

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23689039

研究課題名(和文) 肝癌幹細胞におけるエピジェネティックな制御機構の解明と新規治療法の確立

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of liver cancer stem cells and establishment of a novel therapeutic approach

研究代表者

千葉 哲博 (Chiba, Tetsuhiro)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00381583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,600,000円、(間接経費) 5,880,000円

研究成果の概要(和文)：ポリコーム群(PcG)タンパクEZH2は、肝癌幹細胞の自己複製能維持に必須であり、sh-RNAや低分子化合物3-deazaneplanocin A (DZNep)を用いてEZH2のヒストンH3K27メチル化酵素活性を阻害することで、肝癌幹細胞が分化傾向を示し、造腫瘍活性が低下することを確認した。また、マウス胎児肝臓由来の正常肝幹細胞における全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-Seq)により562個のbivalent geneを同定した。次に、肝幹細胞の分化誘導時のマイクロアレイデータを比較・検討し、bivalent geneの中でより密接に分化制御に關与するものを抽出し得た。

研究成果の概要(英文)：Polycomb group protein EZH2 is essential for the self-renewal of liver cancer stem cells. Short hairpin-RNA against EZH2 and 3-Deazaneplanocin A (DZNep) promotes the conversion toward differentiated progeny cells and reduced tumorigenic ability through the inhibition of H3K27 trimethylation (H3K27me3). We also conducted chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) analysis of normal hepatic stem cells using anti-H3K27me3 and anti-H3K4me3 antibodies, and successfully identified 562 bivalent genes. In combination with microarray data in the differentiation induction, candidate genes closely associated with hepatocytes and/or cholangiocytes were selected from bivalent genes. Since cancer-related genes were included among these genes, further analyses would be necessary to examine the role of these molecules in normal hepatic stem cells and liver cancer stem cells.

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：エピジェネティクス 肝癌 肝臓 幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、ポリコーム群(PcG)タンパクの臨床病理学的な検討を行い、PcGタンパク BMI1 や EZH2 が、約 60%以上の肝癌において異常な発現亢進をみとめることを見いだした。また、正常肝幹細胞および肝癌幹細胞の双方の自己複製制御において、これらの PcG タンパクが、極めて重要な役割を果たし、その機能阻害により自己複製能が著しく抑制されことを明らかにしてきた (Gastroenterology, 133:937, 2007, J Hepatol, 52:854, 2010, Cancer Res, 68:7742, 2008)。

## 2. 研究の目的

癌幹細胞とは、癌を構成する多くの細胞の中で、とりわけ高い造腫瘍活性を有する極めて少数の細胞集団であり、正常幹細胞のように、自己複製能と分化能を持ち併せている。したがって、癌の根治のためには、癌幹細胞の排除が必要不可欠であり、癌幹細胞は癌治療における本質的なターゲットとして認識されつつある。癌幹細胞研究は、多くの癌種において、その分離・同定が進み、現在では癌幹細胞の維持機構に関わるシグナル伝達系や分子群の解明が盛んに試みられている。PcG タンパクは主に標的遺伝子座のヒストン修飾を介して、その遺伝子発現を負に制御することが知られている。そこで本研究では、PcG タンパクあるいはヒストンメチル化の阻害による癌幹細胞の機能抑制の可能性を追求した。また、造血幹細胞や ES 細胞においては、PcG タンパクやトライソラックス(Trx)タンパクによるヒストン修飾が、その分化制御において重要であることが知られている。しかし、正常肝幹細胞におけるヒストン修飾による分化制御機構はほとんど明らかにされていない。そこで、マウス胎児肝臓由来の正常肝幹細胞を分離・回収し、特にトリメチル化ヒストン H3 リジン 4(H3K4me3)とトリメチル化ヒストン H3 リジン 27 (H3K27me3) による転写制御について、詳細に調べることにした。

## 3. 研究の方法

これまでの研究により、CD24, CD90, CD133, Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)などが肝癌幹細胞の表面マーカーとして機能することが報告されている。また、多くの癌種の癌幹細胞において、ALDH1 が高い活性を示すことが示されている。そこで、複数の肝癌培養細胞から、幹細胞分画 (EpCAM 陽性細胞) をフローサイトメトリーを用いて分離・回収し、レンチウイルスベクターや低分子化合物 3-deazaneplanocin A (DZNep)による EZH2 の機能阻害を行った。ところで、正常幹細胞と癌幹細胞は、表面マ

ーカーだけでなく、増殖や分化制御機構などにおいて、多くの共通項を有することが知られている。そこで、正常肝幹細胞における bivalent gene (転写活性化に働く H3K4me3 と転写抑制に働く H3K27me3 の両者の修飾を受けるもの)の網羅的解析 (全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス、ChIP-seq)を行った。次に分離直後の肝幹細胞と分化誘導を行ったサンプルを用いて、マイクロアレイを用いた発現解析を行い、ChIP-seq の結果と照合することで、肝幹細胞の分化制御に直接的に關与する遺伝子群の抽出を行った。

## 4. 研究成果

EZH2 に対する ShRNA や低分子化合物 3-deazaneplanocin A (DZNep)処理により、肝癌培養細胞由来の EpCAM 陽性細胞の sphere 形成能や免疫不全マウスにおける xenograft の造腫瘍活性が有意に低下した。フローサイトメトリーを用いた免疫不全マウスの皮下腫瘍の解析の結果、5-FU を投与した際とは異なり、DZNep 処理により、EpCAM 陽性細胞の実質的な減少が確認された。また、正常肝幹細胞における全ゲノムクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-Seq)により、562 個の bivalent gene を同定した。また、肝幹細胞を分化誘導した際のマイクロアレイ解析の結果と比較検討することで、これらの bivalent gene のうち、肝細胞分化、胆管細胞分化、肝細胞/胆管細胞分化に關与する遺伝子を同定した。これらの研究の過程で、アルデヒド脱水素酵素 1(ALDH1)が肝癌においては幹細胞マーカーではなく、分化マーカーとして機能することや、糖尿病治療薬メトホルミン、嫌酒薬ジスルフィラムが、肝癌幹細胞に対して直接的な機能抑制作用を呈することを見いだした。

## 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 13 件)

Chiba T, Suzuki E, Yuki K, Zen Y, Oshima M, Miyagi S, Saraya A, Koide S, Motoyama T, Ogasawara S, Ooka Y, Tawada A, Nakatsura T, Hayashi T, Yamashita T, Kaneko S, Miyazaki M, Iwama A, Yokosuka O. Disulfiram eradicates tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells in ROS-p38 MAPK pathway-dependent and -independent manners. PLoS One. 2014 Jan 13;9(1):e84807. 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0084807.

Miyagi S, Koide S, Saraya A, Wendt GR, Oshima M, Konuma T, Yamazaki S, Mochizuki-Kashio M, Nakajima-Takagi Y, Wang C, Chiba T, Kitabayashi I, Nakauchi H, Iwama A. The TIF1 $\beta$ -HP1 System Maintains Transcriptional Integrity of Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports*. 2014 Jan 23;2(2):145-52. 査読有  
doi: 10.1016/j.stemcr.2013.12.008.

Kondo T, Maruyama H, Sekimoto T, Shimada T, Takahashi M, Chiba T, Kanai F, Yokosuka O, Yamaguchi T. Natural history of postvascular-phase iso-enhanced lesions on the sonogram in chronic liver diseases. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Jan;29(1):165-72. 査読有  
doi: 10.1111/jgh.12449.

Kitazono S, Takiguchi Y, Ashinuma H, Saito-Kitazono M, Kitamura A, Chiba T, Sakaida E, Sekine I, Tada Y, Kurosu K, Sakao S, Tanabe N, Iwama A, Yokosuka O, Tatsumi K. Effect of metformin on residual cells after chemotherapy in a human lung adenocarcinoma cell line. *Int J Oncol*. 2013 Dec;43(6):1846-54. 査読有  
doi: 10.3892/ijo.2013.2120.

Okimoto K, Ogasawara S, Chiba T, Ooka Y, Oobu M, Azemoto R, Kanogawa N, Motoyama T, Suzuki E, Tawada A, Yoshikawa M, Yokosuka O. Efficacy of transcatheter arterial chemoembolization with miriplatin-lipiodol water-soluble contrast agent emulsion in patients with hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2013 Dec;33(12):5603-9. 査読有

Saito T, Chiba T, Yuki K, Zen Y, Oshima M, Koide S, Motoyama T, Ogasawara S, Suzuki E, Ooka Y, Tawada A, Tada M, Kanai F, Takiguchi Y, Iwama A, Yokosuka O. Metformin, a diabetes drug, eliminates tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. *PLoS One*. 2013 Jul 29;8(7):e70010. 査読有  
doi: 10.1371/journal.pone.0070010.

Ooka Y, Kanai F, Okabe S, Ueda T, Shimofusa R, Ogasawara S, Chiba T, Sato Y, Yoshikawa M, Yokosuka O. Gadoteric acid-enhanced MRI

compared with CT during angiography in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *Magn Reson Imaging*. 2013 Jun;31(5):748-54. 査読有  
doi: 10.1016/j.mri.2012.10.028.

Chiba T, Kanai F, Iwama A, Yokosuka O. Circulating cancer stem cells: a novel prognostic predictor of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2013 Feb;2(1):4-6. 査読有  
doi:10.3978/j.issn.2304-3881.2012.09.02.

Kamezaki H, Kanda T, Arai M, Wu S, Nakamoto S, Chiba T, Maruyama H, Fujiwara K, Kanai F, Imazeki F, Nomura F, Yokosuka O. Adherence to medication is a more important contributor to viral breakthrough in chronic hepatitis B patients treated with entecavir than in those with Lamivudine. *Int J Med Sci*. 2013;10(5):567-74. 査読有  
doi: 10.7150/ijms.5795.

Suzuki E, Chiba T, Zen Y, Miyagi S, Tada M, Kanai F, Imazeki F, Miyazaki M, Iwama A, Yokosuka O. Aldehyde dehydrogenase 1 is associated with recurrence-free survival but not stem cell-like properties in hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2012 Nov;42(11):1100-11. 査読有  
doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01028.x.

Tanaka S, Miyagi S, Sashida G, Chiba T, Yuan J, Mochizuki-Kashio M, Suzuki Y, Sugano S, Nakaseko C, Yokote K, Koseki H, Iwama A. Ezh2 augments leukemogenicity by reinforcing differentiation blockage in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012 Aug 2;120(5):1107-17. 査読有  
doi: 10.1182/blood-2011-11-394932.

Ashinuma H, Takiguchi Y, Kitazono S, Kitazono-Saitoh M, Kitamura A, Chiba T, Tada Y, Kurosu K, Sakaida E, Sekine I, Tanabe N, Iwama A, Yokosuka O, Tatsumi K. Antiproliferative action of metformin in human lung cancer cell lines. *Oncol Rep*. 2012 Jul;28(1):8-14. 査読有  
doi: 10.3892/or.2012.1763.

Chiba T, Suzuki E, Negishi M, Saraya A, Miyagi S, Konuma T, Tanaka S, Tada M, Kanai F, Imazeki F, Iwama A,

Yokosuka O. 3-Deazaneplanocin A is a promising therapeutic agent for the eradication of tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. Int J Cancer. 2012 Jun 1;130(11):2557-67. 査読有  
doi: 10.1002/ijc.26264.

〔学会発表〕(計 12 件)

Ooka Y, Kanai F, Motoyama T, Ogasawara S, Suzuki E, Tawada A, Chiba T, Yokosuka O. Prognosis of the hepatic nodules that show hypovascular in arterial phase and hypointense in hepatobiliary phase on gadoxetic acid enhanced MRI. 2013 年度米国肝臓学会総会 (AASLD 2013) (2013 年 11 月 2 日、米国)

鈴木英一郎、千葉哲博、元山天佑、小笠原定久、大岡美彦、太和田暁之、金井文彦、岩間厚志、横須賀收 肝癌幹細胞治療薬ジスルフィラムの有用性の検証 第 55 回日本消化器病学会大会 (2013 年 10 月 9 日、東京)

小笠原定久、大岡美彦、元山天佑、鈴木英一郎、太和田暁之、千葉哲博、金井文彦、横須賀收 Intermediate stage における TACE 不応症例の治療戦略 第 17 回日本肝臓学会大会 (2013 年 10 月 9 日、東京)

叶川直哉、小笠原定久、元山天佑、鈴木英一郎、大岡美彦、太和田暁之、千葉哲博、金井文彦、横須賀收 当院における非 B 非 C 肝細胞癌の臨床像 第 17 回日本肝臓学会大会 (2013 年 10 月 9 日、東京)

中村昌人、大岡美彦、小笠原定久、元山天佑、鈴木英一郎、太和田暁之、千葉哲博、吉川正治、金井文彦、横須賀收 バルーン下閉塞下肝動脈化学塞栓術 (B-TACE) を用いた TACE 不能症例に対する肝細胞癌治療の経験 第 49 回日本肝臓学会総会 (2013 年 6 月 6 日、東京)

坂本大、大岡美彦、元山天佑、小笠原定久、鈴木英一郎、太和田暁之、千葉哲博、金井文彦、横須賀收 EOB 造影 MRI 肝細胞相で低信号となる乏血性肝細胞性結節の予後 第 49 回日本肝臓学会総会 (2013 年 6 月 6 日、東京)

大岡美彦、金井文彦、元山天佑、小笠原定久、鈴木英一郎、太和田暁之、千葉哲博、横須賀收 高度血小板減少を伴う進行肝細胞癌患者における化学療法導入の

ための部分脾動脈塞栓術および肝動脈化学塞栓術併用療法の有効性と安全性 第 99 回日本消化器病学会総会 (2013 年 3 月 21 日、鹿児島)

小笠原定久、金井文彦、大岡美彦、元山天佑、太和田暁之、千葉哲博、横須賀收 進行肝細胞癌におけるソラフェニブ PD 後の治療戦略 第 16 回日本肝臓学会大会 (2012 年 10 月 11 日、神戸)

鈴木英一郎、千葉哲博、横須賀收 幹細胞マーカーアルデヒド脱水素酵素 1 (ALDH1) の肝癌における解析 第 54 回日本消化器病学会大会 (2012 年 10 月 10 日、神戸)

鈴木英一郎、千葉哲博、横須賀收 アルデヒド脱水素酵素 1 (ALDH1) の新規肝癌バイオマーカーとしての有用性の検討 第 48 回日本肝臓研究会 (2012 年 7 月 20 日、金沢)

Chiba T, Suzuki E, Motoyama T, Ogasawara S, Ooka Y, Tawada A, Kanai F, Iwama A, Yokosuka O. EZH2 ablation is a novel therapeutic target for the eradication of tumor-initiating hepatocellular carcinoma cells. 2012 年度アジア太平洋肝臓学会議総会 (APASL 2012) (2012 年 2 月 18 日、台湾)

千葉哲博、岩間厚志、横須賀收 肝癌幹細胞に対するエピジェネティック治療の可能性 第 53 回日本消化器病学会大会 (2011 年 10 月 20 日、福岡)

〔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 1 件)

名称：肝がん幹細胞阻害剤  
発明者：千葉哲博、鈴木英一郎、金井文彦、横須賀收  
権利者：国立大学法人千葉大学  
種類：特許  
番号：特願 2012-224722 号  
取得年月日：2013 年 5 月 23 日  
国内外の別：国内

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

千葉 哲博 (CHIBA TETSUHIRO)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：00381583

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：