

博士論文

肝腫瘍発生における
ヒストン脱メチル化酵素 **KDM3A** の役割

中塚 拓馬

目次

目次	1
要旨	3
序文	4
方法	13
1). マウス	
2). 病理組織および免疫組織染色	
3). 肝組織中遊離脂肪酸濃度の測定	
4). 定量的リアルタイム PCR 法	
5). イムノブロット法・免疫沈降法	
6). cDNA マイクロアレイ	
7). <i>Pik3ca</i> 安定発現 BNL-CL2 細胞株	
8). クロマチン免疫沈降法 (ChIP)	
9). レンチウイルスベクターを用いた遺伝子ノックダウン	
10). スフィア形成能アッセイ	
11). ヒト肝針生検検体	
12). 統計解析	

結果	22
1). <i>Pik3ca</i> Tg マウスと <i>Kdm3a</i> ^{KO} マウスの交配	
1-1). 腫瘍形成について	
1-2). PI3K/Akt 活性および肝脂肪蓄積について	
2). 肝腫瘍形成促進的に働く KDM3A 依存性遺伝子群の検索	
3). マウス肝における AP-1 標的遺伝子の発現	
4). PI3K シグナルと c-Jun/AP-1 活性	
5). KDM3A による AP-1 標的遺伝子の転写制御機構	
6). AP-1 標的遺伝子が肝腫瘍形成に及ぼす影響	
7). ヒト肝前癌病変における検討	
考察	47
引用文献	54
謝辞	74

要旨

PI3K シグナル活性化を背景とした脂肪肝および肝腫瘍発生においてヒストン脱メチル化酵素 KDM3A が果たす役割についてマウスモデルを用いて検討した。

KDM3A は PI3K シグナル活性および肝脂肪蓄積には影響しないが、肝腫瘍発生に必要であることを見出した。PI3K シグナルが活性化した肝において c-Jun/AP-1 の転写活性が亢進しており、KDM3A は AP-1 の転写活性を脱メチル化活性非依存的な機序で制御することで肝腫瘍発生に寄与していると考えられた。本研究は PI3K シグナル活性を背景とした肝腫瘍発生に KDM3A が重要であり、治療標的となりうる可能性を示唆している。

序文

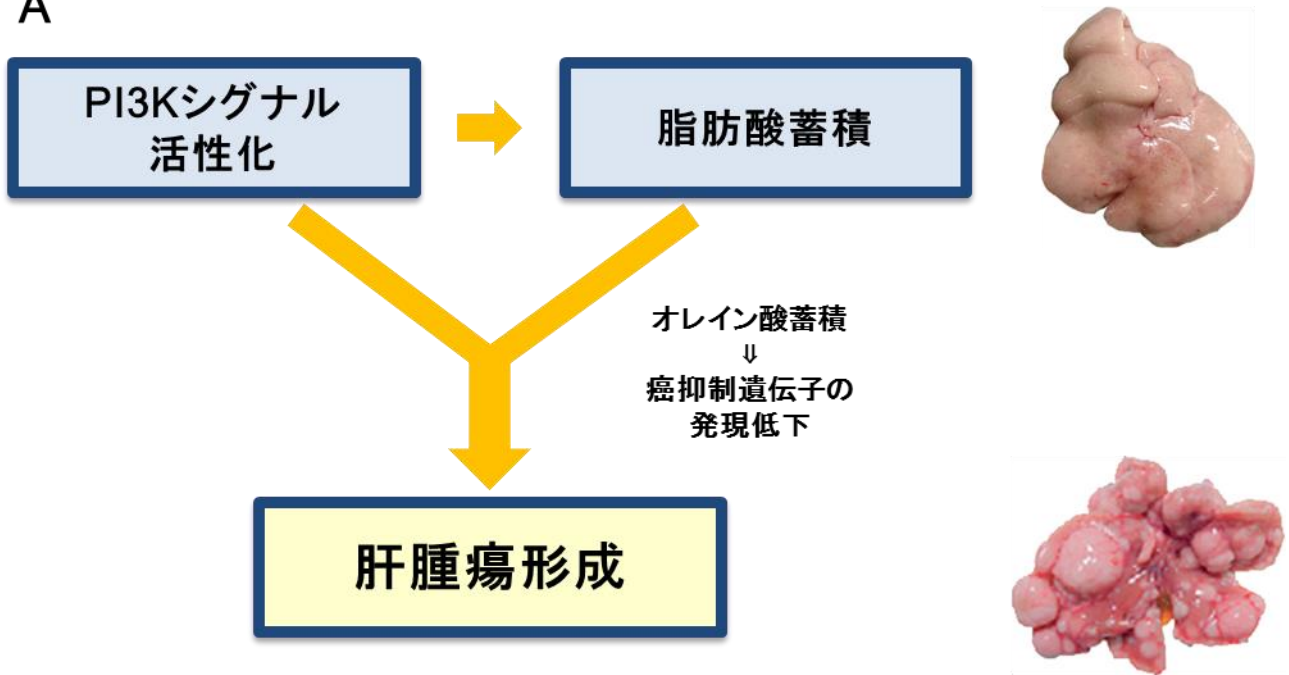
肝癌は世界で5番目に多い癌で、癌死因の第3位である [1]。ここ十数年で肝癌は増加傾向にあり、特に日本を含めた東アジアでは肝癌発生が非常に多い [2-4]。多くの肝癌は慢性肝疾患を背景として発症するが、主なリスクファクターはB型肝炎ウイルスおよびC型肝炎ウイルスの持続感染であり、その他にアルコール性肝障害、非アルコール性脂肪性肝疾患 (Nonalcoholic fatty liver disease: NAFLD) も重要なリスクファクターとして知られている [5]。

NAFLD はアルコールの過剰摂取歴がないにも関わらず肝臓に脂肪が蓄積する病態である。NAFLD の多くは単純性脂肪肝であるが、一部は慢性炎症と線維化を伴う脂肪性肝炎 (Nonalcoholic steatohepatitis: NASH) に進展し、線維化が進行すると肝硬変に至り肝癌の発生母地となる [6-8]。生活習慣の変化などにより世界中で NAFLD 患者が増加しており、本邦においても現在約 1000 万人の NAFLD 患者がいると言われている [9,10]。NAFLD はメタボリックシンドロームの肝臓表現型とも言われる病態であり、肥満、糖尿病などとの関連も強く、これらも肝癌発症の独立したリスクファクターである [11,12]。単純性脂肪肝を含めた NAFLD 全体からみた肝癌発生率は年間 0.05% 程度と、ウイルス性肝炎からの肝癌発症率に比べればかなり低率である [13-15]。しかし NAFLD 患者の母数は多く今後さらに増加が見込まれる状況であり、NAFLD からの肝発癌は増加すること

が予想されるためその対策は喫緊の課題である。

ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI3K) /Akt シグナルは代謝、増殖、抗アポトーシス作用など、様々な細胞内機能に関与している [16,17]。Akt はインスリンシグナルの主要なエフェクターであり、その活性化は肝脂肪蓄積を促進する [18]。また肝癌では約 2-3 割に Akt の活性化が見られ、PI3K 触媒サブユニットの P110 α タンパクをコードする *Pik3ca* 遺伝子の変異も報告されている [19,20]。我々は以前 *Pik3ca* 遺伝子を肝細胞特異的に発現させたトランスジェニックマウス (*Pik3ca* Tg マウス) を作成した [21]。このマウスの肝臓は PI3K/Akt シグナルの恒常活性化により著明な脂肪肝となり、約 1 年の経過で肝腫瘍を形成する (図 1A)。さらに脂肪酸の機能に着目したところ、*Pik3ca* Tg マウスに形成された肝腫瘍には脂肪酸の異常蓄積が見られ、特にオレイン酸が癌抑制遺伝子の発現を抑制し肝腫瘍形成に促進的に働いていることを見出した (図 1B)。これらの結果は PI3K/Akt シグナルが脂肪肝からの肝腫瘍形成に重要であることを示唆しており、このモデルは脂質代謝異常を背景とした肝腫瘍形成を研究する上で有用と考えられた。

A



B

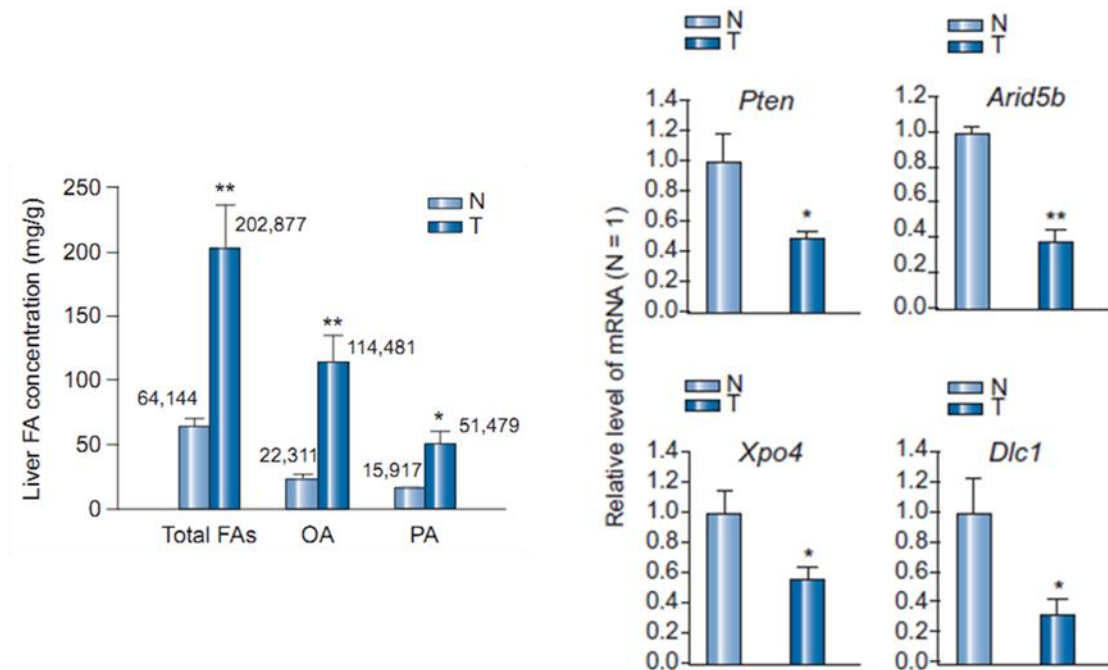


図1. PI3K/Aktシグナルは脂肪肝からの肝腫瘍形成を促進する(文献21より引用)

(A) *Pik3ca* Tg マウス肝では若齢期より著明な脂肪肝を呈し、約1年の経過で肝腫瘍が形成される。(B) 腫瘍部では脂肪酸、特にオレイン酸(OA)の蓄積が見られ、その結果癌抑制遺伝子(*Pten*, *Arid5b*, *Xpo4*, *Dlc1*)の発現が抑制されている。

一方、癌の発生および進展におけるエピジェネティクスの重要性が明らかになってきており、治療標的としても期待されている [22]。エピジェネティクスとは DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御する機構のことであり、よく知られているエピジェネティックな変化として、DNA のメチル化とヒストン修飾が挙げられる。

DNA のメチル化は CpG 配列と呼ばれるシトシンとグアニンがホスホジエステル結合で結びついた 2 塩基配列のシトシン側に起こる。DNA メチル化は遺伝子の転写に関わる様々な因子の結合を阻害し、また後述するヒストン修飾と協調して転写不活性なクロマチン状態を形成し、遺伝子発現を調整している。癌において DNA メチル化は非常に重要であり、癌の進行とともにゲノム全体の低メチル化が進行することが知られており、その結果染色体不安定性が増大することなどにより癌が進展すると言われている。また多くの癌種において癌抑制遺伝子のプロモーター領域 CpG アイランドがメチル化されており、様々な癌抑制遺伝子の発現が抑制されることで腫瘍形成が促進される。

ヒストンの翻訳後修飾も遺伝子の転写・発現に非常に重要な役割を果たすことが分かってきた。DNA はクロマチンと呼ばれる高次構造に収納されているが、クロマチン構造の最小単位は 4 種類のヒストン (H2A、H2B、H3、H4) で構成される 8 量体のコアヒストンとそれを取りまく約 146kb の DNA により形成

されるヌクレオソームと呼ばれる構造である。これらコアヒストンのアミノ酸末端はヌクレオソームの外側に露出されておりヒストンテールと呼ばれる構造をとる。このヒストンテールは、アセチル化、メチル化、リン酸化といった翻訳後修飾を受けることが知られており、この修飾により DNA とヒストンの結合状態に変化が生じ、クロマチン構造が変わることで遺伝子発現がダイナミックに調整されている。一般に、ヒストンがアセチル化されると DNA とヒストンの結合が緩くなるため遺伝子の転写が促進されるが、ヒストンのメチル化は修飾されるアミノ基の場所でその効果が変わってくる。例えば H3 の N 末端から 4 番目に位置するリシンのメチル化 (H3K4me3) は転写を促進し、9 番目や 27 番目のリシンメチル化 (H3K9me2、H3K9me3、H3K27me3) は転写を抑制することが知られている。

ヒストン修飾異常も癌との関連が深く、癌の発生早期からヒストン修飾異常は見られており、癌の進行とともに蓄積することが知られている。例えばヒストン H4 の 16 番リシンのモノアセチル基 (H4K16Ac) と 20 番のトリメチル基 (H4K20me3) は DNA の低メチル化と同様、ヒトのいくつかの癌でその進行とともに失われていくことが明らかとなっている [23]。ヒストン修飾因子の発現異常や遺伝子変異も癌で数多く見つかっており、例えば H3K4 脱メチル化酵素である JARID1B (KDM5B) は前立腺癌や乳癌で過剰発現している [24]。また H3K27 の

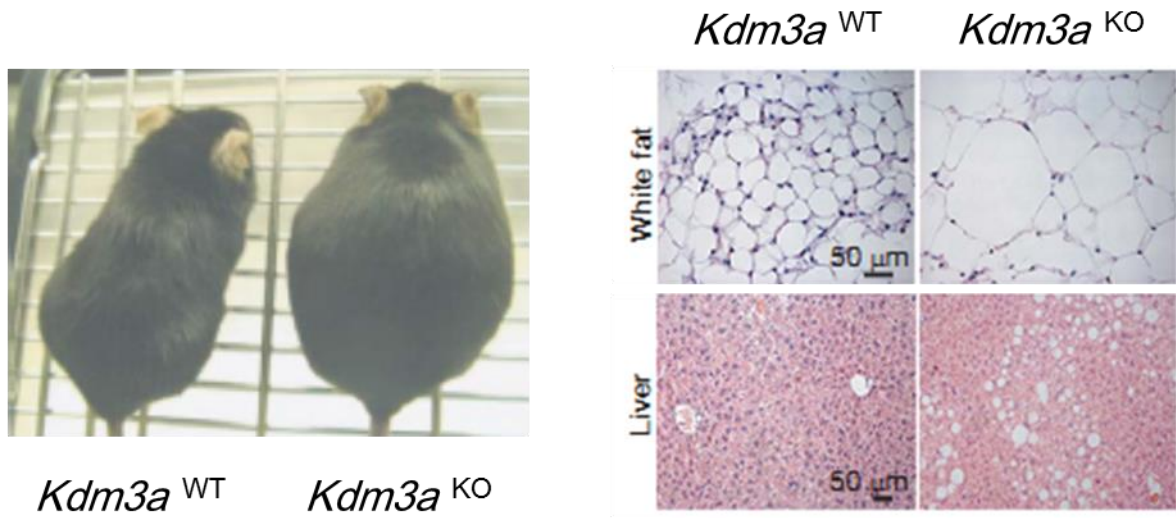
メチル化酵素である EZH2 (Enhancer of zeste homolog2) は濾胞性リンパ腫やびまん性大細胞性 B 細胞リンパ腫において体細胞変異が認められる [25]。また腎癌においては、H3K36 メチル化酵素 SETD2 や H3K4 脱メチル化酵素 JARID1C (KDM5C)、H3K27 脱メチル化酵素 UTX の不活化変異が見られる [26]。

肝癌においてもエピジェネティクス異常は重要と考えられている。発がん要因への反復曝露で蓄積し発がんの素地を形成するエピジェネティクス異常は、ウイルスの持続感染などによる慢性炎症を背景とする肝発がん過程において特に寄与すると言われており、肝癌発生過程におけるエピジェネティクス異常の影響は大きい [27]。実際に、肝癌組織では非癌部と比較して 90 個のエピジェネティクス制御遺伝子のうち 42 個に発現異常が見られたという報告があり、中でも H3K27 メチル化酵素 EZH2 やヒストン H3K9 メチル化酵素 SUV39H1 などは腫瘍促進的に働くことが分かっている [28,29]。また近年、次世代シーケンサーの登場により癌における遺伝子変異などの網羅的解析が数多く行われたことで、肝癌ではクロマチン再構成タンパクである ARID やヒストンメチル化酵素 MLL などの遺伝子変異が高頻度に起こっているということが分かってきた [30, 31]。エピジェネティクス修飾因子は治療標的としても注目されており、ヒストン脱メチル化酵素阻害剤 (HDACi) は肝癌を対象としてフェーズ 2 の治験がすでに行われており、その実用化が期待されている [32]。

数あるエピジェネティクス修飾因子の中で、我々は特にヒストン H3 の N 末端から 9 番目のリシン残基のモノ、ジメチル基 (H3K9me1/2) を脱メチル化する酵素 KDM3A (Lysine (K) - specific demethylase 3A、別名 JHDM2A、JMJD1A) に注目した。KDM3A は H3K9me1/2 を脱メチル化することでクロマチン構造を緩め、転写因子などの結合を容易にして転写を促進する [33]。すなわち KDM3A は転写のコアクチベーターとして働いており、発生、代謝、性決定など様々な場面で機能することが知られている [34-36]。

我々は以前 *Kdm3a* ノックアウトマウス (*Kdm3a*^{KO} マウス) を作成している [37]。このマウスはヒトのメタボリックシンドロームにみられるような内蔵型肥満、高脂血症、脂肪肝などの表現型を示す (図 2 A)。KDM3A は筋肉において脂質代謝に関わる PPAR α ならびに PPAR シグナル遺伝子群の発現を制御し、また褐色脂肪組織において KDM3A は熱産生に重要な *Ucp1* 遺伝子の発現を制御していた。さらに *Ucp1* の発現には PPAR γ などの転写因子やコアクチベーターのリクルートが必須であるが、*Kdm3a*^{KO} マウスではこれらのリクルートも阻害されていた (図 2 B)。すなわち KDM3A は筋肉や脂肪組織などの代謝臓器における代謝関連遺伝子群の発現を介して全身レベルの代謝調節を行っており、さらに KDM3A による転写制御はヒストン修飾のみならず、転写因子やコファクターの標的遺伝子上へのリクルートも関与すると考えられた。

A



B

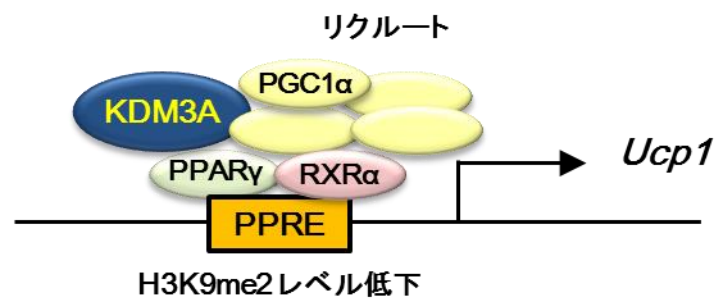


図2. KDM3A は代謝関連遺伝子群の発現コントロールを介して全身レベルの代謝調節を行っている(文献37より引用)

(A) *Kdm3a*^{KO} マウスは内臓型肥満, 脂肪肝の表現型を示す. (B) 特に*Ucp1*の発現機構において, KDM3Aはヒストン脱メチル化のみならず, 転写因子やコアクチベーターのリクルートの調節も行っている.

KDM3A は癌との関連も知られている。KDM3A は低酸素環境である癌において HIF1 により誘導され、腫瘍血管新生や浸潤能などに寄与していると言われており [38-44]、既報からは一般に KDM3A は腫瘍促進的に働く可能性が示唆される。また肝癌での検討はこれまであまり見られないが、臨床検体を用いた検討で、肝癌では KDM3A が高発現しており術後再発の高危険群という報告が 1 報ある [45]。すなわち肝臓においても KDM3A は肝腫瘍促進的に働く可能性が示唆されるが、まだ報告が少ないこともあり不明な点が多く、また *in vivo* の系で KDM3A の肝癌における機能を検討した報告はない。

そこで、本研究では KDM3A が肝腫瘍形成に及ぼす影響をマウスモデルを用いて検討することにした。前述の *Pik3ca* Tg マウスを肝腫瘍形成モデルとして用い、*Kdm3a*^{KO} マウスと交配することで、PI3K シグナル活性を背景とした肝腫瘍形成において KDM3A が果たす役割を解析した。

方法

1). マウス

Pik3ca Tg マウスはアルブミン遺伝子プロモーター下にヒト肝細胞癌で報告された変異遺伝子 *Pik3ca* (N1068fs*4) を発現させたマウスであり、以前当研究室で作成したものを使用した [21]。 *Kdm3a*^{KO} マウスは、理化学研究所 眞貝細胞研究室より供与されたものを使用した。これらのマウスは C57BL/6JJcl (Clea Japan 社) と 5 回以上戻し交配を行っている。本研究では F5 世代の雄マウスを使用した。いずれのマウスも標準的な飼育環境下 (12 時間ずつの明暗周期、室温 23±2 °C、湿度 55±5 %) で市販の通常食餌 (Clea Japan 社) と水を自由に与えて飼育した。なお動物実験を含む全ての手順は東京大学動物実験実施マニュアルおよび東京大学医学部動物実験指針に従って行った。

2). 病理組織および免疫組織染色

取り出したマウス肝組織は 4 % パラホルムアルデヒドで固定しパラフィン包埋した。薄切切片は新組織科学研究所または Sept Sapie 社にてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。

免疫染色には VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector Laboratories 社) を用いた。パラフィン包埋された未染スライドをヒストクリア (National Diagnostics 社) およびエタノールを用いて脱パラフィン化し、蒸留水を用いて再水和した。次に

0.01M クエン酸バッファー (pH6.0) 中にスライドを浸し 120°C で 5 分間オートクレーブを行い抗原賦活化を行った。3% 過酸化水素水中にスライドを室温で 15 分間浸し内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った。2 次抗体の宿主動物血清をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 10% に希釈したもので室温 1 時間ブロッキングを行った後、1 次抗体反応を 4°C で一晩行った。次にビオチン標識 2 次抗体で室温 30 分間反応させたのち、アビジン-ビオチン標識酵素複合体で室温 30 分間処理した。最後にジアミノベンジジン溶液 (ニチレイバイオサイエンス社) を基質として発色させた後、速やかにヘマトキシリンで対比染色し、脱水・透徹処理を行った。なおマウス組織にマウス由来 1 次抗体を使用する際は、ブロッキング試薬および 2 次抗体としてヒストファインマウスステインキット (ニチレイバイオサイエンス社) を使用した。1 次抗体については、ウサギ抗リン酸化 (Ser63) c-Jun 抗体 (CST9261, 1:100 dilution)、ウサギ抗リン酸化 (Ser73) c-Jun 抗体 (CST9164, 1:100 dilution)、ウサギ抗 c-Jun 抗体 (CST 9165, 1:200 dilution)、ウサギ抗リン酸化 (Ser473) Akt 抗体 (CST 3787, 1:50 dilution) は Cell Signaling 社より購入した。マウス抗 H3 di methyl K9 抗体 (ab1220, 1:400 dilution) は abcam 社より購入した。ウサギ抗 KDM3A 抗体 (12835-1-AP, 1:100 dilution) は Proteintech 社より購入した。

3). 肝組織中遊離脂肪酸濃度の測定

マウス肝 20mg を 1mL の溶解液 (1M NaOH, 0.5% TritonX-100, 5mM

EDTA-2Na pH8.0) に入れ、ホモジナイザーで破碎した。遠心上清を回収して遊離脂肪酸濃度を測定した (SRL 社)。

4). 定量的リアルタイム PCR 法

全 RNA は NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) もしくは ISOGEN (ニッポン・ジーン 社) を用いて抽出し、cDNA は ImProm-II Reverse Transcriptase (Promega 社) を使用して逆転写反応にて作成した。定量的 PCR 反応は ABI PRISM 7000 Quantitative PCR system (Applied Biosystems 社) もしくは StepOnePlus realtime PCR system (Applied Biosystems 社) を使用して定められたプロトコールに従った。内在性コントロールとして β -Actin (Actb) の発現量を定量した。

表1. 定量的リアルタイム PCR に使用したプライマー配列

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Pten</i>	GATTACAGACCCGTGGCACT	TCACCTTTAGCTGGCAGACC
<i>Arid5b</i>	AGAAAAACGCCCATCGAGC	CTCCCAGGATTACCACCTAAC
<i>Xpo4</i>	AAGATACCGCAGCTTCCTGA	GTCAAGGCCTCGAGACAAAG
<i>Dlc1</i>	CCACTGATATCCCGGAAAGA	AAGCTGTGCCACCTCAGTCT
<i>Ppary</i>	CATCGAGGACATCCAAGACAAC	GACTCTGGGTGATTCAGCTTGAG
<i>aP2</i>	GGCATGGCCAAACCTAACAT	TTCCATCCCATTCTGACAT
<i>Scd1</i>	TGACCTGAAAGCCGAGAAGC	ATGAAGCACATCAGCAGGAGG
<i>Ccnd1</i>	CAAAATGCCAGAGGCGGATG	GAAAGTGCGTTGTGCGGTAG
<i>CD44</i>	AGCTATCCTGGCCTACCACA	ACCAATCCCAGAGTGGCTTG
<i>Chop</i>	ACCTGAGGAGAGAGTGTTCCA	CAAGGTGAAAGGCAGGGACT
<i>Mmp7</i>	GGCTTCGCAAGGAGAGATCA	GCCAAATTCATGGGTGGCAG
<i>Pdgfrb</i>	TGGTGAAGGTAGGCCGAGTA	ATTCTAGGACTGGTGGGGCT
<i>IL-11</i>	GGAGGGGGAAAAAGGAAGCC	AGACTCCGATCCTTTTCGGCA
<i>Sncg</i>	AGAATGAAGAGGCCAAGAGTGG	CACTGGGCTAGGGACAGAGA
<i>Capns1</i>	TCATCAGCTGCTTGGTCAGG	TCTGGCTGCTGATTGGGAAG
<i>Rock2</i>	GTTCTAGAGTCCGCCTCCG	ACTCTCTGCCCTCTACCCTT
<i>Mapk3</i>	CAACCCAAACAAGCGCATCA	TGTCGAAGGTGAATGGCTCC
<i>Notch4</i>	GCAGACAGACTACGGTGGAC	TGCAGTGCAGTTTTTCCCCT
<i>IL-6</i>	GGGACTGATGCTGGTGACAA	TTGCCATTGCACAACCTTTTTCT
<i>Actb</i>	ATGTGGATCAGCAAGCAGGA	AAGGGTGTAAAACGCAGCTCA

5). イムノブロット法・免疫沈降法

マウス肝組織を RIPA バッファー溶解液 (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% NP-40, 0.1% SDS, 1% sodium deoxycholate, 50 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, protease inhibitors cocktail (Complete Mini EDTA-free, Roche 社)) に入れホモジナイザーで破碎し、遠心後の上清を用いた。ホモジネートのタンパク濃度を Bradford 法 (Bio-Rad Protein Assay, Bio-Rad Laboratories 社) にて測定し、濃度調整の後に SDS-PAGE にて展開し、PVDF 膜 (Amersham Bioscience 社) へ転写した。1 次抗体と 4°C で一晩反応させた後、horseradish peroxidase (HRP) 標識 2 次抗体と室温で 1 時間反応させ、HRP シグナルを ECL-plus (Amersham Bioscience 社) で検出した。培養細胞を用いた実験においても上記の RIPA バッファー溶解液を用いて細胞からホモジネートを回収し、同様の手技にて実験をおこなった。使用した 1 次抗体は以下の通り。ウサギ抗リン酸化 (Ser473) Akt 抗体 (CST9271, 1:1000 dilution)、抗 Akt 抗体 (CST9272, 1:1000 dilution)、抗リン酸化 (Ser63) c-Jun 抗体 (CST9261, 1:1000 dilution)、抗リン酸化 (Ser73) c-Jun 抗体 (CST9164, 1:1000 dilution)、抗 c-Jun 抗体 (CST9165, 1:1000 dilution)、抗リン酸化 (Ser21/9) GSK-3 α/β 抗体 (CST9331, 1:1000 dilution)、抗 GSK3 α/β 抗体 (CST5676, 1:1000 dilution) は Cell Signaling 社より、ウサギ抗 KDM3A 抗体 (12835-1-AP, 1:800 dilution) は Proteintech 社より、マウス抗 β -actin 抗体 (A5441,

1:2000 dilution) は Sigma-Aldrich 社より購入した。Horseradish peroxidase (HRP) 標識抗マウス/ウサギ抗体は GE Healthcare UK 社より購入した。

免疫沈降は、マウス肝組織を TNE バッファー溶解液 (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 mM 2-ME, 1% NP-40, 5% Glycerol, protease inhibitors cocktail (Complete Mini EDTA-free, Roche 社)) に入れホモジナイズし、遠心後の上清を Bradford 法で濃度調整したものを用いた。マウス抗 KDM3A 抗体 (ab91252, Abcam 社) とアガロースビーズ (Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent: sc-2003, Santa Cruz 社) を用いて反応させ、SDS-PAGE にて展開した。

6). cDNA マイクロアレイ

35 週齢の *Pik3ca* Tg; *Kdm3a*^{WT} マウス肝および *Pik3ca* Tg; *Kdm3a*^{KO} マウス肝 1 対より NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) を用いて 全 RNA を抽出した。抽出した RNA サンプルは、吸光度測定にて OD_{260/280}、OD_{260/230} とともに 1.6 以上の純度になるようエタノール沈殿精製を行い、電気泳動にて 28s、18s 以外のバンド以外にゲノムの混入がないことを確認後、GeneChip Mouse Genome 430 2.0 array (affymetrix) を使用してマイクロアレイ発現解析を行った。

7). *Pik3ca* 安定発現 BNL-CL2 細胞株

pcDNA3-myc-mouse *Pik3ca* (N1068fs*4) は KOD-Plus-Mutagenesis Kit (東洋紡社) を用いて作成した。BNL-CL2 細胞にプラスミドを導入 (Effectene

Transfection Reagent, QIAGEN 社) 48 時間後から G418 により選択を開始し、複数のコロニーの中からイムノブロット法にて導入遺伝子の発現を確認したクローンを解析に使用した。

8). クロマチン免疫沈降法 (ChIP)

マウス肝を用いた ChIP assay は既報を参考にした [46]。マウス肝切片を 4°C リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で 21 ゲージ針を通してすりつぶし、室温で 15 分間 1% ホルムアルデヒドでクロスリンクした。反応停止は 0.125M グリシンで室温 5 分間行った。固定した細胞は PBS でリンスしたのちホモジナイザーを用いて破碎し、遠心して上清を破棄した。得られたペレットは細胞溶解液 (10mM HEPES pH7.9、0.5% NP-40、1.5mM MgCl₂、10mM KCl、0.5mM DTT) で懸濁し、氷上で 20 分間留置した後遠心して上清を破棄した。沈殿した核分画を核溶解液 (20mM HEPES pH7.9、25% Glycerol、0.5% NP-40、0.42M NaCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM EDTA) に懸濁し、超音波式ホモジナイザー (VP-050, TAITEC 社) を用いて約 500 塩基長の DNA 断片となるよう破碎した。遠心にて不溶性分画を除去し可溶性クロマチン溶液を得た。1 回の免疫沈降には肝 25mg 由来のクロマチン (約 10-15µg) を用いた。プロテアーゼインヒビター (Complete Mini EDTA-free, Roche 社)、切断サケ精子 DNA (TREVIGEN 社) でブロッキングしたアガロースビーズ (Protein A/G PLUS-Agarose Immunoprecipitation Reagent: sc-2003, Santa Cruz 社)

を加えて pre-clear 処理したものを解析に用いた。抗体と 4°C で一晩反応させた後に得られた免疫複合体をセファロースビーズで沈降し、低塩バッファー (0.1% SDS、1% TritonX-100、2mM EDTA、150mM NaCl、20mM Tris-HCl pH 8.0)、高塩バッファー (0.1% SDS、1% TritonX-100、2mM EDTA、500mM NaCl、20mM Tris-HCl pH 8.0)、塩酸リチウムバッファー (0.25M LiCl、1% NP-40、1% sodium deoxycholate、1mM EDTA、10mM Tris-HCl pH 8.0) で各 1 回ずつ洗浄し、最後に TE バッファーで 2 回洗浄した。免疫複合体を結合したセファロースビーズを溶出バッファー (1% SDS、0.1M NaHCO₃) で溶出した。終濃度 0.2M となるように NaCl を加え、65°C で一晩反応させて脱クロスリンクした。RNase (Wako)、PtoeinaseK (Qiagen) で処理した後、QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) を用いて精製し ChIP-PCR 解析に用いた。使用した抗体について記載する。ウサギ抗 c-Jun 抗体 (CST9165, 1:25 dilution) は Cell Signaling 社より購入した。マウス抗 H3 di methyl K9 抗体 (ab1220, 5µg) は abcam 社より購入した。非特異的抗体として用いた normal rabbit IgG 抗体 (CST2729) は Cell Signaling 社から、normal mouse IgG 抗体 (sc2025) は Santa Cruz 社より購入した。また、ChIP-PCR に用いたプライマーは表 2 の通りであり、AP-1 標的遺伝子のプロモーター領域の AP-1 結合部位 (TGAG/CTCA) を含む領域 500bp を認識するよう設計した。

表2. ChIP-PCRに使用したプライマー配列

Gene	Forward primer	Reverse primer	AP-1 site
<i>CyclinD1</i>	ATCAAGAAGCTTCCGGTGGT	AGGCGGTTTGCCCAAGAAAA	-796bp~-790bp
<i>CD44</i>	TGCGTCGGGATGGATAGGAA	TATTCGCCCACCTGCACAAC	-520bp~-514bp
<i>Chop</i>	CTTCCGGGTCCGAGACAAC	CCTCATCCCTTACATCCGCC	-242bp~-236bp
<i>Mmp7</i>	TGCTCAACAGTGTGACTCAGAT	ATAGCGGCTACTGCAGGTCTA	-756bp~-750bp
<i>Pdgfrb</i>	GTCAGCCCTGGGTCTTTCTC	GGTACTGTGTGCTGGGACTC	-560bp~-554bp
<i>IL-11</i>	CCGGCTCGTCTGAATGAAA	GCAGTGAGGGAGTGTGTACG	-214bp~-208bp

9). レンチウイルスベクターを用いた遺伝子ノックダウン

shRNA ベクター用配列は Open Biosystems 社より購入し、293T 細胞をパッケージング細胞としてレンチウイルスベクターを作成した。標的細胞をポリブレン (8 μ g/mL) 含有培地にてレンチウイルスに感染させ、24 時間後から抗生剤 (ピューロマイシン) により選択を開始、以後抗生剤を含む培地で培養を続けた。至適抗生剤濃度はあらかじめ、非感染細胞が 48 時間で死滅する濃度を調べて決定した。ノックダウン効率は定量的リアルタイム PCR 法により評価した。

10). スフィア形成能アッセイ

無血清の DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) に 1% メチルセルロース、0.4% ウシ血清アルブミンを添加し、0.45 μ m でフィルトレーションした後、B27 (1:50、Invitrogen 社) および Insulin-Transferin-Selenium (ITS、1:100、Invitrogen 社) を加え、さらに 10ng/mL bFGF (Invitrogen 社) と 20ng/mL EGF (Wako 社) を添加し、これを細胞培養液とした。十分にほぐした細胞株を 500cells/500 μ L/well となるよう細胞培養液に懸濁し、24 ウェル Ultra Low attachment plates を用いて浮

遊状態で培養した。培養 10 日後に直径 100 μm 以上のスフィア形成数を計測した。

11). ヒト肝針生検検体

東大病院消化器内科にて 1998 年に肝腫瘍性病変に対して施行された針生検検体のうち当研究室に検体が保管されていた症例を対象として、保存されているパラフィンブロックから未染標本を作製し免疫染色を行った（東京大学大学院医学系研究科・医学部 倫理委員会 審査番号 10282）。

12). 統計解析

得られた値は各群の平均値 \pm 標準誤差として示した。統計学的有意水準は 5%以下とし、2 群間の平均値の比較の検定には Student の t 検定を用いた。

結果

1). *Pik3ca* Tg マウスと *Kdm3a*^{KO} マウスの交配

1-1). 腫瘍形成について

脂肪肝からの肝腫瘍形成における KDM3A の役割を検討するべく、*Pik3ca* Tg マウスと *Kdm3a*^{KO} マウスの交配を行った。*Pik3ca* Tg; *Kdm3a*^{WT} (WT-Tg) マウスは既報通り生後約 1 年で肝腫瘍が形成されたが [21]、*Pik3ca* Tg; *Kdm3a*^{KO} (KO-Tg) マウスでは腫瘍形成が著明に抑制されていた (図 3 A)。病理組織学的には両者の腫瘍に明らかな違いはなく、いずれも脂肪を豊富に含む腺腫と考えられた (図 3 B)。腫瘍のサイズには大きな違いはみられず、腫瘍発生数のみが著明に減少していた (図 3 C)。なお、*Kdm3a*^{KO} マウス肝において KDM3A がノックアウトされていることはタンパクレベルで確認している (図 3 D)。

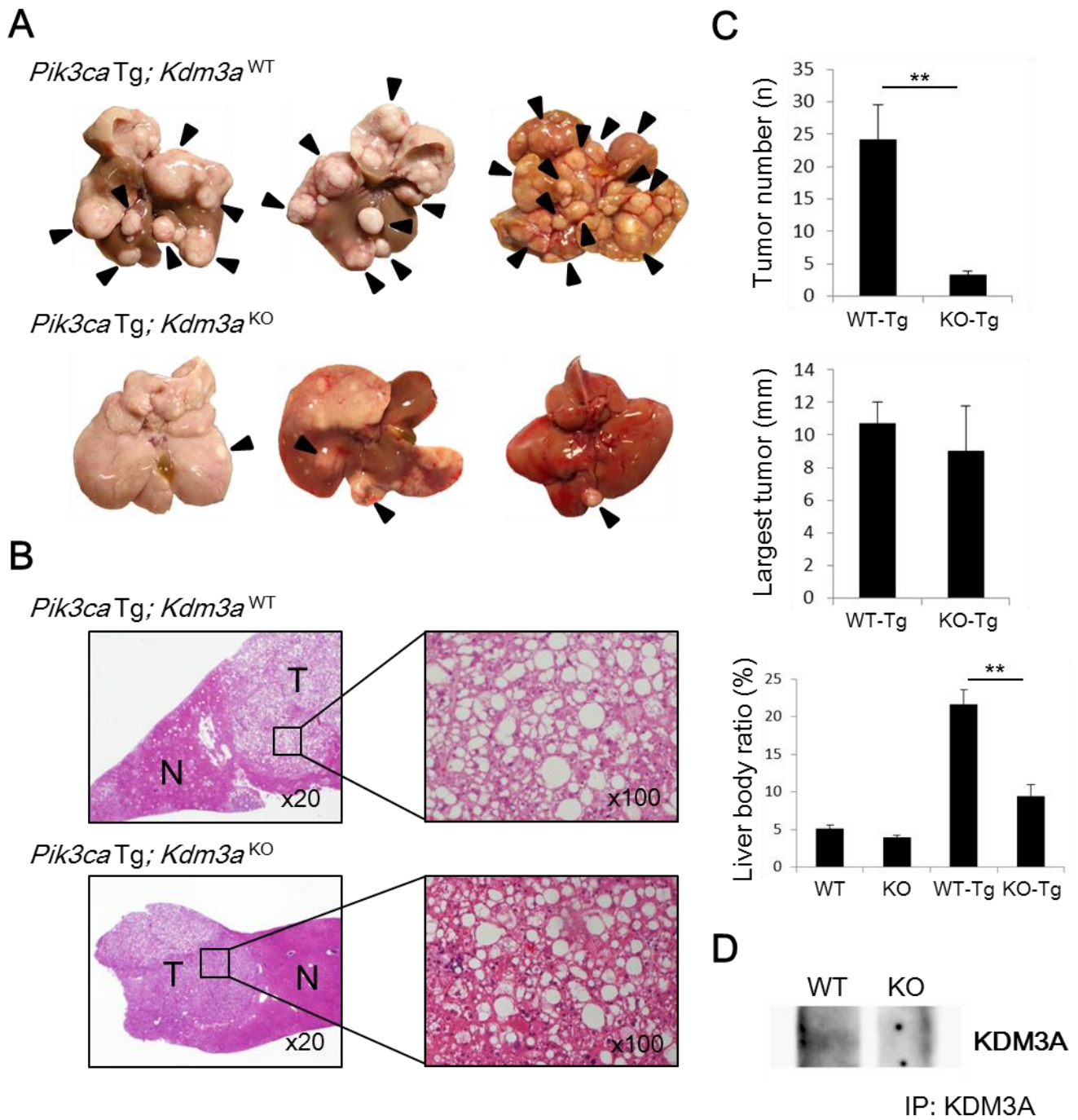


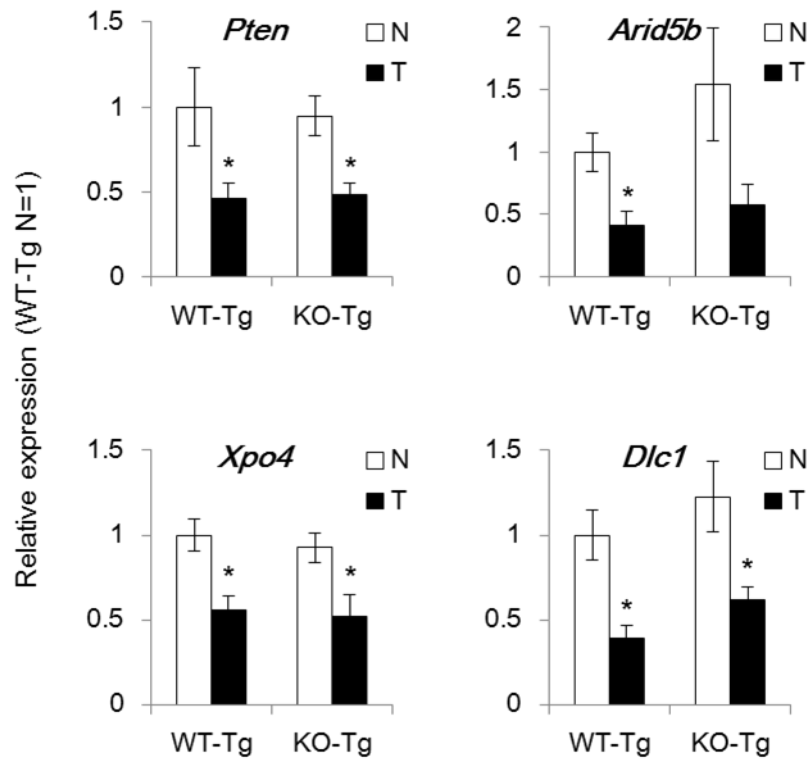
図3. *Pik3ca*Tg マウスの肝腫瘍形成は *Kdm3a*^{KO} により抑制される

52週齢マウスの代表的なマクロ像 (A) およびミクロ像 (HE 染色) (B). 腫瘍数, 最大径, 肝臓/体重比 (C). WT: n=5, KO: n=5, WT-Tg: n=9, KO-Tg: n=8. **: $p < 0.01$. 免疫沈降・イムノブロット法によりマウス肝 KDM3A タンパクのノックアウトを確認した (D).

次に、腫瘍部と非腫瘍部における癌抑制遺伝子の発現量について比較検討した。*Pik3ca* Tg マウスでは PI3K シグナルの活性化およびオレイン酸蓄積の結果、腫瘍部で *Pten*、*Arid5b*、*Xpo4*、*Dlc1* の 4 つの癌抑制遺伝子の発現が低下しているが (図 1 B)、この傾向は KO-Tg マウスにおいても同様であり特に変化は見られなかった (図 4 A)。また、野生型マウス肝および WT-Tg マウス肝の非腫瘍部と腫瘍部における *Kdm3a* の発現状態を比較したところ、野生型マウス肝と WT-Tg マウス肝非腫瘍部では *Kdm3a* 発現レベルに有意な差はなく、腫瘍部における *Kdm3a* 発現レベルは非腫瘍部と比較して低下していた (図 4 B)。

これらの結果から、この系において KDM3A は腫瘍形成後よりもむしろ腫瘍形成に至る過程や腫瘍形成期において重要なのではないかと考えた。

A



B

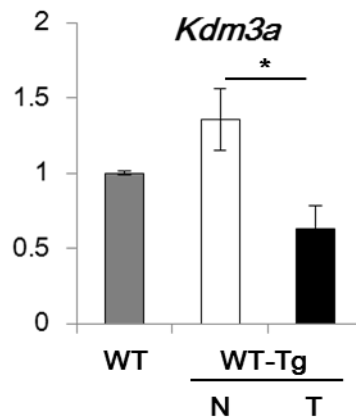


図4. 癌抑制遺伝子の発現量及び *Kdm3a* の発現量比較

(A) 定量的リアルタイムPCR法による非腫瘍部(N)と腫瘍部(T)における癌抑制遺伝子の発現量の比較. 各群 n = 3. *: $p < 0.05$. (B) 野生型マウス肝(WT)およびWT-Tgマウス肝の非腫瘍部(N)と腫瘍部(T)における *Kdm3a* の発現量比較. 各群 n = 3. *: $p < 0.05$.

1-2). PI3K/Akt 活性および肝脂肪蓄積について

次に腫瘍形成直前の 35 週齢マウス肝について解析を行った。WT-Tg マウス、KO-Tg マウスともに著明な脂肪肝を呈しており、病理学的にも肝組織全体で強い脂肪性変化がみられた (図 5 A)。また、免疫染色にて H3K9me2 レベルを比較したが、ほぼ全ての肝細胞において H3K9me2 の発現が見られており、グローバルな H3K9me2 レベルには差が見られなかった (図 5 A)。

Akt のリン酸化レベルについてウエスタンブロット法で確認したが WT-Tg マウスと KO-Tg マウスで差はみられず、KDM3A の有無は肝細胞における PI3K/Akt シグナル活性には影響しないと考えられた (図 5 B)。

肝内の遊離脂肪酸濃度の測定を行ったところ、WT-Tg マウス、KO-Tg マウスのいずれも野生型マウス (WT) と比較して脂肪酸濃度が高くなる傾向が見られたが、WT-Tg マウスと KO-Tg マウスの間では有意差は見られなかった (図 5 C)。さらにマウス肝における脂肪酸代謝関連遺伝子の発現を定量的リアルタイム PCR 法で評価した。脂質合成に関わる PPAR γ およびその標的遺伝子である aP2 は、WT-Tg マウス肝および KO-Tg マウス肝で発現が亢進しており、両者の間では有意差は見られなかった (図 5 D)。また飽和脂肪酸を不飽和脂肪酸へ変換する酵素である Stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) についても同様の傾向が見られた (図 5 D)。これらは KDM3A が肝脂肪蓄積や脂肪酸組成 (脂肪酸飽和度) に影響

していないということを示唆している。

我々は以前、*Pik3ca* Tg マウスでは肝細胞における PI3K/Akt シグナルの活性化および脂肪酸組成変化が肝腫瘍形成に重要な役割を果たしていると報告している [21]。上述の結果から KDM3A はこのいずれにも関与が認められないことが分かったため、別の機序により肝腫瘍形成に寄与していると考えられた。

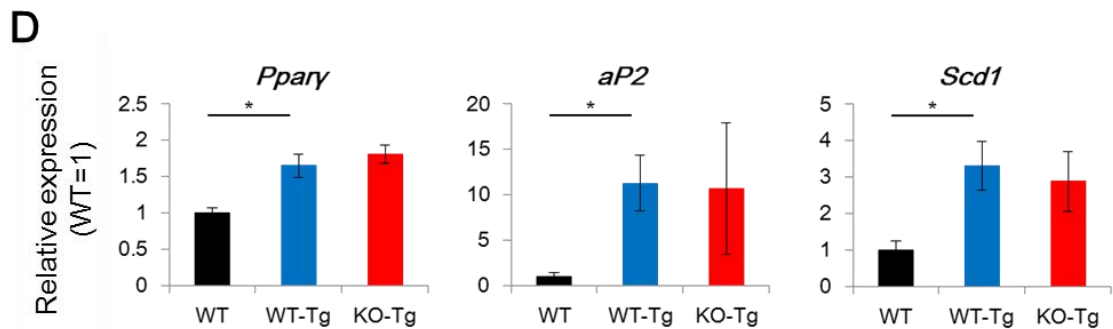
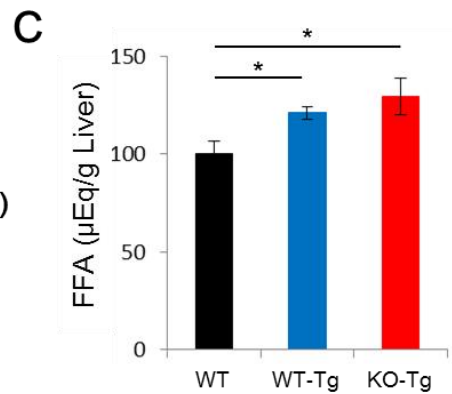
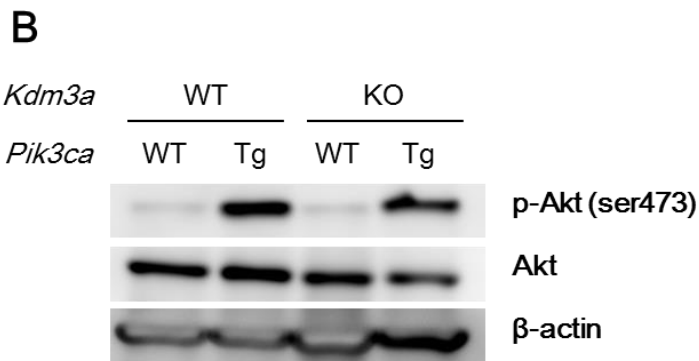
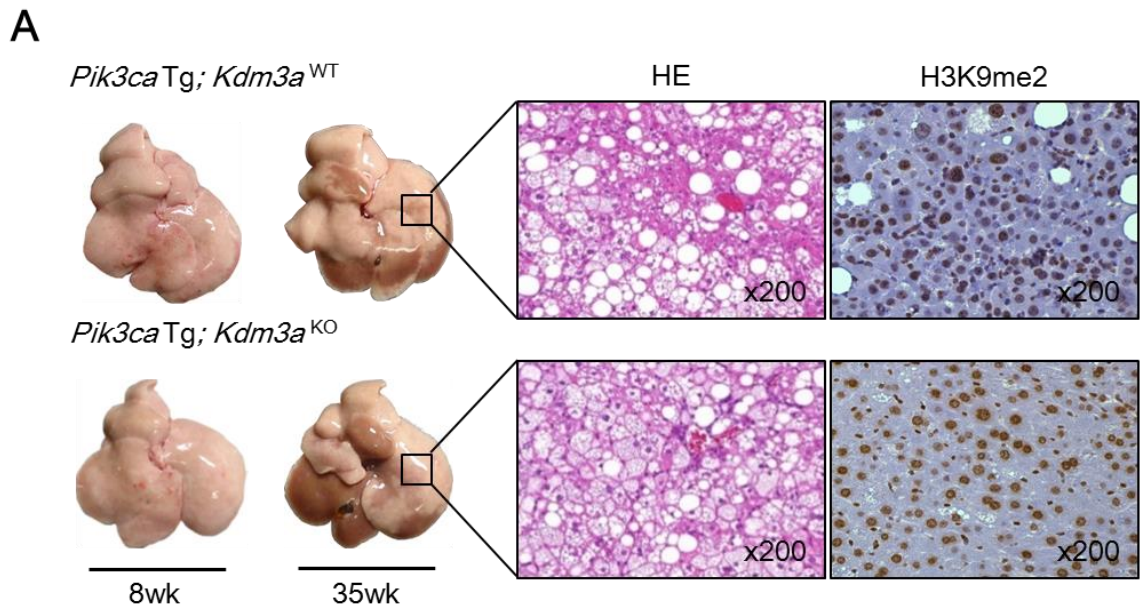


図5. 腫瘍形成前のマウス肝におけるPI3K シグナル活性と脂肪酸蓄積

(A) 8週齢および35週齢マウス肝マクロ像. ミクロ像は35週齢マウス肝のHE染色とH3K9me2染色を示す. (B) ウェスタンブロット法によるリン酸化Aktレベルの比較. (C) 肝内遊離脂肪酸の測定結果. WT: n = 5, WT-Tg: n = 6, KO-Tg: n = 3. *: $p < 0.05$. (D) 定量的リアルタイムPCR法による脂肪酸代謝関連遺伝子の発現量比較. WT: n = 5, WT-Tg: n = 6, KO-Tg: n = 3. *: $p < 0.05$.

2). 肝腫瘍形成促進的に働く KDM3A 依存性遺伝子群の検索

KDM3A が遺伝子発現を促進する機能を持つことを考慮すると、KDM3A 欠損により肝腫瘍形成が抑制された理由として、腫瘍形成に促進的に働く遺伝子が KDM3A により調節されている可能性があると考えられた。そこで、腫瘍形成前の 35 週齢 WT-Tg マウスと KO-Tg マウスの肝臓を用いて、cDNA マイクロアレイで遺伝子発現を解析した。WT-Tg マウス肝と比較して KO-Tg マウス肝では、全 45101 プローブのうち 2039 (4.5%) プローブで 2 倍以上の発現低下がみられ、1295 (2.9%) プローブで 2 倍以上の発現上昇がみられた。全体として発現低下する遺伝子の方が多く存在し、これは KDM3A が遺伝子発現を促進する機能に矛盾しない結果と考えられた。また KDM3A は転写促進的に機能することから、KO-Tg 肝において発現が低下している遺伝子群の中に KDM3A による直接の作用で転写制御されている遺伝子が含まれていると考えられた。

次に KO-Tg マウス肝においてどのような遺伝子群の発現が低下しているか検討した。KDM3A が転写のコアクチベーターであるということを考慮して転写因子の観点から解析を行うこととした。具体的には、転写因子の結合部位ごとに遺伝子群を整理した MSigDB データベースの “collection C3, transcription factor targets” を用いて GSEA の手法で解析を行った [47]。その結果、転写因子 Activator protein-1 (AP-1) の結合部位を転写開始点近傍に持つ遺伝子群の発現が KDM3A

欠損によって抑制される傾向がみられた (図 6 A, B)。すなわち、KDM3A が AP-1 標的遺伝子群の発現制御を行っている可能性が示唆された。

AP-1 は JUN、FOS、ATF (activating transcription factor) 、MAF (musculoaponeurotic fibrocarcoma) などのタンパク質ファミリーにより構成されるホモまたはヘテロ 2 量体の転写因子であり、細胞増殖、細胞死、細胞分化など様々な場面で機能しており、発生や炎症、腫瘍形成などの病態と関連している [48,49]。肝臓において AP-1 は特に急性ストレスに対する反応に重要であり、肝障害に対する保護作用 [50]、肝再生反応 [51]、さらには肝腫瘍形成 [49,52,53] に寄与していると言われている。JUN ファミリーの中でも特に c-Jun の転写活性が最も強く [54]、c-Jun/AP-1 は一部の肝細胞癌において肝腫瘍形成の中心的な役割を担っており [55]、特に腫瘍形成の早期に重要であると言われている [49,53,56]。さらに、肝細胞において AP-1 は飽和脂肪酸により活性化することが知られており [57]、NAFLD 患者においても c-Jun/AP-1 の活性化が確認されている [58,59]。以上より、c-Jun/AP-1 は脂肪肝および肝腫瘍発生のいずれにおいても重要であり、脂肪肝からの肝腫瘍発生に寄与している可能性が考えられたため、この転写因子に着目して解析を進めることにした。

A

Transcription factor motif	Size	NES	p-value
V\$PEA3_Q6	203	-1.8222835	<0.001
CCAWWNAAGG_V\$SRF_Q4	77	-1.655546	0.001894
V\$AP1_Q6_01	206	-1.5548129	<0.001
V\$IRF1_01	190	-1.5522835	<0.001
V\$SRF_Q6	206	-1.5435917	<0.001
V\$COREBINDINGFACTOR_Q6	220	-1.5117433	<0.001
V\$TAXCREB_02	20	-1.5029285	0.040153
KRCTCNNNNMANAGC_UNKNOWN	20	-1.4730685	0.078846
V\$AML1_Q6	207	-1.4590889	0.001845
V\$AML1_01	207	-1.4589977	0.003704
V\$AP1_Q4_01	203	-1.4585735	0.003643
V\$ELF1_Q6	187	-1.4552788	0.001916
V\$AP1_C	223	-1.440521	0.003774
V\$AREB6_01	202	-1.438439	<0.001
GGGNNTTCC_V\$NFKB_Q6_01	109	-1.4191214	0.011834
V\$E2F_Q6_01	188	-1.408371	0.003738
V\$SRF_C	178	-1.400529	0.005693
KTGGYRSGAA_UNKNOWN	56	-1.3948758	0.038384
V\$SREBP1_Q6	200	-1.3910135	<0.001
V\$PAX_Q6	208	-1.3870906	0.00565

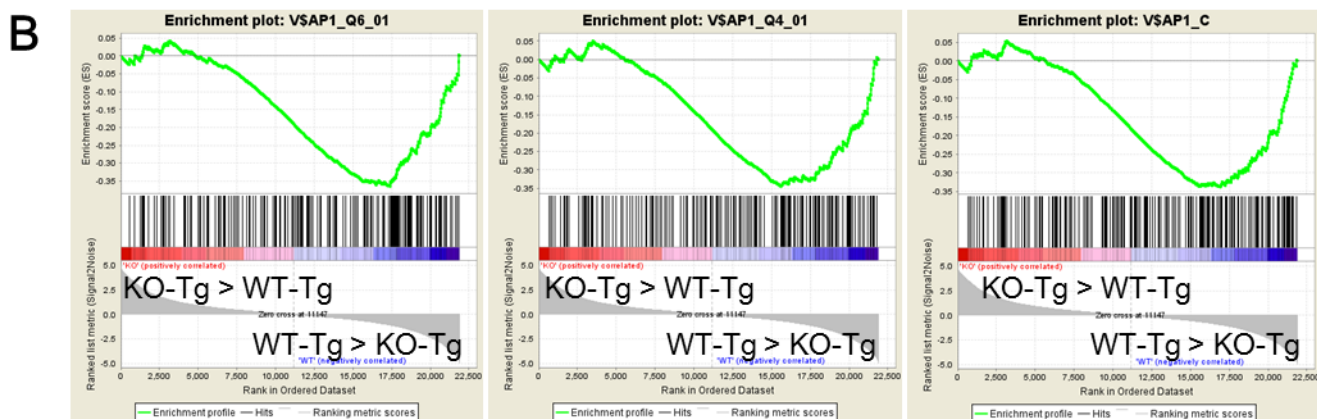


図6. 腫瘍形成前のマウス肝を用いたマイクロアレイのGSEA結果

- (A) KDM3A 欠損により標的遺伝子群の発現が変化する転写因子の上位20個。
 (B) AP-1標的遺伝子群の Enrichment plot.

3). マウス肝における AP-1 標的遺伝子の発現

cDNA マイクロアレイの結果の妥当性を検証するべく、35 週齢の WT マウス、WT-Tg マウス、KO-Tg マウスの肝組織を用いて AP-1 標的遺伝子群の発現状態をリアルタイム PCR 法にて確認した。調べた遺伝子は転写開始点-2kb~+2kb に AP-1 結合部位 (TRE 配列 : TGAG/CTCA) を有し、かつ肝腫瘍形成に関連するものを選択した [60-71]。それぞれのマウスにおける発現量を比較したところ、*CyclinD1*、*CD44*、*Chop*、*Mmp7*、*Pdgfrb*、*IL-11* は、WT マウス肝と比較して WT-Tg マウス肝で発現上昇し、KO-Tg マウス肝で発現が低下する傾向が見られた (図 7)。これらの遺伝子が *Pik3ca* Tg マウスにおいて肝腫瘍形成促進的に機能し、KDM3A 欠損により発現低下する結果、KO-Tg マウスでの肝腫瘍形成が抑制される可能性が考えられた。

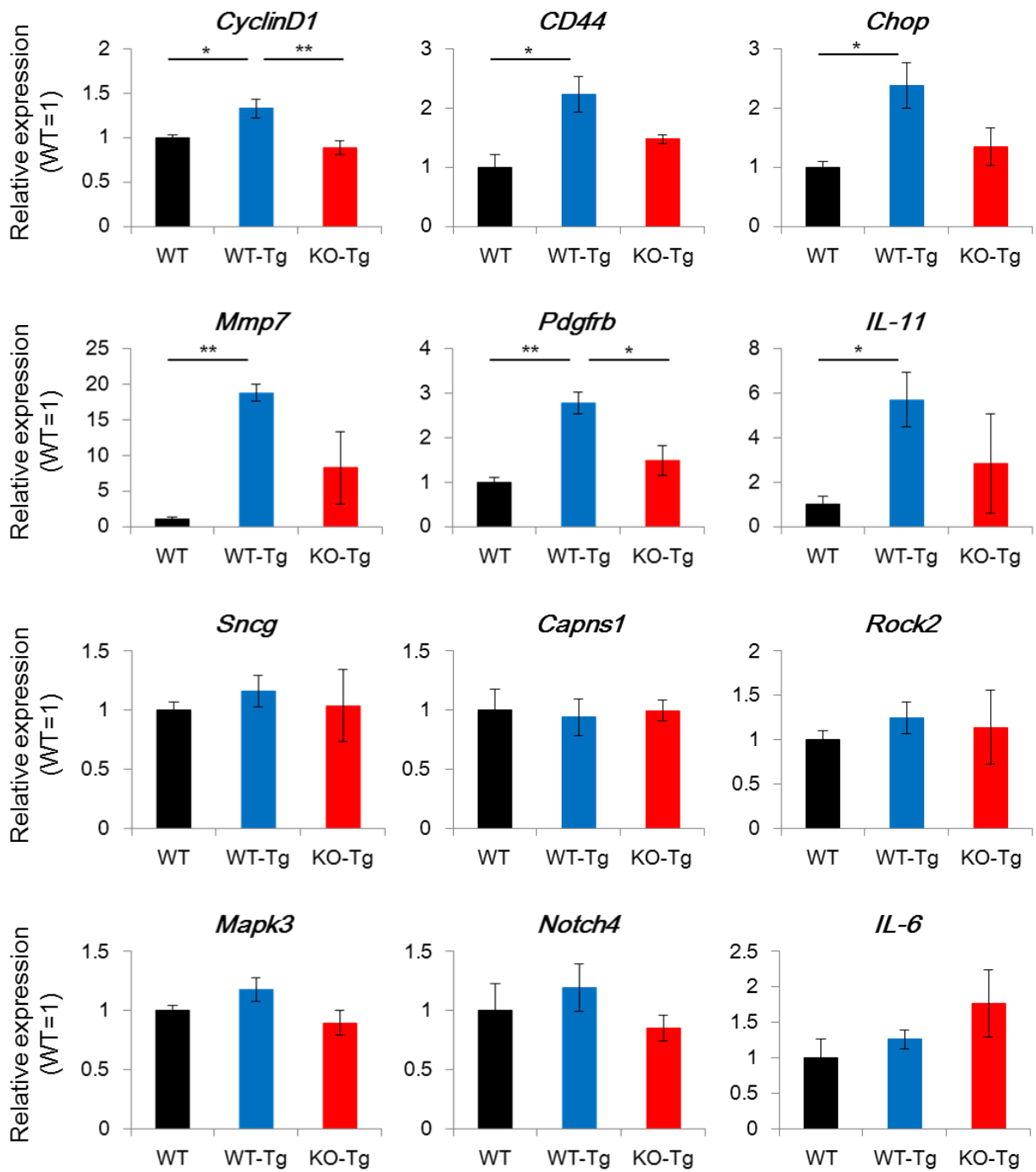


図7. AP-1標的遺伝子の発現量変化

定量的リアルタイムPCR法にてマウス肝におけるAP-1標的遺伝子群の発現量の変化を検討した。WT: n = 3, WT-Tg: n = 4, KO-Tg: n = 3。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

4). PI3K シグナルと c-Jun/AP-1 活性

次に PI3K シグナル活性と c-Jun/AP-1 活性の関係につき検討した。まずは *in vitro* の系で検討するため、BALB/c マウス胎仔より樹立された不死化正常肝細胞株である BNL-CL2 に *Pik3ca* を強制発現させた細胞を使用した。*Pik3ca* 安定発現株では Akt のリン酸化が見られ、さらに c-Jun の発現上昇も見られた (図 8 A)。すなわち、PI3K シグナルが活性化した状態では、その下流で c-Jun の発現が亢進することが示された。

次に *Pik3ca* Tg マウス肝における c-Jun 活性につき検討した。35 週齢の WT マウス、WT-Tg マウス、KO-Tg マウス肝由来のタンパクを用いたイムノブロット法、病理組織標本を用いた免疫染色で c-Jun 活性を確認した。WT マウス肝では c-Jun の発現は認められなかったが、WT-Tg マウス肝では c-Jun の発現及びリン酸化が見られた (図 8 B)。免疫染色においても c-Jun は肝細胞核内で染色されリン酸化も見られた (図 8 C)。c-Jun の核内レベルは転写活性と相関するため [73]、WT-Tg マウス肝において c-Jun/AP-1 の転写活性が上昇していることが示唆された。また興味深いことに、KO-Tg マウス肝においても c-Jun の活性化が見られた。ただし KO-Tg マウス肝では AP-1 標的遺伝子群は発現低下しており、これらの結果から KDM3A は c-Jun 発現および活性状態に関わらずその下流のレベルで標的遺伝子の転写調節を行っていると考えられた。

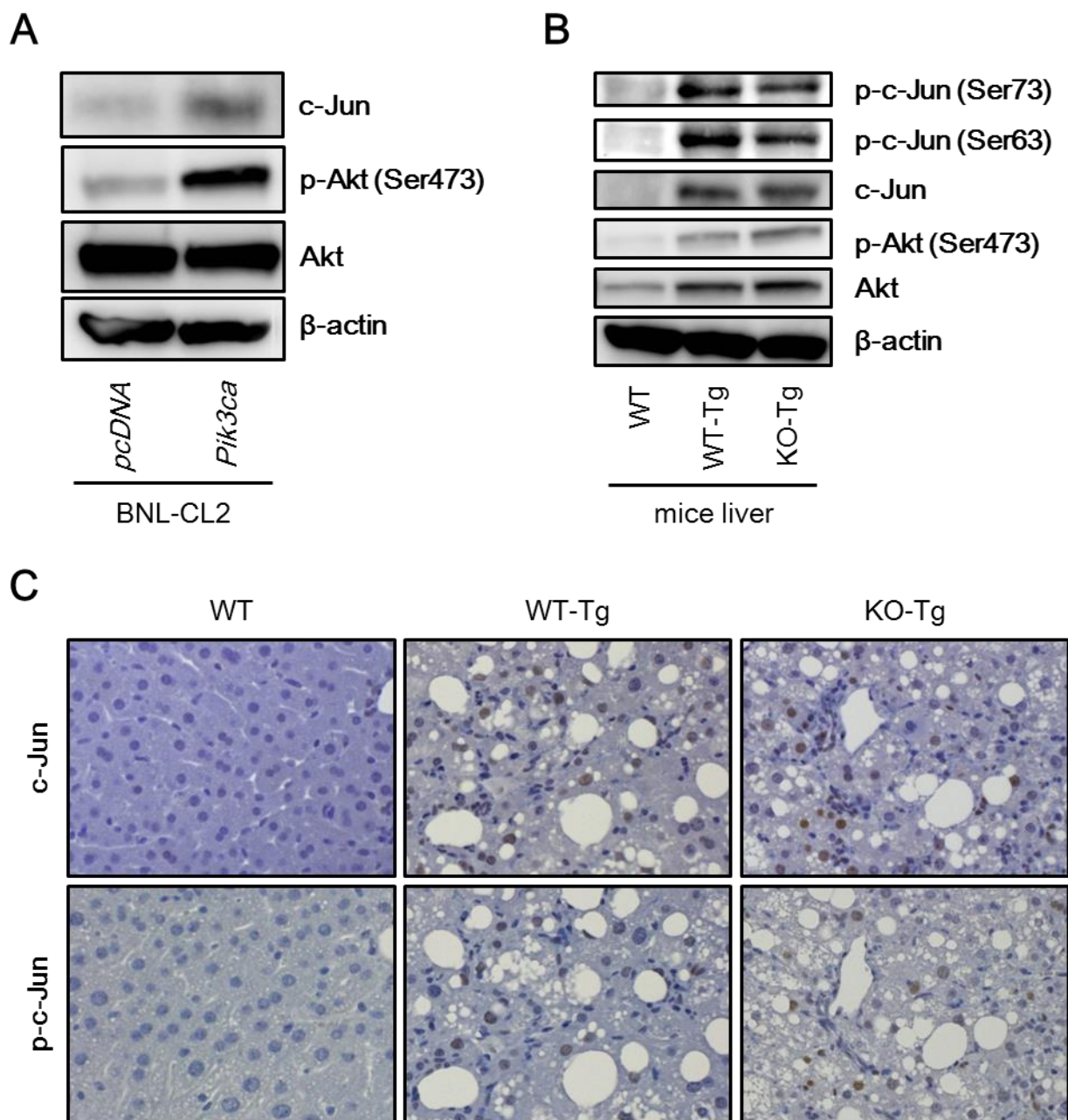


図8. PI3Kシグナルとc-Jun活性

(A) BNL-CL2に*Pik3ca*を強制発現させた細胞のAktリン酸化レベル及びc-Jun発現をイムノブロット法にて確認. マウス肝におけるc-Jun活性をイムノブロット法 (B) 及び免疫染色 (C) にて確認した.

次に PI3K シグナルが c-Jun 発現を上昇させるメカニズムについて検討した。GSK-3 β はユビキチンリガーゼである Fbw7 と結合し c-Jun のユビキチン化を促し、c-Jun のプロテアソーム分解を促進するということが知られている [74]。GSK-3 β は PI3K/Akt 下流でリン酸化され不活化されるため、PI3K シグナル下流で GSK-3 β が不活化されると c-Jun の分解が抑制されて c-Jun 発現が上昇する可能性が考えられた。*Pik3ca* を強制発現させた BNL-CL2 を用いた検討で、無血清状態で数時間培養するとコントロール細胞では c-Jun の発現レベルが低下して行くが、*Pik3ca* 強制発現株では c-Jun レベルは低下してこなかった (図 9 A)。さらに、恒常的 Akt 活性化により GSK-3 β のリン酸化が見られており、GSK-3 β の不活化により c-Jun の分解が抑制されていると考えられた。

また一方で、飽和脂肪酸であるパルミチン酸 (PA) が c-Jun 発現を促進するという報告がある [57]。BNL-CL2 にパルミチン酸を添加して 24 時間培養すると c-Jun 発現が濃度依存性に上昇した (図 9 B)。*Pik3ca* Tg マウス肝ではパルミチン酸の蓄積も確認されており (図 2 B)、パルミチン蓄積による c-Jun 発現上昇の可能性も考えられた。

以上より *Pik3ca* Tg マウス肝では、GSK-3 β 不活化による c-Jun 分解抑制とパルミチン酸蓄積による c-Jun 発現上昇の 2 つのメカニズムにより c-Jun の活性化が見られていると考えられた。

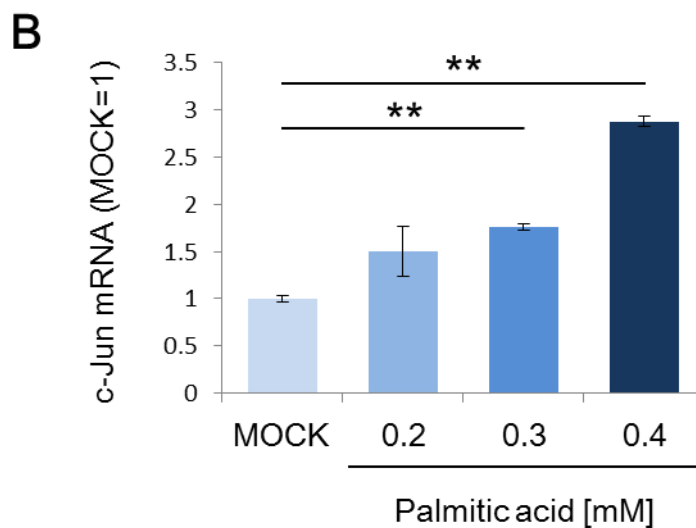
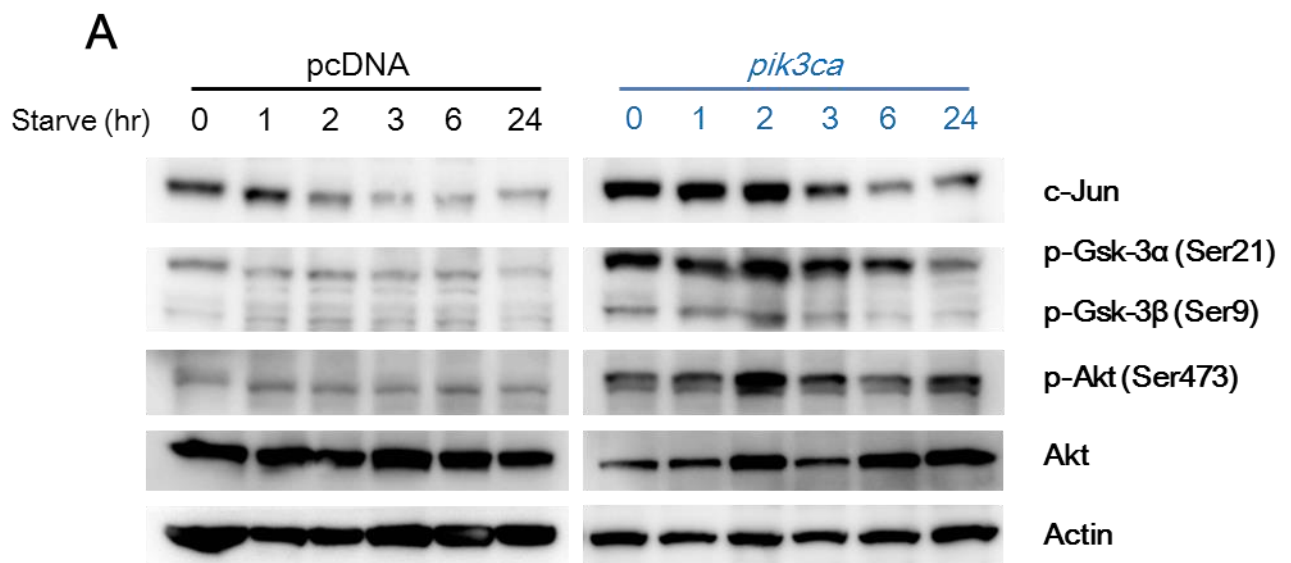


図9. PI3K/Akt/GSK3βシグナル及びパルミチン酸刺激によりc-Jun 発現が上昇する

(A) BNL-CL2 (*Pik3ca*)とコントロール細胞を無血清状態で24時間まで培養し、c-Jun 発現およびGSK-3α/βとAkt のリン酸化レベルをイムノブロット法にて解析した。(B) BNL-CL2に24時間のパルミチン刺激(0.2, 0.3, 0.4mM)を加えた際のc-Jun 発現量の比較. **: $p < 0.01$.

5). KDM3A による AP-1 標的遺伝子の転写制御機構

次に、前項で確認した 6 つの AP-1 標的遺伝子がどのように転写制御されているか検討するためクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。KDM3A は一般に H3K9 の脱メチル化を介して転写を促進するため、標的遺伝子の AP-1 結合領域 H3K9 メチル化状態を確認した。35 週の WT-Tg マウス肝および KO-Tg マウス肝で H3K9me2 抗体を用いて ChIP を行ったところ、WT-Tg と KO-Tg で H3K9me2 状態に一定の傾向はなく、KDM3A ノックアウトマウスでメチル化が回復する所見も見られなかった (図 10A)。このことより KDM3A による AP-1 標的遺伝子の発現制御にヒストン脱メチル化は関与しないことが示唆された。

一部のヒストン脱メチル化酵素は脱メチル化活性とは独立した機能を持つことがあり [75,76]、KDM3A を含むヒストン脱メチル化酵素は転写因子などのリクルートを促進することが知られている (図 2C) [37,77]。そこで KDM3A が c-Jun の AP-1 結合部位へのリクルートを制御する可能性を考え、c-Jun 抗体を用いて ChIP を行った。WT-Tg マウス肝では、*CyclinD1*、*IL-11* への c-Jun 結合は見られなかったが、*CD44*、*Chop*、*Mmp7*、*Pdgfrb* の AP-1 結合領域に c-Jun 結合が見られた。一方 KO-Tg マウスではこの c-Jun 結合が見られなくなっていた (図 10B)。以上より、KDM3A はその脱メチル化活性とは独立した機序で c-Jun のリクルートを制御することで、AP-1 標的遺伝子の発現を調整すると考えられた。

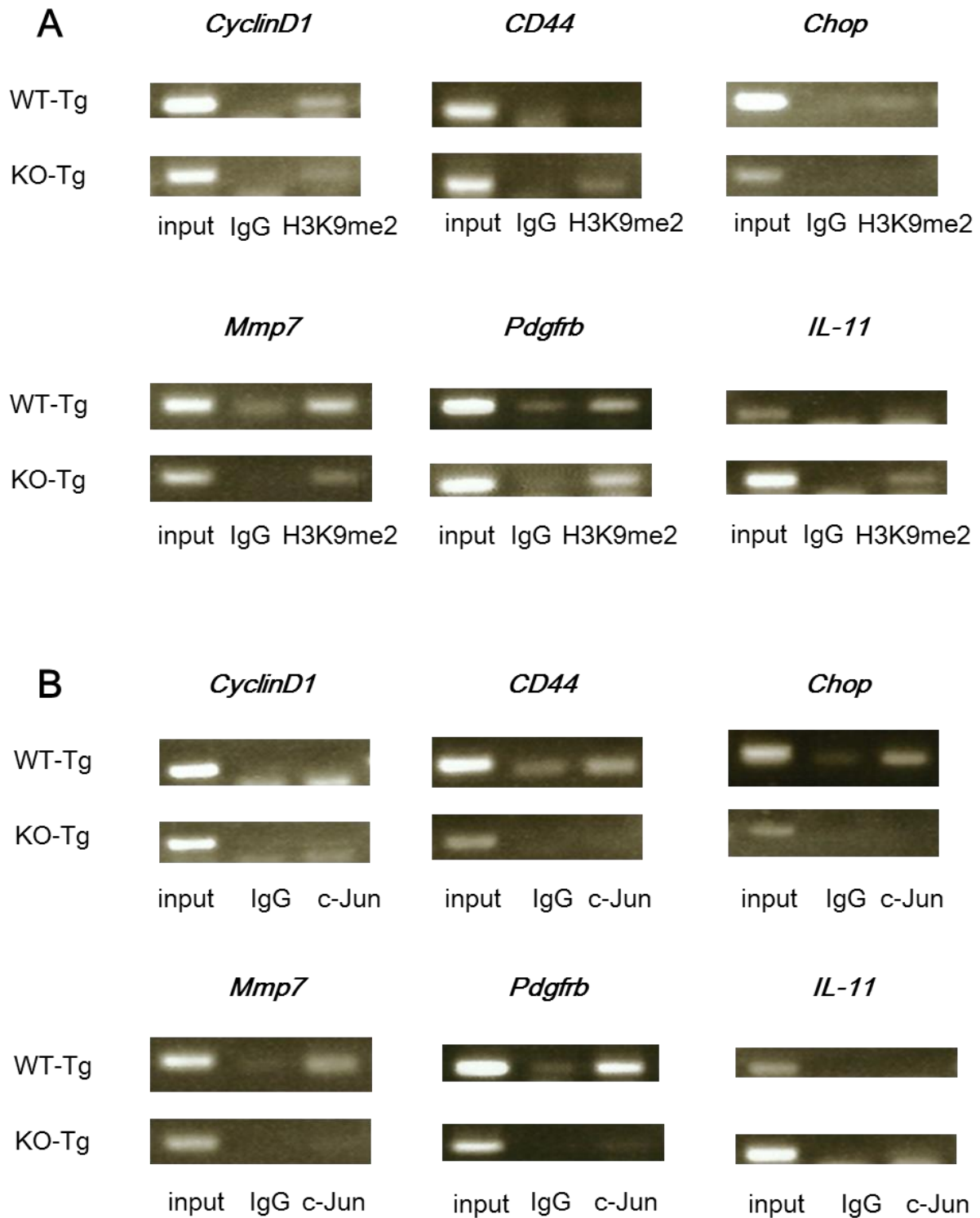


図10. マウス肝組織を用いたChIP assay

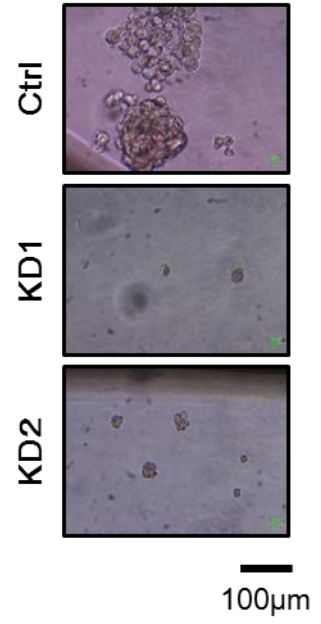
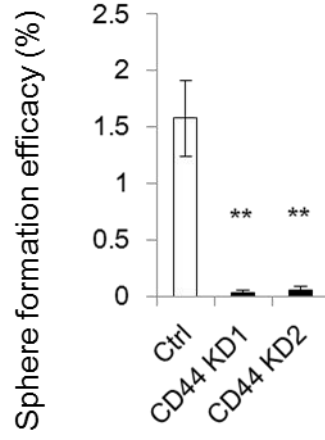
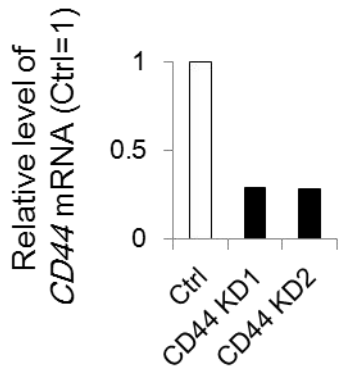
標的遺伝子プロモーター領域のAP-1結合部位に対する、H3K9me2特異的抗体(A)およびc-Jun特異的抗体(B)を用いたクロマチン免疫沈降法。

6). AP-1 標的遺伝子が肝腫瘍形成に及ぼす影響

KDM3A により発現制御されていると考えられた AP-1 標的遺伝子のうち *CD44*、*Chop*、*Pdgfrb* について肝腫瘍形成に及ぼす影響を検討した。2 種類のヒト肝癌細胞株 HLE 及び SK-Hep-1 に対して、sh RNA 発現レンチウイルスベクターを用いて、*CD44*、*Chop*、*Pdgfrb* ノックダウン細胞株をそれぞれ細胞ごとに 2 系列ずつ樹立した。定量的リアルタイム PCR 法にてそれぞれの遺伝子発現量を確認しノックダウン効率を評価した。*Pdgfrb* をノックダウンした細胞株は、HLE、SK-Hep-1 のいずれも有意なスフィア形成数の変化は見られなかったが、*CD44*、*Chop* ノックダウン細胞株では、HLE、SK-Hep-1 ともにスフィア形成数が有意に減少した (図 1 1 A-F)。このことから *CD44*、*Chop* は肝細胞固有に発現し、肝腫瘍形成を促進していると考えられた。

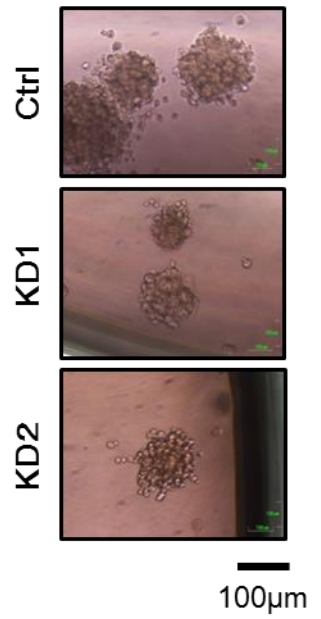
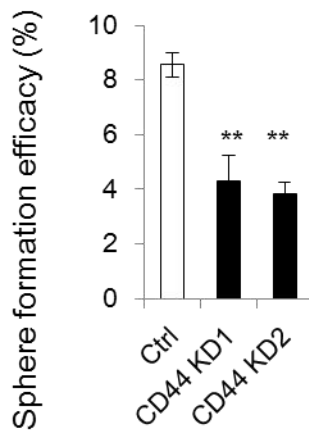
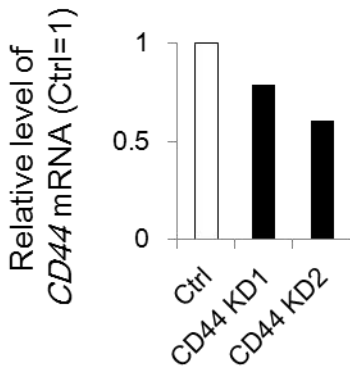
A

HLE (CD44 KD)



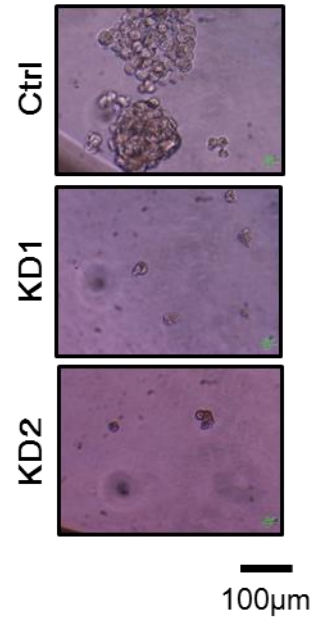
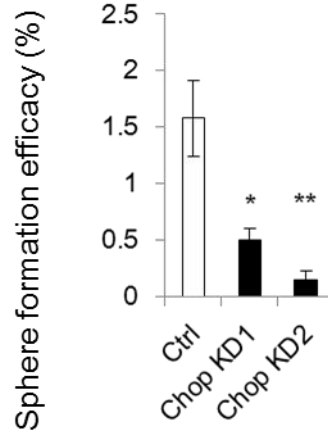
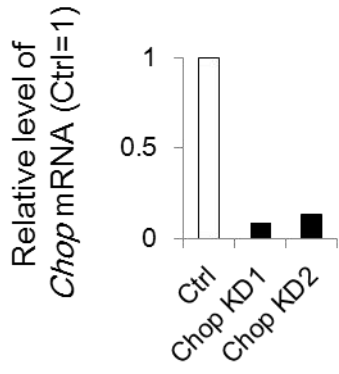
B

SK-Hep-1 (CD44 KD)



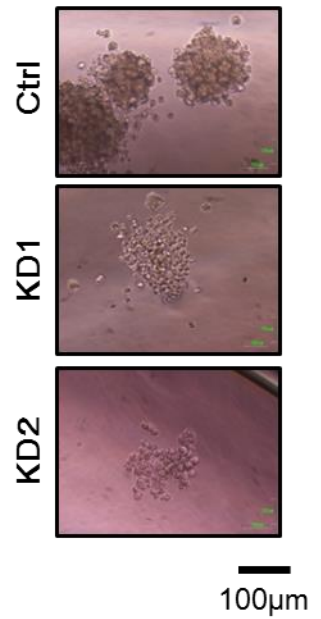
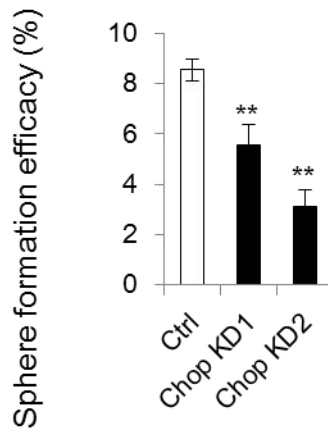
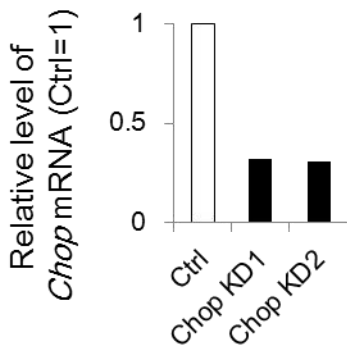
C

HLE (Chop KD)



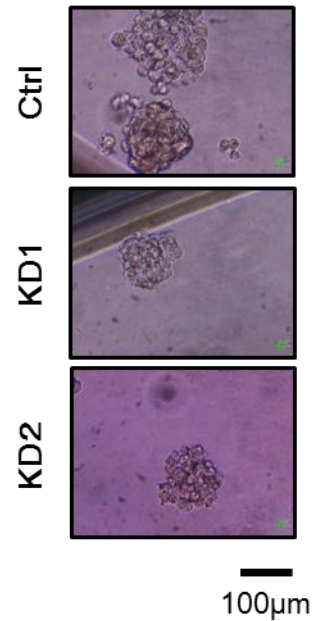
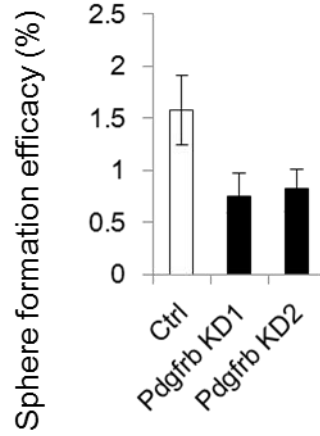
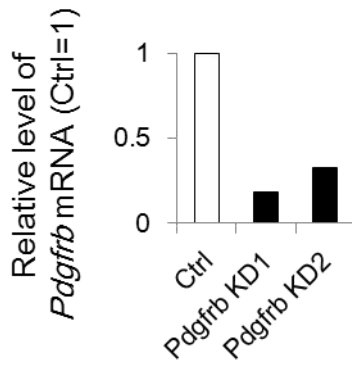
D

SK-Hep-1 (Chop KD)



E

HLE (*Pdgfrb* KD)



F

SK-Hep-1 (*Pdgfrb* KD)

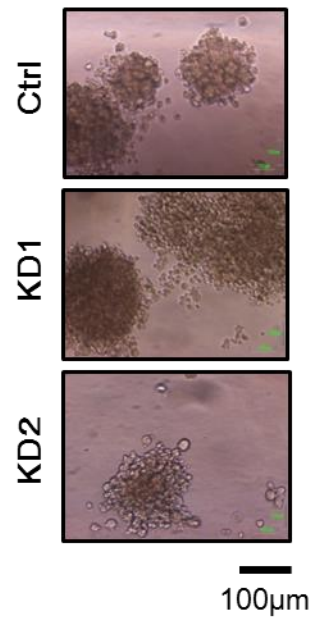
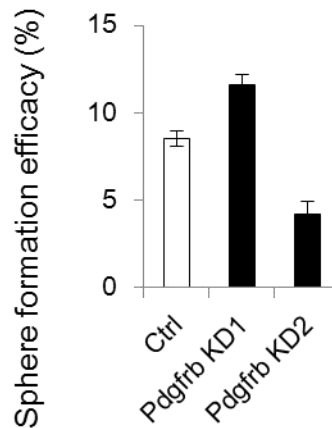
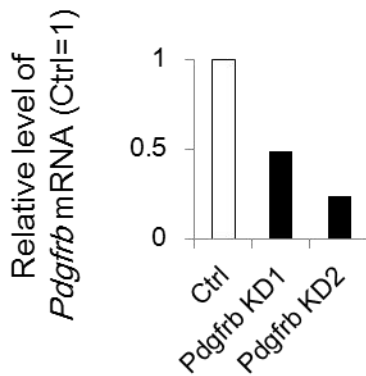
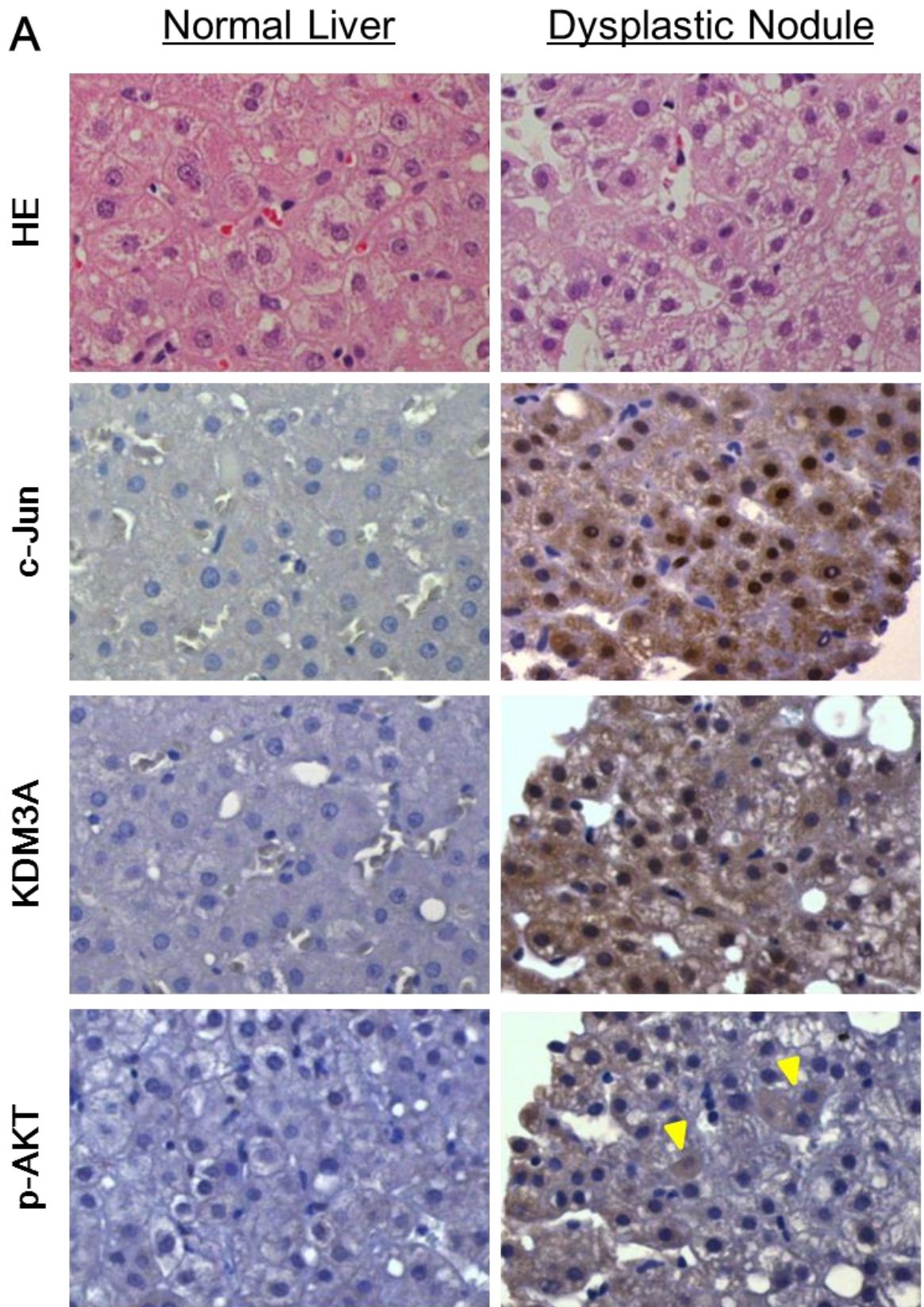


図11. *CD44*, *Chop*, *Pdgfrb* ノックダウン肝癌細胞株のスフィア形成能

肝癌細胞株HLEおよびSK-Hep-1を用いて *CD44*, *Chop*, *Pdgfrb* ノックダウン細胞株を2系列ずつ樹立した。ノックダウン効率をリアルタイムPCR法で確認し、スフィア形成能を評価した。それぞれ、(A) HLE *CD44*KD 細胞株, (B) SK-Hep-1 *CD44*KD 細胞株, (C) HLE *Chop*KD 細胞株, (D) SK-Hep-1 *Chop*KD 細胞株, (E) HLE *Pdgfrb* KD 細胞株, (B) SK-Hep-1 *Pdgfrb* KD 細胞株での結果を示す。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

7). ヒト肝前癌病変における検討

最後に、マウスモデルを用いて得られた以上の結果がヒト肝発癌においてどういう意義をもつか検証した。ヒトの肝腫瘍発生に KDM3A、c-Jun、p-AKT の関与があるか検討するため、ヒト肝癌前駆病変と言われる肝異型結節 (Dysplastic nodule: DN) の病理組織標本を用いてこれらの免疫染色を行った [78]。21 例の肝異型結節を染色し、c-Jun は 9/21 症例 (43%)、KDM3A は 8/21 (38%) 症例、p-AKT は 4/21 (19%) で陽性となった (図 1 2 A)。全て陽性となったのは全 21 例中 3 例 (14%) であり、これらの肝腫瘍発生には KDM3A、c-Jun、p-AKT の 3 因子が関与している可能性が示唆された。また特に c-Jun と KDM3A の発現には有意な相関が見られており (Fisher's exact test: $p = 0.0022$) (図 1 2 B)、肝腫瘍発生時期において KDM3A と c-Jun の両者が協調して作用している可能性が示唆された。



Original magnification x200

B

		c-JUN		
		+	-	Total
KDM3A	+	7	1	8
	-	2	11	13
	Total	9	11	21

Fisher's exact test
 $p = 0.0022$

図12. ヒト肝異型結節での免疫染色

(A) ヒト肝異型結節の針生検検体を使用して c-Jun, KDM3A, p-AKT の染色を行った。陽性率はそれぞれ43% (9/21), 38% (8/21), 19% (4/21)であった。
(B) c-JUNとKDM3Aの相関の検討。

考察

本研究の検討から、KDM3A は PI3K/Akt シグナルの活性化を背景とした脂肪肝において c-Jun/AP-1 の転写活性の制御を介して肝腫瘍発生に対し促進的に働いていることが分かった (図 1 3)。c-Jun/AP-1 が肝腫瘍形成の初期段階で重要であることを考えると [49,53,56]、KDM3A は肝腫瘍発生において非常に重要な役割を担っていると考えられる。

近年癌におけるエピジェネティクスの重要性が判明してきており、今回注目したヒストン脱メチル化酵素 KDM3A も様々な癌で関与が認められている [38-45]。これまでの KDM3A の癌における報告はいずれも進行した癌の増殖や浸潤、転移における機能であるが、本研究では KDM3A がさらに早期の腫瘍発生段階においても関与している可能性があるということを示すことができた。

今回2つのマウスを交配することで *in vivo* の系において KDM3A の肝腫瘍発生における役割が検討できた。1つは脂肪肝から肝腫瘍を発症するモデルとして *Pik3ca Tg* マウスを用いた。このマウスは肝細胞における PI3K/Akt シグナルの恒常活性化の結果、肝脂肪蓄積から肝腫瘍を形成するが、ヒト NAFLD で見られるようなインスリン抵抗性や慢性炎症は惹起されず、形成される腫瘍もほとんどが肝細胞腺腫である [21]。ただしヒトにおいて単純性脂肪肝から慢性炎症や肝硬変を経由せずに肝癌を発症することも最近知られてきており [79-85]、またマ

ウスに形成される肝細胞腺腫は加齢や発癌物質により大きさや異型度が進行し、一部に癌が生じることもあるため前癌病変として扱われることもあり [86]、このマウスは PI3K シグナル活性化および脂質代謝異常を背景とした肝腫瘍発生の過程を検討するうえでは有用なモデルと思われる。

もう 1 つのマウスとして *Kdm3a*^{KO} マウスを用いた。KDM3A は筋においては PPAR シグナルに関わる代謝系遺伝子群の発現を調整し、脂肪細胞においては β アドレナリン刺激により誘導され熱産生に重要な UCP1 遺伝子の発現を調整している。そのため *Kdm3a*^{KO} マウスは熱産生を十分に行えずエネルギー消費効率が減少し、ヒトにおけるメタボリックシンドロームと同様の内蔵型肥満を呈する [37]。 *Kdm3a*^{KO} マウスは全身の細胞で KDM3A を欠損しているため、本研究で観察された肝臓での事象が肝細胞特異的かどうかは不明である。ただし、*Pik3ca* Tg マウスと *Kdm3a*^{KO} マウスの交配の結果、肝脂肪蓄積には影響することなく肝腫瘍形成のみが抑制されているため (図 3 A-C)、全身のエネルギー代謝異常といった肝臓以外のファクターよりも肝臓内で起こっている PI3K シグナル活性および KDM3A 依存性の遺伝子発現の変化の方がこの系の腫瘍形成においては重要であると思われる。またマウス肝臓の免疫染色の結果からは *Pik3ca* Tg マウスの肝細胞内で c-Jun が活性化していると考えられるので (図 8 B, C)、マウス肝臓を用いた ChIP の結果はある程度肝細胞固有に起こっている現象を捉えていると思わ

れる。しかし肝細胞周囲の環境、すなわち肝細胞以外の炎症細胞や肝星細胞などにおける KDM3A 欠損や、その結果変化する細胞外基質などが肝腫瘍形成に寄与しているという可能性は否めない。マウス肝由来の初代培養肝細胞などを用いれば、本研究で得られた知見が肝細胞特異的な事象かどうかある程度判断することができると思われるので、今後の検討課題と考えている。

今回の検討はあくまで PI3K シグナルの活性化した状態で KDM3A の挙動を見たものであり、その他の環境下で KDM3A がどのようにふるまうかは不明である。ただしヒト肝前癌病変である Dysplastic Nodules の免疫染色の結果から、c-Jun と KDM3A の発現に強い相関が見られており (図 1 2B)、PI3K シグナルが活性化した状態に限らず c-Jun/AP-1 が関与する場面では KDM3A が協調して作用している可能性は考えられる。例えばジエチルニトロソアミン (DEN) により誘導される肝腫瘍形成モデルにおいては c-Jun が肝腫瘍形成を促進することが知られており [87-90]、また食餌誘導による NASH モデルマウスの肝臓では c-Jun/AP-1 が活性化し、NASH 進展に伴う遺伝子発現の変化の中心的役割を担っているという報告もある [59]。このような c-Jun 活性化が見られる他のマウスモデルにおいて KDM3A の挙動を検討できれば、さらに c-Jun と KDM3A の関係への理解が深まることが期待される。

AP-1 転写活性のエピジェネティクスによる制御に関しては、H3K9me3 の

脱メチル化酵素である KDM4A が脱メチル化活性依存的に c-Jun および FOSL1 の転写制御を行っており、その結果食道癌の浸潤能、転移能を促進するという既報がある [91]。しかし KDM3A と c-Jun の相互作用を検討した研究はこれまで知られておらず、本研究が初めての報告となる。マウス肝臓を用いた cDNA マイクロアレイの結果から KDM3A は AP-1 標的遺伝子群の発現制御に重要と考えられ、さらに ChIP の検討から KDM3A はヒストン脱メチル化活性とは独立した機序で c-Jun の標的遺伝子 AP-1 結合部位へのリクルートを制御することで AP-1 転写活性を調整していることが示された。H3K9me3 脱メチル化酵素 KDM4C もやはり同様に脱メチル化活性と独立した機序で転写因子のリクルートを促進すると報告されているがそのメカニズムは不明である [77]。ヒストンタンパク修飾酵素群の多くは単独因子として機能せず、核内巨大複合体として機能することが知られている。また c-Jun も活性化した際には RNA ポリメラーゼ II を初めとした基本転写因子やコアクチベーターと相互作用し、クロマチン構造を変化させることで転写制御を可能にしている [92-95]。おそらく c-Jun による遺伝子発現が促進されるためには、KDM3A を含む転写複合体によってクロマチン構造が変化し、c-Jun が AP-1 領域に結合可能となることが必要と考えられるが、まだ確立したデータは存在しておらず、ヒストン修飾因子による転写因子リクルートのメカニズム解明も今後の検討課題の 1 つである。

今回4つのAP-1標的遺伝子 *CD44*、*Chop*、*Mmp7*、*Pdgfrb* が KDM3A により転写制御が行われていることが示された。*CD44* は細胞膜タンパク質で細胞間相互作用において様々な機能を有するが、いわゆる癌幹細胞のマーカースとして広く知られている [96]。また *Mmp7* は細胞外基質の分解に関わるプロテアーゼで、癌の浸潤や転移などとの関連が知られている [97]。本研究ではマウスの腫瘍形成前の肝組織を用いて腫瘍形成に寄与する遺伝子の抽出を行ったが、ヒト肝癌の背景肝を用いた検討において *CD44* および *Mmp7* の高発現は肝癌再発のリスクとなるという報告があり、肝腫瘍発生に寄与している可能性があり大変興味深い [61,63]。また *Chop* は C/EBP ファミリーに属する転写因子であり、小胞体ストレスにより誘導され細胞死を誘導すると言われているが、その標的遺伝子や作用機構には不明な点が多い [98,99]。*Chop* の全身ノックアウトマウスでは化学発癌物質であるジエチルニトロサミンによる肝腫瘍形成が抑制されるという報告があり [62]、*Chop* は肝腫瘍発生に促進的に働いている可能性があると考えられる。

PDGF シグナルは細胞増殖、分化、遊走など様々な生理機能を有するが、多くの癌種でその異常が知られている [100]。*Pdgfra* および *Pdgfrb* はいずれも肝癌で高発現であるという報告があり肝腫瘍形成への寄与が示唆される [64,101]。肝癌細胞株を用いたスフィア形成能のアッセイの結果からは、少なくとも *CD44* 及び *Chop* は肝細胞固有に発現し、肝腫瘍形成を促進する可能性が示唆された。また

Pdgfrb 単独ではスフィア形成には影響しなかったが、細胞外基質との相互作用がある in vivo の環境において初めて肝腫瘍形成に寄与するのかもしれない。

“Field cancerization” という概念が知られており、これは組織全体として蓄積するゲノム・エピゲノム変化が正常細胞の悪性形質転換を誘導し、腫瘍発生を促進するという考え方である [102]。肝癌の特徴として、治癒切除後も再発が多いことが挙げられるが、これは肝癌が多中心性発癌という形式をとることに一因がある。多くの肝癌は慢性肝炎、肝硬変を背景として発生するが、持続する慢性炎症の結果肝臓には様々なゲノム・エピゲノム変化が発生しており、この異常の蓄積が腫瘍発生につながっていくと考えられ、まさに “Field cancerization” の概念にあてはまる。このことから、肝癌組織での分子生物学的異常の検討はもちろん重要ではあるが、それだけではなく非癌部において蓄積しているゲノム異常、エピゲノム異常に対する理解を深めることが必要であり、これは肝癌発症のリスク分析や、発癌を未然に防ぐ治療法につながると考えられる [103]。

本研究ではマウスの腫瘍形成前の肝臓を用いて遺伝子発現の変化やそのメカニズムを検討した結果、KDM3A が腫瘍形成につながる遺伝子発現状態の変化に重要な役割を担うことが示唆された。PI3K シグナル活性および脂質代謝異常により肝臓に蓄積する遺伝子発現の変化やエピジェネティック異常と肝腫瘍形成をつなぐファクターとして KDM3A が重要であり、治療標的にもなりうると思

えられる。肝癌に対する有効な薬物治療として現状ではソラフェニブしか存在しないが [104,105]、KDM3A 阻害剤が開発されれば PI3K シグナル活性や脂質代謝異常を背景とした肝癌の発症予防や肝癌切除後の術後再発などに使用できる可能性があり、本研究の成果はそうした治療法の開発へと発展させることが期待できる。

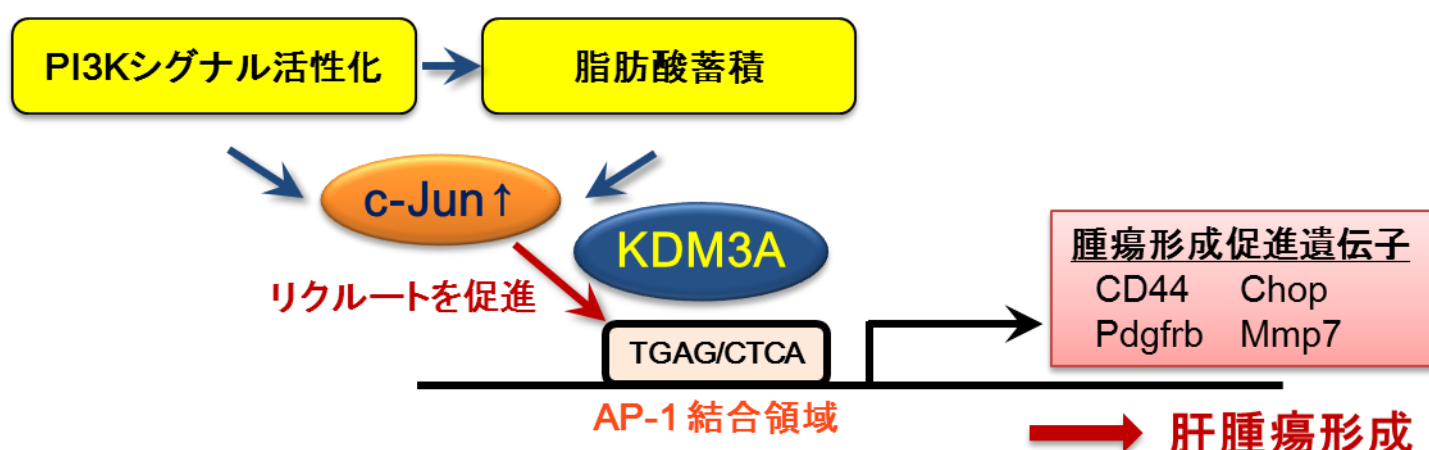


図13. 本研究のまとめ

PI3K/Aktが活性化した環境下ではc-Jun/AP-1転写活性が上昇する。c-Jun/AP-1は肝腫瘍形成を促進する遺伝子の発現を制御しているが、KDM3Aはc-Junのリクルートを制御することで、AP-1転写活性を調節している。AP-1は脂肪肝および肝腫瘍形成に重要な転写因子であり、脂肪肝からの肝腫瘍形成におけるKDM3Aの重要性が示唆される。

引用文献

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. CA. Cancer J. Clin. 61, 69–90 (2011).

[2] Bosch, F. X., Ribes, J., Díaz, M. & Cléries, R. Primary liver cancer: Worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 127, S5–S16 (2004).

[3] Forner, A., Llovet, J. M. & Bruix, J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 379, 1245–55 (2012).

[4] Sherman, M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, surveillance, and diagnosis. *Semin. Liver Dis.* 30, 3–16 (2010).

[5] El-Serag, H. B. Hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 365, 1118–27 (2011).

[6] Ludwig, J., Viggiano, T. R., McGill, D. B. & Oh, B. J. Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* 55, 434–8 (1980).

[7] Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology* 116, 1413–9 (1999).

[8] Cohen, J. C., Horton, J. D. & Hobbs, H. H. Human fatty liver disease: old questions and new insights. *Science* 332, 1519–23 (2011).

[9] Vernon, G., Baranova, A & Younossi, Z. M. Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis in adults. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 34, 274–85 (2011).

[10] Okanoue, T., Umemura, A., Yasui, K. & Itoh, Y. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in Japan. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26 Suppl 1, 153–62 (2011).

[11] Starley, B. Q., Calcagno, C. J. & Harrison, S. a. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 51, 1820–32 (2010).

[12] Siegel, A. B. & Zhu, A. X. Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma: two growing epidemics with a potential link. *Cancer* 115, 5651–61 (2009).

[13] Kawamura Y, Arase Y, Ikeda K, Seko Y, Imai N, Hosaka T, Kobayashi M, Saitoh S, Sezaki H, Akuta N, Suzuki F, Suzuki Y, Ohmoto Y, Amakawa K, Tsuji H, Kumada H. Large-scale long-term follow-up study of Japanese patients with non-alcoholic Fatty liver disease for the onset of hepatocellular carcinoma. *Am. J. Gastroenterol.* 107, 253–61 (2012).

[14] Adams LA, Lymp JF, St Sauver J, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, Angulo P. The Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Population-Based Cohort Study. *Gastroenterology* 129, 113–121 (2005).

- [15] Rafiq N, Bai C, Fang Y, Srishord M, McCullough A, Gramlich T, Younossi ZM. Long-term follow-up of patients with nonalcoholic fatty liver. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 7, 234–8 (2009).
- [16] Bader, A. G., Kang, S., Zhao, L. & Vogt, P. K. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat. Rev. Cancer* 5, 921–9 (2005).
- [17] Engelman, J. a, Luo, J. & Cantley, L. C. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* 7, 606–19 (2006).
- [18] Leavens, K. F., Easton, R. M., Shulman, G. I., Previs, S. F. & Birnbaum, M. J. Akt2 is required for hepatic lipid accumulation in models of insulin resistance. *Cell Metab.* 10, 405–18 (2009).
- [19] Whittaker, S., Marais, R. & Zhu, A. X. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 29, 4989–5005 (2010).
- [20] Lee JW, Soung YH, Kim SY, Lee HW, Park WS, Nam SW, Kim SH, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas. *Oncogene* 24, 1477–80 (2005).
- [21] Kudo Y, Tanaka Y, Tateishi K, Yamamoto K, Yamamoto S, Mohri D, Isomura Y, Seto M, Nakagawa H, Asaoka Y, Tada M, Ohta M, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue

T, Maeda S, Shiina S, Yoshida H, Nakajima O, Kanai F, Omata M, Koike K. Altered composition of fatty acids exacerbates hepatotumorigenesis during activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J. Hepatol.* 55, 1400–8 (2011).

[22] Esteller, M. Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.* 358, 1148–59 (2008).

[23] Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* 37, 391–400 (2005).

[24] Yamane K, Tateishi K, Klose RJ, Fang J, Fabrizio LA, Erdjument-Bromage H, Taylor-Papadimitriou J, Tempst P, Zhang Y. PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Mol. Cell* 25, 801–12 (2007).

[25] Ryan D. Morin, Nathalie A. Johnson, Tesa M. Severson, Andrew J. Mungall, Jianghong An, Rodrigo Goya, Jessica E. Paul, Merrill Boyle, Bruce W. Woolcock, Florian Kuchenbauer, Damian Yap, R. Keith Humphries, Obi L. Griffith, Sohrab Shah, Henry Zhu, Michelle Kimbara, Pavel Shashkin, Jean F. Charlot, Marianna Tcherpakov, Richard Corbett, Angela Tam, Richard Varhol, Duane Smailus, Michelle Moksa, Yongjun

Zhao, Allen Delaney, Hong Qian, Inanc Birol, Jacqueline Schein, Richard Moore, Robert Holt, Doug E. Horsman, Joseph M. Connors, Steven Jones, Samuel Aparicio, Martin Hirst, Randy D. Gascoyne, and Marco A. Marra. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* 42, 181–5 (2010).

[26] Dalgliesh GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A, Davies H, Edkins S, Hardy C, Latimer C, Teague J, Andrews J, Barthorpe S, Beare D, Buck G, Campbell PJ, Forbes S, Jia M, Jones D, Knott H, Kok CY, Lau KW, Leroy C, Lin ML, McBride DJ, Maddison M, Maguire S, McLay K, Menzies A, Mironenko T, Mulderrig L, Mudie L, O'Meara S, Pleasance E, Rajasingham A, Shepherd R, Smith R, Stebbings L, Stephens P, Tang G, Tarpey PS, Turrell K, Dykema KJ, Khoo SK, Petillo D, Wonderegem B, Anema J, Kahnoski RJ, Teh BT, Stratton MR, Futreal PA. Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature* 463, 360–3 (2010).

[27] Martin, M. & Herceg, Z. From hepatitis to hepatocellular carcinoma: a proposed model for cross-talk between inflammation and epigenetic mechanisms. *Genome Med.* 4, 8 (2012).

[28] Au SL, Wong CC, Lee JM, Fan DN, Tsang FH, Ng IO, Wong CM. Enhancer of zeste

homolog 2 epigenetically silences multiple tumor suppressor microRNAs to promote liver cancer metastasis. *Hepatology* 56, 622–31 (2012).

[29] Fan DN, Tsang FH, Tam AH, Au SL, Wong CC, Wei L, Lee JM, He X, Ng IO, Wong CM. Histone lysine methyltransferase, suppressor of variegation 3-9 homolog 1, promotes hepatocellular carcinoma progression and is negatively regulated by microRNA-125b. *Hepatology* 57, 637–47 (2013).

[30] Li M, Zhao H, Zhang X, Wood LD, Anders RA, Choti MA, Pawlik TM, Daniel HD, Kannangai R, Offerhaus GJ, Velculescu VE, Wang L, Zhou S, Vogelstein B, Hruban RH, Papadopoulos N, Cai J, Torbenson MS, Kinzler KW. Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* 43, 828–9 (2011).

[31] Fujimoto A, Totoki Y, Abe T, Boroevich KA, Hosoda F, Nguyen HH, Aoki M, Hosono N, Kubo M, Miya F, Arai Y, Takahashi H, Shirakihara T, Nagasaki M, Shibuya T, Nakano K, Watanabe-Makino K, Tanaka H, Nakamura H, Kusuda J, Ojima H, Shimada K, Okusaka T, Ueno M, Shigekawa Y, Kawakami Y, Arihiro K, Ohdan H, Gotoh K, Ishikawa O, Ariizumi S, Yamamoto M, Yamada T, Chayama K, Kosuge T, Yamaue H, Kamatani N, Miyano S, Nakagama H, Nakamura Y, Tsunoda T, Shibata T, Nakagawa H. Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation

patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat. Genet.* 44, 760–4 (2012).

[32] Yeo W, Chung HC, Chan SL, Wang LZ, Lim R, Picus J, Boyer M, Mo FK, Koh J, Rha SY, Hui EP, Jeung HC, Roh JK, Yu SC, To KF, Tao Q, Ma BB, Chan AW, Tong JH, Erlichman C, Chan AT, Goh BC. Epigenetic Therapy Using Belinostat for Patients With Unresectable Hepatocellular Carcinoma: A Multicenter Phase I/II Study With Biomarker and Pharmacokinetic Analysis of Tumors From Patients in the Mayo Phase II Consortium and the Cancer Therapeutics Res. *J. Clin. Oncol.* 30, 3361–3367 (2012).

[33] Yamane K, Toumazou C, Tsukada Y, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y. JHDM2A, a JmjC-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 125, 483–95 (2006).

[34] Okada, Y., Scott, G., Ray, M. K., Mishina, Y. & Zhang, Y. Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature* 450,119–123 (2007).

[35] Inagaki T, Tachibana M, Magoori K, Kudo H, Tanaka T, Okamura M, Naito M, Kodama T, Shinkai Y, Sakai J. Obesity and metabolic syndrome in histone demethylase JHDM2a-deficient mice. *Genes Cells* 14, 991–1001 (2009).

[36] Kuroki S, Matoba S, Akiyoshi M, Matsumura Y, Miyachi H, Mise N, Abe K, Ogura A, Wilhelm D, Koopman P, Nozaki M, Kanai Y, Shinkai Y, Tachibana M. Epigenetic

Regulation of Mouse Sex Determination by the Histone Demethylase Jmjd1a. *Science* 341, 1106–1109 (2013).

[37] Tateishi, K., Okada, Y., Kallin, E. M. & Zhang, Y. Role of Jhdm2a in regulating metabolic gene expression and obesity resistance. *Nature* 458, 757–61 (2009).

[38] Beyer, S., Kristensen, M. M., Jensen, K. S., Johansen, J. V. & Staller, P. The histone demethylases JMJD1A and JMJD2B are transcriptional targets of hypoxia-inducible factor HIF. *J. Biol. Chem.* 283, 36542–52 (2008).

[39] Cho HS, Toyokawa G, Daigo Y, Hayami S, Masuda K, Ikawa N, Yamane Y, Maejima K, Tsunoda T, Field HI, Kelly JD, Neal DE, Ponder BA, Maehara Y, Nakamura Y, Hamamoto R. The JmjC domain-containing histone demethylase KDM3A is a positive regulator of the G1/S transition in cancer cells via transcriptional regulation of the HOXA1 gene. *Int. J. Cancer* 131, E179–89 (2012).

[40] Krieg AJ, Rankin EB, Chan D, Razorenova O, Fernandez S, Giaccia AJ. Regulation of the histone demethylase JMJD1A by hypoxia-inducible factor 1 alpha enhances hypoxic gene expression and tumor growth. *Mol. Cell. Biol.* 30, 344–53 (2010).

[41] Osawa T, Tsuchida R, Muramatsu M, Shimamura T, Wang F, Suehiro J, Kanki Y, Wada Y, Yuasa Y, Aburatani H, Miyano S, Minami T, Kodama T, Shibuya M. Inhibition of histone demethylase JMJD1A improves anti-angiogenic therapy and reduces

tumor-associated macrophages. *Cancer Res.* 73, 3019–28 (2013).

[42] Padi, S. K. R., Zhang, Q., Rustum, Y. M., Morrison, C. & Guo, B. MicroRNA-627 Mediates the Epigenetic Mechanisms of Vitamin D to Suppress Proliferation of Human Colorectal Cancer Cells and Growth of Xenograft Tumors in Mice. *Gastroenterology* 145, 437–446 (2013).

[43] Uemura M, Yamamoto H, Takemasa I, Mimori K, Hemmi H, Mizushima T, Ikeda M, Sekimoto M, Matsuura N, Doki Y, Mori M. Jumonji domain containing 1A is a novel prognostic marker for colorectal cancer: in vivo identification from hypoxic tumor cells. *Clin. Cancer Res.* 16, 4636–46 (2010).

[44] Park SJ, Kim JG, Son TG, Yi JM, Kim ND, Yang K, Heo K. The histone demethylase JMJD1A regulates adrenomedullin-mediated cell proliferation in hepatocellular carcinoma under hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 722–727 (2013).

[45] Yamada D, Kobayashi S, Yamamoto H, Tomimaru Y, Noda T, Uemura M, Wada H, Marubashi S, Eguchi H, Tanemura M, Doki Y, Mori M, Nagano H. Role of the Hypoxia-Related Gene, JMJD1A, in Hepatocellular Carcinoma: Clinical Impact on Recurrence after Hepatic Resection. *Ann. Surg. Oncol.* 19 Suppl 3, 355–64 (2012).

[46] Friedman JR, Larris B, Le PP, Peiris TH, Arsenlis A, Schug J, Tobias JW, Kaestner

KH, Greenbaum LE. Orthogonal analysis of C/EBPbeta targets in vivo during liver proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12986–91 (2004).

[47] Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 15545–50 (2005).

[48] Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell Biol.* 4, E131–6 (2002).

[49]. Eferl, R. & Wagner, E. F. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 859–68 (2003).

[50] Hasselblatt, P., Rath, M., Komnenovic, V., Zatloukal, K. & Wagner, E. F. Hepatocyte survival in acute hepatitis is due to c-Jun/AP-1-dependent expression of inducible nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 17105–10 (2007).

[51] Behrens A, Sibilian M, David JP, Möhle-Steinlein U, Tronche F, Schütz G, Wagner EF. Impaired postnatal hepatocyte proliferation and liver regeneration in mice lacking c-jun in the liver. *EMBO J.* 21, 1782–90 (2002).

[52] Machida K, Tsukamoto H, Liu JC, Han YP, Govindarajan S, Lai MM, Akira S, Ou JH. c-Jun mediates hepatitis C virus hepatocarcinogenesis through signal transducer and

activator of transcription 3 and nitric oxide-dependent impairment of oxidative DNA repair. *Hepatology* 52, 480–92 (2010).

[53] Min L, Ji Y, Bakiri L, Qiu Z, Cen J, Chen X, Chen L, Scheuch H, Zheng H, Qin L, Zatloukal K, Hui L, Wagner EF. Liver cancer initiation is controlled by AP-1 through SIRT6-dependent inhibition of survivin. *Nat. Cell Biol.* 14, 1203–1211 (2012).

[54] Ryseck, R. P. & Bravo, R. c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene* 6, 533–42 (1991).

[55] Lee JS, Heo J, Libbrecht L, Chu IS, Kaposi-Novak P, Calvisi DF, Mikaelyan A, Roberts LR, Demetris AJ, Sun Z, Nevens F, Roskams T, Thorgeirsson SS. A novel prognostic subtype of human hepatocellular carcinoma derived from hepatic progenitor cells. *Nat. Med.* 12, 410–6 (2006).

[56] Liu P, Kimmoun E, Legrand A, Sauvanet A, Degott C, Lardeux B, Bernuau D. Activation of NF-kappa B, AP-1 and STAT transcription factors is a frequent and early event in human hepatocellular carcinomas. *J. Hepatol.* 37, 63–71 (2002).

[57] Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K, Gobejishvili L, Hill D, Cave M, Hote P, McClain CJ. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* 46, 823–30 (2007).

[58] Videla LA, Tapia G, Rodrigo R, Pettinelli P, Haim D, Santibañez C, Araya AV, Smok G, Csendes A, Gutierrez L, Rojas J, Castillo J, Korn O, Maluenda F, Díaz JC, Rencoret G, Poniachik J. Liver NF-kappaB and AP-1 DNA binding in obese patients. *Obesity (Silver Spring)*. 17, 973–9 (2009).

[59] Dorn C, Engelmann JC, Saugspier M, Koch A, Hartmann A, Müller M, Spang R, Bosserhoff A, Hellerbrand C. Increased expression of c-Jun in nonalcoholic fatty liver disease. *Lab. Invest.* 94, 394–408 (2014).

[60] Yamamoto, M., Tamakawa, S., Yoshie, M., Yaginuma, Y. & Ogawa, K. Neoplastic hepatocyte growth associated with cyclin D1 redistribution from the cytoplasm to the nucleus in mouse hepatocarcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 45, 901–13 (2006).

[61] Tovuu LO, Imura S, Utsunomiya T, Morine Y, Ikemoto T, Arakawa Y, Mori H, Hanaoka J, Kanamoto M, Sugimoto K, Iwahashi S, Saito Y, Yamada S, Asanoma M, Miyake H, Shimada M. Role of CD44 expression in non-tumor tissue on intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Clin. Oncol.* 18, 651–6 (2013).

[62] Scaiewicz V, Nahmias A, Chung RT, Mueller T, Tirosh B, Shibolet O. CCAAT/enhancer-binding protein homologous (CHOP) protein promotes carcinogenesis in the DEN-induced hepatocellular carcinoma model. *PLoS One* 8, e81065 (2013).

[63] Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, Gupta S,

Moore J, Wrobel MJ, Lerner J, Reich M, Chan JA, Glickman JN, Ikeda K, Hashimoto M, Watanabe G, Daidone MG, Roayaie S, Schwartz M, Thung S, Salvesen HB, Gabriel S, Mazzaferro V, Bruix J, Friedman SL, Kumada H, Llovet JM, Golub TR. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 359, 1995–2004 (2008).

[64] Chu JS, Ge FJ, Zhang B, Wang Y, Silvestris N, Liu LJ, Zhao CH, Lin L, Brunetti AE, Fu YL, Wang J, Paradiso A, Xu JM. Expression and prognostic value of VEGFR-2, PDGFR- β , and c-Met in advanced hepatocellular carcinoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 32, 16 (2013).

[65] Chen L, Shi Y, Jiang CY, Wei LX, Lv YL, Wang YL, Dai GH. Coexpression of PDGFR-alpha, PDGFR-beta and VEGF as a prognostic factor in patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J. Biol. Markers* 26, 108–116

[66] Xiang, Z.-L., Zeng, Z.-C., Fan, J., Tang, Z.-Y. & Zeng, H.-Y. Expression of connective tissue growth factor and interleukin-11 in intratumoral tissue is associated with poor survival after curative resection of hepatocellular carcinoma. *Mol. Biol. Rep.* 39, 6001–6 (2012).

[67] Zhao W, Liu H, Liu W, Wu Y, Chen W, Jiang B, Zhou Y, Xue R, Luo C, Wang L, Jiang JD, Liu J. Abnormal activation of the synuclein-gamma gene in hepatocellular

carcinomas by epigenetic alteration. *Int. J. Oncol.* 28, 1081–8 (2006).

[68] Bai DS, Dai Z, Zhou J, Liu YK, Qiu SJ, Tan CJ, Shi YH, Huang C, Wang Z, He YF, Fan J. Capn4 overexpression underlies tumor invasion and metastasis after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 49, 460–70 (2009).

[69] Liu T, Yu X, Li G, Yuan R, Wang Q, Tang P, Wu L, Liu X, Peng X, Shao J. Rock2 regulates Cdc25A through ubiquitin proteasome system in hepatocellular carcinoma cells. *Exp. Cell Res.* 318, 1994–2003 (2012).

[70] Ito Y, Sasaki Y, Horimoto M, Wada S, Tanaka Y, Kasahara A, Ueki T, Hirano T, Yamamoto H, Fujimoto J, Okamoto E, Hayashi N, Hori M. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 27, 951–8 (1998).

[71] Ahn, S., Hyeon, J. & Park, C.-K. Notch1 and Notch4 are markers for poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int* 12, 286–94 (2013).

[72] He G, Dhar D, Nakagawa H, Font-Burgada J, Ogata H, Jiang Y, Shalpour S, Seki E, Yost SE, Jepsen K, Frazer KA, Harismendy O, Hatziapostolou M, Iliopoulos D, Suetsugu A, Hoffman RM, Tateishi R, Koike K, Karin M. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling. *Cell* 155, 384–96 (2013).

[73] Schreck I, Al-Rawi M, Mingot JM, Scholl C, Diefenbacher ME, O'Donnell P, Bohmann D, Weiss C. c-Jun localizes to the nucleus independent of its phosphorylation by and interaction with JNK and vice versa promotes nuclear accumulation of JNK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 735–40 (2011).

[74] Wei, W., Jin, J., Schlisio, S., Harper, J. W. & Kaelin, W. G. The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer Cell* 8, 25–33 (2005).

[75] Miller, S. a, Mohn, S. E. & Weinmann, A. S. Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. *Mol. Cell* 40, 594–605 (2010).

[76] Zhao W, Li Q, Ayers S, Gu Y, Shi Z, Zhu Q, Chen Y, Wang HY, Wang RF. Jmjd3 inhibits reprogramming by upregulating expression of INK4a/Arf and targeting PHF20 for ubiquitination. *Cell* 152, 1037–50 (2013).

[77] Yamamoto S, Tateishi K, Kudo Y, Yamamoto K, Isagawa T, Nagae G, Nakatsuka T, Asaoka Y, Ijichi H, Hirata Y, Otsuka M, Ikenoue T, Aburatani H, Omata M, Koike K. Histone demethylase KDM4C regulates sphere formation by mediating the cross talk between Wnt and Notch pathways in colonic cancer cells. *Carcinogenesis* 34, 2380–8 (2013).

- [78] Masamichi Kojiro, Ian R. Wanless, Venancio Alves, Sunil Badve, Charles Bala-baud, Pierre Bedosa, Prithi Bhathal, Paulette Bioulac-Sage, Elizabeth M. Brunt, Alastair D. Burt, John R. Craig, Amar Dhillon, Linda Ferrell, Stephen A. Geller, Zackary D. Goodman, Annette S. H. Gouw, Maria Guido, Maha Guindi, Pro-dromos Hytioglou, Masayoshi Kage, Fukuo Kondo, Masutoshi Kudo, Gregory Y. Lauwers, Masayuki Nakano, Valerie Paradis, Young-Nyun Park, Alberto Quaglia, Massimo Roncalli, Tania Roskams, Boris Ruebner, Michiie Sakamoto, Romil Sax-ena, Neil D. Theise, Swan Thung, and Dina Taniakos. Pathologic diagnosis of early hepatocellular carcinoma: a report of the international consensus group for hepatocellular neoplasia. *Hepatology* 49, 658–64 (2009).
- [79] Torres DM, Harrison SA. Nonalcoholic steatohepatitis and noncirrhotic hepatocellular carcinoma: fertile soil. *Semin Liver Dis* 32: 30–38. (2012)
- [80] Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: a weighty connection. *Hepatology* 51: 1820–1832. (2010)
- [81] Kawada N, Imanaka K, Kawaguchi T, Tamai C, Ishihara R, Matsunaga T, Gotoh K, Yamada T, Tomita Y. Hepatocellular carcinoma arising from non-cirrhotic nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol* 44: 1190–1194. (2009)
- [82] Chagas AL, Kikuchi LO, Oliveira CP, Vezozzo DC, Mello ES, Oliveira AC, Cella

LC, Herman P, Bachella T, Caldwell SH, Alves VA, Carrilho FJ. Does hepatocellular carcinoma in non-alcoholic steatohepatitis exist in cirrhotic and non-cirrhotic patients?

Braz J Med Biol Res 42: 958–962. (2009)

[83] Ertle J, Dechêne A, Sowa JP, Penndorf V, Herzer K, Kaiser G, Schlaak JF, Gerken G,

Syn WK, Canbay A. Non-alcoholic fatty liver disease progresses to hepatocellular

carcinoma in the absence of apparent cirrhosis. *Int J Cancer* 128: 2436–2443. (2011)

[84] Paradis V, Zalinski S, Chelbi E, Guedj N, Degos F, Vilgrain V, Bedossa P, Belghiti J.

Hepatocellular carcinomas in patients with metabolic syndrome often develop without

significant liver fibrosis: a pathological analysis. *Hepatology* 49: 851–859. (2009)

[85] Takuma Y, Nouse K. Nonalcoholic steatohepatitis-associated hepatocellular

carcinoma: our case series and literature review. *World J Gastroenterol* 16: 1436–1441

(2010)

[86] Jang, J. J., Weghorst, C. M., Henneman, J. R., Devor, D. E. & Ward, J. M.

Progressive atypia in spontaneous and N-nitrosodiethylamine-induced hepatocellular

adenomas of C3H/HeNCr mice. *Carcinogenesis* 13, 1541–7 (1992).

[87] Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David JP, Rath M, Wagner EF. Liver tumor

development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell* 112, 181192

(2003).

- [88] Hui, L., Zatloukal, K., Scheuch, H., Stepniak, E. & Wagner, E. F. Proliferation of human HCC cells and chemically induced mouse liver cancers requires JNK1-dependent p21 downregulation. *J. Clin. Invest.* 118, 3943–53 (2008).
- [89] Hui L, Bakiri L, Mairhorfer A, Schweifer N, Haslinger C, Kenner L, Komnenovic V, Scheuch H, Beug H, Wagner EF. p38alpha suppresses normal and cancer cell proliferation by antagonizing the JNK-c-Jun pathway. *Nat. Genet.* 39, 741–9 (2007).
- [90] Das, M., Garlick, D. S., Greiner, D. L. & Davis, R. J. The role of JNK in the development of hepatocellular carcinoma. *Genes Dev.* 25, 634–45 (2011).
- [91] Ding X, Pan H, Li J, Zhong Q, Chen X, Dry SM, Wang CY. Epigenetic activation of AP1 promotes squamous cell carcinoma metastasis. *Sci. Signal.* 6, ra28.1–13, S0–15 (2013).
- [92] Lively, T. N., Ferguson, H. A., Galasinski, S. K., Seto, A. G. & Goodrich, J. A. c-Jun binds the N terminus of Human TAFII250 to derepress RNA polymerase II transcription in vitro. *J. Biol. Chem.* 276, 25582–25588 (2001).
- [93] Franklin, C. C., McCulloch, A. V. & Kraft, A. S. In vitro association between the Jun protein family and the general transcription factors, TBP and TFIIB. *Biochem. J.* 305, 967–974 (1995).
- [94] Karin, M., Liu, Z. G. & Zandi, E. AP1 function and regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.*

9, 240–246 (1997).

[95] Weiss C, Schneider S, Wagner EF, Zhang X, Seto E, Bohmann D. JNK phosphorylation relieves HDAC3-dependent suppression of the transcriptional activity of c-Jun. *EMBO J.* 22, 3686–3695 (2003).

[96] Zöller, M. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* 11, 254–67 (2011).

[97] Ii, M., Yamamoto, H., Adachi, Y., Maruyama, Y. & Shinomura, Y. Role of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin) in human cancer invasion, apoptosis, growth, and angiogenesis. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 231, 20–7 (2006).

[98] Marciniak SJ, Yun CY, Ouyang S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 18, 3066–77 (2004).

[99] Yamaguchi, H. & Wang, H.-G. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 279, 45495–502 (2004).

[100] Demoulin, J.-B. & Essagher, A. PDGF receptor signaling networks in normal and cancer cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 25, 273–83 (2014). [Epub ahead of print]

[101] Wei T, Zhang LN2, Lv Y3, Ma XY2, Zhi L4, Liu C3, Ma F3, Zhang XF3.

Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha promotes tumor progression and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget* (2014).

[102] Slaughter, D. P., Southwick, H. W. & Smejkal, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6, 963–8 (1953).

[103] Utsunomiya, T., Shimada, M., Morine, Y., Tajima, A. & Imoto, I. Specific molecular signatures of non-tumor liver tissue may predict a risk of hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci.* 105, 749–54 (2014).

[104] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Häussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D, Bruix J; SHARP Investigators Study Group. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N. Engl. J. Med.* 359, 378–90 (2008).

[105] Cheng AL, Kang YK, Chen Z, Tsao CJ, Qin S, Kim JS, Luo R, Feng J, Ye S, Yang TS, Xu J, Sun Y, Liang H, Liu J, Wang J, Tak WY, Pan H, Burock K, Zou J, Voliotis D, Guan Z. Efficacy and safety of sorafenib in patients in the Asia-Pacific region with advanced hepatocellular carcinoma: a phase III randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Oncol.* 10, 25–34 (2009).

謝辞

本論文の作成にあたり懇切なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科 消化器内科学 小池和彦教授に謹んで御礼申し上げます。

本研究の遂行に当たりましては、以下の先生方に特に多大なるご協力を賜りましたことをここに記し、深く感謝申し上げます。

東京大学 消化器内科

立石敬介先生、工藤洋太郎先生、田中康雄先生、伊地知秀明先生、

大塚基之先生、平田喜裕先生、浅岡良成先生、中川勇人先生

山本恵介先生、坪内光子氏

理化学研究所 眞貝細胞記憶研究室

眞貝洋一先生

その他、様々な点でご協力頂いた東京大学消化器内科の先生方に感謝いたします。