

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：32612  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2012～2014  
 課題番号：24590993  
 研究課題名(和文) 肝臓におけるエピゲノム変化の解析とヒストンアセチル化を標的とした新規治療の探索  
  
 研究課題名(英文) Analysis of epigenetic changes in hepatocellular carcinoma and an investigation for a new therapeutic modality targeting histone acetylation  
  
 研究代表者  
 齋藤 英胤 (Saito, Hidetsugu)  
  
 慶應義塾大学・薬学部・教授  
  
 研究者番号：80186949  
  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌及びウイルス感染を含むその原因に対する新たな治療としてエピゲノム変化のうちヒストン修飾変化の可能性を探索することを目的とした。C型肝炎ウイルス(HCV)を感染した肝臓細胞株に対して、ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬(HDACi) SAHAは、宿主細胞遺伝子発現変化を介してHCV増殖抑制効果を示し、EZH2の阻害作用により細胞増殖を抑制するものと考えられた。HCV持続感染にはNrf2遺伝子発現が重要で、HCVや細胞増殖にはNrf2, EZH2, miR-122の相互作用により影響されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate a new therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma (HCC) and viral infection using epigenetic changes especially by the histone modifier. Cell lines infected with hepatitis C virus (HCV) or replicons were used in this study. Histone deacetylase inhibitor (HDACi), SAHA, inhibited HCV replication by changing host cellular gene expressions as well as decreasing cellular proliferation by inhibiting EZH2 expression. Nrf2 expression was important for long-term HCV infection in the cell line, and expression levels of Nrf2, EZH2 and miR-122 mutually affect proliferation of cells and also HCV.

研究分野：消化器内科学

キーワード：エピゲノム変化 H2 培養細胞株 ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 microRNA C型肝炎ウイルス 肝細胞癌 Nrf2 EZ

1. 研究開始当初の背景

細胞のエピゲノム変化は、遺伝子変異に加えて環境刺激に速やかに対応すべく、ヒトでも循環的な転写調節の基礎となっている。特に癌では、タンパク質リン酸化異常などと並び、タンパク質のアセチル化は重要な調節機構であり、発癌と関連が深い。一部の癌ではヒストン脱アセチル化 (HDAC) 阻害薬 (HDACi) の臨床応用がされているが (Minucci S, et al. Nat Rev Cancer 2006;6:38)、肝癌においては不明である。

我々は、これまで肝癌における p16 プロモーターメチル化異常、DNA メチル化酵素の発現と肝発癌の関連 (Saito Y, et al. Int J Cancer 2003;105:527)、DNA メチル化酵素の抑制による癌細胞死 (Kurita S, et al. Cancer Sci 2010; 101:1431) や、肝癌細胞におけるヒストンタンパクの修飾を検討し、HDACi の抗癌作用には大きな期待が持てることを報告してきた (Saito H, et al. Int J Cancer 1991;48:291 以降)。一方クラス III に属する HDAC である Sir2 を活性化する薬物により肝脂肪化の改善がみられ、これが抗酸化活性によるものであること、しかしながら HCV-RNA の増殖を助長することを発見した (Nakamura M, et al. World J Gastroenterol 2010;16:184)。特に肝癌細胞に対する作用としては、癌遺伝子発現、アポトーシス制御、テロメラーゼ制御、細胞周期制御など多方面で抗癌作用を持つことを報告してきた (Saito H, et al. Hepatology 1998; 27: 1233, Masuda T, et al. In Vitro Cell Develop Biol 2000; 36: 387, Nakamura M, et al. J Cell Biochem 2001; 187: 392 等)。この際検討した薬物はクラス I の HDACi でも活性の弱い sodium butyrate であったため、最近、活性の強い tricostatin A (TSA) の肝癌細胞に対する作用を検討した。その過程で、特定の癌抑制遺伝子発現が、増殖抑制と一致して発現増強することを見いだした。また強力な HDACi で TSA と同様のヒドロキサム酸に属する薬物 suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA; ゴリンザ®) が臨床現場に登場したが、肝癌に対する作用は全く不明である。

DNA メチル化とヒストン修飾には深い関連があることがわかっている。5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA) は DNA メチルトランスフェラーゼの強力な阻害剤であるが、TSA との併用で、MLH1, TIMP3, maspin, gelsolin など主要な因子の転写が回復して抗癌作用がもたらされる。このように DNA メチル化酵素とヒストン修飾による癌抑制遺伝子発現の回復も、我々の検討した TSA の作用と同様、抗癌作用にとっては大きな正の要素である。さらに近年、肝脂肪化と肝発癌に深い関わりを持つ RAR $\alpha$  は、HDAC 複合体を動員して転写を抑制することがわかり、retinoic acid が HDAC のかわりにヒストンに結合することで、RAR $\alpha$  の転写抑制を解除する機序も解明されつつある。

以上のように、ヒストン修飾には期待され

る抗癌活性があるが、肝発癌の危険因子である肝脂肪化とも深い関連があることが理解される。またさらに、我々が検討したように NAD 依存的なヒストン脱アセチル化は HCV 増殖に負の影響を持つことから、HDACi には、HCV RNA に対する大きな影響が予想される。

一方エピジェネティックな変化は、細胞分化過程で特徴的に発揮され、癌細胞の分化誘導と相同するところがあり、実質-間質の相互変換にも関連し、アポトーシスと並行してオートファジーも生ずることが予想される。しかし、これらすべての過程がヒストン修飾によりどのように変化しているかは、肝癌において全く不明である。

2. 研究の目的

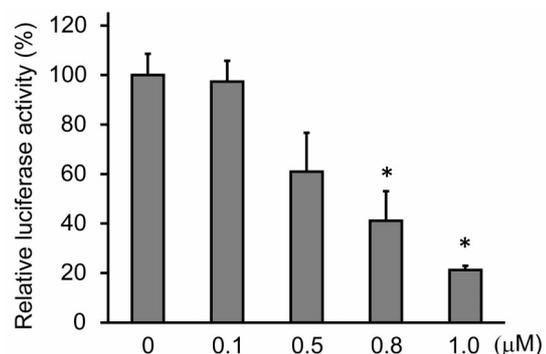
本研究では、これまでの研究結果に基づいて、肝癌に対する DNA 脱メチル化、ヒストン修飾による治療法の開発を目指して、肝癌細胞を対象にしてウイルス、脂肪化を含め、エピゲノムの作用を包括的に検討することとした。そのために、エピゲノム変化をきたすヒストンアセチル化酵素阻害薬 (HDAC inhibitor) に焦点を絞り、ウイルス増殖に対する作用とがん細胞増殖に対する作用を検討し、そのエピゲノム調節機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

肝癌細胞と HCV レプリコン細胞を対象にして、主に (1) 細胞のフェノタイプ変化 (2) 酵素化学的解析 (3) 標的遺伝子のヒストン化学修飾の解析 (4) ゲノム変化の解析 に分けて研究を進める。

4. 研究成果

(1) ウイルス増殖の検討は、C型肝炎ウイルス (HCV) ゲノム (RNA) を含み RNA 増幅が恒常的に行われるレプリコン細胞株 OR6 を用いた。HDACi としてスペロイルアニリドヒドロキサム酸 (SAHA) を使い、OR6 細胞への添加培養による変化を検討した。HCV RNA の増幅は SAHA 添加により有意に減少した。細胞増殖との関連については、1  $\mu$ M 以下の濃度では、細胞増殖に影響せずに RNA 増幅のみが抑制された (図: 縦軸はウイルス量を示し、横軸は添加した SAHA の濃度を示す)。



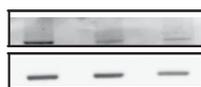
すなわち HDAC inhibitor は HCV RNA 増幅を抑制することが明らかとなった。近年、HCV

RNAの増幅は肝臓特異的に発現する micro RNAであるmiR-122の発現と正の相関があることが報告され、miR-122がHCV RNAの翻訳開始部位であるIRESに直接作用することがわかっている。そのため、SAHA添加によるmiR-122発現の変化を検討したが、miR-122の関与は無いことが明らかになった。これらの作用はSAHA以外のHDACiであるTSAでも同様に認められた。

(2) SAHA添加による細胞内mRNA発現変化を網羅的に検討し、osteopontin (OPN) (7.43倍発現上昇)とApolipoprotein A (Apo-A1) (0.25倍発現低下)に注目した。これらの発現はSAHAによりそれぞれ8.6倍、0.39倍に変化しており、それぞれのプロモーター領域のアセチル化が免疫沈降法(ChIP assay)により確認された。OR6以外の肝がん細胞に対してのSAHAは増殖抑制効果を発揮しアポトーシスの亢進が認められた。

(3) ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬SAHAのHCV RNA増幅抑制効果をレプリコン細胞OR6以外で検討した結果、AH1R細胞やHCV JFH株(脇田ら)をHuh7.5細胞に導入した細胞においてもOR6同様、細胞障害を認めない濃度でHCV増殖抑制が認められた。しかし、他のORL6, ORL11細胞では細胞障害が強く、細胞障害を認めない濃度でのHCV増幅抑制効果はみられず、レプリコン産生細胞株によってSAHAの作用が異なることがわかった。

(4) SAHAの癌細胞株HepG2に対する効果をアレイにて検討し、SAHAが、癌細胞の維持に必要で発現亢進しているEZH2 (enhancer of zeste homologue 2) 発現を強力に抑制することを発見した。



Cont SAHA DZNep

上からEZH2、 $\beta$ -actinのWB

マイクロアレイの検討にて、これがmiR-1246, miR-302aの発現亢進によるものであることを明らかにした。さらにこれらmiRNAの標的遺伝子であるDYRK1A, CDK2, BMI-1, Girdin発現がSAHA添加により低下し、癌細胞にアポトーシス、細胞周期停止、遊走能低下をきたした。ChIPアッセイを行ない、EZH2がこれらmicroRNAのプロモーター領域へ結合する現象をSAHAが抑制することを確認した。杉山和夫博士の樹立したHCV持続感染細胞HPIでは、細胞障害作用が強く、HCV増殖抑制効果を見ることはできなかった。以上から、SAHAのHCV増殖抑制作用と癌細胞障害活性のバランスは、細胞のEZH2の発現に左右されることが推定された。

(5) メトボローム解析の結果、HPI細胞では、HCVの持続産生を得るためにエネルギー産生が豊富で脂質代謝が亢進し、さらに活性酸素種に耐性を獲得するNrf2の発現が亢進していた。

(6) こうした変化がin vivoでも認められる

かを検討するために、マウスを用いた動物モデルを構築することとした。臨床的には、脂肪性肝障害からの発癌が増加しており将来的に重要な問題を含むため、ウイルス発癌との対比をする意味から、脂肪性肝障害-発癌モデルを検討した。一つは、胎生期に膵 $\beta$ 細胞を破壊して飼育したSTAM<sup>®</sup>マウスとし、もう一つは、高脂肪食を与え脂肪性肝炎から発癌するモデルを作成しつつある。STAMマウスでは肝硬変から発癌する過程でmiR-122発現が減弱することを見出した。また高脂肪食による脂肪性肝障害マウスでは、腸内細菌叢の変化、胆汁酸、脂肪酸素性の変化が肝内慢性炎症の惹起に重要な因子であることが判明した。

## 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11件)

1. Takaki Y, Saito Y, Takasugi A, Toshimitsu K, Yamada S, Muramatsu T, Kimura M, Sugiyama K, Suzuki H, Arai E, Ojima H, Kanai Y, Saito H. Silencing of microRNA-122 is an early event during hepatocarcinogenesis from nonalcoholic steatohepatitis. *Cancer Sci* 2014; 105(10): 1254-60. (査読有)
2. Hibino S, Saito Y, Muramatsu T, Otani A, Kasai Y, Kimura M, Saito H. Inhibitors of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) activate tumor-suppressor microRNAs in human cancer cells. *Oncogenesis* 2014;3:e104. doi:10.1038/oncsis.2014.17 (査読有)
3. Sugiyama K, Ebinuma H, Nakamoto N, Sakasegawa N, Murakami Y, Chu PS, Usui S, Ishibashi Y, Wakayama Y, Taniki N, Murata H, Saito Y, Fukasawa M, Saito K, Yamagishi Y, Wakita T, Takaku H, Hibi T, Saito H, Kanai T. Prominent steatosis with hypermetabolism of the cell line permissive for years of infection with hepatitis C virus. *PLoS One* 2014 Apr 9 ;9(4) :e94460. doi: 10.1371/journal.pone.0094460. (査読有)
4. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, Usui S, Furuhashi H, Kimura A, Nishiyama K, Maejima T, Okada Y, Kurihara C, Shimamura K, Ebinuma H, Saito H, Yokoyama Y, Watanabe C, Komoto S, Nagao S, Sugiyama K, Aosasa S, Hatsuse K, Yamamoto J, Hibi K, Miura S, Hokari R, Kanai T. Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase a mediates liver fibrosis by regulating free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells. *J Hepatol* 2014; 61(1):98-106. (査読有)
5. Saito Y, Saito H, Liang G-N, Friedman JM. Epigenetic alterations and microRNA misexpression in cancer and autoimmune

- diseases: a critical review. *Clinic Rev Allerg Immunol* 2014; 47(2): 128-35. doi: 10.1007/s12016-013-8401-z (査読有)
6. Saito Y, Hibino S, Saito H. Alterations of epigenetics and microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2014; 44(1): 31-42. (査読有)
  7. Tomita K, Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Narimatsu K, Okada Y, Kurihara C, Irie R, Yokoyama H, Shimamura K, Usui S, Ebinuma H, Saito H, Watanabe C, Komoto S, Kawaguchi A, Nagao S, Sugiyama K, Hokari R, Kanai T, Miura S, Hibi T. Free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells: Mechanism of liver fibrosis aggravation in nonalcoholic steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2014; 59(1): 154-69. (査読有)
  8. 正木尚彦, 齋藤英胤, 朝比奈靖浩. ウイルス肝炎はまだなくなる。成人病と生活習慣病 43(11), 1287-1304, 2013. (査読無)
  9. Sato A, Saito Y, Sugiyama K, Sakasegawa N, Muramatsu T, Fukuda S, Yoneya M, Kimura M, Ebinuma H, Hibi T, Saito H. Suppressive effect of the histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), on hepatitis C virus replication via epigenetic changes in host cells. *J Cell Biochem*. 2013; 114(9):1987-96. (査読有)
  10. Saito Y, Saito H. MicroRNAs in cancers and neurodegenerative disorders. *Front Genet* 2012;3:194. (査読有)
  11. Saito Y, Saito H. Role of CTCF in the regulation of microRNA expression. *Front Genet* 2012;3:186. (査読有)

〔学会発表〕(計16件)

1. Saito H, Takaki Y, Takasugi A, Yamada S, Muramatsu T, Kimura M, Sugiyama K, Suzuki H, Kanai Y, Saito Y. Decrease of microRNA-122 is a key event during hepatocarcinogenesis from non-alcoholic steatohepatitis. 2015 Annual Meeting of American Association for Cancer Research. 4/21/2015 Philadelphia, PA, USA.
2. 齋藤義正, 鈴木秀和, 齋藤英胤. 腸管腫瘍由来幹細胞に対する DNA メチル化阻害薬の効果. シンポジウム「消化管癌の分子病態学に関する進歩」第100回日本消化器病学会総会 4/23-26/2014 東京.
3. 酒瀬川典子, 杉山和夫, 海老沼浩利, 中本伸宏, 村上優子, 齋藤英胤, 金井隆典. HCV 感染細胞における転写因子 Nrf2 によって制御される遺伝子群の発現解析. 第61回日本ウイルス学会学術集会 11/10-12/2013 神戸.
4. 齋藤義正, 高杉 梓, 齋藤英胤. NASH-肝発がんモデルにおけるマイクロRNA発現の網羅的解析と新規治療への応用. シンポジウム「NASH 肝癌の発がんメカニ

ズム解明と治療への応用」10/9-12/2013 東京.

5. 杉山和夫, 齋藤英胤, 日比紀文. メタボローム・トランスクリプトーム統合的解析による C 型肝炎肝脂肪蓄積の機構解明. シンポジウム「消化器疾患と栄養代謝ネットワークー基礎から臨床までー」10/9-12/2013 東京.
6. 日比野沙奈, 齋藤義正, 村松俊英, 大谷亜希, 笠井雄佑, 植木里美, 山田翔士, 木村真規, 齋藤英胤. ヒストン修飾酵素によるマイクロRNAを介した抗がん作用の検討. 第72回日本癌学会学術総会 10/3-5/2013 横浜.
7. 高木陽子, 齋藤義正, 高杉 梓, 甲 浩子, 植木里美, 山田翔士, 村松俊英, 木村真規, 齋藤英胤. NASH 肝発がんモデルにおけるマイクロRNA発現の網羅的解析と新規治療への応用. 第72回日本癌学会学術総会 10/3-5/2013 横浜.
8. 杉山和夫, 海老沼浩利, 酒瀬川典子, 齋藤義正, 金井隆典, 日比紀文, 齋藤英胤. Nrf2/sMaf 転写因子複合体は HCV による肝細胞脂肪蓄積に関与する. 第72回日本癌学会学術総会 10/3-5/2013 横浜.
9. 齋藤英胤, 齋藤義正, 杉山和夫. Epigenetics 作用薬を用いた C 型肝炎ウイルスの制御: ヒストン脱アセチル化阻害薬の有用性. 第49回日本肝臓学会総会 6/6-7/2013 東京.
10. 日比野沙奈, 齋藤義正, 村松俊英, 大谷亜希, 笠井雄佑, 植木里美, 山田翔士, 木村真規, 齋藤英胤. がん細胞に対する DZNep および SAHA の投与によるマイクロRNA発現変化の網羅的検討. 日本薬学会第133年会 3/27-30/2013 横浜.
11. Saito H, Genka A, Fukuda S, Nagami S, Muramatsu T, Saito Y, Sugiyama K. Double-effect therapeutic strategy using a histone deacetylase inhibitor for HCV-associated hepatocellular carcinoma. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 3/24-28/2013 Amsterdam.
12. Teratani T, Suzuki T, Shimizu M, Sato H, Okada Y, Kurihara C, Yokoyama H, Irie R, Ebinuma H, Saito H, Watanabe C, Komoto S, Hokari R, Kawaguchi A, Nagao S, Sugiyama K, Kanai T, Hibi T, Miura S. The characteristic mechanisms of free cholesterol accumulation in hepatic stellate cells aggravate liver fibrosis in nonalcoholic steatohepatitis in mice. 48th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver. 3/24-28/2013 Amsterdam.
13. 杉山和夫, 齋藤英胤, 日比紀文. C 型肝炎ウイルス持続感染培養肝細胞の樹立と応用. シンポジウム「HCV 研究; 私の研究と Serendipity」第39回日本肝臓学会東部会 12/6-7/2012, 東京.

14. Sugiyama K, Saito H, Ebinuma H, Sakasegawa N, Murakami Y, Nakamoto N, Usui S, Ishibashi Y, Chu P-S, Wakayama Y, Saito Y, Kanai T, Hibi T. Usefulness of long-term (over 2 years) cultured cell clone persistently and productively infected with chimeric HCV. 63th Annual Meeting of AASLD 11/9-13/2012, Boston, USA.
15. 佐藤郁美、齋藤義正、永見早耶花、酒瀬川典子、福田真也、木村真規、杉山和夫、海老沼浩利、齋藤英胤 . ヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) による C 型肝炎ウイルス (HCV) の増殖抑制効果 . 第 48 回日本肝臓学会総会 6/7-8/2012 金沢 .
16. 杉山和夫、齋藤英胤、酒瀬川典子、村上優子、海老沼浩利、中本伸宏、梅田瑠美子、碓井真吾、石橋由佳、楮 柏松、若山遊子、齋藤義正、日比紀文 . 新たな HCV 研究ツールとしての HCV 持続感染培養肝細胞およびその治癒細胞の樹立 . 第 48 回日本肝臓学会総会 6/7-8/2012 金沢 .

〔その他〕

ホームページ等

慶應義塾大学 薬学部・薬学研究科 研究

研究室紹介 薬物治療学

<http://www.pha.keio.ac.jp/research/pt/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

齋藤英胤 (Saito, Hidetsugu)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：80186949

### (3)連携研究者

増野匡彦 (Mashino, Tadahiko)

慶應義塾大学・薬学部・教授

研究者番号：90165697

齋藤義正 (Saito, Yoshimasa)

慶應義塾大学・薬学部・准教授

研究者番号：90360114