

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15741

研究課題名(和文) 肝がんを制御するヒストンメチル化修飾機構の解明と治療標的化戦略

研究課題名(英文) Significance of histone methylation in liver carcinogenesis and its possibility as therapeutic target

研究代表者

中塚 拓馬 (Nakatsuka, Takuma)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50772042

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンメチル化酵素G9aは様々な生体機能、疾患に関わる。我々は肝特異的G9a欠損マウスを用い、G9aが阻害された肝では肝癌発生が抑制されることを見出した。マウス肝を用いた網羅的遺伝子発現解析、クロマチン免疫沈降法の結果、G9aはp53の標的遺伝子発現制御を介して、DNA損傷を受けた肝細胞のアポトーシス誘導に寄与することを見出した。G9aの阻害によりDNA損傷を受けた肝細胞からの肝癌発生が抑制されるため、治療標的として期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌は難治癌のひとつであり、特に進行肝癌に対しては未だ有効な治療薬が少なく新規治療法の開発が望まれている。慢性肝炎により誘導されるエピゲノム異常が肝癌に重要な役割を担うことが知られてきているが、本研究の成果により、エピゲノム修飾因子のひとつであるヒストンメチル化酵素G9aがDNA損傷からの肝癌に重要な役割を担うことが明らかとなった。G9a阻害剤により肝癌発生を抑制できる可能性があり、肝癌に対する新規創薬のターゲットとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Histone methyltransferase G9a is involved in various biological functions and diseases. Using liver-specific G9a-deficient mice, we found that hepatocarcinogenesis is suppressed in G9a-knockout livers. As a result of comprehensive gene expression analysis and chromatin immunoprecipitation using mouse liver, we found that G9a contributes to the induction of apoptosis in DNA-damaged hepatocytes through the regulation of p53 target gene expression. Inhibition of G9a attenuates liver carcinogenesis from DNA-damaged hepatocytes and is expected to be a therapeutic target.

研究分野：消化器内科 肝臓病学

キーワード：エピゲノム異常 肝癌 ヒストン修飾 DNA損傷 アポトーシス G9a

1. 研究開始当初の背景

肝癌は本邦において癌死因の第 5 位であり、治療技術の進歩にも関わらずその高い再発率が問題となっている。特に進行肝がんに対する薬物治療の選択肢は少なく、肝癌患者の生命予後改善のため新規薬剤の開発が望まれる。

肝癌の多くは慢性肝炎を背景として発症するが、慢性炎症により惹起されたエピゲノム異常の蓄積は前癌状態から発癌に至る過程において重要な役割を担うとされる (Genome Med. 2012;4:8)。肝癌の約 7 割にエピゲノム修飾因子の遺伝子変異が存在するという近年のゲノムシークエンスの結果はこれを裏付ける事実である (Nat Genet. 2014;46:1267-73)。エピゲノム阻害剤は新規抗癌剤として注目されており、肝癌領域ではヒストン脱アセチル化酵素阻害剤の臨床試験が行われ、既存の標準的薬物治療に匹敵する効果が期待されている (J Hepatol. 2016;65:280-288)。このような背景から我々は肝癌発生におけるエピゲノム異常、特にヒストンメチル化修飾の意義について注目し研究を進めてきた。

ヒストンメチル化酵素 G9a は癌抑制遺伝子のサイレンシング、癌幹細胞性の獲得など、腫瘍形成に有利に機能することが知られている。そこで、G9a の肝癌における役割ならびに G9a 阻害剤による肝癌治療の可能性につき検討した。

2. 研究の目的

G9a の肝癌における役割、ならびに治療標的としての可能性を明らかにするため、下記について検討した。

- (1) ヒト臨床検体における肝癌と G9a の関係
- (2) 生体内での肝発癌における G9a の役割
- (3) G9a が制御する肝発癌関連遺伝子の同定ならびにその制御機構

3. 研究の方法

(1) ヒト臨床検体を用いた肝癌と G9a の関係
がんゲノムアトラス (TCGA) データを用いて、肝癌における G9a の発現量、癌の進行度との関係につき検討した。また当院での肝癌手術検体を用いて G9a の発現量につき検証を加えた。

(2) 生体内での肝発癌における G9a の役割
肝特異的 G9a ノックアウト (KO) マウスを作成し、ジエチルニトロサミン (DEN) および四塩化炭素 (CCl₄) を投与し肝発癌を誘導し、コントロールマウス (WT) と比較した。また、G9a 阻害剤投与時の肝発癌の変化についても検討した。

(3) G9a が制御する肝発癌関連遺伝子の同定ならびにその制御機構
G9a KO および WT マウス肝を用いて網羅的遺伝子発現解析を行い、G9a が制御する肝発癌に関与する標的遺伝子を同定した。またクロマチン免疫沈降法にて、G9a がどのように標的遺伝子を制御するか詳細に解析した。

4. 研究成果

- (1) ヒト臨床検体における肝癌と G9a の関係

TCGA データを用いて肝癌におけるヒストンメチル化酵素、脱メチル化酵素の発現状態につき調査した。ヒストンメチル化酵素 G9a は肝癌症例の約 17%で発現亢進が見られ、これは調査した 81 因子中 2 番目であった(右図)。また、肝癌の進行に伴い G9a 発現量が増加する傾向が見られた。

当院の肝癌手術検体 40 例を用いて G9a の発現を調べたところ、約半数の症例では腫瘍部での発現が非腫瘍部に比して 2 倍以上に亢進していた。

これらデータから、G9a が肝癌において普遍的に何らかの役割を担う可能性が示唆された。

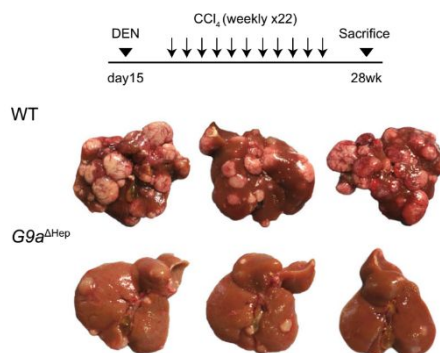
Upregulated histone modifiers in HCC

Rank	Symbol	Enzymatic Function	Z-score > 2 Cases (%)
1	SETDB1	H3K9 methyltransferase	39.1
2	G9a	H3K9 methyltransferase	16.6
2	SMYD2	H3K36 methyltransferase	16.6
4	SMYD3	H3K4 methyltransferase	16.4
5	ASH1L	H3K4 methyltransferase	15.8
6	JMJD6	Histone arginine demethylase	15.3
7	KDM5B	H3K4 demethylase	12.9
8	PRDM16	Component of lysine methyltransferase	10.2
9	JARID2	Component of lysine methyltransferase	9.9
10	KMT5A	H4K20 methyltransferase	8.8
11	EZH2	H3K27 methyltransferase	8.6
11	KDM1B	H3K4 demethylase	8.6
13	EZH1	H3K27 methyltransferase	8.0
14	KMT5B	H4K20 methyltransferase	7.8
14	KMT5C	H4K20 methyltransferase	7.8
14	SMYD5	H4K20 methyltransferase	7.8
17	SUV39H2	H3K9 methyltransferase	7.5

(2) 生体内での肝発癌における G9a の役割

肝癌における G9a の機能解析を行うため、肝臓特異的 G9a KO マウスを用いた。このマウスでは DEN+CC14 による肝発癌が著明に抑制された(右図)。さらに G9a 阻害剤を投与した WT マウスで同様に DEN+CC14 を投与したところ、G9a KO マウスと同様に肝腫瘍形成が抑制された。

これら結果から、G9a 阻害は肝癌抑制的に働いており、阻害剤投与による肝発癌抑制の可能性が示唆された。



(3) G9a が制御する肝発癌関連遺伝子の同定ならびにその制御機構

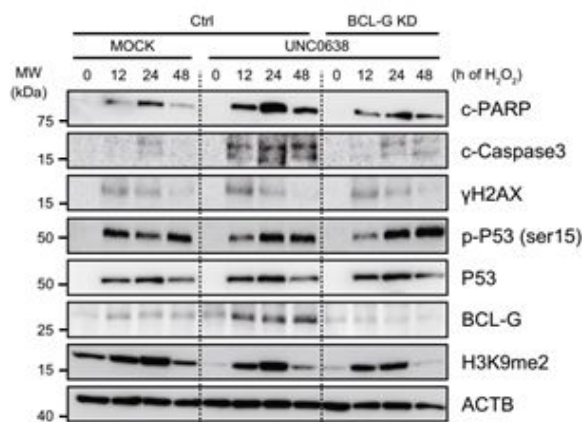
G9a が制御する肝発癌関連遺伝子

DEN 投与発癌モデルでは、DEN 投与時に生じる DNA ダメージが後の肝発癌に寄与することが知られる。そこで DEN 投与直後に DNA ダメージが生じた際の肝臓について、G9a 有無による違いを調査するため、DEN 投与直後に採取したマウス肝組織を用いて免疫染色、ならびにウエスタンブロットを行った。その結果、G9a KO 肝では DNA ダメージが生じた際アポトーシスが著明に亢進することが分かった。さらに、G9a KO および WT マウス肝を用いて網羅的遺伝子発現解析を行ったところ、アポトーシス促進に関与する Bcl2-like 14(Bcl-G)が G9aKO マウスで発現亢進していた。

肝細胞における Bcl-G 発現とアポトーシス

の結果から、G9a による Bcl-G 発現制御が DNA 損傷を生じた肝細胞におけるアポトーシス誘導のゲートキーパーとなっている可能性が示唆された。このことを検証するため、in vitro の系で肝細胞に DNA ダメージを与える実験を行った。

ヒト不死化肝細胞株を用い、過酸化水素または放射線照射(UVB)で DNA ダメージを与えたところ、いずれの系でも p53 の活性化とともに、cleaved-PARP および cleaved-Caspase3 の発現が亢進し、アポトーシスが誘導された(右図は過酸化水素投与時のウエスタンブロット)。ここに G9a 阻害剤(UNC0638)を投与しておく、DNA ダメージ誘導時の BCL-G 発現が著明に亢進し、アポトーシス誘導も亢進した。さらに short hairpin RNA を用いて Bcl-G をノックダウンしておく、p53 の活性化には変化が見られないものの、Bcl-G の発現が誘導されずアポトーシスがキャンセルされた。これら in vitro の実験系から、DNA 損傷時の肝細胞のアポトーシスには G9a による Bcl-G 発現制御

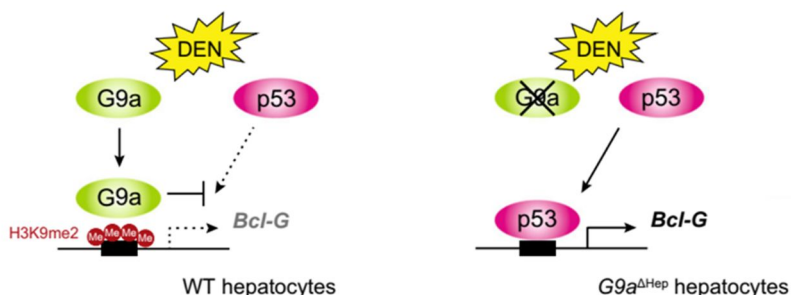


が重要な役割を担うことが明らかとなった。

G9a による Bcl-G 発現制御機構

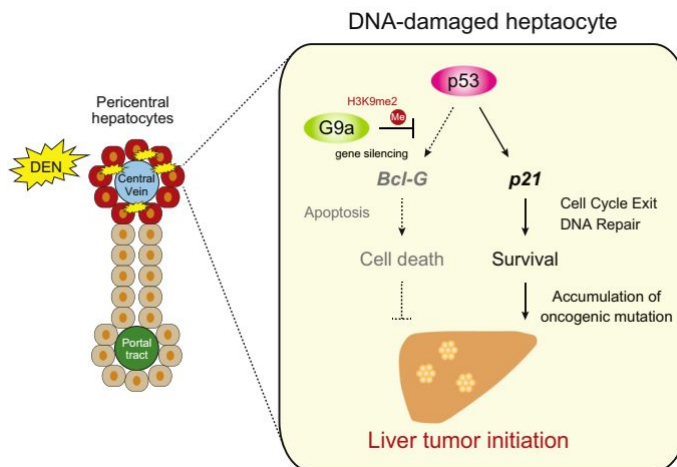
最後に、G9a が Bcl-G をどのように発現制御するか検討した。Bcl-G は p53 の標的遺伝子であることが知られる。一般にヒストン修飾因子は標的遺伝子のヒストン修飾状態を変化させることで、転写因子の結合状態を調整することから、DNA 損傷時における Bcl-G の p53 結合領域における G9a、p53 の結合状態につきクロマチン免疫沈降法で確認した。

DEN 投与 24 時間後のマウス肝を用いてクロマチン免疫沈降を行ったところ、DEN 投与後の WT 肝では、Bcl-G の p53 結合領域に G9a がリクルートされ結合し、ヒストンメチル化 (H3K9me2) レベルが上昇し、p53 の結合が抑制された。一方 G9a KO 肝では G9a がリクルートされないため同部位のヒストンメチル化レベルが上昇せず、p53 の結合が亢進し Bcl-G の発現が上昇した (下図)。



以上まとめると、DNA 損傷時の肝細胞では G9a 発現が亢進し、p53 標的遺伝子である Bcl-G の発現をエピジェネティックに抑制して、肝発癌促進的に機能することが示唆された (右図)。

これら結果から、G9a 阻害が肝癌発生を抑制する可能性があり、今後の創薬ターゲットとして期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakatsuka Takuma, Tateishi Keisuke, Kato Hiroyuki, Fujiwara Hiroaki, Yamamoto Keisuke, Kudo Yotaro, Nakagawa Hayato, Tanaka Yasuo, Ijichi Hideaki, Ikenoue Tsuneo, Ishizawa Takeaki, Hasegawa Kiyoshi, Tachibana Makoto, Shinkai Yoichi, Koike Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibition of histone methyltransferase G9a attenuates liver cancer initiation by sensitizing DNA-damaged hepatocytes to p53-induced apoptosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-020-03381-1	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中塚拓馬
2. 発表標題 ヒストンメチル化酵素G9aは肝細胞のp53依存性DNA損傷応答と発癌に関与する
3. 学会等名 第55回肝臓学会総会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 中塚拓馬
2. 発表標題 Histone methyltransferase G9a promotes hepatocarcinogenesis by regulating p53 transactivity during DNA damage response
3. 学会等名 AASLD The Liver Meeting 2018（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------	---------