

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861050

研究課題名(和文)肝細胞癌進展におけるポリコム蛋白を介したマイクロRNAの作用機序解明

研究課題名(英文)The identification and functional analysis of micro RNA via polycomb proteins in HCC progression.

研究代表者

増田 稔郎 (MASUDA, Toshiro)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：50551256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々のこれまでの研究から、EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2)という蛋白質が癌の進展に関わっている事が分かっており、今回このEZH2を制御するマイクロRNA (miR) を、肝細胞癌細胞株を用いたデータから検索したところ、miR-32、miR-382という2つのマイクロRNAが同定された。続いてmiR-EZH2の経路がどのように肝細胞癌に作用するかを調べたところ、p16INK4aという癌抑制遺伝子と、CDH1という上皮間葉転換(癌の転移に必要な変化)を抑制する遺伝子の発現を抑制している事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Previously we reported that the EZH2 (Enhancer of Zeste Homolog 2) regulate cancer progression. Here, we retrieved microRNAs which regulate the EZH2 expression from the database of HCC (Hepatocellular carcinoma) cell lines, and we identified miR-32 and miR-382. We analyzed how miR-EZH2 pathway worked in HCC progression, and we found that the pathway suppressed p16INK4a and CDH1. p16INK4a is known as tumor suppressor gene and regulate cell cycle and senescence, and CDH1 is known as a EMT (Epithelial-Mesenchymal Transition) marker and suppress EMT.

研究分野：消化器外科 (肝胆膵外科)

キーワード：HCC micro RNA EZH2 Cancer progression

1. 研究開始当初の背景

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。しかし、肝細胞癌においては依然として有効な化学療法は非常に限られており、手術による根治治療後も再発を繰り返す特徴を有するため、新しい癌標的治療の開発が不可欠である。様々な癌種で発癌および癌進展における後天的 DNA 修飾によるエピジェネティックな遺伝子発現制御の関与が明らかにされつつあり、我々はこれまでにポリコーム蛋白 Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) の発現が膵癌・胆管癌の発育・進展や予後と関連することを明らかにした。本研究の目的は肝細胞癌進展におけるエピジェネティックな遺伝子制御機構の解明と新たな癌治療開発の基礎を築く事である。

ポリコーム複合体を構成するポリコーム蛋白の一つである EZH2 は、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、癌抑制遺伝子や細胞周期関連遺伝子の発現を抑制することにより、癌の発育・進展に関与することが報告されている(図 1)。EZH2 を含めたポリコーム蛋白の癌発育・進展における役割を明らかにすることで、EZH2 の H3K27 メチル化部位をターゲットとしたメチル化阻害剤を用いた癌治療への臨床応用が期待される。乳癌・前立腺癌・卵巣癌の領域では、癌抑制遺伝子 p27^{KIP1} やサイクリン依存性キナーゼ CDK との関連が報告されている一方、消化器癌領域での EZH2 の役割については不明な点が多い。我々は予後不良な癌種として知られる胆管癌・膵癌において EZH2 高発現が予後不良因子である事(図 2)に加えて、癌抑制遺伝子 p16^{INK4a}、p27^{KIP1} の転写を抑制し癌進展を促進するメカニズム(図 3)や、EZH2 の発現誘導に関与する因子として microRNA (miR101) が上流に位置して EZH2 の発現を抑制することを明らかにした。

2. 研究の目的

本研究の目的は、EZH2 を介した癌進展を制御する microRNA を同定し、HCC におけるその機能を明らかにすることである。

3. 研究の方法

肝細胞癌細胞株において miR-EZH2 の発現抑制・過剰発現を行い、癌の増殖・浸潤・遊走・アポトーシスに及ぼす影響を明らかにする。同時に FACS (fluorescence activated cell sorting) を用いた解析にてアポトーシス・細胞周期に与える影響を検索する。さらに、miR を介したエピジェネティックな制御機構を明らかにする。本研究では microRNA により EZH2 を介した p16^{INK4a}/CDH1 の制御が行われているという仮説に基づいて、ルシフェラーゼリポーターアッセイ、クロマチン免疫沈降を用いてこれを証明する。続いて、in vitro において確認された制御機構をヒト検体・in vivo における mRNA レベル・タンパ

クレベルでの解析を行い、生体内での動態を確認し、in vivo での増殖能・浸潤/転移能を評価し、生体内における microRNA-EZH2 経路の役割を検証する。更にメチル化阻害剤を用いた腫瘍増殖抑制、治療への応用へと進める。

1. EZH2 を制御する microRNA の同定

EZH2 高発現の HCC 細胞株である HLE、SKHep1 と低発現細胞株である PLC と HLF を用いて microRNA-PCR array にて 400 種類の microRNA の発現レベルを測定し、このデータを用いて EZH2 を制御する microRNA を同定する。

2. 肝細胞癌における miR-EZH2 pathway 機能的役割の解明

2-1

肝細胞癌進展における miR32/382 の役割

当科にて所有している肝細胞癌細胞株 8 株を用いて miR32/382 の過剰発現及び発現抑制の実験を行う。miR32/382 をターゲットとした pre-miR/anti-miR を肝細胞癌細胞株にトランスフェクションし、control と比較することでその機能解析を行い、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する。また、FACS を用いた解析を行う。PI 染色・Annexin 染色・FACS 解析を行うことで、アポトーシス細胞を検出し、miR32/382 がアポトーシスに与える影響を分析する。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に与える影響を検討する。

2-2

miR32/382 と EZH2、p16^{INK4a}/E-cadherin (CDH1) との関連

我々の基礎実験結果から、siRNA を用いた EZH2 発現抑制時に、p16^{INK4a} と CDH1 の発現の著明な上昇が誘導されることが分かっている。これは、EZH2 がヒストンのメチル化を介してこの 2 つの遺伝子の発現を抑制していることを示唆する。また、EZH2 を制御する miR の絞込みにより miR32/382 が EZH2 を抑制的に制御していると考えられる。まず、pre-miR を用いた miR32/382 過剰発現細胞株における、EZH2 発現低下、および p16^{INK4a}、CDH1 の発現上昇を確認し、anti-miR を用いてその逆の変化を確認する。

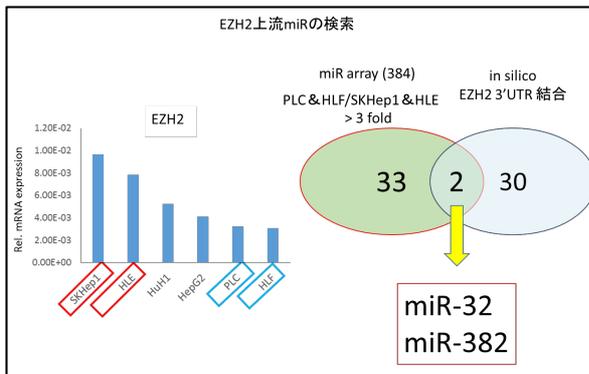
4. 研究成果

1. EZH2 を制御する microRNA の同定

PCR array を用いて EZH2 発現誘導に関与する microRNA (miR) の検索を行った。肝細胞癌細胞株の中で EZH2 高発現株である SKHep1・HLE と、EZH2 低発現株である PLC・HLF の 4 つの細胞株に対して 328 種類の miR をターゲットとした PCR array を行った。SKHep1・HLE にて低発現、PLC・HLF において高発現である miR のうち、3 倍以上の差があるものを pick up し、更に in silico において EZH2 の

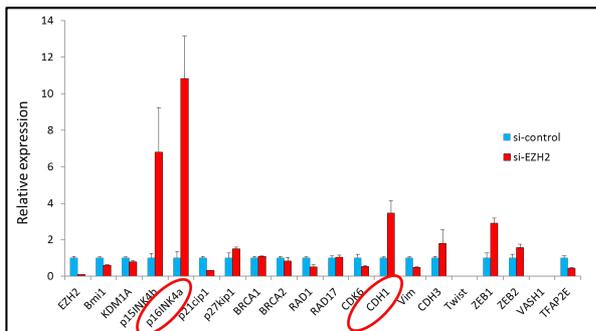
3' -UTR との結合能を有する miR を選択した。これにより EZH2 を制御する miR の候補として miR-32、miR382 が抽出された。

2. 肝細胞癌における miR-EZH2 pathway の機



能的役割の解明

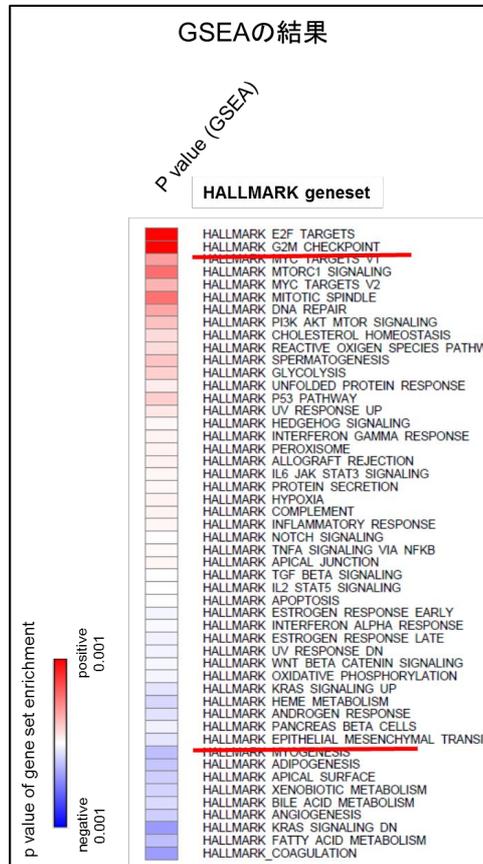
肝細胞癌細胞株 HLE を用いて siRNA による EZH2 の発現を抑制し、細胞周期、上皮間葉転換、血管新生に関わる遺伝子群の発現変化を比較し、肝細胞癌における EZH2 のターゲット遺伝子の検索を行った。その結果、癌抑制遺伝子である p16INK4a と上皮間葉転換に関与する E-cadherin (CDH1) の著明な発現上昇を認め、EZH2 が p16INK4a と CDH1 の発現を抑制し、細胞周期及び EMT の制御に関わっていると考えられた。



続いて、臨床検体における miR-EZH2 経路と細胞周期及び EMT の関係を調べるために、パブリックデータベースを用いて解析を行った。HCC の gene expression array のデータベースである GSE1898 を用いて、GSEA (gene set enrichment analysis) を行った。検体を EZH2 高発現群と低発現群に分けて HALLMARK geneset の発現パターンを比較検討した。EZH2 高発現群において、細胞周期 geneset (G2/M checkpoint) は強い発現増強を認めたが、EMT (Epithelial mesenchymal transition) は相関を認めなかった。

miR-EZH2 経路は、細胞周期を制御し、腫瘍の進展に関わると考えられたが、EMT への関与は証明できなかった。

GSEAの結果



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 12 件)

Endoscopic Radiofrequency Ablation in Elderly Patients with Hepatocellular Carcinoma. Doi K, Beppu T, Ishiko T, Chikamoto A, Hayashi H, Imai K, Nitta H, Baba Y, Masuda T, Okabe K, Kuramoto M, Kudo K, Ogata K, Ohchi T, Takamori H, Kikuchi K, Baba H: *Anticancer Res* (in press).

The effect of extensive intraoperative peritoneal lavage therapy (EIPL) on stage III B + C and cytology-positive gastric cancer patients. Masuda T, Kuramoto M, Shimada S, Ikeshima S, Yamamoto K, Nakamura K, Yoshimatsu S, Urata M, Baba H. *Int J Clin Oncol*. 2016 Apr;21(2):289-94. doi: 10.1007/s10147-015-0892-6.

Intraoperative baseline oxygen consumption as a prognostic factor in emergency open abdominal surgery. Masuda T, Kuramoto M, Tanimoto H, Yamamoto K, Ikeshima S, Kitano Y, Kuroda D, Shimada S, Baba H. *J Crit Care*.

2016 Apr;32:42-7
doi: 10.1016/j.jcrc.2015.11.014.

Predictive factors of pathological vascular invasion in hepatocellular carcinoma within 3 cm and 3 nodules without radiological vascular invasion. **Masuda T**, Beppu T, Okabe H, Nitta H, Imai K, Hayashi H, Chikamoto A, Yamamoto K, Ikeshima S, Kuramoto M, Shimada S, Baba H. *Heatol Res*. 2015 Dec 15.
doi: 10.1111/hepr.12637.

Repeated hepatic resections and radio-frequency ablations may improve the survival of adult undifferentiated embryonal sarcoma of the liver: report of two cases. **Masuda T**, Beppu T, Doi K, Miyata T, Nakagawa S, Okabe H, Hayashi H, Ishiko T, Iyama K, Baba H. *Surg Case Rep*. 2015;1(1):55.
doi: 10.1186/s40792-015-0056-y.

Angiopoietin-like protein 2 renders colorectal cancer cells resistant to chemotherapy by activating spleen tyrosine kinase-phosphoinositide 3-kinase-dependent anti-apoptotic signaling. Horiguchi H, Endo M, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Odagiri H, **Masuda T**, Kadomatsu T, Tanoue H, Motokawa I, Terada K, Morioka MS, Manabe I, Baba H, Oike Y. 3-kinase-dependent anti-apoptotic signaling. *Cancer Sci* 2014;105(12):1550-9. doi: 10.1111/cas.12554.

Splanchnicectomy for pancreatic cancer pain. **Masuda T**, Kuramoto M, Shimada S, Ikeshima S, Yamamoto K, Nakamura K, Baba H: *BioMed Res Int* 2014;941726, 2014.
doi: 10.1155/2014/941726.

Sarcopenia is a prognostic factor in living donor liver transplantation. **Masuda T**, Shirabe K, Ikegami T, Harimoto N, Yoshizumi T, Soejima Y, Uchiyama H, Ikeda T, Baba H, Maehara Y: *Liver Transpl* 20(4):401-7, 2014.
doi: 10.1002/lt.23811.

Carcinoembryonic Antigen Half-life Is an Early Predictor of Therapeutic Effects in Induction Chemotherapy for Liver Metastases from Colorectal Cancer. Nagai Y, Beppu T, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Hayashi H, Nitta H, Imai K, **Masuda T**, Okabe H, Hirashima K, Imamura Y, Baba Y, Chikamoto A, Baba H: *Anticancer Res* 34(10):5529-35,

2014.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Carcinoembryonic+Antigen+Half-life+Is+an+Early+Predictor+of+Therapeutic+Effects+in+Induction+Chemotherapy+for+Liver+Metastases+from+Colorectal>

Remnant liver volume-based predictors of postoperative liver dysfunction after hepatectomy: analysis of 625 consecutive patients from a single institution. Okabe H, Beppu T, Chikamoto A, Hayashi H, Yoshida M, **Masuda T**, Imai K, Mima K, Nakagawa S, Kuroki H, Nitta H, Ishiko T, Hashimoto D, Yamashita Y, Baba H: *Int J Clin Oncol* 2014;19(4):614-21.
doi: 10.1007/s10147-013-0591-0.

Rank classification based on the combination of indocyanine green retention rate at 15 min and (99m)Tc-DTPA-galactosyl human serum albumin scintigraphy predicts the safety of hepatic resection. Okabe H, Beppu T, Hayashi H, Mima K, Nakagawa S, Kuroki H, Imai K, Nitta H, **Masuda T**, Hashimoto D, Chikamoto A, Watanabe M, Ishiko T, Yoshida M, Yamashita Y, Baba H: *Nucl Med Commun* 2014;35(5):478-83.
doi: 10.1097/MNM.0000000000000075.

Endoscopic versus Open Hepatic Resection for Patients with Hepatocellular Carcinoma Meeting the Milan Criteria: A Propensity Case-matched Analysis. Beppu T, Hayashi H, Okabe H, Imai K, Nitta H, **Masuda T**, Hashimoto D, Chikamoto A, Ishiko T, Kikuchi K, Baba H: *Anticancer Res* 2015;35(3):1583-90.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Endoscopic+versus+Open+Hepatic+Resection+for+Patients+with+Hepatocellular+Carcinoma+Meeting+the+Milan+Criteria>

〔学会発表〕(計 5件)

増田稔郎、倉本正文、北野雄希、黒田大介、山本謙一郎、池嶋聡、別府透、馬場秀夫、島田信也、「肝右葉切除を施行した10cm以上の単発巨大肝細胞癌の治療成績」、第51回日本肝臓学会総会、2015年5月21日、鶴屋東館(熊本県・熊本市)

増田稔郎、倉本正文、池嶋聡、山本謙一郎、北野雄希、黒田大介、谷本宏成、島

田信也、馬場秀夫、「緊急開腹手術における酸素摂取量測定の意義」、第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年 4 月 17 日、名古屋国際会議場（愛知県・名古屋市）

増田稔郎、倉本正文、池嶋聡、山本謙一郎、北野雄希、黒田大介、谷本宏成、島田信也、馬場秀夫、「緊急開腹手術において術前アルブミン値と術中酸素摂取量は予後を予測する」、第 40 回九州代謝・栄養研究会、2015 年 3 月 12 日、沖縄県市町村自治会館（沖縄県・那覇市）

増田稔郎、倉本正文、池嶋聡、山本謙一郎、北野雄希、黒田大介、別府透、馬場秀夫、島田信也、「腹腔鏡補助下肝部分切除術における肝静脈根部からの出血と対応」、第 36 回九州肝臓外科研究会学術集会、2015 年 1 月 31 日、大塚製薬グループビル（福岡県・久留米市）

Shigeki Nakagawa, Yasuo Sakamoto, Ryuma Tokunaga, Takaaki Higashi, Keita Sakamoto, Akira Chikamoto, Takatoshi Ishiko, Toru Beppu, Hideo Baba. Vasohibine-1 negative and EZH2 positive may predict the prognosis of cholangiocarcinoma. AACR Annual Meeting 2014, 2014 年 4 月 8 日、San Diego Convention Center（米国・サンディエゴ）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 稔郎 (MASUDA, Toshiro)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：50551256

(2) 研究分担者

無し

(3) 研究協力者

中川 茂樹 (NAKAGAWA, Shigeki)
熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師
研究者番号：10594872