

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17468

研究課題名(和文)肝細胞癌におけるBRD4阻害の抗腫瘍メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of the anti-tumor mechanism of BRD4 inhibition in hepatocellular carcinoma

研究代表者

佐々木 基 (Sasaki, Hajime)

札幌医科大学・医学部・訪問研究員

研究者番号：30784441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肝細胞がん(HCC)に対するプロモドメイン蛋白BRD4阻害の抗腫瘍メカニズムの解明を目的とした。BRD4阻害剤JQ1処理はHCC細胞株において細胞周期停止とアポトーシスを誘導し、増殖を抑制した。マイクロアレイ解析の結果、JQ1は遺伝子発現プロファイルに大きな影響を与えること、その中には細胞周期やアポトーシス関連遺伝子が多く含まれることを見いだした。さらに我々はHCC細胞における新たなBRD4標的遺伝子として、BCAT1, DDR1, GDF15, FANCD2, SENP1, TYRO3を同定した。本研究から、BRD4阻害による抗腫瘍メカニズムに関わる新たな遺伝子が同定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞がんは多発や再発が多い腫瘍であり、進行肝細胞がんに対する治療法の開発は社会的意義が大きい。BRD4阻害剤の抗腫瘍効果は様々な癌種において報告されているが、肝細胞癌における研究論文はまだまだ少なく、抗腫瘍メカニズムの全容は解明されていない。我々は、複数の肝がん細胞株のトランスクリプトーム解析から、複数の新規BRD4標的遺伝子候補を同定した。これらの遺伝子はいずれも肝がんが発現上昇しており、かつ発がんとの関わりがこれまでに報告されていることから、抗腫瘍効果に関わるものが推測された。本研究から、BRD4阻害による肝がんの抗腫瘍効果メカニズムの一端が解明された。

研究成果の概要(英文)：BRD4 inhibitors exert anti-tumor effects in various cancers, including hepatocellular carcinoma (HCC). We investigated the mechanism underlying the anti-tumor effects of BRD4 inhibition in HCC. We first tested the effects of the BRD4 inhibitor JQ1 in a series of 9 HCC cell lines and found that it strongly suppressed HCC cell proliferation by inducing cell cycle arrest and apoptosis. Gene expression microarray analysis revealed that JQ1 also induced marked changes in the gene expression profiles of HCC cells, and genes associated with cell cycle and apoptosis were significantly enriched among the affected genes. Notably, a number of cancer-related genes, including BCAT1, DDR1, GDF15, FANCD2, SENP1 and TYRO3, were strongly suppressed by JQ1 in HCC cells. We also confirmed BRD4 bound within the promoter regions of these genes, which suggests they are targets of BRD4 in HCC cells. JQ1 thus appears to exert its anti-tumor effects in HCC by suppressing multiple BRD4 target genes.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞がん ヒストン修飾 エピジェネティクス がん治療 BET阻害剤 BRD4阻害剤

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化異常やヒストン修飾変化に代表されるエピゲノム異常は、ほぼあらゆる癌種で認められる現象であり、重要な治療標的と考えられている。ヒストンのアセチル化は転写活性化に重要であるが、2010年にアセチル化ヒストンのリーダーであるBETプロモドメイン蛋白BRD4を特異的に阻害する小分子が開発され、以降様々ながん種に対するBRD4阻害剤の抗腫瘍効果が報告されている。そのメカニズムは様々な遺伝子の転写開始点領域、あるいはエンハンサー領域におけるBRD4結合を特異的に阻害して転写を抑制することであり、とくに癌特異的なスーパーエンハンサーを阻害することでMYCなどの癌遺伝子を抑制することが明らかにされた(Loven et al. Cell, 2013)。BRD4阻害剤の標的としてMYCが最もよく知られているが、これまでの多くの研究から、BRD4阻害剤の効果は多岐にわたり、癌種ごとに異なるスペクトラムの遺伝子に影響を与えることで抗腫瘍効果を発揮していることも徐々に明らかにされつつある(Devaraj et al Leukemia, 2016)。

肝細胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)に対するBRD4阻害剤の抗腫瘍効果についても明らかにされはじめ、E2F2など新たなBRD4標的遺伝子が報告されている(Hong et al. Oncotarget, 2017)。しかし、肝細胞癌におけるスーパーエンハンサーの報告はほとんどなく、BRD4阻害の抗腫瘍効果メカニズムには不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究は、HCCにおけるBRD4阻害の抗腫瘍メカニズムを明らかにし、臨床応用につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 解析対象と薬剤処理

HCC細胞株9株(JHH-4, Li-7, HepG2, Hep3B, HLE, HLF, huH-1, HuH-7, PLC/PRF/5)を解析対象とした。肝がん細胞をBRD4阻害剤JQ1(0.001 μ M, 0.048 μ M, 0.24 μ M, 1.2 μ M, 6 μ M, 30 μ M)5日間で処理し、細胞増殖をMTTアッセイで解析することで、IC50を決定した。

HCC細胞株を1 μ MのJQ1で48時間処理し、細胞周期とアポトーシスをフローサイトメーターで解析した。

(2) 遺伝子発現解析

JQ1処理がHCC細胞株の遺伝子発現に与える影響を定量RT-PCR法で解析した。また1 μ MのJQ1でHCC細胞株を処理し、網羅的な遺伝子発現解析をAgilent SurePrint G3 Human GEマイクロアレイで解析した。

(3) RNAiによるノックダウン

BRD4のノックダウンを行うため、BRD4に対するsiRNAあるいはcontrol siRNAをHCC細胞株にトランスフェクトし、48時間後に細胞を回収した。

(4) クロマチン免疫沈降

BRD4と標的遺伝子の結合をクロマチン免疫沈降(Chromatin immunoprecipitation, ChIP)法により解析した。HCC細胞を固定し、超音波により破碎した後、抗BRD4抗体あるいはcontrol IgGを用いて沈降した。標的遺伝子へのBRD4の集積を定量PCR(ChIP-PCR)により解析した。

4. 研究成果

(1) BRD4阻害剤によるHCC細胞の増殖抑制効果

まずHCC細胞9株を一連の濃度のJQ1で処理することで各細胞株のIC50を測定した。JQ1は全てのHCC細胞株に対して増殖抑制効果を占めたが、効果の程度は細胞ごとに多様であった。例えば、HuH-7, Hep3B, HLEはJQ1に対し高感受性であり、IC50はそれぞれ0.046, 0.048, 0.076 μ Mであった。高感受性株を用いた細胞周期アッセイでは、JQ1によるG1期停止が確認された。またJQ1処理によるアポトーシス誘導が確認された。一方、huH1やPLC/PRF/5はJQ1に対し比較的抵抗性であった。

(2) BRD4阻害剤による遺伝子発現への影響

これまで研究報告から、HCCにおけるBRD4標的遺伝子として、MYCとE2F2が知られてる。そこでJQ1処理後のMYCとE2F2の発現を定量RT-PCRにより解析した。HuH-7, HLE, HepG2の3株を対象に、JQ1の濃度を0.5 μ M, 1.0 μ M, 2.0 μ Mの3段階、処理時間を0h, 6h, 24h, 48hの4段階に設定して処理した結果、濃度依存および時間依存なMYC、E2F2の発現抑制が確認された。

さらにJQ1がHCC細胞のトランスクリプトームに与える影響を詳細に検討するため、HCC細

胞株 9 株を 1 μ M の JQ1 で 24 時間処理し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、5497 個の遺伝子発現の変動が認められた(t-test, $p < 0.05$)。そのうち、JQ1 により発現が低下する遺伝子は 1868 個であった。Gene Ontology 解析の結果、JQ1 により発現低下する遺伝子には、細胞膜や細胞内小器官に関わるものが多く含まれることが分かった。またパスウェイ解析の結果、JQ1 により発現低下する遺伝子には、細胞周期、アポトーシス、がん関連パスウェイに関わるものが多く含まれることが分かった。さらに我々は、BCL2L11 や MCL1 の発現が JQ1 により上昇することを見いだした。

(3) HCC 細胞の新規 BRD4 標的遺伝子の同定

HCC 細胞に対する BRD4 阻害の抗腫瘍効果に関わる BRD4 標的遺伝子を同定するため、マイクロアレイ結果から、HCC において JQ1 処理により顕著に発現低下する遺伝子(>2-fold, $p < 0.05$)を 226 個抽出した。この 226 遺伝子の中から、The Cancer Genome Atlas (TCGA)のデータセットを用いることで、腫瘍特異的な発現上昇を示す遺伝子をさらに絞り込んだ。その結果、7 遺伝子(BCAT1, FANCD2, MAPK3, NUAK1, PAK1, SENP1, TYRO3)を抽出した。またこれまでの文献から、HCC との関連が報告されている遺伝子として、DDR1 と GDF15 を抽出した。これらの 9 遺伝子は、HCC 細胞株で JQ1 処理によって顕著に発現上昇することが、我々のマイクロアレイデータから確認された。定量 RT-PCR の結果、BCAT1, DDR1, FANCD2, GDF15, SENP1, TYRO3 の 6 遺伝子が、正常肝組織と比較して、複数の HCC 細胞株で発現上昇し、かつ JQ1 処理により発現抑制されることが確認された。

次に我々は、この 6 遺伝子が BRD4 の標的遺伝子であることを確認するための実験を行った。まず HCC 細胞株 HuH-7, HLE, HepG2 を用いて、BRD4 のノックダウンを行い、これらの遺伝子発現が低下することを確認した。さらに ChIP-qPCR 法により、BRD4 がこれらの遺伝子のプロモーターから転写開始点近傍領域に結合することを確認した。以上の結果から、BCAT1, DDR1, FANCD2, GDF15, SENP1, TYRO3 の 6 遺伝子は HCC における新たな BRD4 標的遺伝子であると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Niinuma T, Kitajima H, Kai M, Yamamoto E, Yorozu A, Ishiguro K, Sasaki H, Sudo G, Toyota M, Hatahira T, Maruyama R, Tokino T, Nakase H, Sugai T, Suzuki H.	4. 巻 11
2. 論文標題 UHRF1 depletion and HDAC inhibition reactivate epigenetically silenced genes in colorectal cancer cells.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clin Epigenetics	6. 最初と最後の頁 70
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13148-019-0668-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishiguro K, Kitajima H, Niinuma T, Ishida T, Maruyama R, Ikeda H, Hayashi T, Sasaki H, Wakasugi H, Nishiyama K, Shindo T, Yamamoto E, Kai M, Sasaki Y, Tokino T, Nakase H, Suzuki H.	4. 巻 104
2. 論文標題 DOT1L inhibition blocks multiple myeloma cell proliferation by suppressing IRF4-MYC signaling.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Haematologica	6. 最初と最後の頁 155-165
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3324/haematol.2018.191262	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ishiguro Kazuya, Kitajima Hiroshi, Niinuma Takeshi, Maruyama Reo, Nishiyama Naotaka, Ohtani Hitoshi, Sudo Gota, Toyota Mutsumi, Sasaki Hajime, Yamamoto Eiichiro, Kai Masahiro, Nakase Hiroshi, Suzuki Hiromu	4. 巻 7
2. 論文標題 Dual EZH2 and G9a inhibition suppresses multiple myeloma cell proliferation by regulating the interferon signal and IRF4-MYC axis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41420-020-00400-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------