

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月10日現在

機関番号：83901
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23791491
 研究課題名（和文）肝発癌を抑制する標的分子探索へ向けた肝幹細胞特異的なヒストン修飾制御因子の解析
 研究課題名（英文）Analysis of hepatic stem cell specific histone modifications as a basis for identification of molecular targets to block hepatic carcinogenesis
 研究代表者
 中田 晋（NAKATA SUSUMU）
 愛知県がんセンター（研究所）腫瘍病理学部 主任研究員
 研究者番号：80590695

研究成果の概要（和文）：胎生期の肝幹細胞と成熟肝細胞で、核内局在と総量が大きく変化するヒストン修飾を明らかにした。これらが集積する遺伝子を全ゲノム上で調べたところ、H3K27me3 が集積する遺伝子は分化に伴って大部分が入れ替わり、特に代謝等の成体の機能性遺伝子は、胎生期特異的に抑制制御されていた。さらに初期発生や発癌に関与する遺伝子を含む肝幹細胞に特異的な転写活性化遺伝子リストを抽出した。

研究成果の概要（英文）：We found some histone modifications that change its localization and amount between embryonic hepatic stem cells and adult hepatocytes. We identified their target genes at genomic level, demonstrating vast majority of the targets of a repressive histone mark, H3K27me3, are mutually exclusive. An integrated analysis revealed that some functional genes involved in metabolisms were repressed by H3K27me3 and that some early development-related and cell cycle-promoting genes were associated with distinct transcription activating pattern of the histone marks in the hepatic stem cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科学一般

キーワード：ヒストン修飾 肝幹細胞 肝細胞分化 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

ヒストン修飾を含むエピジェネティック制御は幹細胞の未分化性や体細胞分化による多様性獲得に重要であると考えられているものの、肝臓の発生過程における肝幹細胞の分化/成熟を制御するヒストン修飾の変遷に関する報告は見当たらない。肝臓においてもEzh2やBMI1といった分子の重要性は指摘されているものの、個々のヒストン修飾が実際に集積する遺伝子についての知見は極めて乏しい。

2. 研究の目的

肝幹細胞と終末分化した肝細胞の間で、ヒストン修飾の状態がどのように変化するのかを明らかにし、肝細胞癌の発症に鍵となるヒストン修飾異常の探索に向けた分子基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) マウス胎仔肝臓から、c-Kit⁻CD29⁺CD49f^{+/low}CD45⁻TER119⁻画分をセルソーターで分離した肝幹/前駆細胞を用い、成体マウスより分離した終末分化した成熟肝細胞と

対比することで、多数のヒストン修飾に対する特異的抗体を用いて核内局在の解析及び定量解析を行った。

(2) H3K27me3 および AcH3K9 のヒストン修飾標的遺伝子の網羅的解析は ChIP-seq 解析を行った。

(3) 遺伝子発現解析は発現アレイ解析を行った。特に、H3K27me3 の修飾酵素である Ezh2 のコンディショナルノックアウトマウスを用い、H3K27me3 の発現制御に対する寄与を明らかにした。

(4) 以上の網羅的解析の結果の統合解析から抽出された、肝幹細胞特異的に転写活性化された遺伝子に関して特異的抗体を用いて肝臓癌臨床検体を用いて発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) H3K27me3, H3K9me2, H3K9me3, AcH3K9, H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3 に対する特異的抗体を用いて核内局在の解析を行った。その結果、成体肝細胞では抑制性修飾 H3K27me3 (図 1) や H3K9me2 (図 2) は Nucleolin 蛋白に標識される核小体領域に、H3K9me3 は Heterochromatin protein 1 (HP1) にマークされる構成的ヘテロクロマチンに優位な局在を示した (図 3, 4)。一方、対照的に、肝幹/前駆細胞ではこれらは全て核辺縁に優位な局在を示した (図 1, 2, 4)。

図 1

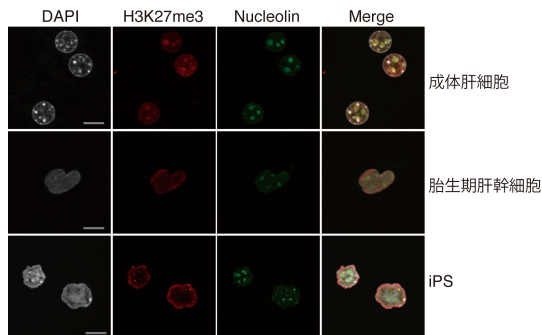


図 2

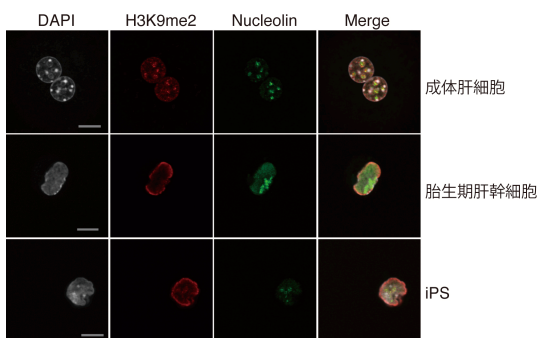


図 3

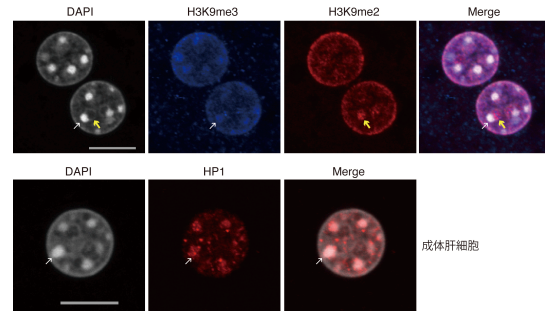
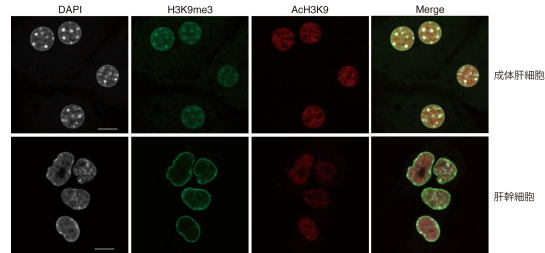


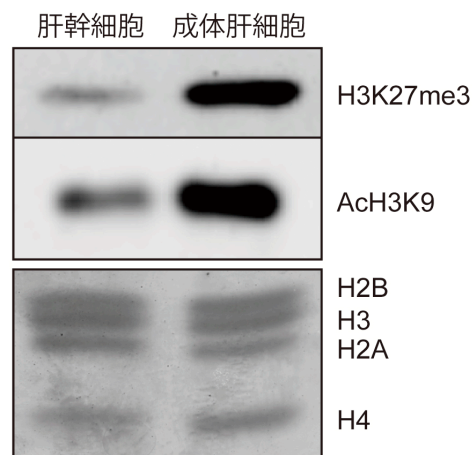
図 4



以上より、核辺縁部は肝幹細胞特異的な遺伝子発現の抑制の場である可能性が考えられ、肝細胞分化に伴う抑制性ヒストン修飾の核内局在の変化が細胞分化の制御に関わっている可能性が示唆された。

(2) ウェスタンブロットによる定量解析により、H3K27me3 と AcH3K9 が肝分化に伴い顕著に増加することを見いだした (図 5)。

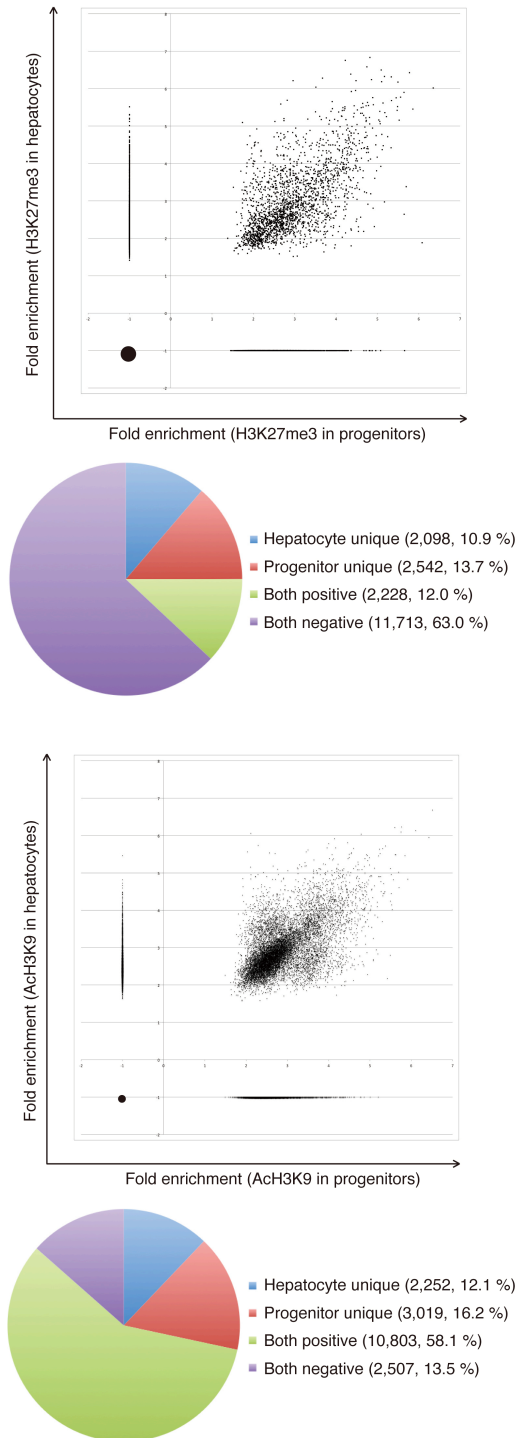
図 5



以上を合わせ、H3K27me3 と AcH3K9 の 2 種類のヒストン修飾が、肝臓の分化に伴い大きく変化することが分かったため、これらに関して、以下のさらに詳細な検討を行う方針とした。

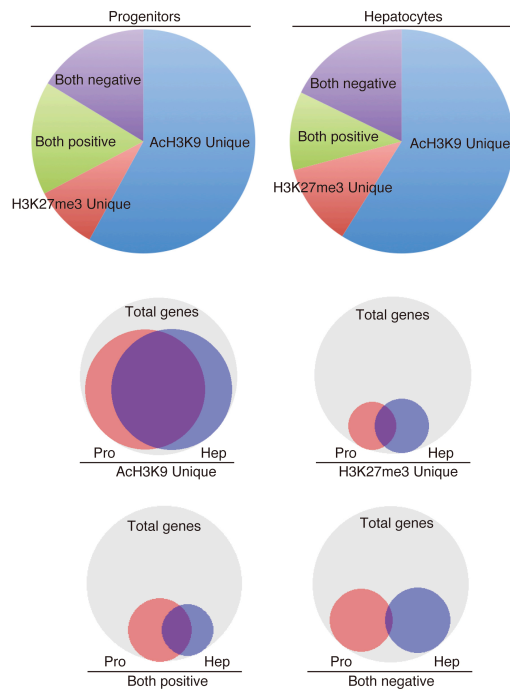
(3) H3K27me3 と AcH3K9 が実際に集積する遺伝子を、ChIP-seq 解析で明らかにした。その結果、H3K27me3 が集積する遺伝子は全体の約 25%前後であったが、AcH3K9 が集積する遺伝子は約 60%を超える広範囲の遺伝子に集積がみられた。それぞれのヒストン修飾について、肝幹細胞と成体肝細胞との間で比較すると、集積の分布からも両者の間でバランスがとれた分布を示した (図 6)。

図 6



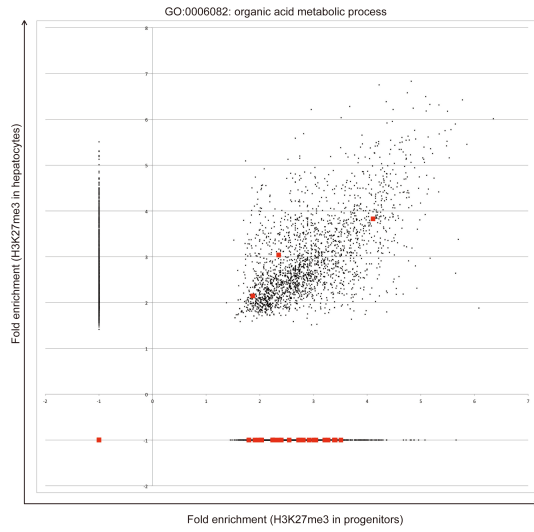
(4) 各ヒストン修飾の標的遺伝子の数的にも、または集積シグナルの強度的にも、両者の間に大きな差がみられなかった。従って、両者の遺伝子リストの中身が大きく入れ替わっている可能性が考えられた。図 7 に各フラクションの遺伝子リストの相互の重なりを解析結果を示す。特に H3K27me3 が集積する遺伝子は分化成熟に伴い 70%以上が相互に入れ替わっていた。また、H3K27me3 と AcH3K9 の双方が集積しない遺伝子群に至ってはほぼ全ての遺伝子が相互排他的であった。

図 7



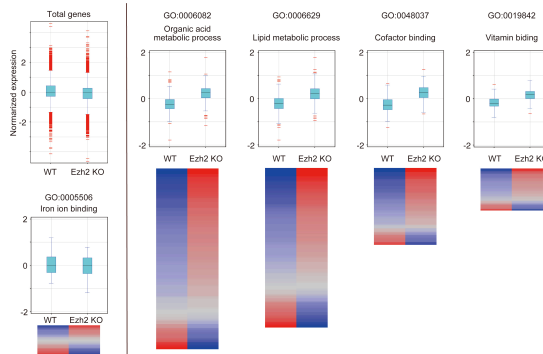
(5) 上記結果より、抑制性ヒストンの集積する遺伝子セットの入れ替わり、すなわち分化度特異的な標的遺伝子群の選択が、細胞の identity の確立に大きな役割を果たしている可能性が考えられた。それを検証するために、遺伝子発現アレイで成体肝細胞に高い発現を示した遺伝子群を抽出したところ、多数の代謝関連遺伝子群が見いだされた。これらの機能性遺伝子群についてヒストン修飾の状態を解析したところ、複数の機能性遺伝子群で、幹細胞において抑制性 H3K27me3 が集積するが、成体では外れていることがわかった。この結果から、細胞機能に照らして未だ不要な遺伝子群が選択的に抑制される合目的的な制御を受けていることが示唆された。代表的な有機酸代謝関連遺伝子群を赤色のドットでプロットした次頁図 8 に示す。

図 8



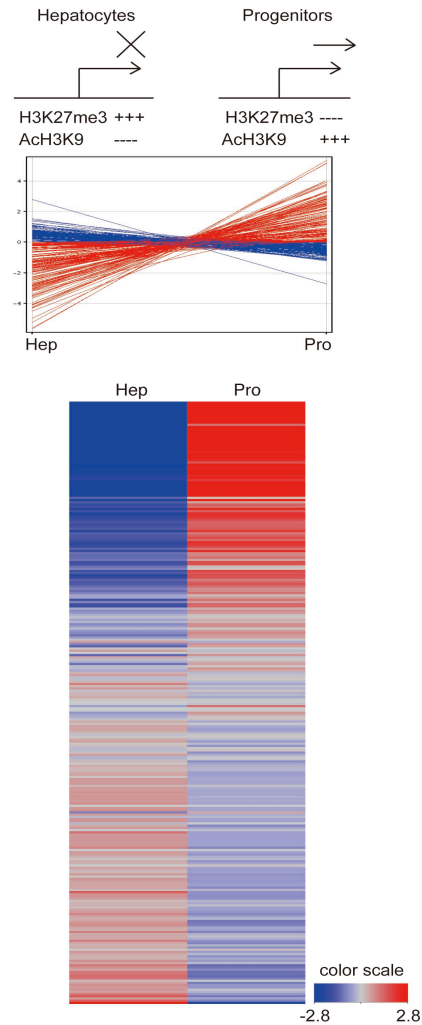
(6) 上記で明らかとなった、成体の肝細胞に特異的な機能性遺伝子群への H3K27me3 の集積が、実際に肝臓の分化制御の過程に寄与しているかを検証するために、H3K27me3 の修飾酵素である Ezh2 のコンディショナルノックアウトマウスから同様の肝幹/前駆細胞を分離して網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、確かにこれらの遺伝子群に特異的な脱抑制がみられた (図 9)。これらの結果より、ただ単に結果的に結合しているのではなく、Ezh2 を介した H3K27me3 ヒストン修飾の誘導によって、未分化な肝幹/前駆細胞では機能性遺伝子群が抑制性の制御を受けていることが明らかとなった。

図 9



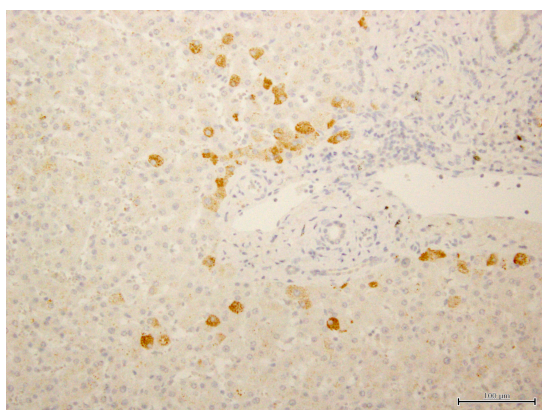
(7) さらに、胎生期末分化肝細胞において特異的に重要な遺伝子の同定する目的で、H3K27me3 と AcH3K9 の双方が異なる集積パターンを示した遺伝子セットを抽出した。すなわち、成体肝臓において H3K27me3 のみが集積し、かつ胎生期で抑制性ヒストン H3K27me3 が集積せず、AcH3K9 集積のみを伴う、すなわちエピジェネティック制御として特異的に転写活性化された遺伝子を抽出し、網羅的発現アレイ解析と統合した。確かにこれらの遺伝子の過半数は胎生期の肝幹細胞において高発現を示した。最も強い発現変化を示す、より絞り込んだ遺伝子リスト中に、サイクリン遺伝子、Myb 癌原遺伝子、Sox 遺伝子、トランスポーター遺伝子などを含む、発癌に深い関連がある遺伝子、および ES 細胞や iPS 細胞に発現し初期発生に深く関与する遺伝子が複数見いだされた。これらは、肝臓の発癌において腫瘍細胞の未分化性獲得の過程で寄与している可能性が考えられる。

図 10



(8) 肝細胞癌の臨床検体における肝幹/前駆細胞に特異的な転写活性化遺伝子の発現解析を行った。すなわち、マウス胎生期の未分化な肝幹細胞にのみ特異的に、抑制性H3K27me3が集積しておらず、活性化ヒストン修飾AcH3K9のみを集積している遺伝子群の発現解析を行った。その結果、肝細胞癌症例において発現が回復し、かつ、肝臓における組織幹細胞ニッチと考えている脈管周囲領域に特異的な局在を示す新規標的候補遺伝子を見いだした(図11)。現在、これらの陽性細胞の幹細胞特性と薬剤耐性獲得の両面から解析中である。

図 1 1



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5件)

(1) Nakata S, Campos B, Bageritz J, Lorenzo Bermejo J, Becker N, Engel F, Acker T, Momma S, Herold-Mende C, Lichter P, Radlwimmer B, Goidts V.: LGR5 is a marker of poor prognosis in glioblastoma and is required for survival of brain cancer stem-like cells. *Brain Pathology*, 23(1):60-72, 2013, DOI: 10.1111/j.1750-3639.2012.00618.x. 査読有

(2) Goidts V, Bageritz J, Puccio L, Nakata S, Zaparka M, Barbus S, Toedt G, Campos B, Korshunov A, Momma S, Van Schaftingen E, Reifenberger G, Herold-Mende C, Lichter P, Radlwimmer B.: RNAi screening in glioma stem-like cells identifies PFKFB4 as a key molecule important for cancer cell survival. *Oncogene*, 31(27):3235-43, 2012, DOI: 10.1038/onc.2011.490. 査読有

(3) Horinaka M, Yoshida T, Nakata S, Shiraishi T, Tomosugi M, Yoshikawa S, Wakada M, Sakai T.: Aclarubicin enhances tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis through death receptor 5 upregulation. *Cancer Sci*, 103(2): 282-287, 2012, DOI: 10.1111/j.1349-7006.2011.02150.x. 査読有

(4) Ernst A, Aigner M, Nakata S, Engel F, Schlotter M, Kloor M, Brand K, Schmitt S, Steinert G, Rahbari N, Koch M, Radlwimmer B, Weitz J, Lichter P: A gene signature distinguishing CD133hi from CD133-colorectal cancer cells: essential role for EGR1 and downstream factors. *Pathology*, 43(3): 220-7, 2011, DOI: 10.1097/PAT.0b013e328344e391 査読有

(5) 小池博之, 中田晋, 谷口英樹: 癌幹細胞と検査医学 各論 膵癌
臨床検査, 55 (5): 495-9, 2011, URL: <http://ci.nii.ac.jp/naid/40018806472>
査読無

〔学会発表〕（計6件）

(1) Expression of stemness-related genes in hypoxic area of *Sleeping Beauty* transposon-mediated murine glioblastoma
中田晋, 藤田貢, 中西速夫, 葛島清隆, 近藤英作

第71回 日本癌学会学術総会 2012年9月19日,
ロイトン札幌, 札幌

(2) Quantitative targeted proteomics of transporters in pancreatic cancer treated with neoadjuvant chemoradiation therapy
上野康晴, 孫略, 大内梨江, 中田晋, 鄭允文, 寺崎哲也, 倉田昌直, 山本直人, 森永聡一郎, 宮城洋平, 横瀬智之, 遠藤格, 谷口英樹

第71回 日本癌学会学術総会 2012年9月19日,
札幌市教育文化会館, 札幌

(3) COX-2 blockade immunologically suppresses brain metastasis of lung cancer
藤田貢, 張エイ, 中田晋, 葛島清隆

第71回 日本癌学会学術総会 2012年9月20日,
ロイトン札幌, 札幌

(4) Aclarubicin enhances TRAIL-induced apoptosis through DR5 up-regulation
堀中真野, 吉田達士, 中田晋, 白石匠, 友杉充宏, 三木恒治, 酒井敏行

第71回 日本癌学会学術総会 2012年9月19日,
札幌市教育文化会館, 札幌

(5) アクラルピシンは p53 非依存的に DR5 の発現を誘導し、TRAIL 感受性を増強する
堀中真野, 吉田達士, 中田晋, 白石匠, 酒井敏行

第16回 日本がん分子標的治療学会 2012年6月28日,
西日本総合展示場, 北九州

(6) Role of LGR5 in survival of glioblastoma- and neural-stem cells
中田晋, 近藤英作

第70回 日本癌学会 2011年10月3日, 名古屋国際会議場, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 晋 (なかつた すずむ)

愛知県がんセンター研究所 腫瘍病理学
部 主任研究員

研究者番号：80590695