

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591006

研究課題名(和文)胆道がんの分子標的治療を目指した包括的ゲノム解析の応用

研究課題名(英文) Application of genome informatics for the molecular targeting therapy against cholangiocarcinoma

研究代表者

木暮 宏史 (Kogure, Hirofumi)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60568921

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)：胆道がんの発生においては、高率で特異的に存在する遺伝子異常がまだ明らかにはなっていない。このことは遺伝子変異による胆道がんのスクリーニングを困難にするばかりが、胆道がんに対する有効な分子標的薬の開発にも大きなデメリットとなっている。がんの発生・進展においては、ゲノムのみならずエピゲノムの異常を介した遺伝子発現変化の重要性が注目を集めつつあるが、胆道がんにおけるその関与には不明な点が多い。本研究では胆道がんにおいてみられるゲノムおよびエピゲノム異常について、その意義を検討する。

研究成果の概要(英文)：Recent reports have documented gene mutations found in cholangiocellular carcinoma by comprehensive genomic analysis, however it remains unknown whether or how the mutations contribute to malignant features of cholangiocarcinoma. The status of epigenome as well as genome is suspected as the significant factor for tumor characteristics. In this research, we address the role of alteration of genome and epigenome in cholangiocarcinoma.

研究分野：消化器内科学

キーワード：胆道癌 ヒストン修飾

## 1. 研究開始当初の背景

### **胆道がん細胞の様々な形質におけるゲノム・エピゲノム制御機構およびその異常の意義は十分には明らかにされていない。**

胆道がんは5年生存率10%と予後不良な疾患である。根治的切除後の再発例も多く、切除不能例に対する化学療法の効果も乏しい。しかしながらその病態にはまだまだ明らかにすべき点が多い。

胆道がんの発生においては、大腸がんにおける *APC-βcatenin* 遺伝子の異常、膵がんにおける *Kras* 遺伝子の異常のような、高率で特異的に存在する遺伝子異常がまだ明らかにはなっていない。このことは遺伝子変異による胆道がんのスクリーニングを困難にするばかりか、胆道がんに対する有効な分子標的薬の開発にも大きなデメリットとなっている。近年、次世代シーケンシングによって、胆道がん、特に肝内胆道がんにおいて、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) 遺伝子が高頻度に変異していることが明らかとなった。IDHは細胞内 (IDH1) 或はミトコンドリア内 (IDH2) のイソクエン酸を還元し  $\alpha$  ケトグルタル酸 ( $\alpha$ KG) を産生する酵素である。細胞内には様々な  $\alpha$ KG 依存性脱水素酵素が存在し、その中にはDNAやヒストンの脱メチル化に働く酵素 (TET, JMJ family)、低酸素下での血管新生・腫瘍増殖に働く *HIF1 $\alpha$*  の分解に関係する酵素 (EGLN) などがある。IDH 遺伝子に変異が起こると、 $\alpha$ KG から新たに2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) が産生され、2-HG により前述の酵素活性が阻害される。その結果、細胞内のエネルギー代謝に影響するだけでなく、エピジェネティックな遺伝子発現制御や血管新生にも影響を及ぼすと考えられている。

そのエピジェネティックな変化は遺伝子変異同様、発癌および癌の進展に重要であることが明らかにされている。DNAはヒストン多量体に巻きつく形でヌクレオソームを形成し、クロマチンの基本構造となる。そのヒストンのN末端側はメチル化、アセチル化、ユビキチン化、リン酸化といった翻訳後修飾を受けることが知られている。この epigenetic system による転写制御機構については2006年にヒストン脱メチル化酵素の発見という大きなブレイクスルーがあり、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化からなるヒストンの主たる翻訳後修飾のすべてが可逆性であることが示された。転写にかかわるヌクレオソームの動的な構造変化はこのヒストン修飾の変化によっても影響を受けるため、同時にヒストン修飾の変化もクロマチン構造を通して遺伝子発現に影響を及ぼすといえる。よって epigenetic な遺伝子発現制

御はDNAメチル化のみならずこの可逆的なヒストン修飾パターンが重要であることが明らかになってきた。逆に多様なヒストン修飾の変化による遺伝子発現の変化が、複雑な細胞応答の一手段なのであるとすれば、DNAメチル化異常のみならずヒストン修飾機構の破綻も癌細胞の多様な形質に寄与する可能性が推測される。

### **なぜ核内ヒストン修飾調節が、がんにおいて重要であるのか**

分担者である立石は過去の論文で、ヒストンH3の27番目リジンのメチル化に結合するポリコム複合体の構成因子 *Bmi1* が、消化器前がん病変の悪性度に比例してその発現量を増していくことを報告した (Tateishi et al. Clin.Cancer.Res. 2006;12(23):6960-6.)。また *JARID1b* がH3の4番目リジンの脱メチル化酵素であると明らかにするとともに、その分子と乳がん細胞の増殖との関連を報告した (Yamane, et al. Mol Cell 2007;25(6):801-12.)。またがんに限らず肥満及びエネルギー代謝においてH3の9番目リジンの脱メチル化酵素が重要であることを報告し (Tateishi et al. Nature 2009;458(7239):757-61) 様々な細胞系譜におけるヒストン可逆性の意義についても発表してきた (Okada et al. J.Androl 2010;31(1):75-8.)。本来、がんは不均一で多様な細胞集団であるといわれている。昨今、がん組織中の“がん幹細胞”の可能性が提唱されているが、これもがん細胞の heterogeneity から発した概念と想像される。例えば治療抵抗性を引き起こす細胞群に“がん幹細胞性”が関与する、という考えもそのひとつであろう (J Clin Invest. 2010;120(1):41)。面白いことに、がん細胞集団中の抗がん剤抵抗性クローンの維持にヒストン脱メチル化酵素 *RBP2* が重要な役割を持つと報告 (Cell 2010;141(1):69) され、また *H3K4* 脱メチル化酵素 *JARID1b* の発現の不均一性がメラノーマの腫瘍形成能に関与する報告もなされた。同時にこの数年間にヒストン修飾因子群のがんにおける変異が次々に報告された (Nat.Rev.Cancer 2010;10:457)。*JARID1b* が前立腺癌・乳癌で過剰発現し、*H3K27* メチル化酵素である *EZH2* の体細胞変異は follicular lymphoma および diffuse B cell lymphoma に関与する。同時に *EZH2* は前立腺癌・乳癌を含めた様々な癌でしばしば過剰発現している。*H3K36* メチル化酵素 *SETD2*、*H3-K4* 脱メチル化酵素 *JARID1c*、*H3-K27* 脱メチル化酵素 *UTX* 等の遺伝子の不活化変異も腎癌で見出された。さらには転座や増幅、LOHなども様々な癌で報告され、食道がんでは *KDM4C* の遺伝子増幅が認められる。これらの知見はいずれも、ヒストン修飾調節の破綻ががん細胞の特性に

関わる可能性を強く示唆するものである。同時に癌における”エピゲノム遺伝子のゲノム異常”の重要性もますます明らかになるであろう。

## 2. 研究の目的

本研究では胆道がんにおいてみられるゲノムおよびエピゲノム異常について、胆道がんにおける意義を検討する。

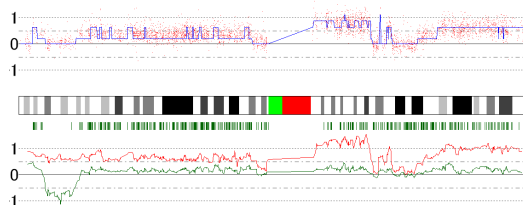
## 3. 研究の方法

(1). 高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて、胆道がんにおいて新規に増幅および欠失あるいは LOH を認める染色体領域を探索する。アレイは Affymetrix GeneChip Mapping 50 K Array を使用した。細胞から QIAamp DNA Mini Kit にて抽出した DNA を二種類の制限酵素で処理し、アダプターを付加した後に PCR にて増幅した。DNaseI にて 250-2000bp まで断片化したのちにラベリングシアレイにハイブリダイズした。データは隠れマルコフモデルを用いて、CNAG ソフトウェアパッケージにて解析を行った。SNP および遺伝子のアライメントは UCSC genome browser を用い、International Human Genome Sequencing Consortium によって作成されたヒトゲノムシークエンスをレファレンスに用いた。

(2). 異常の見られた染色体領域・遺伝子、とくにエピジェネティクスに関わる可能性のあるものについては、細胞株を用いた過剰発現あるいはノックダウン実験を行って胆道がんにおける役割を検討する。

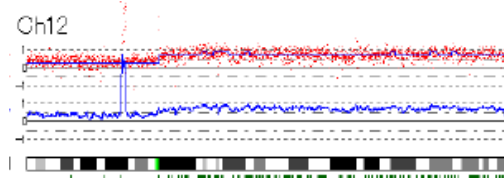
## 4. 研究成果

(1). 癌細胞のゲノムでは、特定の遺伝子領域で増幅や欠失が起こることが知られている。近年、大規模 SNP タイピングを目的として開発された高密度オリゴヌクレオチドアレイが、染色体コピー数変化および LOH を同時に解析できるということが知られている(下図・例)。



そこで、当研究室ではこのアレイを用いて膵癌および肝癌をはじめとする消化器癌細胞株のゲノム異常の網羅的解析を行ってきた (Oncology. 2008;75(1-2):102-12. J.Hepatol.2008 Nov;49(5):746-57 )

今回は胆道がんについて同様の解析を行い、胆道がんにおいて新規に増幅および欠失あるいは LOH を認める染色体領域を探索した。



上の例のように、肝内胆管がん細胞においていくつかの遺伝子増幅領域を見出した。現在、それらの遺伝子異常についてヒト検体をも用いて引き続き validation を行っている。

b. また一方で、報告されている ARID1A, IDH1 などエピジェネティクス修飾に関わる遺伝子異常についてはその変異遺伝子を細胞に導入、あるいはノックダウンし、表現型の評価を行っている。具体的には増殖能、遊走能、浸潤能などの *in vitro* 解析およびマウス皮下移植による *in vivo* 解析が進行中である。

## 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 76 編 すべて査読あり)

1. Kogure H, Isayama H, Nakai Y, Tsujino T, Matsubara S, Yashima Y, Ito Y, Hamada T, Takahara N, Miyabayashi K, Mizuno S, Mohri D, Kawakubo K, Sasaki T, Yamamoto N, Hirano K, Sasahira N, Tada M, Koike K. High single-session success rate of endoscopic bilateral stent-in-stent placement with modified large cell Niti-S stents for malignant hilar biliary obstruction. Dig Endosc. 2014Jan;26(1):93-9.
2. Kogure H, Tsujino T, Isayama H, Takahara N, Uchino R, Hamada T, Miyabayashi K, Mizuno S, Mohri D, Yashima Y, Kawakubo K, Sasaki T, Yamamoto N, Nakai Y, Hirano K, Sasahira N, Tada M, Koike K. Short- and long-term outcomes of endoscopic papillary large balloon dilation with or without sphincterotomy for removal of large bile duct stones. Scand J Gastroenterol. 2014 Jan;49(1):121-8.
3. Yamamoto K, Tateishi K, Kudo Y, Sato T, Yamamoto S, Miyabayashi K, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Nakai Y, Isayama H, Ikenoue T, Kurokawa M, Fukayama M, Kokudo N, Omata M and Koike K. Loss of histone demethylase KDM6B enhances aggressiveness of pancreatic cancer through downregulation of C/EBP $\alpha$ . Carcinogenesis. 2014 Nov;35(11):2404-14

4. Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y, Ichimura T, Ushiku T, Funahashi S, Tateishi K, Wada I, Shimizu N, Nomura S, Koike K, Seto Y, Fukayama M, Aburatani H, Ishikawa S. Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nat Genet.* 2014 Jun;46(6):583-7.
5. Yamamoto S, Tateishi K, Kudo Y, Yamamoto K, Isagawa T, Nagae G, Nakatsuka T, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Aburatani H, Omata M, Koike K. Histone demethylase KDM4C regulates sphere formation by mediating the cross talk between Wnt and Notch pathways in colonic cancer cells. *Carcinogenesis.* 2013 Oct;34(10):2380-8.
6. Kudo Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Asaoka Y, Ijichi H, Nagae G, Yoshida H, Aburatani H, Koike K. Loss of 5-hydroxymethylcytosine is accompanied with malignant cellular transformation. *Cancer Sci.* 2012 Apr;103(4):670-6.
7. Miyabayashi K, Ijichi H, Mohri D, Tada M, Yamamoto K, Asaoka Y, Ikenoue T, Tateishi K, Nakai Y, Isayama H, Morishita Y, Omata M, Moses HL, Koike K. Erlotinib prolongs survival in pancreatic cancer by blocking gemcitabine-induced MAPK signals. *Cancer Res.* 2013 Apr 1;73(7):2221-34.

〔学会発表〕(計8件)

1. 毛利大, 佐々木隆, 伊佐山浩通, 高原楠昊, 濱田毅, 宮林弘至, 木暮宏史, 山本夏代, 中井陽介, 平野賢二, 伊地知秀明, 立石敬介, 多田稔, 小池和彦 第22回日本消化器関連学会週間2014/10/23-26 神戸胆嚢癌化学療法における内臓脂肪の臨床的意義
2. 中塚拓馬, 立石敬介, 工藤洋太郎, 山本恵介, 高橋良太, 宮林弘至, 浅岡良成, 田中康雄, 伊地知秀明, 加藤雅紀, 眞貝洋一, 油谷浩幸, 小池和彦 第73回日本癌学会学術総会 シンポジウム がん治療とがん予防を目指す動物モデル 口演 2014/09/27 横浜 Role of histone demethylase Kdm3a in liver tumorigenesis
3. 工藤洋太郎, 立石敬介, 永江玄太, 中塚拓馬, 山本恵介, 浅岡良成, 田中康雄, 池上恒雄, 白井聖一, 米沢理人, 関元昭, 油谷浩幸, 小池和彦 第73回日本癌学会学術総会 2014/09/25 横浜 TET1 regulates proper mitotic process in cancer cell.
4. 山本恵介, 立石敬介, 工藤洋太郎, 佐藤智彦, 松坂恵介, 山本信三, 宮林弘至, 浅岡良成, 伊地知秀明, 中井陽介, 伊佐山浩通, 池上恒雄, 黒川峰夫, 深山正久, 國土典宏, 小俣政男, 小池和彦 第45回日本膵臓学会大会 2014/7/11-12 小倉七

ストン脱メチル化酵素 KDM6B の発現低下は CEBPA の発現低下を介し膵癌の進展を促進する

5. 山本信三, 立石敬介, 工藤洋太郎, 山本恵介, 砂河孝行, 永江玄太, 中塚拓馬, 浅岡良成, 伊地知秀明, 小俣政男, 油谷浩幸, 小池和彦 第72回日本癌学会学術総会 大腸がんの悪性メカニズムの解明 口演 2013/10/4(3-5) 横浜 JHDM3C regulates sphere formation by mediating the crosstalk between Wnt and Notch pathways ヒストン修飾酵素 JHDM3C は Wnt-Notch シグナルのメデイエーターとして大腸腫瘍形成能を制御する
6. 宮林弘至, 伊地知秀明, 毛利大, 多田素久, 山本恵介, 浅岡良成, 池上恒雄, 立石敬介, 中井陽介, 伊佐山浩通, 多田稔, 小池和彦 第50回日本臨床分子医学会学術総会 2013/4/12-13 東京国際フォーラム 膵発癌モデルマウスを用いた Gemcitabine と Erlotinib 併用療法の効果とメカニズムの検討
7. 山本恵介, 立石敬介, 工藤洋太郎, 山本信三, 宮林弘至, 浅岡良成, 伊地知秀明, 池上恒雄, 佐藤智彦, 黒川峰夫, 小俣政男, 小池和彦 第50回日本臨床分子医学会学術総会 2013/4/12-13 東京国際フォーラム ヒストン脱メチル化酵素 JMJD3 の発現低下は膵癌の進展を促進する
8. 工藤洋太郎, 立石敬介, 山本恵介, 山本信三, 浅岡良成, 伊地知秀明, 池上恒雄, 白井聖一, 永江玄太, 吉田晴彦, 油谷浩幸, 小池和彦 第50回日本臨床分子医学会学術総会 2013/4/12-13 東京国際フォーラム 悪性形質転換における DNA 脱メチル化反応中間体ヒドロキシメチル化シトシンの検討

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木暮 宏史 (KOGURE, Hirofumi)  
東京大学医学部附属病院・助教  
研究者番号: 60568921

(2) 研究分担者

立石 敬介 (TATEISHI, Keisuke)  
東京大学医学部附属病院・講師

研究者番号: 20396948

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: