

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19959

研究課題名(和文) 胃がん関連線維芽細胞のエピジェネティック特性の解明

研究課題名(英文) Identification of epigenetic characteristics of Cancer-associated fibroblasts

研究代表者

前田 将宏 (Maeda, Masahiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：30738703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではがん間質の主要細胞成分であるがん関連線維芽細胞(CAF)のエピジェネティック特性とそのがん進展における意義の解明を行った。胃がん手術検体のがん部及び非がん部より各々CAFおよびnon-CAFを初代培養し、安定で細胞分化に重要な抑制性ヒストン修飾であるH3K27me3に着目してゲノム網羅的解析を行った。CAFは明瞭に異なるH3K27me3パターンを示し、H3K27me3標的遺伝子は腫瘍促進に関連する分泌因子を多く含んでいた。その中でCAF由来の治療標的となり得るWNT5Aを同定した。CAFにおいてエピジェネティック変化がその生物学的特性を規定していることを示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cancer-associated fibroblasts (CAFs), a major cellular component of cancer stroma, play a crucial role in cancer progression. In this study, we aimed to identify epigenetic characteristics of CAFs, which may underlie stable tumor-promoting capacities of CAFs. Primary culture of CAFs and non-CAFs was established from gastric surgical specimens. Focusing on H3K27me3, a repressive histone mark that is stable and essential for cell-specific differentiation, we revealed that CAFs had genome-wide alterations of H3K27me3, leading to aberrant production of various tumor promoting factors due to decreased H3K27me3. Among them, we identified WNT5A as a therapeutic target derived from CAFs. This study suggested that epigenetic alterations may determine CAF's biological behaviors.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：がん関連線維芽細胞 H3K27me3 WNT5A

1. 研究開始当初の背景

1) がん間質における主要細胞成分である線維芽細胞は、がん関連線維芽細胞 (CAF) と呼ばれる。CAF はがん細胞により活性化され、がん微小環境を形成してがんの進展に寄与している。これまで CAF における腫瘍促進性は腫瘍と共存しなくても比較的安定に維持されることが示されており [Orimo et al., Cell, 1, 273, 2005]、その機序として CAF におけるエピジェネティックな変化もしくはジェネティックな変化が示唆されている。しかしこれまで CAF におけるエピジェネティック特性については世界的に不明であり、体細胞変異の有無についてもまだ結論は出ていない。

2) 研究責任者は、胃癌臨床切除検体を用い、がん部よりがん関連線維芽細胞 (CAF) を、また十分に離れた非がん部より非がん関連線維芽細胞 (NCAF) を樹立した。これらの 2 検体を用いて、ヒストン修飾の中でも最も安定で、単独で強力な遺伝子発現抑制効果を有するヒストン修飾であるヒストン H3 のリジン 27 トリメチル化 (H3K27me3) について、ゲノム網羅的解析 (ChIP-on-chip 及び ChIP シークエンシング) を行った。その結果 CAF における H3K27me3 の広範な変化を見出し、CAF におけるエピジェネティック変化 (H3K27me3) は、その生物学的特性を規定しているという作業仮説を考えた。

2. 研究の目的

- 1) CAF におけるエピジェネティック変化の全貌を解明する
- 2) CAF におけるエピジェネティック変化のがん進展における意義を解明する。

3. 研究の方法

1) CAF/NCAF の樹立
 胃癌切除検体のがん浸潤部および非がん部より組織標本を採取し、静置培養によりそれぞれ CAF および non-CAF (NCAF) の初代培養を行う。樹立後、免疫蛍光法 (αSMA, Vimentin, Cytokeratin, CD31) により、樹立線維芽細胞の純度を評価すると共に CAF マーカー発現による特徴づけを行う。がん組織及び対応する CAF に Comprehensive cancer panel を用いた変異解析を行いがん細胞の混入について検討する。また培養上清を用いて CAF のがん促進作用 (Cell growth, Cell migration) を確認する。

2) H3K27me3 解析及び制御遺伝子の同定

12 組の CAF と NCAF において、CpG island microarray (Agilent) を用いた H3K27me3 のゲノム網羅的解析を行う。階層的クラスタリング、主成分分析によるプロファイリングの後、DEseq 正規化を用いて CAF/NCAF の各ペアにおいて有意な H3K27me3 変化領域を同定する。マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行い、

H3K27me3 変化に伴って遺伝子発現の増減した遺伝子群を選定し、その機能的意義づけを行う。それらの中で、H3K27me3 レベルが減少して遺伝子発現が上昇した分泌因子に着目し、CAF 由来の治療標的を同定する。標的候補はその抑制により、CAF のがん促進効果を抑制するかを検討する。

3) 組織検体における発現異常の確認

上記の候補遺伝子について組織検体を用い、免疫組織化学染色 (IHC) もしくは RNA in situ によりがん間質と非がん間質での線維芽細胞における発現異常の確認を行う。

4) エピジェネティック制御解析

候補遺伝子の発現変化を伴う CAF に対応する NCAF を用い、ヒストンメチル化酵素の EZH2 阻害剤である GSK126 を用いて、H3K27me3 を低下させ、標的遺伝子の発現が上昇し、標的遺伝子が H3K27me3 により制御されているか否かを確認する。また H3K27me3 レベルを増加させることが知られるヒストン脱メチル化酵素阻害薬 (GSK-J4) 処理により、H3K27me3 の増加と遺伝子発現低下が誘導できるか否かを解析する。

4. 研究成果

1) CAF/NCAF の樹立

確立した初代培養法により、計 44 組の CAF と NCAF を樹立した。切除胃は全例ピロリ菌感染による胃粘膜萎縮を呈していたため、control としてピロリ菌非感染非がん (GIST) 患者の胃切除検体を用いて Normal fibroblast (NF) を 2 例樹立した。樹立した線維芽細胞は、Cytokeratin 陰性、CD31 陰性、Vimentin 陽性、αSMA 陽性であり、典型的な線維芽細胞形態を示した。CAF マーカー (αSMA、FAP) の発現に有意差は認めなかった。また腫瘍の変異解析 (n=5) において 10% 以上のアレル頻度で同定された全ての変異は CAF で 1% 以上の頻度で認められずがん細胞の混入の可能性は低いと考えられた。複数の CAF の培養上清 (CM) において、胃癌細胞株 (N87) の増殖および遊走能促進効果が確認された (図 1)。

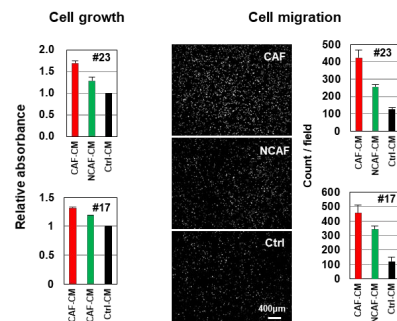


図 1. CAF の培養上清 (CM) はがん細胞株の増殖、遊走能を促進した。

2) H3K27me3 解析及び制御遺伝子の同定
階層的解析において CAF は NCAF や NF と比べ明瞭に異なる H3K27me3 プロファイルを示した(図 2)。

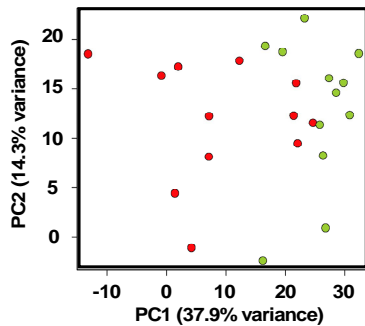


図 2. 主成分解析で CAF は明瞭に異なる H3K27me3 パターンを示した。

次に背景因子を調整するためペア毎に有意な H3K27me3 変化領域を同定し、変化領域を有する遺伝子中、3 組以上で共通していた遺伝子を探索したところ、CAF で H3K27me3 の増加がみられた遺伝子には Developmental protein が、H3K27me3 の減少が見られた遺伝子には、Glycoprotein, WNT ligand や Growth factor が含まれた。

これらの中で最も高頻度(11/12)に CAF で H3K27me3 の低下が認められた遺伝子として WNT5A を同定した。WNT5A は胃がん細胞から分泌され、オートクライン作用により機能すると報告されていた。しかし CAF の発現量は、NCAF・胃がん細胞株よりはるかに高値であった。同時に CAF における WNT5A プロモーター領域の H3K27me3 の低下も確認された(図 3)。培養上清でも CAF は NCAF や細胞株に比べて WNT5A は高分泌されていた。

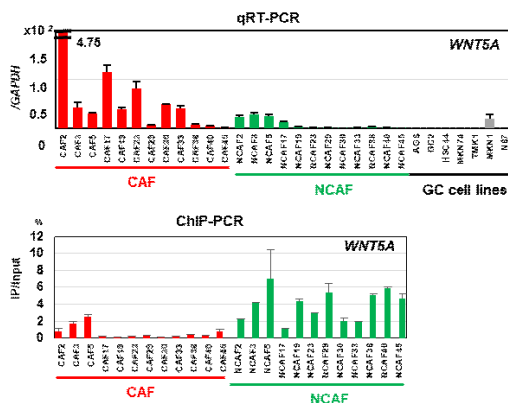


図 3. WNT5A は CAF (赤)で NCAF (緑)および細胞株 (灰)に比べ高発現 (上: qRT-PCR)していた。また WNT5A のプロモーター領域の H3K27me3 は CAF で低下していた (下: ChIP-PCR)。

また、組織標本においても RNA in situ (RNA scope) により、間質の紡錘形細胞における WNT5A の高発現が示された(図 4)。

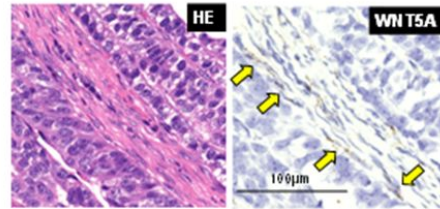


図 4. RNA scope による WNT5A の間質細胞での高発現 (x40) #30

WNT5A の Antagonist である BOX5 は CAF 由来の CM の腫瘍増殖促進効果を抑制した。

4) エピジェネティック制御解析

NCAF に対する GSK126 治療は H3K27me3 を低下させ、WNT5A を含む標的遺伝子の発現を上昇させ、標的遺伝子の H3K27me3 による制御が確認された(図 5)。

現在、GSK-J4 治療による CAF のリプログラミングの条件検討を行っている。

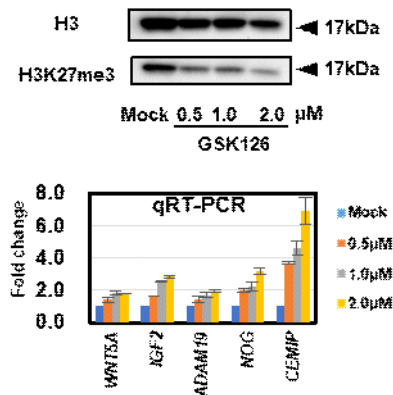


図 5. GSK126 治療 (NCAF23) による H3K27me3 の低下(上)と標的遺伝子の発現変化(下)。H3K27me3 の低下に伴い、発現上昇が確認された

5) まとめ

以上より、CAF には多くのエピジェネティック変化 (H3K27me3) が存在すること、またその変化は少なくとも部分的に CAF のがん促進的作用に関与していることが明らかとなった。本研究はこれらの変化を利用して CAF 由来の治療標的を同定した。またエピゲノム変化を標的としたエピジェネティック治療による CAF のリプログラミングの可能性が示唆された。

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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

第76回日本癌学会学術総会, 2017年9月

第32回発癌病理研究会, 2017年8月

第89回日本胃癌学会総会, 2017年3月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

前田 将宏 (MAEDA Masahiro)

国立がん研究センター研究所

エピゲノム解析分野

研究員

研究者番号: 30738703

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし