

# エネルギー代謝システムとしてのヒストンメチル化制御の分子基盤

東京大学大学院 医学系研究科 消化器内科

立石 敬介

## 1. 背景

エピジェネティクスによる転写制御としては、DNA のメチル化修飾と、ヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などの翻訳後修飾が大きな役割をもつ。2004 年に LSD1 が H3K4me1,2 に対する脱メチル化活性をもつことが示され、2006 年に Tsukada らにより JmJc ドメインがヒストン脱メチル化活性を司ることが初めて発見された。これらのブレークスルーによりヒストン修飾機構がいずれも可逆性を有することが明らかとなった。同時にこれはいわばヒストンの修飾状態が細胞核内において合目的的にそして動的に制御されている可能性を示唆するものであった。こうした多様なヒストン修飾の変化により紡ぎ出される遺伝子発現の変化が、複雑な生体機能への適応を可能とする一手段なのであろうと推察される。逆にいえば、ヒストン修飾機構の破綻は生体内において様々な病態を引き起こす可能性があるのかもしれない。一方で肥満や糖尿病などの生活習慣病における各種病態においては、それを左右する鍵遺伝子がいくつも同定されてきている。ただしそれらの遺伝子群のエピジェネティクスな転写制御が病態にどう関わるか、あるいは正常においてその制御がいかにコントロールされているかについては、まだ不明な点が多い。また最近ではヒストン修飾機序の異常と悪性腫瘍とのかわりが報告され始め、新たな抗腫瘍標的としてヒストン修飾酵素群の重要性の認識が高まりつつある。

今回申請者はエネルギー代謝調節の破たんが関与する病態の一つである、非アルコール性肝脂肪性疾患を背景とする肝炎進展、腫瘍発生に焦点を当て、いわゆる NASH 発癌の自然史においてヒストン修飾系が及ぼす影響を検討することを目的に研究を進めてきた。非アルコール性脂肪肝、脂肪性肝炎 (NASH) は食事の西洋化と共に増加しつつあり、経過中、肝細胞癌の発生母地となることが知られている。この肝への脂肪蓄積から起因する病態をエピジェネティクス制御異常から検討するという試みは、最近の申請者の報告に基づいている。申請者はヒストンのメチル化制御に重要な酵素をコードする遺伝子 *Jhdm2a* を欠損するマウスを作成し、そのマウスが脂肪肝を含めたメタボリックシンドロームと同様の表現型を示すことを報告した。そしてヒストンのメチル化を含めたエピジェネティクス制御が生体内での脂質代謝系遺伝子の発現に重要であることを明らかにした。一方で最近では様々な脂肪酸が単なる脂質の代謝産物としてではなく、細胞内で様々なシグナル伝達に寄与していることが明らかになってきた。今回の研究では、申請者らが作成した非アルコール性脂肪肝から肝細胞がんを発症するマウスモデルを用いて、その病態に影響を及ぼす因子を検討、とくに肝腫瘍発生に対する脂肪酸組成の影響とその下流のヒストン修飾系の関与について検討を行った。

## 2. 方法

### a. *PIK3CA* トランスジェニックマウスの作成

PI3K シグナリングの異常が代謝や腫瘍形成に関与していると報告されているが、とくに肝臓においても PI3K シグナリングの活性分子である *PIK3CA* の変異が肝がんにて報告されている。しかしながら PI3K シグナリングの異常が *In vivo* の肝臓において腫瘍を発生させるメカニズム、およびそれに関する因子については必ずしも明らかとは言えない。そこで申請者らは変異型 *PIK3CA* を肝臓特異的に恒常的に過剰発現するトランスジェニック (TG) マウスを作製した。

#### b. *PIK3CA* トランスジェニックマウスの解析

肝組織所見、血清 ALT 値、肝組織トリグリセライド濃度、肝組織中脂肪酸濃度を野生型と比較した。肝組織及び腫瘍部の各種遺伝子発現も real time RT-PCR で評価した。*in vitro* での腫瘍形成能の評価法として正常肝細胞による colony formation assay の解析も行った。

#### c. 組織中の脂肪酸定量および脂肪酸分画組成の測定

ガスクロマトグラフィー法を用い、肝腫瘍部と非腫瘍部との脂肪酸を測定した。

### 3. 結果

#### a. *PIK3CA* トランスジェニックマウスの肝における脂肪代謝異常

本マウスは通常食でも 4 週から脂肪肝を呈し (図 1 左)、肝トリグリセライドの高値を示した。その TG 肝において脂肪合成にかかわる *Pparg* とその下流分子の発現上昇を認めたことから、この脂肪肝は *Pparg* シグナリングの亢進による肝脂肪合成の増加が寄与していることが示唆された。

#### b. *PIK3CA* トランスジェニックマウスの肝腫瘍形成

TG マウスは生後一年で 90%以上のマウスに肝腫瘍が発生、そのうち 10%の腫瘍が肝細胞がんに至るといふ表現型を呈した (図 1 右)。このマウスの肝腫瘍組織と非腫瘍部での PI3K シグナリングの活性化を比較すると、腫瘍部においてより強いシグナリングの活性化がみられていた。また遺伝子発現を比較すると *Pten*, *Xpo4*, *Dlc1* などの肝臓における腫瘍抑制遺伝子の発現低下が認められた。この PTEN の発現低下が腫瘍部にて見られた PI3K のより強い活性化に寄与している可能性が考えられた。またこれらのがん抑制遺伝子の発現低下がこのマウスにおける肝腫瘍発生の一因である可能性が示唆された。

#### c. *PIK3CA* トランスジェニックマウスの肝腫瘍における脂肪酸組成異常

一方で腫瘍部と非腫瘍部の脂肪酸含有量を比較したところ、明らかに腫瘍での総脂肪酸濃度が増加していた。さらには分画組成を比較したところ、腫瘍部において有意にオレイン酸 (OA) など一価の不飽和脂肪酸群の一部が増加していることが明らかとなった (図 2)。これらの脂肪酸プロファイルが肝腫瘍発生に及ぼす影響を *In vitro* の実験にて検討した。面白いことに *In vitro* の *PIK3CA* の過剰発現では上記の腫瘍抑制遺伝子の発現低下は見られなかった。一方、腫瘍部で増加していた脂肪酸のうち、オレイン酸 (OA) の投与にて腫瘍抑制遺伝子群の発現低下が誘導された (図 3)。そればかりでなく、オレイン酸添加によりコロニー形成能が肝細胞において誘導されることを見出した。これらの知見は、オレイン酸のような脂肪酸が、がん抑制遺伝子の発現に影響し、ひいては肝細胞の腫瘍形成に促進的に働きうることを示唆するものであった。次にオレイン酸によるがん抑制遺伝子の発現調節にヒストン修飾変化が関与しているかどうかを検討した。*In vitro* でのオレイン酸投与 (UFA) によるいくつかのがん抑制遺伝子の発現低下は、ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である TSA および、ヒストン H3K9 のメチル化酵素である G9a の阻害剤である BIX01294 の投与においてその発現が回復することが明らかとなった (図 4)。

#### 4. 考察

オレイン酸によるがん抑制遺伝子の発現調節においてヒストン脱アセチル化および、ヒストン H3K9 のメチル化などが関与していることを示唆していた。PI3K シグナルの異常亢進に伴う脂肪肝からの腫瘍形成には脂肪酸およびヒストン修飾変化などの二次的な要因が重要であることが示唆された。今後は脂肪酸からヒストン修飾変化に至るシグナル経路、分子メカニズムについても検討を進めたい。なお本研究成果は論文として現在投稿中である。

#### 謝辞

本研究にあたり、アステラス病態代謝研究会による研究助成を賜りましたことを深謝申し上げます

図 1



図 2

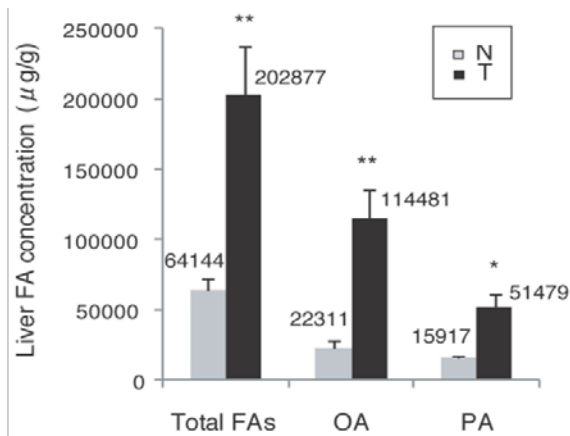


図 3

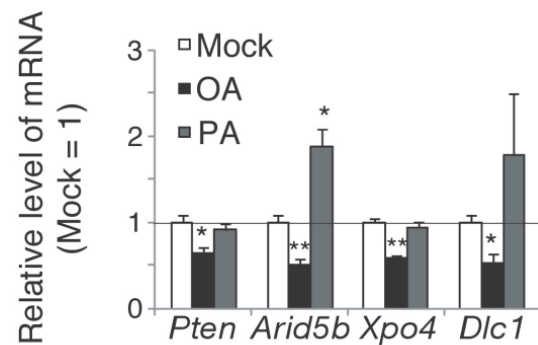


図 4

