

機関番号：12501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790649

研究課題名（和文）肝臓癌においてポリコム群遺伝子によって制御される新規癌抑制遺伝子の同定と解析

研究課題名（英文）Investigation of novel target genes regulated by polycomb group genes in hepatocellular carcinoma

研究代表者

千葉 哲博（CHIBA TETSUHIRO）

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00381583

研究成果の概要（和文）：

ポリコム(PcG)群遺伝子はPRC1とPRC2の2つの複合体を形成し、*Ink4a-Arf*などの標的分子の発現を負に制御する。PRC1の主要な構成分子である*Bmi1*は、多くの幹細胞システムに共通な自己複製制御分子であるが、申請者らは*Bmi1*欠損肝幹細胞および*Ink4a-Arf*欠損肝幹細胞を詳細に解析し、*Bmi1*が*Ink4a-Arf*依存性あるいは非依存性に自己複製能維持や腫瘍形成能の獲得に関与することを明らかにした（Chiba et al, *Hepatology* 52:1111, 2010）。さらに、*Bmi1*の新規標的分子として、マイクロアレイ解析によりSRY (sex determining region Y)-box 17 (Sox17)を含む5個の候補遺伝子を同定した。

また、PRC2の主要な構成分子である*Ezh2*の機能解析を行った結果、正常肝幹細胞および肝臓幹細胞の自己複製能維持においても、重要であることを見出だした（Chiba et al, *J Hepatol* 52:854, 2010）。さらに低分子化合物3-deazaneplanocin A (DZNep)によるPRC2の機能阻害が、肝臓幹細胞を標的とした新たなアプローチとなりえる可能性を示した（論文投稿中）。

研究成果の概要（英文）：

PcG proteins form chromatin-associated multiprotein complexes, polycomb repressive complex 1 (PRC1) and PRC2 and repress the expression of targets such as *Ink4a/Arf* genes. *Bmi1*, a component of PRC1, has been implicated in the regulation of self-renewal in a range of different stem cells including hepatic stem cells. Analyses of *Bmi1*-deficient and/or *Ink4a/Arf* deficient hepatic stem cells revealed that *Bmi1* regulates self-renewal and tumorigenicity in both *Ink4a/Arf*-dependent and -independent manners. Microarray analyses successfully identified 5 down-regulated genes as candidate downstream targets for *Bmi1* such as sex determining region Y-box 17 (Sox17).

Loss-of-function assays of *Ezh2*, a major component of PRC2, also revealed that *Ezh2* tightly regulates self-renewal in both normal and cancer stem cells in liver. Moreover, we showed that pharmacological inhibition of *EZH2* by an S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaneplanocin A (DZNep) is a promising approach for the eradication of liver cancer stem cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000

年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：癌幹細胞、肝臓癌、ポリコム群遺伝子、自己複製能、BMI1、EZH2

1. 研究開始当初の背景

ポリコム遺伝子群 (PcG) は、polycomb repressive complex (PRC)1 および PRC2 の 2 つの複合体を形成し、エピジェネティックな転写制御を担う。PcG は幹細胞の自己複製制御分子として機能するが、肝幹細胞を含めた組織肝細胞の機能解析は PRC1 の構成分子である Bmi1 などを中心に行なわれており、PRC2 の機能は未だ十分に解析されていない。申請者らも、PcG タンパク Bmi1 が正常肝幹細胞 (Chiba et al, Gastroenterology 133:937, 2007) および肝臓幹細胞 (Chiba et al, Cancer Res 68:7742, 2008) の維持に必須であることを明らかにしたが、肝臓における標的分子の同定や詳細な分子メカニズムは明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、肝臓における Bmi1 による転写制御機構の解明に向けて、Ink4a/Arf 以外の新規標的分子を見出す試みを行った。同時に、正常肝幹細胞および肝臓幹細胞を用いて PRC2 の主要な構成分子である Ezh2 の機能解析を行い、PcG による肝幹細胞制御機構のさらなる理解を目的とした。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析による Bmi1 の新規標的分子の探索
Bmi1 を強制発現した Ink4a/Arf 欠損肝幹細胞

のマイクロアレイ解析により Ink4a/Arf 以外の標的分子の同定を試みた。

(2) 肝臓の培養細胞および臨床検体における SOX17 遺伝子の発現解析

肝臓培養細胞および肝臓手術検体において、MSP 法により SOX17 遺伝子プロモーターの DNA メチル化を検討するとともに、リアルタイム PCR 法にて mRNA の発現レベルを評価した。

(3) 正常肝幹細胞における Ezh2 の機能解析 胎児肝臓由来の Dlk 陽性細胞を分離・回収し、レンチウイルスベクターを用いて Ezh2 のノックダウンを行い、培養系において検討した。

(4) 肝臓幹細胞における EZH2 の機能解析 肝臓培養細胞から EpCAM 陽性細胞を分離・回収し、レンチウイルスベクターおよび低分子化合物 (DZNep) を用いて EZH2 のノックダウンを行い、培養系および in vivo において検討した。

4. 研究成果

(1) 本研究のマイクロアレイ解析と既知の (ES 細胞の) ChIP-on Chip のデータとの比較により、Bmi1 の新規標的分子として、Sox17, Irx5, Gjb2, Shox2, Bhmt2 の 5 遺伝子をピックアップした。Sox17 を強制発現した肝幹細胞は増殖能が有意に低下し、分化傾向

をみとめた。

(2) *SOX17*は、大腸癌において DNA メチル化により silencing を受ける癌抑制遺伝子として報告されていることから、肝癌細胞を用いた検討を行った。HepG2 細胞では、プロモーター領域の異常メチル化と gene silencing がみとめられたが、肝癌臨床検体では、癌部・非癌部ともに極めて低い発現レベルを示し、癌部の DNA メチル化は低頻度であった。よって、*SOX17* 遺伝子が肝癌における癌抑制遺伝子として機能するか否かは不明であった。

(3) *Ezh2* をノックダウンした肝幹細胞のコロニーアッセイでは、自己複製能が抑制されるとともに、肝細胞系譜への分化・成熟化の促進が観察された。

(4) 肝癌細胞を用いた検討では、ウイルスベクターあるいは低分子化合物 DZNep による *EZH2* の機能阻害によって、EpCAM 陽性細胞分画の減少および sphere 形成能の低下をみとめた。免疫不全マウスの xenograft model では、DZNep 投与により腫瘍形成および腫瘍増大の抑制がみとめられた。

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 4 件)

1. Chiba T, Seki A, Aoki R, Ichikawa H, Negishi M, Miyagi S, Oguro H, Saraya A, Kamiya A, Nakauchi H, Yokosuka O, Iwama A. Bmi1 promotes hepatic stem cell expansion and tumorigenicity in both

Ink4a/Arf-dependent and -independent manners in mice. *Hepatology*, 52:1111-1123, 2010. 査読有

2. Chiba T, Aoki R, Miyagi S, Negishi M, Konuma T, Taniguchi H, Ogawa M, Yokosuka O, Iwama A. The polycomb group gene product Ezh2 regulates proliferation and differentiation of murine hepatic stem/progenitor cells. *J Hepatol*, 52:854-863, 2010. 査読有
3. Negishi M, Chiba T, Saraya A, Miyagi S, Iwama A. Dmap1 plays an essential role in the maintenance of genome integrity through the DNA repair process. *Gene Cells*, 14:1347-1357, 2009. 査読有
4. Chiba T, Kamiya A, Yokosuka O, Iwama A. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Recent progress and perspective. *Cancer Lett*, 286:145-153, 2009. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. 千葉哲博、岩間厚志、横須賀收 Regulation of liver cancer stem cells by polycomb group proteins. 第 3 回 JCA-AACR Special Joint Conference (千葉県, 2011 年 3 月 4 日)
2. 千葉哲博、青木竜太郎、横須賀收 ポリコーム群タンパクによる肝幹細胞の制御機構 第 96 回日本消化器病学会総会 (新潟県, 2010 年 4 月 23 日)

3. 千葉哲博、岩間厚志 肝臓における正常幹細胞および癌幹細胞システムの制御機構 第 17 回日本消化器病学会関連週間（京都府, 2009 年 10 月 15 日）

4. 千葉哲博、青木竜太郎、横須賀收、岩間厚志 **Regulatory machinery of Bmi1 in both normal and cancer stem cells in liver** 第 68 回日本癌学会総会（神奈川県, 2009 年 10 月 2 日）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉 哲博 (CHIBA TETSUHIRO)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00381583

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

岩間 厚志 (IWAMA ATSUSHI)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：70244126

宮城 聡 (MIYAGI SATORU)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：20400997

横須賀 收 (YOKOSUKA OSAMU)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90182691