

論文の内容の要旨

論文題目 肝腫瘍発生におけるヒストン脱メチル化酵素 KDM3A の役割

氏名 中塚 拓馬

<研究の背景および目的>

近年、生活習慣の変化などにより非アルコール性肝疾患 (NAFLD) からの肝発癌が増加してきている。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) を用いて、PI3K シグナルが肝脂肪蓄積からの肝腫瘍形成において重要であるということを示した。

一方で、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いる。我々はその中でも特にヒストン脱メチル化酵素 KDM3A に注目した。一般に KDM3A は H3K9 を脱メチル化することでクロマチン構造を緩め、転写を促進する機能を持つ。KDM3A は様々な癌種において腫瘍促進的に働いていることが確認されてきているが、肝癌における役割はまだ不明な点が多い。

そこで本研究では上述のマウスモデルを用いて、KDM3A が特に PI3K シグナル活性を背景とする肝腫瘍形成に及ぼす影響を検討することにした。

<方法>

Pik3ca Tg マウスを肝腫瘍形成モデルとして用い、*Kdm3a* ノックアウトマウスと交配した。*Pik3ca* Tg マウスは著明な脂肪肝を呈し、約 1 年の経過で腫瘍形成をきたすことが分かっていたため、52 週齢でマウスを屠殺し KDM3A 欠損が腫瘍形成に与える影響を検討した。また腫瘍形成前のマウス肝臓組織を用いて以下の項目について解析を行った。肝脂肪および脂肪酸蓄積の程度を比較し、定量的リアルタイム PCR 法で脂肪酸代謝関連遺伝子の発現を確認した。また、ウエスタンブロット法にて PI3K/Akt シグナル活性の程度を比較した。さらに cDNA マイクロアレイにより遺伝子発現の変化を網羅的に解析し、腫瘍形成に寄与する KDM3A 依存性遺伝子を検索し、定量的リアルタイム PCR 法で検証した。クロマチン免疫沈降法で、KDM3A が標的とする遺伝子の発現調整をどのように行っているか検討した。また抽出した KDM3A の標的遺伝子が肝腫瘍発生に及ぼす影響につきスフィア形成アッセイにて確認した。最後にヒトの肝腫瘍針生検検体を用いた免疫染色で、マウスモデルで観察された事象のヒトにおける意義につき検討した。

<結果>

Pik3ca Tg マウスで見られた肝腫瘍形成は KDM3A ノックアウトにより著明に抑制された。両マウスに形成された腫瘍には明らかな病理組織学的差異はなく、腫瘍のサイズにも違いは見られなかった。腫瘍発生数のみが減少していたことや腫瘍部における KDM3A の発現レベルが非腫瘍部に比較して高くないことなどから、KDM3A は腫瘍発生に至るまでの過程で重要と考えた。

次に腫瘍形成前の肝臓について解析を行った。KDM3A の有無で Akt のリン酸化レベルに差は見られず、脂肪沈着および脂肪酸蓄積の程度についても差が見られなかった。脂肪酸代謝関連遺伝子の発現を定量的リアルタイム PCR 法で評価したが、いずれも差が見られなかった。これらの結果から KDM3A は PI3K シグナル活性と脂肪酸蓄積のいずれにも影響せず、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。

KDM3A が転写促進的に働くことを考慮し、肝腫瘍促進的に働く遺伝子の発現が KDM3A 欠損の結果低下した可能性があるかと予想した。そこで腫瘍形成前のマウス肝臓を用いて cDNA マイクロアレイで遺伝子発現状態を比較した。KDM3A 欠損により発現が低下した遺伝子は全体の約 4.5%程度であった。さらに GSEA の手法を用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ところ、転写因子 Activator protein-1 (AP-1) の標的遺伝子群の発現が低下している傾向がみられた。AP-1 およびその主要構成因子である c-Jun は肝腫瘍形成の中心的な役割を担っており、特に腫瘍形成の早期に重要と言われていることもあり、この転写因子に着目して解析を進めることにした。

cDNA マイクロアレイの結果を定量的リアルタイム PCR 法にて検証した。転写開始点近傍に AP-1 結合部位を有し、かつ肝腫瘍形成に関連する遺伝子に関してそれぞれのマウスにおいて発現量を比較したところ、*CyclinD1*、*CD44*、*Chop*、*Mmp7*、*Pdgfrb*、*IL-11* は *Pik3ca* Tg マウスで発現上昇し、KDM3A をノックアウトすると発現低下する傾向が見られた。これら遺伝子は KDM3A 依存的に発現している可能性が考えられた。

また、PI3K シグナル活性と c-Jun/AP-1 活性の関連につき検討した。マウス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用いて検討したところ *Pik3ca* 安定発現株では Akt のリン酸化レベル上昇とともに c-Jun の発現上昇が見られた。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唆された。次に *Pik3ca* Tg マウス肝における c-Jun 活性について、肝由来のタンパクを用いたイムノブロット法および病理組織標本を用いた免疫染色で検討した。正常マウス肝では c-Jun は全く発現しないが、*Pik3ca* Tg マウス肝では c-Jun の発現及びリン酸化が見られた。さらに肝細胞核内において c-Jun が強く染色されており 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 KDM3A をノックアウトしてもマウス肝において c-Jun の活性化が見られていた。これらの結果から KDM3A は c-Jun 活性に影響せず AP-1 下流の遺伝子発現を調整していると考えられた。さらに *in vitro* の系で 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も検討を加えたところ、PI3K/Akt

シグナルにより GSK3- β が不活化され、c-Jun のプロテアソーム分解が抑制されるという機序と、パルミチン酸刺激により c-Jun 発現が促進されるという機序の両方が影響している可能性が考えられた。

次に、AP-1 標的遺伝子が KDM3A によりどのように転写制御されているか検討した。クロマチン免疫沈降により AP-1 結合領域の H3K9 メチル化状態を確認したところ、KDM3A ノックアウトによるメチル化状態の回復は見られなかったため、KDM3A による AP-1 標的遺伝子の発現制御は脱メチル化活性非依存的であることが示唆された。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序で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ため、次に c-Jun の AP-1 結合領域への結合状態を確認した。その結果、*Pik3ca* Tg マウスにおいて *CD44*、*Chop*、*Mmp7*、*Pdgfrb* の 4 つの遺伝子の AP-1 結合部位には c-Jun の結合が見られたが、KDM3A をノックアウトした状態では c-Jun の結合が見られなくなった。すなわち、KDM3A は脱メチル化活性とは独立した機序で c-Jun のリクルートを促進し、AP-1 標的遺伝子 *CD44*、*Chop*、*Mmp7*、*Pdgfrb* の発現を調整していると考えられた。

これら AP-1 標的遺伝子が肝腫瘍形成に及ぼす影響に関して、ヒト肝癌細胞株を用いたスフィア形成アッセイで評価した。HLE、SK-Hep-1 の 2 種類の細胞株で、*CD44*、*Chop*、*Pdgfrb* のノックダウン株を作成したところ、*CD44*、*Chop* ノックダウン株ではスフィア形成が減少した。このことから少なくとも *CD44*、*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。

最後にマウスモデルを用いて得られた上記の結果がヒトにおいても通用するか検証した。ヒトの肝癌前駆病変である肝異型結節のサンプルを用いて c-Jun、KDM3A、p-AKT に対する免疫染色を行ったところ、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。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 ($p = 0.0022$)、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。

<考察>

本研究の検討から、ヒストン脱メチル化酵素 KDM3A は PI3K/Akt シグナルの活性化を背景とした肝臓において c-Jun/AP-1 の転写活性の制御を介して肝腫瘍発生に促進的に働いていることが分かった。KDM3A は様々な癌で関与が認められているが、これまでの報告で知られているのはいずれも進行した癌の増殖や浸潤、転移における KDM3A の機能であり、本研究により KDM3A はさらに早期の段階で腫瘍発生に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。代謝異常により蓄積する遺伝子発現の変化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、治療標的となる可能性が示唆された。