

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592033

研究課題名(和文)胆管癌におけるポリコーム蛋白の発現意義とエピジェネティック治療への応用

研究課題名(英文)The role of polycomb protein expression and application for epigenetic therapy in cholangiocarcinoma.

研究代表者

近本 亮(Chikamoto, Akira)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10419640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝内、肝外胆管癌症例において、EZH2高発現群はKi67高発現と有意に相関し、低発現群と比較すると有意に累積生存率が不良であった。ヒト胆管癌細胞株を用いた実験において、EZH2の発現抑制により、細胞増殖能は低下したが浸潤能には変化を認めなかった。EZH2の発現抑制によりG1 arrestおよびアポトーシス細胞の増加を認め、p16INK4A、p27KIP1の有意な発現上昇を認めた。また、抗EZH2薬であるDZNepを用いたEZH2作用阻害によりEZH2発現抑制と同様の結果が得られ、細胞増殖の抑制が認められた。EZH2高発現が胆管癌の予後不良に関り、治療標的となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In Intra- and extra-hepatic cholangiocarcinoma patients, EZH2 high expression was significantly correlated with the poor prognosis by using immunohistochemical analysis. In vitro analysis, knockdown of EZH2 reduced cell growth and induced G1 arrest, and induced apoptosis. Moreover, a knockdown of EZH2 increased the expression of p16INK4A and p27KIP1 in real time PCR. An EZH2 inhibitor, DZNep reduce the expression of EZH2 and demethylase H3K27, and result to reduce cell proliferation. Inhibition of EZH2 by DZNep also induced G1 arrest and induced apoptosis, and increased the expression of p16INK4A and p27KIP1 which revealed by western blotting. As conclusion, this study demonstrates that the high expression of EZH2 accelerate tumor malignancy and is related to poor prognosis in patients with cholangiocarcinoma. Pharmacological inhibition of EZH2 by DZNep can also inhibit cell proliferation. These results suggest that EZH2 is a potential therapeutic target for cholangiocarcinoma.

研究分野：消化器外科学

キーワード：Enhancer cholangiocarcinoma epigenetics cell cycle apoptosis p16INK4A p27KIP1 3-deaza neplanocin A

1. 研究開始当初の背景

肝内・肝外・肝門部を含む胆管癌は悪性度が高く予後不良な疾患であり、これに対する治療法としては、現在外科的治療以外に根拠が期待できる治療法はなく、進行した場合は予後不良であることから、新たな薬物療法・抗癌化学療法・分子標的治療の確立が期待されている。

近年、エピジェネティクスに関する分野の研究が進み、遺伝形質発現において後天的 DNA 修飾による遺伝子発現制御が行われていることが明らかになってきた。ポリコーム蛋白の一つである Enhancer of zeste homolog2 (EZH2) は、ポリコーム複合体 (PCR2) を形成し、ヒストン 3 リジン 27 をメチル化することでクロマチン構造を変化させ、遺伝子の発現を抑制している。癌抑制遺伝子や細胞周期レギュレーターの発現を抑制することにより、癌の発育・進展に関与するとの報告されている。更に EZH2 を含めたエピジェネティックな領域をターゲットとした治療への応用が期待されている。

2. 研究の目的

近年の種々の癌種における治療成績の改善には化学療法・分子標的治療の進歩がその一翼を担っている。様々な癌種において、後天的 DNA 修飾によるエピジェネティックな遺伝子発現制御が明らかにされつつあり、我々は膵癌と miR101、EZH2 の関連を明らかにした。胆管癌 (肝内胆管癌・肝外胆管癌) において、現在有効な化学療法は非常に限られており、手術による根治が不可能な場合または再発癌に対する治療は困難である。本研究の目的は胆管癌におけるポリコーム蛋白を中心としたエピジェネティックな遺伝子制御機構を解明し、治療への応用を目指すことである。

3. 研究の方法

(1)胆管癌切除標本におけるポリコーム蛋白発現と、臨床病理学的因子との関連性の検討
熊本大学医学部附属病院及び関連病院における肝内胆管癌・肝外胆管癌の切除標本及びその予後・臨床病理学的因子の情報を収集する。1990-200 年に行われた肝内胆管癌・肝外胆管癌の R0 切除標本それぞれ 45 例・47 例のパラフィン包埋切片を用いてポリコーム蛋白、腫瘍増殖因子 (MIB1)、血管増殖因子 (CD34) 標的となる癌抑制遺伝子の免疫染色を行い、各因子間の関連性及び臨床病理学的因子との関連性を検討した。

(2)胆管癌細胞株を用いた、ポリコーム蛋白 (特に EZH2) の機能解析

当科にて継代培養・保存を行っている胆管癌細胞株 8 株に関して EZH2 の発現が確認されている。これらの細胞株に対して siRNA

導入を用いて EZH2 の発現抑制及びプラスミドベクター・ウイルスベクターを用いた過剰発現を行い、MTT assay にて増殖能、invasion assay にて浸潤能、scratch assay にて遊走能に与える影響を明らかにした。また、FACS を用いた解析を行う。PI 染色・Annexin 染色を行い FACS 解析を行うことで、アポトーシス細胞を検出し、EZH2 に遺伝子干渉を行った場合の変化を分析した。細胞固定後に PI 染色細胞を行い、FACS 解析を行うことで細胞周期の解析を行い、EZH2 の細胞周期に与える影響について解析を行った。これまでの文献を元にした予想としては、EZH2 の過剰発現により G1 arrest が阻害されることで、腫瘍の増殖が進むと考えられる。

(3)EZH2 阻害剤、3-deazaneplanocinA (DZNep)を用いた薬剂的 EZH2 阻害の効果検証

EZH2 高発現胆管癌細胞株である RBE、TFK-1 を用いて DZNep 単独投与及び Gemcitabine との併用における EZH2 発現抑制効果及び H3K27 メチル化の変化、細胞株の増殖能に与える変化、細胞周期及びアポトーシスに与える影響、p16^{INK4a}、p29^{KIP1} の発現変化を検討した。

4. 研究成果

(1)肝内胆管癌 (ICC)、肝外胆管癌 (ECC) に対して根治的手術を行ったそれぞれ 45 症例、41 症例に対して EZH2 及び Ki67 の免疫染色を行った。EZH2 は癌周囲の正常組織には発現を認めず、癌部、特に癌細胞の核に高発現であった。EZH2 発現と臨床病理学的因子、Ki67 発現との比較を行ったところ、ICC、ECC 共に EZH2 高発現群において有意に Ki67 高発現であり (P=0.010、P=0.029)、EZH2 高発現群において有意に生存予後が不良であった (図 1、P=0.045、P=0.028)。

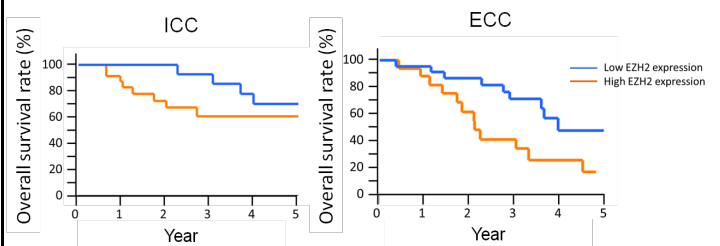


図1. ICC、ECCにおけるEZH2発現レベル別生存曲線

(2)EZH2 高発現株である RBE 及び TFK-1 を用いて EZH2 発現抑制による機能解析を行った。EZH2 を標的とした siRNA を用いて EZH2 の発現抑制を行い、細胞増殖アッセイを用いて増殖能に与える影響を評価したところ、両細胞株において 36 時間から 60 時間後に有意に細胞増殖能の低下を認めた (P<0.05)。同様に EZH2 発現抑制が細胞周期及びアポトーシスに与える影響を検証した。

FACS を用いた細胞周期解析において EZH2 発現抑制により subG0-phase, G0/G1-phase の有意な増加及び S-phase の有意な減少を認めた。更に Propidium Iodide (PI)、AnnexinV2 重染色によるアポトーシスアッセイでは PI(+)/AnnexinV(+)細胞の有意な増加を認めた。この結果により EZH2 発現抑制による G1-arrest の誘導及びアポトーシスの増加が確認された。続いて EZH2 発現を抑制した際の下流の標的遺伝子の発現変化を real-time PCR を用いて確認した。EZH2 発現抑制を行った細胞株より RNA を抽出し、細胞周期に関連する遺伝子の発現変化を測定したところ、Control 群と比して $p16^{INK4a}$ 、 $p29^{KIP1}$ の有意な発現上昇を認めた(図 2、 $P<0.001$)。従って、EZH2 は $p16^{INK4a}$ 、 $p29^{KIP1}$ の発現を制御する事で細胞周期、アポトーシスに影響を与えていると考えられた。

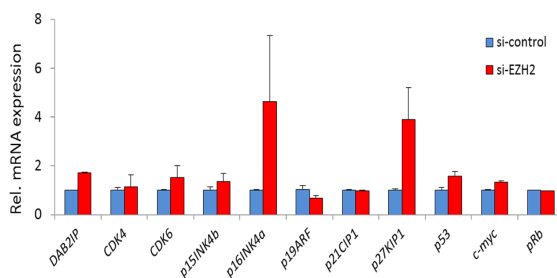


図2. EZH2発現抑制による遺伝子発現の変化

(3)結果(2)と同様に EZH2 高発現細胞株である RBE、TFK-1 を用いて DZNep を用いた EZH2 発現抑制の効果を検証した。両細胞株において DZNep 投与により EZH2 発現の抑制、H3K27m3 の発現低下をウエスタンブロットにて確認した。更に(2)と同様の方法を用いて細胞周期、アポトーシスに与える影響を検討したところ、DZNep 投与によって有意な G1-arrest の誘導、アポトーシスの増加を認めた。更に DZNep を投与における $p16^{INK4a}$ 、 $p29^{KIP1}$ の蛋白発現量の変化を確認したところ、DZNep 投与により発現量の増加が認められた(図 3)。続いて胆管癌に対する抗癌剤治療におけるキードラッグである Gemcitabine と DZNep を併用した際の効果を検証した。Gemcitabine 単独投与と比べて、DZNep との併用において細胞増殖の減少、G1-arrest、アポトーシスの増加を認め、両者の相加的な効果が認められた。この結果から EZH2 は胆管癌に対する薬剤的な治療の標的になり得る可能性が示唆された。

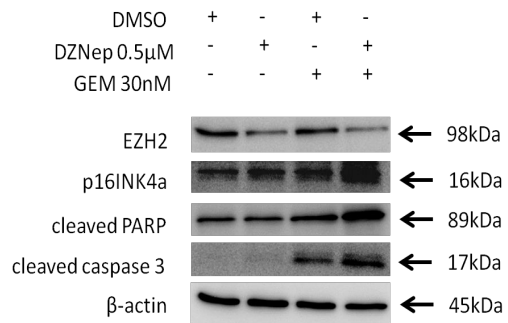


図3. DZNep添加によるたんぱく質の発現変化

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 8 件)

- Horino K, Beppu T, Komori H, Masuda T, Hayashi H, Okabe H, Takamori H, Baba H: Evaluation of mass-forming intrahepatic cholangiocarcinoma with viral hepatitis. *Hepato-Gastroenterol* 59(116): 1217-9, 2012. 査読有り
- Okabe H, Beppu T, Ueda M, Hayashi H, Ishiko T, Masuda T, Otao R, Horlad H, Mima K, Miyake K, Iwatsuki M, Baba Y, Takamori H, Jono H, Shinriki S, Ando Y, Baba H: Identification of CXCL5/ENA-78 as a factor involved in the interaction between cholangiocarcinoma cells and cancer-associated fibroblasts. *Int J Cancer* 131(10):2234-41, 2012. 査読有り
- Nakagawa S, Okabe H, Sakamoto Y, Hayashi H, Hashimoto D, Yokoyama N, Sakamoto K, Kuroki H, Mima K, Nitta H, Imai K, Chikamoto A, Watanabe M, Beppu T, Baba H: Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes progression of cholangiocarcinoma cells by regulating cell cycle and apoptosis. *Ann Surg Oncol* 20 (S3):S667-75, 2013. 査読有り、DOI: 10.1245/s10434-013-3135-y.
- Nakagawa S, Sakamoto Y, Okabe H, Hayashi H, Hashimoto D, Yokoyama N, Tokunaga R, Sakamoto K, Kuroki H, Mima K, Beppu T, Baba H: Epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A inhibits the growth of cholangiocarcinoma cells. *Oncol Rep* 31(2):983-8, 2014. 査読有り、DOI: 10.3892/or.2013.2922.
- Kuroki H, Hayashi H, Okabe H, Hashimoto D, Takamori H, Nakahara O, Nakagawa S, Fukushima Y, Chikamoto A,

- Beppu T, Hirota M, Iyama K, Baba H: EZH2 Is Associated with Malignant Behavior in Pancreatic IPMN via p27Kip1 Downregulation. *PLoS ONE* 9(8):e100904, 2014. 査読有り
6. Okabe H, Ishimoto T, Mima K, Nakagawa S, Hayashi H, Kuroki H, Imai K, Nitta H, Saito S, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Watanabe M, Nagano O, Beppu T, Saya H, Baba H: CD44s signals the acquisition of the mesenchymal phenotype required for anchorage-independent cell survival in hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 110(4):958-66, 2014. 査読有り
 7. Beppu T, Sakamoto Y, Hasegawa K, Honda G, Tanaka K, Kotera Y, Nitta H, Yoshidome H, Hatano E, Ueno M, Takamura H, Baba H, Kosuge T, Kokudo N, Takahashi K, Endo I, Wakabayashi G, Miyazaki M, Uemoto S, Ohta T, Kikuchi K, Takayama T, Yamaue H, Yamamoto M, Takada T: Optimal cut-off value for the number of colorectal liver metastases: a project study for hepatic surgery of the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 21(3):169-75, 2014. 査読有り
 8. Sakamoto K, Beppu T, Hayashi H, Nakagawa S, Okabe H, Nitta H, Imai K, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Kikuchi K, Baba H: Antiviral Therapy and Long-term Outcome for Hepatitis B Virus-related Hepatocellular Carcinoma after Curative Liver Resection in a Japanese Cohort. *Anticancer Res* 35(3):1647-55, 2015. 査読有り
- 〔学会発表〕(計8件)
1. 中川茂樹、岡部弘尚、別府透、黒木秀幸、美馬浩介、新田英利、今井克憲、生田義明、中原修、近本亮、土居浩一、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫、肝内胆管癌において EZH2 は癌の進展に關与する、第 112 回日本外科学会学術総会、平成 24 年 4 月 12 日、幕張メッセ(千葉)
 2. 中川茂樹、岡部弘尚、別府透、黒木秀幸、美馬浩介、新田英利、今井克憲、生田義明、中原修、近本亮、土居浩一、石河隆敏、高森啓史、馬場秀夫、肝内・肝外胆管癌において EZH2 はアポトーシスを制御し癌の進展に關与する、第 67 回消化器外科学会総会、平成 24 年 7 月 18 日、富山国際会議場(富山)
 3. Shigeki Nakagawa, Hirohisa Okabe, Yasuo Sakamoto, Hideyuki Kuroki, Hidetoshi Nitta, Katsunori Imai, Hiromitsu Hayashi, Yoshiaki Ikuta, Akira Chikamoto, Takatoshi Ishiko, Toru Beppu, Hideo Baba, EZH2 controls cell proliferation of cholangiocarcinoma via the inhibition of apoptosis. 第 71 回日本癌学会学術総会、平成 24 年 9 月 19 日、ロイトン札幌(北海道)
 4. Shigeki Nakagawa, Hirohisa Okabe, Yasuo Sakamoto, Hiromitsu Hayashi, Daisuke Hashimoto, Hideyuki Kuroki, Katsunori Imai, Akira Chikamoto, Masayuki Watanabe, Toru Beppu, and Hideo Baba, Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) promotes progression of cholangiocarcinoma by regulating cell cycle and apoptosis. 104th American Association of Cancer Research Annual Meeting, 2013 年 4 月 6 日、(ワシントン DC、アメリカ合衆国)
 5. 中川茂樹、岡部弘尚、坂本快郎、坂本慶太、黒木秀幸、今井克憲、新田英利、林洋光、橋本大輔、生田義明、近本亮、石河隆敏、渡邊雅之、別府透、馬場秀夫、胆管癌において EZH2 は p16^{INK4A}、p27^{KIP1} を制御し、癌の進展に關与する、第 113 回日本外科学会総会、平成 25 年 4 月 11 日、福岡国際会議場(福岡)
 6. 中川茂樹、岡部弘尚、坂本快郎、黒木秀幸、新田英利、今井克憲、生田義明、近本亮、石河隆敏、別府透、馬場秀夫、肝外胆管癌において、EZH2 は細胞周期・アポトーシスを制御して癌の進展に關与する、第 24 回消化器癌発生学会総会、平成 25 年 9 月 6 日、ホテル日航金沢(石川)
 7. Shigeki Nakagawa, Yasuo Sakamoto, Hideyuki Kuroki, Hiromitsu Hayashi, Katsunori Imai, Daisuke Hashimoto, Akira Chikamoto, Masayuki Watanabe, Toru Beppu, and Hideo Baba, Epigenetic therapy with 3-deazaneplanocin A (DZNep) inhibits growth of cholangiocarcinoma cells. 第 72 回日本癌学会学術総会、平成 25 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜(神奈川)
 8. Shigeki Nakagawa, Yasuo Sakamoto, Hiromitsu Hayashi, Daisuke Hashimoto, Hideyuki Kuroki, Katsunori Imai, Akira Chikamoto, Masayuki Watanabe, Toru Beppu, and Hideo Baba, Epigenetic therapy with 3-deazaneplanocin A (DZNep), an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, inhibits

growth of cholangiocarcinoma cells
by regulating cell cycle and
apoptosis 、 1st International
Conference of Federation of Asian
Clinical Oncology (FACO)、2013年9
月26日、廈門市 (中華人民共和國)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

近本 亮 (CHIKAMOTO, akira)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10419640

(2)研究分担者

別府 透 (BEPPU, toru)
熊本大学・医学部附属病院・特任教授
研究者番号：70301372

岡部 弘尚 (OKABE, hirohisa)
熊本大学・医学部附属病院・特任助教
研究者番号：40573621