

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：87102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460382

研究課題名(和文) ヒストンメチル化酵素PR-set7の関わる細胞機能と発癌の解析

研究課題名(英文) Function of histone methyltransferase PR-set7 and its relationship to carcinogenesis

研究代表者

小田 尚伸(Oda, Hisanobu)

独立行政法人国立病院機構(九州がんセンター臨床研究センター)・その他部局等・連携研究員

研究者番号：30295133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンメチル化酵素PR-Set7によるH4リジン20残基のメチル化はゲノム安定性の維持に関わっている。本研究では肝臓特異的にこの酵素を欠いたマウスを作成した。胎児期の欠失では肝自体の形成が阻害され、生後の欠失では肝細胞壊死に引き続き周囲の炎症、線維化、周辺細胞の代償性増殖が誘発された。さらに肝細胞の壊死と再生が繰返され、癌遺伝子STAT3が活性化された結果、肝臓癌が発生した。この中には自己複製能を有し免疫欠損マウスへ移植が可能で、肝細胞と異なる分化能をもつ癌幹細胞が含まれていた。遺伝子発現解析では胆管上皮前駆細胞および癌関連遺伝子の発現がみられ、肝臓癌発生の新たな経路を見出す成果となった。

研究成果の概要(英文)：PR-SET7-mediated histone 4 lysine 20 methylation has been implicated in maintaining genome integrity. Hepatocyte-specific deletion of PR-SET7 in mouse embryos resulted in G2 phase arrest followed by massive cell death and defect in liver organogenesis. Inactivation at postnatal stages caused cell duplication-dependent hepatocyte necrosis, accompanied by inflammation, fibrosis and compensatory growth induction of neighboring hepatocytes and resident ductal progenitor cells. Prolonged necrotic regenerative cycles coupled with oncogenic STAT3 activation led to the spontaneous development of hepatic tumors composed of cells with cancer stem cell characteristics. These include a capacity to self-renew in culture or in xenografts and the ability to differentiate to phenotypically distinct hepatic cells. Hepatocellular carcinoma in PR-SET7-deficient mice displays a cancer stem cell gene signature specified by the co-expression of ductal progenitor markers and oncofetal genes.

研究分野：医化学、分子生物学

キーワード：ヒストンメチル化酵素 癌幹細胞 肝臓癌

1. 研究開始当初の背景

染色体を構成するヒストンは種々のメチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化といった翻訳後修飾により、その細胞内機能が制御されている。これらの修飾はヌクレオソームの可動性や相互作用に影響を与え、あるいはその修飾を特異的に認識する蛋白質の動員によって、クロマチンの構造変換を惹起して DNA の複製、転写、修復といった種々の細胞機能の調節に関わっている。またヒト癌のゲノムワイドな解析によりヒストン修飾酵素の変異が発癌のメカニズムにおいても大きな役割を果たしていることが明らかになりつつある。

ヒストンメチル化酵素は、その部位特異的な修飾と異なるレベルのメチル化により種々の細胞内機能を惹起することが知られている。なかでもヒストン H4K20 のメチル化は個々のメチル化の状態が細胞周期の中で非常に動的に制御されていることが特徴で、哺乳類の生体内では主に PR-Set7/set8, Suv4-20h1, Suv4-20h2 の三つの酵素が異なるレベルのメチル化を制御しているが、これらの酵素がどのように動的な H4K20 のメチル化を協調的に制御しているのかについては不明であった。

生体でのモノメチル化酵素である PR-Set7/set8 の機能を解析する目的で遺伝子破壊マウスを作成した。遺伝子欠失マウスは胎生致死であり、8細胞期で発生が停止した。さらに PR-Set7 の条件特異的ノックアウト ES 細胞を用いた解析により PR-Set7 非存在下では細胞周期の停止と自発的な DNA 損傷が細胞内で誘発され、その結果として細胞死が誘導されることを示した。

さらに臓器特異的な遺伝子欠損マウスを作成することにより、転写など他の細胞内機能を明らかにすることを試みた。胎児期の皮膚において欠損させた結果、皮膚の増殖と分化に影響された。PR-set7 の非存在

下では表皮の前駆細胞が消失し、汗腺および毛嚢間の上皮が不可逆的に失われた。表皮細胞の増殖と分化の過程において PR-Set7 と c-Myc が協調的に働いていることを示唆する結果が得られた。

2. 研究の目的

今回は臓器特異的な遺伝子破壊マウスの解析のうち肝臓特異的に PR-Set7 を欠失させたマウスでは肝臓内に癌が多発するという興味深い現象が認められたため、その発生基盤および分子機構を解析することを目的とした。PR-Set7 が DNA 損傷修復における機能を有することから、その欠失が間接的に発癌抑制に貢献している可能性も考えられた。これまでに CRL4/Cdt2 が PR-Set7 ユビキチン化することにより、細胞周期の S 期において蛋白分解を引き起こすことを報告している (H. Oda et al, Molecular Cell, 2010) が、Cdt2 は乳癌、肝臓癌、胃癌において過剰発現していることが報告されており癌遺伝子としての活性が示唆されていた。

3. 研究の方法

胎児期の肝臓で特異的に発現される AFP (アルファフェトプロテイン) のプロモーターで駆動される Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスと成体の肝臓で特異的に発現するアルブミンプロモーターで駆動される Cre リコンビナーゼ発現トランスジェニックマウスをそれぞれ PR-Set7 遺伝子改変マウスと交配することにより、胎児期および成体のマウス肝において PR-Set7 を時期特異的に遺伝子破壊した。

成体マウスの肝臓特異的欠失を行ったマウスでは、その後の観察で肝臓に多発する肝臓癌が認められた。これらを種々の細胞マーカーに対する抗体により免疫組織染色を行うことによって、腫瘍細胞の起源を明

らかにすることを試みた。発癌のメカニズムについて STAT3 癌遺伝子の活性化や酸化ストレスについての評価を行った。発生した癌細胞を用いて、免疫不全マウスへの移植実験を行い、幹細胞としての形質を確認した。また癌幹細胞の性質や起源を明らかにすることを目的として遺伝子発現の網羅的解析を行った。

4. 研究成果

胎児期のマウス肝において PR-Set7 を遺伝子破壊したマウスは胎生致死となり、胎生 18.5 日目で著明な貧血および肝体積の極端な縮小が認められた。

対照的に成体肝で PR-Set7 をノックアウトした際にはマウスは出生し、肝臓の一部に壊死を伴った領域が認められた。肝臓壊死は再生領域において認められ、PR-Set7 が欠失している状況で肝細胞が増殖を試みることによって引き起こされていた。肝再生を刺激するために部分的肝切除を行い、残った肝細胞の補充的な増殖を誘発する実験を行った。PR-Set7 欠失細胞は増殖を行うことで死に至り、慢性炎症とともに壊死領域の拡大を引き起こした。もっとも興味深いことには、肝部分切除を施行したすべての PR-Set7 欠失マウスにおいて生後 240 日から 300 日の間に肝臓癌が発生した。肝細胞壊死に引き続き周囲の炎症、線維化、周辺細胞の代償性増殖が誘発され、この繰り返しと癌遺伝子 STAT3 が活性化された結果として、肝臓癌が発生したと考えられた。

この肝臓癌には癌幹細胞の性質を有する細胞が多数含まれていた。すなわちこれらの細胞は自己複製能を有しており、免疫欠損マウスへの移植が可能であることが示された。また肝細胞とは異なる分化能をもっていることが示唆された。遺伝子発現解析では胆管上皮前駆細胞および癌関連遺伝子の発現がみられた。

本研究の結果からヒストンメチル化酵素 PR-Set7 の欠失は肝細胞の広範な壊死と周囲細胞の増殖や炎症を誘発することにより肝臓癌の発生を誘発することが明らかになった。これは従来からの肝細胞に由来する肝臓癌以外に新たな発癌経路を見出す成果となった。

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 1 件)

Nikolaou KC, Moulos P, Chalepakis G, Hatzis P, Oda H, Reinberg D, Talianidis I, Spontaneous development of hepatocellular carcinoma with cancer stem cell properties in PR-SET7-deficient livers, *EMBO J* 34(4), 430-47, 2015

[学会発表](計 1 件)

小田 尚伸、ヒストンメチル化酵素 PR-SET7 の肝特異的欠失による幹細胞様の特徴を有する肝臓癌の発生、第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日、愛知県名古屋市

[図書](計 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小田 尚伸 (ODA, Hisanobu)
九州がんセンター・臨床研究センター・連
携研究員
研究者番号：30295133

(2) 研究分担者

中別府 雄作 (NAKABEPPU, Yusaku)
九州大学・生体防御医学研究所・教授
研究者番号：30180350

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()