



北海道公立大学法人
札幌医科大学
Sapporo Medical University

SAPPORO MEDICAL UNIVERSITY INFORMATION AND KNOWLEDGE REPOSITORY

Title 論文題目	Analysis of the anti-tumor mechanism of BRD4 inhibition in hepatocellular carcinoma (肝細胞癌における BRD4 阻害の抗腫瘍効果メカニズムの解析)
Author(s) 著者	佐々木, 基
Degree number 学位記番号	甲第 3048 号
Degree name 学位の種別	博士 (医学)
Issue Date 学位取得年月日	2019-3-31
Original Article 原著論文	札幌医学雑誌 88 巻 1 号 掲載予定
Doc URL	
DOI	
Resource Version	Author Edition

学位論文の内容の要旨

報告番号	甲第 3048 号	氏名	佐々木 基
主論文			
Analysis of the anti-tumor mechanism of BRD4 inhibition in hepatocellular carcinoma (肝細胞癌における BRD4 阻害の抗腫瘍効果メカニズムの解析)			
【研究目的】			
<p>肝細胞癌は世界中で毎年 700,000 人以上が死亡する疾患であり、その患者数は全癌腫中、男性で第 5 位、女性で第 9 位と多くの患者が存在する。本邦においても部位別癌死亡数で第 5 位と多くの患者が本疾患において命を落としている。しかしながら本疾患に対する有効な全身化学療法は、2008 年に分子標的治療薬である Sorafenib が登場するまでは存在しなかった。近年ようやく新規分子標的治療薬が治療適応となったが、その種類、効果共に十分とは言い難く、有効な新規治療薬の登場が期待されている。</p> <p>近年、ヒストン修飾や DNA メチル化などのエピジェネティックな制御機構の異常が、癌の発生、進展に重要であることが明らかとなり、それらは可逆的な変化であることから、有望な治療標的として期待されている。エピジェネティックな変化の一つにヒストンアセチル化があるが、その reader 蛋白質である BET ファミリー蛋白質は転写調節に重要な役割を担うことが知られている。近年、BET ファミリー蛋白質の一つである BRD4</p> <p>(Bromodomain-containing protein 4) 蛋白質に対する阻害剤 (以下 BRD4 阻害剤) が開発され、様々な悪性腫瘍に対して抗腫瘍効果を示す事が報告されている。BRD4 阻害剤の肝細胞癌に対する抗腫瘍効果も報告されているが、その詳細な分子メカニズムに関しては解明されていない。本研究は、BRD4 阻害剤の肝細胞癌に対する抗腫瘍メカニズムを明らかにすることを目的とした。</p>			
【研究方法】			
<u>1. 肝癌細胞株と正常肝組織</u>			
<p>肝癌細胞株 JHH-4, Li-7, HepG2, Hep3B, HLE, HLF, huH-1, HuH-7, PLC/PRF/5 を研究対象とした。BioChain 社より健常成人の正常肝組織由来の RNA を購入し、遺伝子発現解析に用いた。</p>			
<u>2. 薬剤処理と細胞増殖解析</u>			
<p>肝細胞癌株を BRD4 阻害剤 JQ1 (濃度 0.001 μM, 0.048 μM, 0.24 μM, 1.2 μM, 6 μM, 30 μM) あるいは DMSO で 5 日間処理して、細胞増殖に与える影響を cell viability アッ</p>			

セイによって検証した。

3. 細胞周期とアポトーシス解析

肝癌細胞株を JQ1 (濃度 1 μM) で 48 時間処理し、細胞周期およびアポトーシスをフローサイトメトリー法により解析した。

4. 定量 RT-PCR

肝癌細胞株より RNA を抽出して cDNA を合成し、遺伝子発現を SYBR green を用いた定量 RT-PCR (qRT-PCR) 法により解析した。

5. 遺伝子発現マイクロアレイ解析

肝癌細胞株を JQ1 (濃度 1 μM) あるいは DMSO で 24 時間処理後に RNA を抽出し、遺伝子発現をマイクロアレイ (Agilent 製 SurePrint G3 Human GE マイクロアレイ) により網羅的に解析した。Gene Spring GX ソフトウェアを用いて JQ1 処理により発現変動する遺伝子を抽出し、バイオインフォマティクス解析 (Gene Ontology 解析、Pathway 解析) を行った。

6. siRNA を用いた BRD4 のノックダウン

肝癌細胞株に BRD4 に対する siRNA あるいはコントロール siRNA を Lipofectamine RNAiMAX を用いてトランスフェクションし、48 時間後に RNA を抽出した。

7. クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイ

抗 BRD4 抗体あるいは抗アセチル化ヒストン H3 リジン 27 (H3K27ac) 抗体を用いて肝癌細胞株のクロマチンを免疫沈降して定量 PCR を行うことで (ChIP-qPCR)、BRD4 のゲノム上への結合およびヒストンのアセチル化を検証した。

【研究成績】

1. BRD4 阻害剤が肝癌細胞株に対する抗腫瘍効果

肝癌に対する JQ1 の抗腫瘍効果を検証するため、肝癌細胞 9 株 (JHH-4, Li-7, HepG2, Hep3B, HLE, HLF, huH-1, HuH-7, PLC/PRF/5) を、各濃度 (0.001 μM , 0.048 μM , 0.24 μM , 1.2 μM , 6 μM , 30 μM) の JQ1 で 5 日間処理し、細胞増殖に与える影響を cell viability assay で検証した。その結果、いずれの細胞においても増殖抑制効果を認めたが、50%阻害濃度 (IC50) は細胞株によって異なっており、細胞によって感受性が異なることが示された。高感受性株である HuH-7, HLE, Hep3B を用いて細胞周期およびアポトーシス解析を行った結果、JQ1 により細胞周期停止とアポトーシスの誘導効果が確認された。しかし低感受性株である huH1, PLC/PRF/5 では、細胞周期停止とアポトーシス誘導は限定的であった。

2. BRD4 阻害剤が遺伝子発現プロファイルに与える影響

BRD4 阻害による抗腫瘍効果メカニズムを明らかにするため、JQ1 処理が遺伝子発現に与える影響をマイクロアレイにより網羅的に解析した。マイクロアレイ解析に最適な

JQ1 処理の条件を検討するため、肝癌における既報の BRD4 標的遺伝子である MYC および E2F2 の発現を定量 RT-PCR により解析した。その結果、MYC は JQ1 処理開始後 6 ～24 時間後に発現が最も低下し、48 時間後には回復する傾向が複数の細胞株で確認された。一方、E2F2 は時間および濃度依存的に発現が抑制される傾向にあった。これらの結果を踏まえ、全ての肝癌細胞株を 1 μ M の JQ1 あるいは DMSO で 24 時間処理した後に RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。全ての細胞株で共通して JQ1 により発現抑制された遺伝子について、Gene Ontology 解析および Pathway 解析を行った結果、細胞周期やアポトーシスに関連する遺伝子が多数含まれることが分かった。

3. BRD4 阻害剤の抗腫瘍効果に関わる遺伝子の検索

次に我々は、JQ1 の抗腫瘍効果に関係する遺伝子の同定を試みた。TCGA (The Cancer Genome Atlas) が公開している肝癌症例 (n=377) の遺伝子発現解析データと、我々のマイクロアレイデータを比較することで、肝癌において発現上昇を認め、かつ JQ1 処理により抑制される遺伝子として、BCAT1、FANCD2、MAPK3、NUAK1、PAK1、SENP1、TYRO3 を抽出した。また、肝癌との相関が報告されている遺伝子として DDR1、GDF15 を抽出した。これらの遺伝子発現を、肝癌細胞株および正常肝組織を用いて定量 RT-PCR 解析した結果、肝癌細胞株で発現有意な発現上昇が見られた 6 遺伝子 (BCAT1、DDR1、GDF15、FANCD2、SENP1、TYRO3) を、BRD4 阻害剤の抗腫瘍効果に関与する遺伝子候補として抽出した。

4. BRD4 標的遺伝子の検証

上記で同定した遺伝子の JQ1 による発現抑制が、BRD4 の特異的な阻害によるものかを検証するため、siRNA を用いて BRD4 をノックダウンして定量 RT-PCR を行った。その結果、6 遺伝子 (BCAT1、DDR1、GDF15、FANCD2、SENP1、TYRO3) のいずれも、BRD4 のノックダウンによって発現が低下した。

最後に、これらの遺伝子が BRD4 の直接の標的遺伝子であるかを検証した。まず ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) の公開データから、肝癌細胞株 HepG2 のヒストン H3 リジン 27 アセチル化 (H3K27ac) のデータを得た。6 遺伝子 (BCAT1、DDR1、GDF15、FANCD2、SENP1、TYRO3) の転写開始点近傍における H3K27ac の位置をもとに BRD4 結合領域を推測し、抗 H3K27ac 抗体あるいは抗 BRD4 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行い、各遺伝子の転写開始点領域を定量 PCR (ChIP-qPCR) 解析した結果、それぞれの転写開始点領域における H3K27ac および BRD4 の結合を確認した。これらの結果から、6 遺伝子は肝癌細胞において BRD4 の直接の標的遺伝子であることが示唆された。

【考察】

本研究で我々は、肝細胞癌において BRD4 阻害の抗腫瘍効果に関わる可能性のある遺

伝子を複数同定した。BCAT1 (Branched-chain amino acid transaminase 1) は細胞内 α ケトグルタル酸濃度を調整することで他の癌関連遺伝子の活性を制御し、癌促進的に働く。DDR1 (Discoidin domain receptor 1) は細胞膜受容体であり細胞外コラーゲンをリガンドとし NF κ B シグナルや MAPK シグナルの活性化に関与する。FANCD2 (Fanconi anemia complementation group D2) は DNA 修復に関与する蛋白であり DNA 損傷性抗がん剤に対する抵抗性のみならず、細胞増殖抑制、細胞周期停止に関与するとされる。GDF15 (growth differentiation factor 15) は TGF- β スーパーファミリー蛋白の一つであり、炎症、組織損傷などにより誘導されて MAPK シグナル、PI3K シグナルを活性化する。SEN1 (Specific SUMO protease 1) は HIF-1 α を脱 SUMO 化することで安定化させ、肝癌細胞の stemness に関与することが報告されている。TYRO3 (TYRO3 protein tyrosine kinase) は細胞膜受容体で凝固因子をリガンドとし NF κ B シグナル、MAPK シグナルの活性化に寄与する。これらの遺伝子はいずれも肝細胞癌において癌促進的に働く事が報告されており、これらを抑制することが BRD4 阻害剤の抗腫瘍効果につながる可能性が考えられた。これまで肝細胞癌における BRD4 標的として MYC や E2F2 が報告されているが、本研究はそれ以外にも様々な癌関連遺伝子が BRD4 標的であることを提示した。

しかしながら、本研究にはいくつかの限界がある。まず肝癌細胞株における各遺伝子の発現量や、BRD4 阻害剤による抑制の度合いと、BRD4 阻害剤感受性との相関は認められなかった。BRD4 阻害剤の感受性を規定する因子や BRD4 阻害剤感受性予測因子の同定のためには、今後さらなる研究が必要である。また BRD4 は癌細胞のスーパーエンハンサー領域に結合し、MYC など癌遺伝子を活性化することが知られている。今回我々が同定した BRD4 標的遺伝子候補も、癌特異的なエンハンサーにより活性化される可能性があるが、そのようなエンハンサー領域を同定するにはさらなる研究が必要である。最後に、siRNA による BRD4 ノックダウンによる効果は、BRD4 阻害剤 JQ1 と比べ限定的であった。このことから今回我々が同定した遺伝子は BRD4 以外の BET ファミリータンパクの標的である可能性も完全には否定できていない。

【結論】

本研究は、BRD4 阻害が肝細胞癌の遺伝子発現プロファイルに大きな影響を与えることを明らかにした。その中から、我々は肝細胞癌における新規の BRD4 標的遺伝子候補を同定した。本研究の結果から、複数の癌関連遺伝子の発現を抑制する事が、肝細胞癌における BRD4 の抗腫瘍効果につながっている可能性が示された。

論文審査の要旨及び担当者

(平成 31 年 3 月 31 日授与)

報告番号	甲第 3048 号	氏 名	佐々木 基
論文審査 担当者	主査 教授 仲瀬 裕志	副査	教授 加藤 淳二
	副査 教授 時野 隆至	委員	教授 鈴木 拓

論文題名	Analysis of the anti-tumor mechanism of BRD4 inhibition in hepatocellular carcinoma (肝細胞癌における BRD4 阻害の抗腫瘍効果メカニズムの解析)
結果の要旨	
<p>BRD4 を含む BET ファミリー蛋白質はアセチル化ヒストンのリーダー蛋白質であり、転写調節において重要な役割を担っている。BRD4 阻害剤は様々な悪性腫瘍において抗腫瘍効果を示す事が報告されているが、肝細胞癌における報告は少ない。今回我々は、肝細胞癌における BRD4 阻害の抗腫瘍効果メカニズムの解明を目的とし研究を行った。まず BRD4 阻害剤 JQ1 の抗腫瘍効果を 9 種類の肝癌細胞株を用いて検証した結果、増殖抑制、細胞周期停止、アポトーシスの誘導が認められた。次に我々は、JQ1 が遺伝子発現に与える影響をマイクロアレイによって解析した。その結果、JQ1 が細胞周期やアポトーシス関連遺伝子に強い影響を与えること、そして BCAT1、DDR1、GDF15、FANCD2、SENPI、TYRO3 など複数の肝細胞癌関連遺伝子の発現を抑制することを見いだした。これらの遺伝子のプロモーター領域への BRD4 結合が確認されたことから、これらは肝細胞癌における BRD4 の標的遺伝子と考えられた。今回の結果から、BRD4 阻害剤は複数の癌関連遺伝子を抑制することで、肝細胞癌に対する抗腫瘍効果を示すと考えられた。</p> <p>上記研究内容の発表と研究内容に関する質疑応答を行い、博士（医学）の学位授与に値すると審査委員全員に認められた。</p>	