

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590370

研究課題名(和文) ギガシークエンサーによる肝星細胞形質転換時のエピジェネティクス変動の網羅的解析

研究課題名(英文) Global analysis for epigenetic alterations of hepatic stellate cells in the transformation using Gia-sequencing method.

研究代表者

増田 友之 (MASUDA TOMOYUKI)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：10199698

研究成果の概要(和文)：本邦では欧米に比較して肝炎ウイルスの汚染率が高く、急性肝炎あるいは肝線維症(慢性肝炎・肝硬変)から肝不全で死亡する例が多く、大きな社会的問題となっている。肝移植が頻繁に施行されるようになった現在でも、提供肝の絶対数は不足しており、多くの肝不全患者を救うためには新たな治療法の開発が必要である。我々は、肝不全患者の治療戦略として、①抗肝線維化療法、②肝再生療法、③分裂寿命/細胞死からみた肝細胞庇護療法を3つの重要な開発研究課題と位置づけ、集学的な研究を遂行してきた。肝の線維化には、類同壁細胞である肝星細胞(hepatic stellate cell:HSC)が重要な役割を担っている。当該研究課題では、HSCの形質転換時にクロマチン修飾の変動する転写領域を網羅的に同定し、個々の遺伝子発現がHSCの表現型にどのような影響を与えるかギガベース(10億ベース)シークエンサーを用いた、ChIP(chromatin immunoprecipitation) sequencing法によって解析した。活性型HSCの分離を行い、形質転換実験をHDAC(histone deacetylase)阻害薬、interferon(IFN)- $\gamma$ を用いて基礎実験を行った。いずれでも、形質転換が可能であり各々の条件でのDNA、mRNA、蛋白質の解析を行った。形質転換時のエピゲノム形成に重要な、多能性維持関連蛋白質の特定に至った。多能性維持関連蛋白質のうち nucleus accumbens associated-1 はエピゲノムの保持に重要な蛋白質であり、MYC、Nanog との相互作用があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We intensively examined on hepatic stellate cells (HSC) for the treatment strategy of liver fibrosis. The present study focused on epigenetic alterations within the process of HSCs transformation. Using Gia-base sequencing method, global alterations of DNA methylation were examined in HSC under the condition of HDAC inhibitor (TSA) and interferon (IFN)- $\gamma$ . Of them, genes relating pluripotency of stem cells were altered, and the nucleus accumbens associated-1 (NACC1) might be an important factor along with cMYC and NANOG. These transition of HSC might be induced though epigenetic alterations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	300,000	90,000	390,000
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：人体病理

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肝、線維症、星細胞、miRNA、epigenetics

## 1. 研究開始当初の背景

本邦では欧米に比較して肝炎ウイルスの汚染率が高く、急性肝炎あるいは肝線維症（慢性肝炎・肝硬変）から肝不全で死亡する例が多く、大きな社会的問題となっている。肝移植が頻繁に施行されるようになった現在でも、提供肝の絶対数は不足しており、多くの肝不全患者を救うためには新たな治療法の開発が必要である。我々は、肝不全患者の治療戦略として、①抗肝線維化療法、②肝再生療法、③分裂寿命／細胞死からみた肝細胞庇護療法を3つの重要な開発研究課題と位置づけ、集学的な研究を遂行してきた。

肝の線維化には、類同壁細胞である肝星細胞 (hepatic stellate cell:HSC) が重要な役割を担っている。HSC は正常肝では vitamin A を貯蔵し、静止期と呼ばれる状態にある。肝臓に肝炎ウイルスやアルコールによる慢性的な障害が加わると、HSC は形質転換を起こし、細胞外マトリックスを多量に分泌し、肝の線維化を誘導する活性型となる。我々は複数の HSC の形質転換阻害薬を用いて、transcriptome/ proteome/ metabolome の手法を駆使して、標的分子の同定とその形質転換時に生じる分子機構の解明をおこなってきた。

我々は、histone deacetylase (HDAC) 阻害剤であるトリコスタチン (TSA) が、強力な活性型 HSC の形質還元剤であることを明らかにした (GUT submitted data)。*in vitro* で TSA 処理された HSC では、活性型 HSC のマーカーである  $\alpha$ -SMA の発現を減少させ、線維化誘導に関わる TGF  $\beta$ 、PDGF の発現が抑えられた。さらに、VitaminA の取り込み能が復活し、細胞外マトリックスの分泌も抑制された。HSC の形質転換には、複数の分子のエピジェネティクス制御機構が関連している可能性があり、この変化を網羅的にとらえることは、新たな抗肝線維化療法開発の糸口となり得る。

HSC の形質転換とエピジェネティクス制

御機構の変化に注目した研究は少ない。しかし、発生や分化の過程でエピジェネティクスの変化が細胞の表現型に大きな影響を与えていることを考えれば、本研究の着想点は間違っていない。活性型 HSC の形質還元に関わるエピジェネティクス機構を同定することは、新たな抗肝線維化療法開発の糸口となり、有効な治療法のない肝不全患者の利益につながると考える。

## 2. 研究の目的

当該研究課題では、HSC の形質転換時にクロマチン修飾の変動する転写領域を網羅的に同定し、個々の遺伝子発現が HSC の表現型にどのような影響を与えるか、解析する。方法は、ギガベース (10 億ベース) シークエンサーを用いた、ChIP (chromatin immunoprecipitation) sequencing 法による。

この研究は以下の Step で行われる。  
STEP1: 静止型 vs 活性型 HSC のヒストン修飾領域の網羅的同定と検証: ラット HSC をコラゲナーゼ処理により分離し、静止期の HSC と *in vitro* 活性型の HSC の間で、ChIP (chromatin immunoprecipitation) sequencing 法により comparative に比較する。

STEP2: HDAC 阻害剤投与時の活性型 HSC の形質還元に係る責任転写領域の同定と検証: *in vitro* 活性型の HSC に対して HDAC 阻害剤を添加し、前後で変化した領域を特定する

STEP3: STEP1 and 2 の解析結果を受け HSC の形質転換に重要なクロマチン修飾領域を同定し、関連分子の機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) HSC の分離・培養

無処置の Wistar 系ラット (250 g) の肝組織より比重遠心法を用いて HSC を分離した。

分離したHSCを10% fetal bovine serum(FBS)を含む培養液を添加した plastic dish で培養した. *in vitro* 活性化では5, 7, 14 日目の細胞を各々, 静止期, 中間期, 活性期として ChIP assay に使用した. *in vitro* 活性型の HSC に対する HDAC 阻害剤処理 trichostatin: TSA (100 nM-1・M) の濃度で7日間処理した.

#### (2) ChIP assay

ホルムアルデヒドで細胞を固定化し, 蛋白質と DNA のクロスリンクを行う. GeneMachines HydroShear DNA 断片化装置を用いて各 phase の DNA を断片化した histone H3-K4, H3-K9, H4-K27 の acetyl-, methyl-抗体 (cell signaling), Sim3, HDAC1, MeCP2 抗体 (Upstate) で免疫沈降する. 脱クロスリンクを行いシーケンス反応へ移行する.

#### (3) Sequence 反応

Illumina Genome Analyzer を用いて解析を行った. 平成 20, 21 年度は受託解析により解析を行ったが, 平成 22 年度には Life technologies 社の Solid 5500X1 system を用いて解析を行った. ケミストリーには 5500 SOLiD™ メイトペアライブラリコンストラクションキット (Life technologies)

#### (4) データ解析

データ解析には BioScope システムを用いて各 ChIP assay で採取された DNA 領域を特定する.

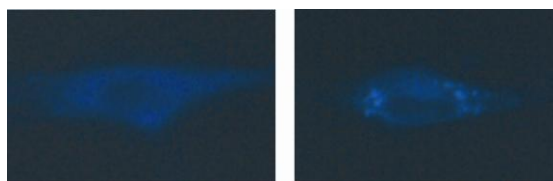
#### (5) Bisulfite genome sequence

各 ChIP assay で形質転換前後の差を認めた領域について, Cells-to-CpG™ バイサルファイトコンバージョンキット (ABI) で DNA のメチル化状態を特定する.

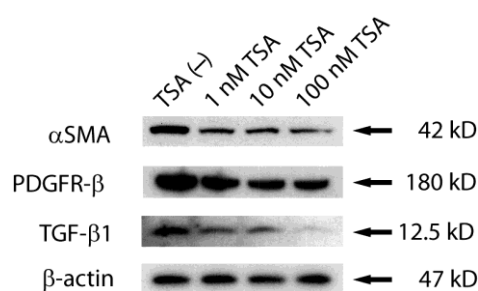
### 4. 研究成果

#### (1) HSC の形質転換

活性型の HSC の分離に成功し, Vitamin A の放出および,  $\alpha$  SMA の発現を western blot で確認できた.



TSA 処理により, 活性型 HSC にみられた Vitamin A 取り込み能の復元 (TSA 処理した右の細胞で顆粒上の Vitamin が観察される).



TSA 処理により, 活性型 HSC にみられた線維化関連分子の変動

#### (2) TSA 添加時の形質転換時の mRNA の変動と ChIP assay によるプロモーター領域でのエピジェネティクスの相関

2823 遺伝子の発現変動が見られた (増加 1512, 減少 1311). HDAC 阻害剤による mRNA の発現について gene ontology による heat map の作成を試みたが一定の傾向はなかった. 一方, ChIP assay との関連では H3-K4 のアセチル化の亢進は比較的 mRNA の発現と相関したしたが, 他の抗体での相関は認められなかった.  $\alpha$  SMA を中心とした細胞骨格系の分子の発現について着目したが, 意外なことに蛋白質の発現と mRNA の発現は相関せず, post-transcriptional な変化が別に生じている可能性が示唆された.

IFN- $\gamma$  に関する検討を行う予定であったが, シーケンサーの導入時期が遅れ解析に

は至らなかった。現在、IFN- $\gamma$  の解析を継続中である。

### (3) Bisulfite genome sequence

mRNA の発現変動が確認され、ChIP assay でアセチル化の亢進していた領域について、多能性維持関連蛋白質の遺伝子座が存在することが明らかとなった。特に、多能性維持関連蛋白質の nucleus accumbens associated-1, c MYC, NANOG に着目して Bisulfite genome sequence を行ったところ、脱メチル化剤処理ではなく、TSA 処理でこれらのプロモーター領域の脱メチル化が認められた。このことは、TSA が従来の HDAC 阻害剤の機構のみではなく、別経路で作用した可能性が考えられる。現在、HOTAIR のような lincRNA の作用を介してこのような現象が生じていると想定し、研究の新たな展開を模索している。いずれにせよ、NAC1 と NANOG は直接結合することが報告されており、cMYC との相互作用と合わせて HSC の形質転換時に、多能性維持関連蛋白質の機能が関与している可能性を示唆するものであった。

### 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 17 件)

1. E. Sakurai, C. Maesawa. Down-regulation of microRNA-211 is involved in expression of preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) in melanoma cells. *Int J Oncol*, in press (2011)
2. K. Tsunoda, H. Oikawa, H. Tada, Y. Tatemichi, S. Muraoka, S. Miura, M. Shibazaki, F. Maeda, K. Takahashi, T. Akasaka, T. Masuda, C. Maesawa, Nucleus Accumbens-Associated 1 Contributes to Cortactin Deacetylation and Augments the Migration of Melanoma Cells. *J Invest Dermatol*, in press (2011).
3. H. Kuroda, K. Kakisaka, Y. Tatemichi, K. Sawara, Y. Miyamoto, K. Oikawa, A. Miyasaka, Y. Takikawa, T. Masuda, K. Suzuki, Non-invasive evaluation of liver fibrosis using acoustic radiation force impulse imaging in chronic hepatitis patients with hepatitis C virus infection. *Hepatogastroenterology* 57 (2010) 1203-1207.
4. Y. Tatemichi, H. Oikawa, C. Maesawa, J. Ambo, M. Sato, H. Koike, T. Sata, T. Fujioka, T. Masuda, Detection of human papillomavirus in a urothelial carcinoma mimicking urethral caruncle. *Int J Urol* 17 (2010) 189-191.
5. T. Takahashi, K. Takahashi, M. Yamashina, C. Maesawa, T. Kajiwara, H. Taneichi, N. Takebe, Y. Kaneko, T. Masuda, J. Satoh, Association of the TNF- $\alpha$ -C-857T polymorphism with resistance to the cholesterol-lowering effect of HMG-CoA reductase inhibitors in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 33 (2010) 463-466.
6. H. Oikawa, K. Hayashi, C. Maesawa, T. Masuda, K. Sobue, Expression profiles of nestin in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *Exp Cell Res* 316 (2010) 940-950.
7. A. Miyamoto, K. Akasaka, H. Oikawa, T. Akasaka, T. Masuda, C. Maesawa, Immunohistochemical Study of HER2 and TUBB3 Proteins in Extramammary Paget Disease. *Am J Dermatopathol* (2010).
8. K. Yamauchi, H.M. Piao, T. Nakadate, T. Shikanai, Y. Nakamura, H. Ito, T. Mouri, H. Kobayashi, C. Maesawa, T. Sawai, H. Ohtsu, H. Inoue, Enhanced goblet cell hyperplasia in HDC knockout mice with allergic airway inflammation. *Allergol Int* 58 (2009) 125-134.

9. A.D. Russa, C. Maesawa, Y. Satoh, Spontaneous [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> oscillations in G1/S phase-synchronized cells. J Electron Microsc (Tokyo) 58 (2009) 321-329.
- 10.T. Satoh, E. Sakurai, H. Tada, T. Masuda, Ontogeny of reticular framework of white pulp and marginal zone in human spleen: immunohistochemical studies of fetal spleens from the 17th to 40th week of gestation. Cell Tissue Res 336 (2009) 287-297.
- 11.Y. Nagata, C. Maesawa, H. Tada, Y. Takikawa, A. Yashima-Abo, T. Masuda, Differential microRNA expression between bone marrow side population cells and hepatocytes in adult mice. Int J Mol Med 24 (2009) 35-43.
- 12.Y. Minami, M. Satoh, C. Maesawa, Y. Takahashi, T. Tabuchi, T. Itoh, M. Nakamura, Effect of atorvastatin on microRNA 221 / 222 expression in endothelial progenitor cells obtained from patients with coronary artery disease. Eur J Clin Invest 39 (2009) 359-367.
- 13.K. Kato, C. Maesawa, T. Itabashi, K. Fujisawa, K. Otsuka, S. Kanno, H. Tada, Y. Tatemichi, K. Kotani, H. Oikawa, T. Sugai, G. Wakabayashi, T. Masuda, DNA hypomethylation at the CpG island is involved in aberrant expression of the L1 cell adhesion molecule gene in colorectal cancer. Int J Oncol 35 (2009) 467-476.
- 14.K. Akasaka, C. Maesawa, M. Shibazaki, F. Maeda, K. Takahashi, T. Akasaka, T. Masuda, Loss of class III beta-tubulin induced by histone deacetylation is associated with chemosensitivity to paclitaxel in malignant melanoma cells. J Invest Dermatol 129 (2009) 1516-1526.
- 15.S. Mitomo, C. Maesawa, S. Ogasawara, T. Iwaya, M. Shibazaki, A. Yashima-Abo, K. Kotani, H. Oikawa, E. Sakurai, N. Izutsu, K. Kato, H. Komatsu, K. Ikeda, G. Wakabayashi, T. Masuda, Downregulation of miR-138 is associated with overexpression of human telomerase reverse transcriptase protein in human anaplastic thyroid carcinoma cell lines. Cancer Sci 99 (2008) 280-286.
- 16.N. Izutsu, C. Maesawa, M. Shibazaki, H. Oikawa, T. Shoji, T. Sugiyama, T. Masuda, Epigenetic modification is involved in aberrant expression of class III beta-tubulin, TUBB3, in ovarian cancer cells. Int J Oncol 32 (2008) 1227-1235.
- 17.H. Itabashi, C. Maesawa, H. Oikawa, K. Kotani, E. Sakurai, K. Kato, H. Komatsu, H. Nitta, H. Kawamura, G. Wakabayashi, T. Masuda, Angiotensin II and epidermal growth factor receptor cross-talk mediated by a disintegrin and metalloprotease accelerates tumor cell proliferation of hepatocellular carcinoma cell lines. Hepatol Res 38 (2008) 601-613.

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 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

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

増田 友之 (MASUDA TOMOYUKI)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：10199698

### (2) 研究分担者

前沢 千早 (MAESAWA CHIHAYA)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：10326647

及川 浩樹 (OIKAWA HIROKI)

岩手医科大学・医・講師

研究者番号：50285582

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：