

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17482

研究課題名（和文）肝臓におけるマルチキナーゼ阻害剤のエピジェネティックな耐性機序の検討

研究課題名（英文）Evaluation of epigenetic resistance mechanisms of a multikinase inhibitor in hepatocellular carcinoma

研究代表者

日下部 裕子（Kusakabe, Yuko）

千葉大学・大学院医学研究院・特任助教

研究者番号：30646708

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：EZH1/2はヒストンH3リジン27をトリメチル化(H3K27me3)することで標的遺伝子の転写を抑制し、発癌に関与すると報告されている。肝臓手術検体を用いた検討では高いH3K27me3レベルは予後不良と相関し、肝臓培養細胞ではEZH1/2阻害が細胞増殖を有意に抑制した。既存の肝臓治療薬であるソラフェニブはAktを介したセリン21でのEZH2リン酸化を抑制してH3K27me3レベルを上昇させ、ソラフェニブとEZH1/2阻害薬の併用は高い抗腫瘍効果を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓癌においてEZH2のみならずEZH1もH3K27me3レベルの上昇を介して癌の進行に重要な役割を担うことが示唆された。またマルチキナーゼ阻害剤であるソラフェニブがH3K27me3レベルを上昇させることで薬剤の耐性に関与する可能性があり、EZH1/2阻害剤とソラフェニブの併用は肝臓癌の新たな治療戦略となる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that EZH1/2 inhibits the transcription of target genes via H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and is involved in carcinogenesis. According to a study that used surgical specimens from patients with hepatocellular carcinoma (HCC), a high H3K27me3 level is associated with a poor prognosis and EZH1/2 inhibition significantly suppresses cell proliferation of liver cancer cells. Sorafenib, an existing agent used to treat liver cancer, inhibits EZH2 phosphorylation at serine 21 via Akt, resulting in an increase in the H3K27me3 level. A combination use of sorafenib and EZH1/2 inhibitors exhibits potent antitumor activity.

研究分野：消化器内科学

キーワード：エピジェネティクス 肝臓癌 ヒストン修飾

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスは DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現の制御機構であり、その異常はがん抑制遺伝子の不活性化や染色体不安定性などを引き起こすことにより発癌メカニズムに密接に関与する。さらに近年では抗癌剤耐性獲得や転移性の獲得にも関与する可能性が報告されており、その可塑性から癌治療のターゲットとして注目されている。

ポリコム群タンパクである EZH1/2 は SET ドメインを有するメチルトランスフェラーゼであり、polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) を形成してヒストン H3 リジン 27 をトリメチル化 (H3K27me3) することで標的遺伝子の転写を抑制する。幹細胞の制御に重要であるとともに、多くの癌で発現が上昇しており、腫瘍の悪性度にも関連することが報告されている。また EZH2 が抗癌剤耐性の獲得にも関与する可能性があることが報告 (Gardner EE, et al. Cancer Cell. 2017 Feb 13; 31(2):286-299.) されており、新規の治療標的となり得ることが示唆される。

### 2. 研究の目的

肝細胞癌における H3K27 トリメチル化異常に着目してその役割を明らかにするとともに、EZH1/2 の治療標的分子としての可能性を探る。さらに既存の肝癌治療薬であるマルチキナーゼ阻害剤投与によるヒストン修飾の変化についても明らかにし、マルチキナーゼ阻害剤と EZH1/2 阻害剤の併用療法の有用性について検証し、肝細胞癌の新たな治療戦略を展開することを目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 肝癌手術検体を用いた臨床病理学的検討

肝癌手術検体を用いて EZH1/2 発現と H3K27me3 レベルを評価し、H3K27me3 レベルによる臨床病理学的特徴の差異について検討した。

#### (2) 肝細胞癌における EZH1、EZH2 の機能解明

肝癌培養細胞で sh-RNA や低分子化合物を用いた loss-of-function assay を行い、その機能を解析した。また肝癌培養細胞の EZH1/2 ノックダウン株を用いて RNA-sequence を行った。

#### (3) ソラフェニブと EZH1/2 阻害剤の併用療法の有用性検証

マルチキナーゼ阻害剤であるソラフェニブ投与による H3K27me3 レベルの変化について検討し、培養系及びマウスのゼノグラフトモデルを用いてソラフェニブと EZH1/2 阻害剤の併用による抗腫瘍効果を検証した。

### 4. 研究成果

#### (1) H3K27me3 レベルの上昇は EZH2 と EZH1 の両者が関与し、予後不良と関連する

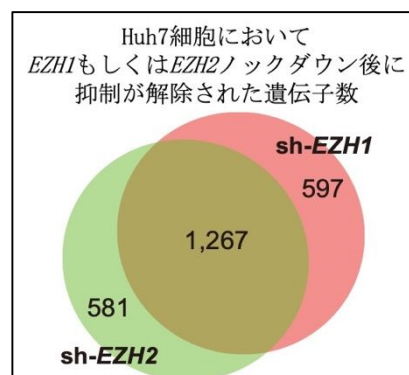
肝癌手術検体を用いた検討では EZH2 発現と H3K27me3 レベルには正の相関がみられたが、一部で H3K27me3 レベルが上昇しているにもかかわらず EZH2 発現の低い症例が認められた。それらの症例では EZH1 発現の上昇や H3K27 脱メチル化酵素である UTX の発現が減少していることが確認された。また H3K27me3 レベルの上昇は無再発生存率が有意に低下しており、予後不良と関連することが示唆された。

#### (2) EZH2 と EZH1 両者の阻害が肝癌培養細胞において高い細胞増殖抑制効果を示した

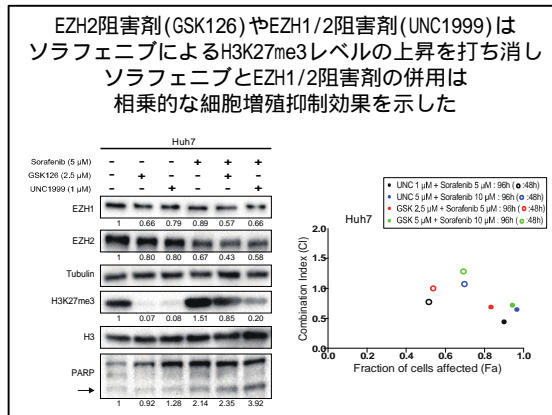
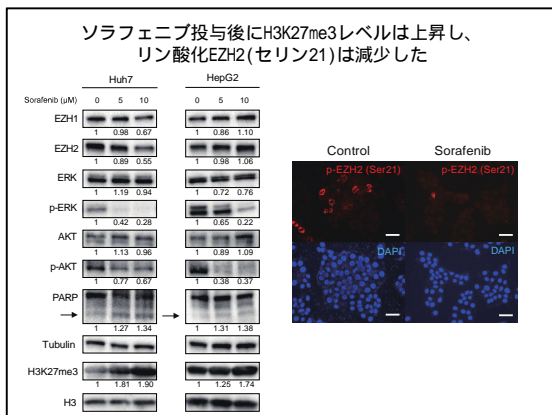
肝癌培養細胞において、sh-RNA や低分子化合物を用いた EZH1/2 阻害は EZH2 単独の阻害に比して細胞増殖を有意に抑制した。肝癌培養細胞の EZH1 もしくは EZH2 ノックダウン株を用いた RNA-sequence では、両者の標的遺伝子は多くが重複するが約 30% は一致せず、両者を阻害することが細胞増殖能を抑制するために重要と考えられた。

#### (3) ソラフェニブは肝癌培養細胞の H3K27me3 レベルを上昇させ、ソラフェニブと EZH1/2 阻害剤の併用は高い抗腫瘍効果を示した

ソラフェニブの投与は肝癌培養細胞において H3K27me3 レベルの増加をもたらした。Akt は EZH2 のセリン 21 をリン酸化することでメチルトランスフェラーゼ活性を失わせることが報告されている (Yamaguchi H, et al. Cancer Res Treat. 2014;46:209-22.)。ソラフェニブ投与で肝癌培養細胞におけるリン酸化 EZH2 の減少が認められ、このような EZH2 の翻訳後修飾がメチル化酵素活性を上昇させ、H3K27me3 レベルが上昇していることが考えられた。ソラフェニブと EZH1/2 阻害剤の併用はソラフェニブによる H3K27me3 レベルの上昇を打ち消し、相乗的な細胞増殖抑制効



果を示した。また NOD/SCID マウスを用いた xenograft モデルにおいて、ソラフェニブと EZH1/2 阻害剤の併用は腫瘍増殖を著明に抑制した。



これらの結果からソラフェニブによる H3K27me3 レベルの上昇は薬剤の耐性に関与する可能性も示唆され、EZH1/2 阻害剤はソラフェニブの抗腫瘍効果を増強し、新規の肝癌治療戦略となる可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Kusakabe Y, Chiba T, Oshima M, Koide S, Rizq O, Aoyama K, Ao J, Kaneko T, Kanzaki H, Kanayama K, Maeda T, Saito T, Nakagawa R, Nakamura M, Ogasawara S, Nakamoto S, Yasui S, Mikata R, Muroyama R, Kanda T, Maruyama H, Kato J, Mimura N, Ma A, Jin J, Zen Y, Otsuka M, Kaneda A, Iwama A, Kato N, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 EZH1/2 inhibition augments the anti-tumor effects of sorafenib in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-00889-0	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 -

1. 著者名 Kanayama K, Chiba T, Oshima M, Kanzaki H, Koide S, Saraya A, Miyagi S, Mimura N, Kusakabe Y, Saito T, Ogasawara S, Suzuki E, Ooka Y, Maruyama H, Iwama At, Kato N	4. 巻 2019
2. 論文標題 Genome-Wide Mapping of Bivalent Histone Modifications in Hepatic Stem/Progenitor Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cells International	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2019/9789240	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 Ao J, Chiba T, Shibata S, Kurosugi A, Qiang N, Ma Y, Kan M, Iwanaga T, Sakuma T, Kanzaki H, Kanayama K, Kojima R, Kusakabe Y, Nakamura M, Saito T, Nakagawa R, Kondo T, Ogasawara S, Suzuki E, Muroyama R, Kato J, Mimura N, Kanda T, Maruyama H, Kato N	4. 巻 549
2. 論文標題 Acquisition of mesenchymal-like phenotypes and overproduction of angiogenic factors in lenvatinib-resistant hepatocellular carcinoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 171~178
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.02.097	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kanzaki H, Chiba T, Ao J, Koroki K, Kanayama K, Maruta S, Maeda T, Kusakabe Y, Kobayashi K, Kanogawa N, Kiyono S, Nakamura M, Kondo T, Saito T, Nakagawa R, Ogasawara S, Suzuki E, Ooka Y, Muroyama R, Nakamoto S, Yasui S, Tawada A, Arai M, Kanda T, Maruyama H, Mimura N, Kato J, Zen Y, Ohtsuka M, Iwama At, Kato N	4. 巻 11
2. 論文標題 The impact of FGF19/FGFR4 signaling inhibition in antitumor activity of multi-kinase inhibitors in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-84117-9	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 日下部裕子、千葉哲博、金山健剛、神崎洋彰、前田隆宏、中村昌人、齊藤朋子、小笠原定久、鈴木英一郎、大岡美彦、中本晋吾、安井伸、三方林太郎、太和田暁之、室山良介、神田達郎、丸山紀史、加藤直也
2. 発表標題 レンパチニブ とエビジェネティック治療薬の併用による肝癌の新規治療法の基礎的検討
3. 学会等名 JDDW 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shima Y, Ogasawara S, Ooka Y, Kobayashi K, Maruta S, Kanzaki H, Kanayama K, Maeda T, Kusakabe Y, Kiyono S, Nakamura M, Saito T, Suzuki E, Nakamoto S, Yasui S, Tawada A, Chiba T, Arai M, Kanda T, Maruyama H, Kato N
2. 発表標題 Post progression survival in patients with intermediate-stage hepatocellularcarcinoma after receiving transarterial chemoembolization
3. 学会等名 THE INTERNATIONAL LIVER CONGRESS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sensui M, Ogasawara S, Ooka Y, Kobayashi K, Maruta S, Kanzaki H, Kanayama K, Maeda T, Kusakabe Y, Kiyono S, Nakamura M, Saito T, Suzuki E, Nakamoto S, Yasui S, Tawada A, Chiba T, Arai M, Kanda T, Maruyama H, Kato N
2. 発表標題 Survival among patients with advanced hepatocellular carcinoma in the pre-TKI versus TKI eras
3. 学会等名 THE INTERNATIONAL LIVER CONGRESS 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金山健剛、千葉哲博、興相慧輔、神崎洋彰、丸田享、日下部裕子、小林和史、清野宗一郎、中村昌人、齊藤朋子、大岡美彦、小笠原定久、近藤孝行、鈴木英一郎、中本晋吾、太和田暁之、室山良介、叶川直哉、加藤順、加藤直也
2. 発表標題 レンパチニブ導入肝細胞癌症例における好中球リンパ球比の予後予測能の検討
3. 学会等名 JDDW 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 強娜, 千葉哲博, 敖俊杰, 小川慶太, 岩永光巨, 菅元泰, 佐久間崇文, 兒島隆太, 金山健剛, 神崎洋彰, 日下部裕子, 齊藤朋子, 中村昌人, 近藤孝行, 小笠原定久, 中本晋吾, 中川良, 室山良介, 加藤直也
2. 発表標題 血清Angiopoietin 2の肝細胞癌新規バイオマーカーとしての有用性
3. 学会等名 JDDW 2021
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------