiogenesis gene set in public database. We also find that EZH2 suppress VASH1 expression in vitro assay and IHC study. In IHC analysis, EZH2-high/VASH1-low status was independently associated with poor disease-free survival (P=0.019) and poor overall survival (P=0.0055). The current study demonstrated that high EZH2 expression was associated with activation of tumor angiogenesis, and the EZH2 mediated angiogenesis pathway predicts the prognosis of patients with ICC.

研究分野：消化器外科、肝胆膵外科

キーワード：肝内胆管癌 EZH2 VASH1 血管新生 細胞増殖 Notch1

1. 研究開始当初の背景

ポリコム複合体を構成するポリコム蛋白の一つである EZH2 は、ヒストン 3 リジン 27 をメチル化することでクロマチン構造を変化させ、癌抑制遺伝子や細胞周期関連遺伝子の発現を抑制することにより、癌の発育・進展に関与することが報告されている (図 1)。EZH2 を含めたポリコム蛋白の癌発育・進展における役割を明らかにすることで、EZH2 の H3K27 メチル化部位をターゲットとしたメチル化阻害剤を用いた癌治療への臨床応用が期待される。乳癌・前立腺癌・卵巣癌の領域では、癌抑制遺伝子 p27KIP1 やサイクリン依存性キナーゼ CDK との関連が報告されている一方、消化器癌領域での EZH2 の役割については不明な点が多い。我々は予後不良な癌種として知られる胆管癌・膵癌において EZH2 高発現が予後不良因子である事 (図 2) に加えて、癌抑制遺伝子 p16INK4a、p27KIP1 の転写を抑制し癌進展を促進するメカニズム (図 3) や、EZH2 の発現誘導に関与する因子として microRNA (miR101) が上流に位置して EZH2 の発現を抑制することを明らかにした。また、癌抑制遺伝子を標的とした癌進展機構の他に、血管新生を制御する因子を標的として癌の増殖・転移を促進する機構も知られている。このため、胆管癌細胞株 RBE 及び TFK-1 を用いて siRNA を用いて EZH2 発現を抑制することで、胆管癌における標的遺伝子の検索を行ったところ、癌抑制遺伝子 p16INK4a、p27KIP1 の他に、血管新生抑制因子である Vasohibin-1 の発現上昇を認めた。即ち、EZH2 は胆管癌において、癌抑制遺伝子の他に、Vasohibin-1 を標的とすることで血管新生を促進し癌の進展に関与する可能性も示唆された。



更にこれまでに、間接的な EZH2 阻害効果を持つ、H3K27 メチル化阻害剤である DZNep を用いた実験を行っている。DZNep による EZH2 阻害効果を評価する為に、EZH2 項発現胆管癌株である RBE 及び TFK-1 を用いて現象及びターゲットとなる癌抑制遺伝子の発現の変化を評価した。これにより胆管癌細胞において増殖能の低下、アポトーシスの増加 (図 5)、細胞周期の停止 (図 6) を認めており、更に癌抑制遺伝子である p16INK4a、p27KIP1 の発現の増加を認め、これは抗癌剤であるゲムシタビンと併用した際により

明らかであった。近年、更なる EZH2 阻害剤の研究が進んでおり、Non-Hodgkin Lymphoma において、EZH2 阻害剤である EPZ-6438 の有用性が in vitro 及び in vivo で示されている (2014 Nat chem biolo Knutson et al, 2013 PANS Knutson et al)。本研究では、EPZ-6438 の胆管癌細胞株への増殖抑制効果、現象変化、及びその作用機序について評価し、更に In vitro、ヒト胆管癌切除検体を用いて抗腫瘍効果の評価を行う事を目的とした。

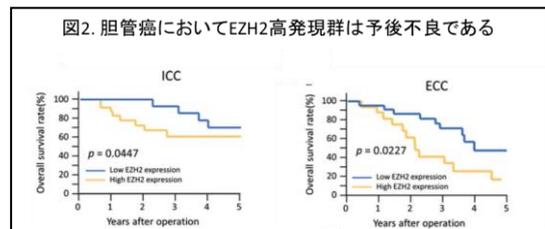
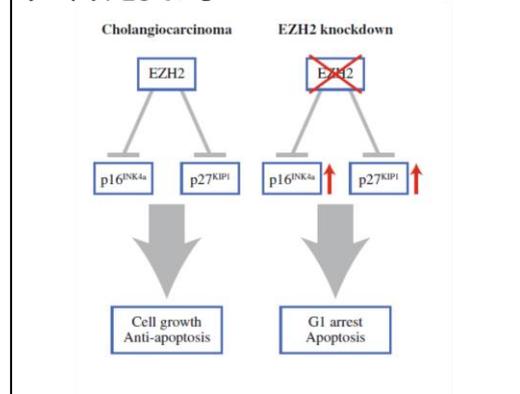


図3. 胆管癌においてEZH2はp16INK4a, p27KIP1をターゲットとしている



2. 研究の目的

(1)胆管癌細胞株における EZH2 阻害剤 EPZ-6438 の効果の評価及び下流の遺伝子変化の確認

EZH2 阻害剤の胆管癌における報告は少なく、その効果は未だ明らかでない。胆管癌細胞株を用いて EPZ-6438 が癌増殖・浸潤・遊走・血管新生に与える効果及び標的遺伝子の発現変化を評価する事で臨床応用へ向けた第一歩とする。

(2)In vivo における EPZ-6438 の腫瘍抑制効果及び血管新生抑制効果の評価

In vitro において得られた実験結果をマウスなどの生体内で確認することで、ヒトにおける動態を疑似的に再現でき、これにより治療への応用の足がかりとすることができると考える。

(3)ヒト胆管癌切除検体から得られる Tissue slice を用いた検討 (ex vivo)

①EPZ-6438 のヒト胆管癌組織における抗腫瘍効果及び標的遺伝子に与える影響の評価

当科においては、細胞株やマウスを用いた in vitro, in vivo の実験のみならず、手術により得られるヒト胆管癌組織が継続的に入手可能である。この手術検体のスライス q w w

(Precision cut slice) を用いて薬剤と共にカルチャーする事で、腫瘍微小環境を保持したまま、ヒト検体における薬剤の効果を評価することが可能である。この ex vivo の実験系を用いて EPZ-6438 を添加した際の抗腫瘍効果、標的遺伝子の発現変化、血管新生に与える影響などを評価する。これによりヒト胆管癌における有用性を評価することができ、臨床応用への足がかりとすることが出来る。

②抗癌剤及び EZH2 阻害剤の効果予測マーカーとしての EZH2 の有用性の検討

同様に腫瘍 ex vivo において腫瘍の EZH2 発現と抗癌剤 (ゲムシタビン)、EPZ-6438 の効果を比較することで抗腫瘍薬の効果予測マーカーとしての EZH2 の有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 胆管癌細胞株における EZH2 阻害剤 EPZ-6438 の効果の評価及び下流の遺伝子変化の確認

当科にて保有している胆管癌細胞株 7 株を用いて EPZ-6438 の抗腫瘍効果を評価する。MTT assay にて増殖能、invasion assay にて浸潤能、scratch assay にて遊走能、tube formation assay にて血管新生に与える影響を明らかにする。また、FACS を用いた解析を行う。PI 染色・Annexin V 染色・FACS 解析を行うことで、アポトーシス細胞を検出し、EPZ-6438 がアポトーシスに与える影響を分析する。細胞固定後に PI 染色を行い FACS 解析を行うことで細胞周期に与える影響を検討する。更に、EPZ-6438 投与における EZH2 と標的遺伝子の発現、細胞内シグナルの変化を qPCR、Western blot にて mRNA レベル、蛋白レベルにおいて評価し、作用機序の解明を行う。

(2) In vivo における EPZ-6438 の腫瘍抑制効果及び血管新生抑制効果の評価

胆管癌細胞株をヌードマウスへ皮下注射し、EPZ-6438 投与群とコントロール群において in vivo における抗腫瘍効果の評価を行う。腫瘍サイズの評価、EZH2、標的遺伝子の発現変化の評価と同時に、in vivo では特に血管新生への影響に着目する。In vitro においては評価困難な血管新生を含めた腫瘍微小環境の評価が in vitro の実験により可能となるためである。血管上皮マーカーである CD34、CD31 及び血管新生抑制因子であり EZH2 の標的である Vasohibin-1 の発現を免疫染色、Western Blot にて確認し、EPZ-6438 による発現の変化を評価する。更に VEGF シグナルの解析を行い、EZH2/Vasohibin-1 との相互作用を検討する。続いて EPZ-6438 の浸潤・転移の阻害効果の検討を行う。胆管癌細胞株をヌードマウスへ尾静脈注入を行い、マウス肺への肺転移をコントロールと比較し評価することで、EPZ-6438 の転移抑制効果を検討する。こうして作成したマウス皮下腫瘍及びマウス肺転移巣の切除標本を用いて免疫染色を行い、EZH2、標的遺伝子のタンパクレベル

での発現変化を評価・検討する。

(3) ヒト胆管癌切除検体から得られる Tissue slice を用いた検討 (ex vivo)

手術による切除後すぐの胆管癌組織を、マイクロトームを用いて厚さ 300 μ m にスライスし、細胞培養用メディアウムを用いてカルチャーを行う (図 9)。この組織に対して各種薬剤を投与し、MTS アッセイにてその viability を、カルチャー後の蛋白、mRNA を回収してその蛋白、遺伝子発現の変化を評価する。このような ex vivo の実験系を用いてヒト胆管癌組織に対する薬剤の効果を評価することで、血管新生などの腫瘍微小環境を残しつつ、薬剤感受性の評価を行う事が可能である。

① EPZ-6438 のヒト胆管癌組織における抗腫瘍効果及び標的遺伝子に与える影響の評価

上記 ex vivo の実験系において、胆管癌スライスに EPZ-6438 を添加し、継続的に MTS を測定しコントロールと比較する事で抗腫瘍効果の評価を行う。更に、カルチャー後の胆管癌スライスから mRNA、蛋白を抽出することで標的遺伝子の発現変化や VEGF シグナルの変化を評価する。同様に胆管癌スライスにホルマリン固定した標本の免疫染色を行う事で血管新生 (CD31, 34)、増殖能 (Ki67, BrDU)、アポトーシス (Caspase3, TUNNEL) の評価を行い、EPZ-6438 の抗腫瘍効果の詳細を明らかにする (図 10)。Ex vivo の実験系を使用する事で、ヒト検体での抗腫瘍効果の評価が可能となる。

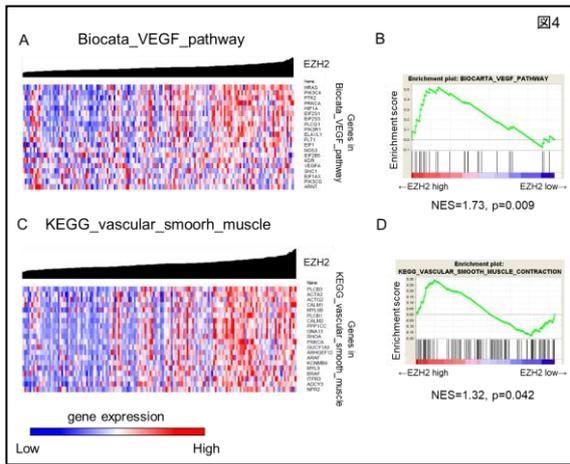
② 抗癌剤及び EZH2 阻害剤の効果予測マーカーとしての EZH2 の有用性の検討

カルチャー前の胆管癌組織の EZH2 発現を免疫染色及び qPCR にて確認し、その後カルチャーを行い EPZ-6438 の効果を測定する。EZH2 発現と EPZ-6438 の抗腫瘍効果の相関を評価し、EZH2 の効果予測マーカーとしての意義を検討する。更に、同様の腫瘍を用いて、現行胆管癌治療のキードラッグであるゲムシタビン及びシスプラチンの抗腫瘍効果を測定し、EZH2 発現とこれら抗癌剤の抗腫瘍効果との相関関係を評価する。これによって抗癌剤の効果予測マーカーとしての EZH2 の意義を検討する事が出来る。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイデーを用いた EZH2 と血管新生の相関関係の検証

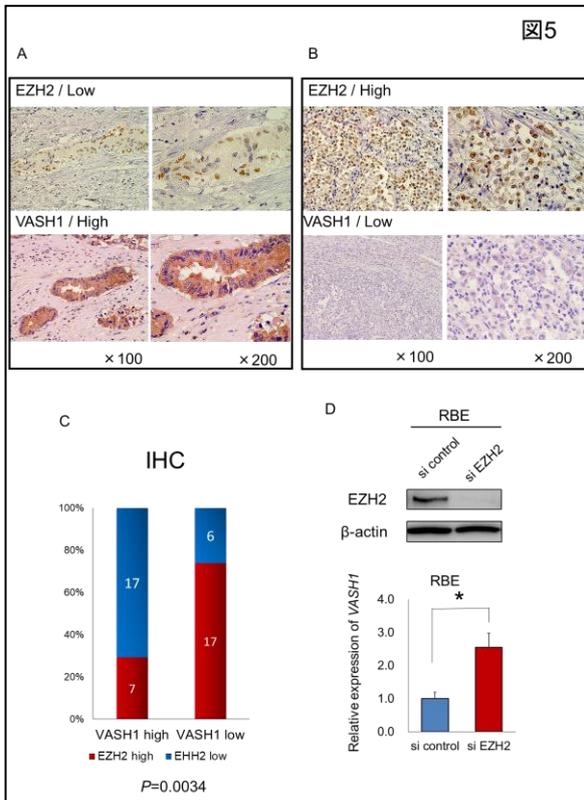
まず、EZH2 と血管新生の相関関係を明らかにするために、胆管癌のマイクロアレイデータである GSE3225 (n=155) を用いて GSEA ; Gene set enrichment analysis を用いて EZH2 の発現レベルと血管新生に関わる Geneset の相関関係を解析した。EZH2 の高発現は、血管新生に関わる Geneset である、Biocata_VEGF_pathway 及び KEGG_vascular_smooth_muscle と有意に相関を示した。(それぞれ NES=1.73, p=0.009, NES=1.32, p=0.042、図 4)



(2) EZH2 による血管新生は、VASH1 の発現抑制を介して行われる。

VASH1 は、EZH2 のターゲットの一つとして知られており、EZH2 によりエピジェネティックなメカニズムにより発現の抑制を受ける。VASH1 は血管新生を阻害する因子であり、無秩序な血管新生を抑制していると考えられている。胆管癌細胞株 RBE において、EZH2 の発現を siRNA を用いて抑制すると、VASH1 の発現が上昇した ($p=0.0034$)。(図 5、D)

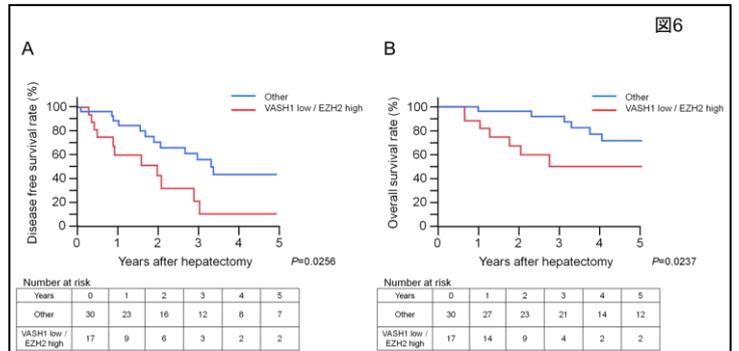
続いて、ヒト臨床検体における EZH2 と VASH1 の相関関係を明らかにするため、胆管癌組織を用いて免疫染色による EZH2 及び VASH1 の評価を行った。EZH2 高発現は有意に VASH1 低発現と相関し ($p=0.0034$)、臨床検体においても VASH1 は EZH2 により抑制的な制御を受けていると考えられた。(図 5)



(3) EZH2 高発現、VASH1 低発現群は胆管癌に

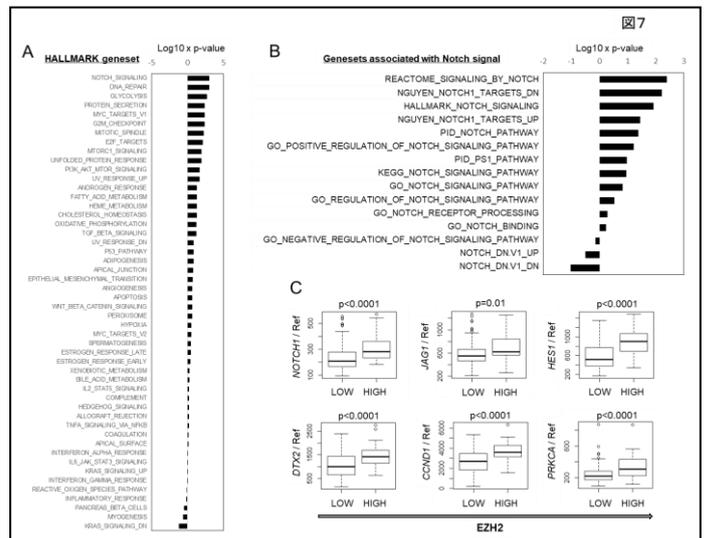
おける独立予後不良因子である。

EZH2 及び VASH1 発現の胆管癌における予後の相関を明らかにするために、Cox regression model 単変量及び多変量解析を行った。EZH2 高発現、かつ VASH1 低発現群を血管新生が促進されている群として解析すると、EZH2 高発現かつ VASH1 低発現群において有意に予後不良 (全生存率) であり ($p=0.0237$)、有意に無再発生存率も不良であった ($p=0.0256$)。多変量解析を行うと、腫瘍系 ($p=0.01$) 及び EZH2 高発現 VASH1 低発現 ($p=0.0055$) が全生存率不良に対する独立予後不良因子であった。また、リンパ節転移 ($p=0.031$) 及び EZH2 高発現 VASH1 低発現 ($p=0.019$) が無再発生存率不良を予測する独立因子であった。(図 6)



(4) EZH2 は Notch シグナルを介して胆管癌の増殖を促進している。

更に、EZH2 が胆管癌の進展に関わる他のメカニズムを明らかにするために、GSE3225 コホートにおいて、HALLMARK geneset を用いて GSEA を行い、EZH2 高発現において活性化しているシグナルを網羅的に解析した。そのきっかけ、Notch シグナルが EZH2 高発現症例において最も活性化しており、EZH2 が細胞増殖にいたるメカニズムにおいて Notch シグナルが重要な役割をになっていると考えられた。更に他の Geneset を用いて検証すると、他のほとんどの Geneset においても Notch シグナルが EZH2 高発現において活性化している事が明らかになった。



Notch1、JAG1、HES1、DTX2、CCND1、PPKCA といった Notch シグナル下流の遺伝子群も EZH2 高発現においてその発現が上昇している事がわかった。(それぞれ $p < 0.0001$, $p = 0.01$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$, $p < 0.0001$)、
図 7

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 9 件)

① Hayashi H, Higashi T, Yokoyama N, Kaida T, Sakamoto K, Fukushima Y, Ishimoto T, Kuroki H, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Oki E, Beppu T, Baba H: An Imbalance in TAZ and YAP Expression in Hepatocellular Carcinoma Confers Cancer Stem Celllike Behaviors Contributing to Disease Progression. *Cancer Res.* 75(22) : 4985 - 97, 2015 査読有
doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-0291.

② Sakamoto K, Imai K, Higashi T, Taki K, Nakagawa S, Okabe H, Nitta H, Hayashi H, Chikamoto A, Ishiko T, Beppu T, Baba H: Significance of P-cadherin overexpression and possible mechanism of its regulation in intrahepatic cholangiocarcinoma and pancreatic cancer. *Cancer Sci*106(9): 1153-62, 2015 査読有
doi: 10.1111/cas.12732.

③ Nakagawa S, Hayashi H, Nitta H, Okabe H, Sakamoto K, Higashi T, Kuroki H, Imai K, Hashimoto D, Sakamoto Y, Chikamoto A, Beppu T, Baba H: Scoring system based on tumor markers and Child-Pugh classification for HCC patients who underwent liver resection. *Anticancer Res* 35(4):2157-63, 2015 査読有
<http://ar.iiarjournals.org/content/35/4/2157.abstract>

④ Kaida T, Nitta H, Kitano Y, Yamamura K, Arima K, Izumi D, Higashi T, Kurashige J, Imai K, Hayashi H, Iwatsuki M, Ishimoto T, Hashimoto D, Yamashita Y, Chikamoto A, Imanura T, Ishiko T, Beppu T, Baba H: C5a receptor (CD88) promotes motility and invasiveness of gastric cancer by activating RhoA. *Oncotarget.* 7(51) 84798 - 84809, 2016 査読有
doi: 10.18632/oncotarget.12656.

⑤ Higashi T, Hayashi H, Kitano Y, Yamamura K, Kaida T, Arima K, Taki K, Nakagawa S, Okabe H, Nitta H, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Beppu T, Baba H: Statin

attenuates cell proliferative ability via TAZ (WWTR1) in hepatocellular carcinoma. *Med Oncol.* 33(11):123, 2016 査読有
doi: 10.1007/s12032-016-0845-6

⑥ Hashimoto D, Arima K, Yokoyama N, Chikamoto A, Taki K, Inoue R, Kaida T, Higashi T, Nitta H, Ohmuraya M, Hirota M, Beppu T, Baba H: Heterogeneity of KRAS Mutations in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas.* 45(8):1111-4, 2016 査読有
doi: 10.1097/MPA.0000000000000624.

⑦ Miyata T, Yamashita YI, Yamao T, Umezaki N, Tsukamoto M, Kitano Y, Yamamura K, Arima K, Kaida T, Nakagawa S, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Baba H: Prognostic impacts of postoperative complications in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma after curative operations. *Int J Clin Oncol*22, (3):526-532, 2017 査読有
doi: 10.1007/s10147-017-1099-9.

⑧ Chikamoto A, Inoue R, Komohara Y, Sakamaki K, Hashimoto D, Shiraishi S, Takamori H, Yamashita YI, Yoshida N, Yamanaka T, Yamashita Y, Baba H: Preoperative High Maximum Standardized Uptake Value in Association with Glucose Transporter 1 Predicts Poor Prognosis in Pancreatic Cancer. *Ann Surg Oncol.* 24(7):2040-2046. 2017 査読有
doi: 10.1245/s10434-017-5799-1.

⑨ Nakagawa S, Okabe H, Ouchi M, Tokunaga R, Umezaki N, Higashi T, Kaida T, Arima K, Kitano Y, Kuroki H, Mima K, Nitta H, Imai K, Hashimoto D, Yamashita YI, Chikamoto A, Baba H: Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) regulates tumor angiogenesis and predicts recurrence and prognosis of intrahepatic cholangiocarcinoma. *HPB(Oxford)*. 2018 May 11. pii: S1365-182X(18)30795-0. 査読有
doi: 10.1016/j.hpb.2018.03.018.

[学会発表] (計 2 件)

① 中川茂樹、梅崎直紀、山尾宣暢、北野雄希、山村謙介、宮田辰徳、美馬浩介、今井克憲、橋本大輔、山下洋市、近本亮、馬場秀夫 肝細胞癌における多中心性及び肝内転移再発予測の為に Molecular gene signature の検討 第 72 回日本消化器外科学会総会 2017. 7. 21 ホテル金沢

② Shigeki Nakagawa, Naoki Umesaki, Takanobu Yamao, Yuki Kitano, Kensuke Yamamura, Kota Arima, Tatsunori Miyata,

Takayoshi Kaida, Yujin Hoshida, Katsunori Imai, Daisuke Hashimoto, Yoichi Yamashita, Akira Chikamoto, Hideo Baba

A stromal liver gene signature predictive of HCC risk across all liver disease etiologies. AACR2017 2017.4.4 Walter E. Washington Convention Center (Washington, D. C., USA)

〔図書〕（計〇件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近本 亮 (CHIKAMOTO, Akira)
熊本大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：10419640

(2) 研究分担者

美馬 浩介 (MIMA, Kosuke)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医
師
研究者番号：00546559

中川 茂樹 (NAKAGAWA, Shigeki)
熊本大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：10594872

岡部 弘尚 (OKABE, Hirohisa)
熊本大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40573621

林 洋光 (HAYASHI, Hiromitsu)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医

師

研究者番号：80625773

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()