

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460977

研究課題名(和文) 正常肝臓及び肝臓におけるヒストンメチル化酵素ESETの幹細胞制御機構の解明

研究課題名(英文) The regulatory machinery of histone methyltransferases ESET in normal liver and liver cancer

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓細胞及び正常肝臓幹細胞を用いて、H3K9のトリメチル化酵素であるESET、SUV39H1の機能解析を行った。肝臓培養細胞を用いたSUV39H1の機能喪失では、H3K9me3の発現レベルは低下しており、増殖能および腫瘍形成能が抑制され、肝臓手術検体におけるSUV39H1とH3K9me3の発現は有意に相関していた。一方で、ESETに関してはこれらの所見は認められなかった。また、ESETノックアウトマウスの胎児肝臓由来のDlk細胞のコロニーアッセイでは、培養系において幹/前駆細胞の減少と分化障害が認められた。したがって、正常肝臓及び肝臓におけるESETの役割は大きく異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Histone lysine methyltransferases, such as ESET and SUV39H1, regulate transcriptional repression through the formation of Histone H3 lysine 9 trimethylation (H3K9me3). In the loss-of-function assays for HCC cells, SUV39H1 knockdown but not ESET knockdown reduced H3K9me3 levels and impaired HCC cell growth and sphere formation. The expression levels of SUV39H1 but not those of ESET were significantly correlated with H3K9me3 levels in primary HCC samples. In addition, loss of ESET function in embryonic murine hepatic stem/progenitor cells derived from tamoxifen-inducible conditional knockout mice for ESET, severely impaired proliferation and self-renewal capability. Our findings indicate that ESET plays an essential role in the maintenance of both the proliferative and self-renewal capacity of hepatic stem/progenitor cells but not in the tumorigenicity of HCC cells.

研究分野：肝臓病学

キーワード：幹細胞

1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまでに、ポリコーン群 (PcG) タンパクのポリコーン抑制複合体 (PRC)2 の中心的分子であり、ヒストン H3K27 のトリメチル化酵素活性を有する EZH2 が、正常肝幹細胞および肝癌幹細胞双方における自己複製能の維持に必須であることを報告してきた (Chiba et al, J Hepatol, 52:854, 2010; Chiba et al, Hepatology, 52:1111, 2010; Chiba et al, Int J cancer, 130:2557, 2012)。現在では EZH2 のみならず、様々なヒストンメチル化酵素およびヒストン脱メチル化酵素の遺伝子異常や発現異常が報告されており、その機能解析が進められつつある。

2. 研究の目的

エピジェネティクスとは、DNA 塩基配列の変化を伴わずに、細胞分裂を経ても忠実に継承される遺伝子発現制御機構である。ES 細胞や組織幹細胞では、ヒストン修飾や DNA メチル化などが協調して、その未分化性の維持に関与することが知られている。一方で、エピジェネティックな制御機構による厳密な遺伝子発現制御の破綻は、癌化とも密接に関与していることが知られている。実際に、様々な癌において、DNA メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティックな異常がみとめられ、発癌および癌の進展におけるエピジェネティクスの重要性は疑う余地がない。トリメチル化ヒストン H3K9 (H3K9me3) は、トリメチル化ヒストン H3K27 (H3K27me3) と同様に、重要な転写抑制性ヒストン修飾であり、神経幹細胞や造血幹細胞などの分化制御において極めて重要であることが報告されている (Tan et al, Development, 139:3806, 2012)。また、大腸癌や前立腺癌などで癌抑制遺伝子のサイレンシングに関与することも示唆されているが (Ohm et al, Nat Genet, 37:391, 2005)、詳細は不明のままである。そこで本研究では、主にユークロマチン領域においてヒストン H3K9 のトリメチル化酵素として機能する ESET (SETDB1) および SUV39H1 に注目し、正常肝幹細胞および肝癌幹細胞におけるそれらのヒストンメチル化酵素の機能解析を行う。

3. 研究の方法

H3K9 のトリメチル化酵素として機能する ESET (SETDB1) および SUV39H1 に対する Sh-RNA を作成し、肝癌培養細胞における loss-of-function assay を行った。また、肝癌手術検体を用いた臨床病理学的を行い、バイオマーカーとしての有用性を検討した。

さらに、タモキシフェンコンディショナルノックアウトマウスを用いて、胎児肝臓より肝幹細胞 (Dlk 陽性細胞) を分離回収し、コロニーアッセイを行い、自己複製能および分化能を評価する。これらの解析を通して、肝臓における (正常) 幹細胞システムと癌幹細胞システムの異同を評価・検討した。

4. 研究成果

肝癌培養細胞を用いて ESET に対する ShRNA の安定発現株を作成したが、H3K9me3 の変化は無く、増殖能や腫瘍形成能に明らかな変化は見られなかった。一方で、SUV39H1 に対する ShRNA や低分子化合物 Chaetocin 処理による H3K9me3 阻害により、肝癌培養細胞の sphere 形成能や免疫不全マウスにおける xenograft の造腫瘍活性は有意に低下した。

また、肝癌手術検体を用いた臨床病理学的検討では、SUV39H1 と H3K9me3 の発現は有意に相関しており、これらが高発現している症例では、低発現の症例に比して再発率が有意に高い傾向をみとめた。

また、Alb-cre マウスとの交配により得られた肝臓特異的 ESET ノックアウトマウスを生後 6 ヶ月、12 ヶ月の時点で病理学的に評価したが、異常所見はみとめられなかった。

その一方で、タモキシフェンコンディショナルノックアウトマウスの胎児肝臓由来の幹/前駆細胞 (Dlk 陽性細胞) のコロニーアッセイでは、培養系において、幹/前駆細胞分画の減少と、肝細胞への強い分化障害がみとめられた。

以上の結果から、正常な幹細胞機能維持における ESET の重要性が示唆された。一方で、肝癌培養細胞を用いたアッセイ系では、ESET よりもむしろ SUV39H1 の機能喪失時に有意な変化が認められたことから、肝癌細胞の増殖能や腫瘍形成能における ESET の役割は不明瞭であった。

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 10 件)

Ogasawara S, Chiba T, Ooka Y, Suzuki E, Kanogawa N, Saito T, Motoyama T, Tawada A, Kanai F, Yokosuka O. Post-progression survival in patients with advanced hepatocellular carcinoma resistant to sorafenib. Invest New Drugs. 2016 Apr;34(2):255-60. 査読有 doi: 10.1007/s10637-016-0323-1.

Tawada A, Chiba T, Saito T,

Ogasawara S, Suzuki E, Ooka Y, Arai M, Kanda T, Shinozaki M, Goto N, Nagashima K, Yokosuka O. Utility of Prediction Scores for Hepatocellular Carcinoma in Patients with Chronic Hepatitis B Treated with Nucleos(t)ide Analogues. *Oncology*. 2016;90(4):199-208. 査読有 doi: 10.1159/000444392.

Chiba T, Iwama A, Yokosuka O. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma: Therapeutic implications based on stem cell biology. *Hepatol Res*. 2016 Jan;46(1):50-7. 査読有 doi: 10.1111/hepr.12548.

Ogasawara S, Chiba T, Ooka Y, Suzuki E, Kanogawa N, Saito T, Motoyama T, Tawada A, Kanai F, Yokosuka O. Liver function assessment according to the Albumin-Bilirubin (ALBI) grade in sorafenib-treated patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Invest New Drugs*. 2015 Dec;33(6):1257-62. 査読有 doi: 10.1007/s10637-015-0292-9.

Suzuki E, Chiba T, Ooka Y, Ogasawara S, Tawada A, Motoyama T, Kanogawa N, Saito T, Yoshikawa M, Yokosuka O. Transcatheter arterial infusion for advanced hepatocellular carcinoma: Who are candidates? *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7;21(29):8888-93. 査読有 doi: 10.3748/wjg.v21.i29.8888.

Ogasawara S, Chiba T, Ooka Y, Kanogawa N, Saito T, Motoyama T, Suzuki E, Tawada A, Kanai F, Yokosuka O. Sorafenib treatment in Child-Pugh A and B patients with advanced hepatocellular carcinoma: safety, efficacy and prognostic factors. *Invest New Drugs*. 2015 Jun;33(3):729-39. 査読有 doi: 10.1007/s10637-015-0237-3.

Chiba T, Saito T, Yuki K, Zen Y, Koide S, Kanogawa N, Motoyama T, Ogasawara S, Suzuki E, Ooka Y, Tawada A, Otsuka M, Miyazaki M, Iwama A, Yokosuka O. Histone lysine methyltransferase SUV39H1 is a potent target for epigenetic therapy of hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 2015 Jan 15;136(2):289-98. 査読有 doi: 10.1002/ijc.28985.

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 TIF1B-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.

[学会発表](計6件)

Chiba T. Cancer stem cells in hepatocellular carcinoma and epigenetic therapy. 2016年度アジア太平洋肝臓病学会議総会(APASL 2016) (2016年2月23日) グランドプリンスホテル新高輪(東京都品川区)

千葉哲博、岩間厚志、横須賀収. ヒストンメチル化による肝幹細胞制御機構. 第57回日本消化器病学会大会(2015年10月8日) グランドプリンスホテル新高輪(東京都品川区)

鈴木英一郎、千葉哲博、横須賀収. 癌幹細胞をターゲットとした医師主導第I/II相試験の試み. 第101回日本消化器病学会総会(2015年4月23日) 仙台国際センター(宮城県仙台市)

新井誠人、千葉哲博、横須賀収. HBV関連肝癌の現状と効率的な発癌サーベイ

ランスの検討. 第 56 回日本消化器病学会大会 (2014 年 10 月 23 日) 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

齊藤朋子、千葉哲博、叶川直哉、小笠原定久、鈴木英一郎、大岡美彦、太和田暁之、岩間厚志、横須賀收. 肝癌幹細胞に対する糖尿病治療薬メトホルミンの作用機序の検討. 第 50 回日本肝臓学会総会 (2014 年 5 月 29 日) ホテルニューオータニ (東京都千代田区)

大岡美彦、千葉哲博、横須賀收. 肝がん既往のない慢性肝疾患患者における EOB-MRI 肝細胞相で低信号となる乏血性結節の予後と多血化リスク. 第 100 回日本消化器病学会総会 (2014 年 4 月 23 日) 東京国際フォーラム (東京都千代田区)

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

(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