

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Heterogeneity of Epigenetic and Epithelial Mesenchymal Transition Marks in Hepatocellular Carcinoma with Keratin 19 Proficiency

(ケラチン 19 陽性肝細胞癌におけるエピジェネティックマーカーおよび上皮間葉転換マーカーの特異性)

横道直佑、西田直生志、榎田祐三、谷口文崇、安井和也、戸嶋俊明、母里淑子、入谷光洋、田中健大、山田岳史、山口佳之、八木孝仁、藤原俊義、Ajay Goel、工藤正俊、永坂岳司

Liver Cancer (掲載予定)

平成 29 年 9 月 The 42th European Society for Medical Oncology Congress 2018 に発表
平成 26 年 9 月 The 39th European Society for Medical Oncology Congress 2014 に発表
平成 26 年 4 月 第 114 回日本外科学会定期学術集會に発表
平成 25 年 9 月 第 72 回日本癌学会学術総會に発表
平成 25 年 5 月 Digestive Disease Week 2013 に発表
平成 25 年 4 月 第 113 回日本外科学会定期学術集會に発表

主 論 文

Heterogeneity of Epigenetic and Epithelial Mesenchymal Transition Marks in Hepatocellular Carcinoma with Keratin 19 Proficiency

(ケラチン 19 陽性肝細胞癌におけるエピジェネティックマーカーおよび上皮間葉転換マーカーの特異性)

【緒言】

肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma: HCC)は全世界で 6 番目に多い悪性新生物であり、がんによる死亡原因の第 3 位である[1-3]。肝切除術や肝移植術が早期の HCC に対する唯一の治癒治療であるが、再発・転移率が高いため根治術後の予後が悪くなる[2]。

ケラチン 19(K19)は胆管細胞や hepatic progenitor cell のマーカーである。K19 を発現する HCC は幹細胞関連の特徴や EMT の特徴を有し、K19 が HCC の予後予測因子である可能性が指摘されている[4-8]。さらには、K19 陽性 HCC は脈管浸潤や低分化型癌、切除やラジオ波焼灼術や肝移植後の再発と関連することが報告されている[9]。しかしその一方で、K19 陽性 HCC の発生や分化、臨床病理学的特徴は十分明らかになっていない。K19 陽性 HCC が progenitor cell マーカーを発現することや浸潤能を有すること、化学療法抵抗性を示すことから、hepatic progenitor cell から発生するのではないかとする報告がある[6, 9-11]。それに対して、HCC における K19 発現は持続的な突然変異誘発を通して起こる悪性肝細胞の脱分化だとする報告もある[12-14]。さらには、肝再生に関する研究において、K19 陽性 HCC を含めて原発性肝癌の細胞起源を同定するのは困難だったという報告がある[15-16]。

肝癌化メカニズムが明らかではない一方で、HCC には染色体変異や遺伝子増幅、突然変異などのジェネティックな異常や、エピジェネティックな変化があることは広く受け入れられている[17]。例えば、癌抑制遺伝子における DNA メチル化レベルの上昇は HCC の発生や進行と関連する[18,19]。HCC における癌抑制遺伝子はゲノムワイドメチル化解析によって同定されている[20]。その中、17 番染色体上の K19 をコードする遺伝子 (*KRT19*) にはプロモーター領域に CpG アイランドが存在することが分かっているが[21,22]、今日までに悪性腫瘍における *KRT19* プロモーターメチル化に関する報告はない。HCC における K19 発現の制御機構は解明されていないが、プロモーターCpG アイランドが存在することから DNA メチル化が HCC のエピジェネティックプロセスとして働いている可能性がある。

本研究では、細胞株と臨床サンプルを用いて、エピジェネティックな変化を解析することで、K19 陽性 HCC の特徴を明らかにする。まず、K19 陽性 HCC 細胞株を用いて、エピジェネティックな変化を調べる。次に、HCC を切除した 564 症例を用いて、*KRT19* プロモーター領域や *LINE-1* のメチル化を解析し、EMT マーカー、胆管細胞マーカー、肝細胞マーカーと比較することで、K19 陽性 HCC の臨床病理学的特徴を明らかにする。

K19 陽性 HCC の特徴を明らかにすることは新規治療標的や新薬の開発、HCC の生存改善に寄与する可能性がある。

【材料と方法】

対象患者

2000年から2010年に岡山大学病院で肝切除術を施行されたHCC患者を対象とした。混合型肝癌、再発HCC、主要血管浸潤、破裂／他臓器浸潤、肝移植症例、肝動脈化学塞栓療法などの術前療法を受けた症例は除外した。

細胞株

K19陽性HCCの細胞株として、HepG2、HuH7、PLC/PRF/5を用いた。K19陰性HCCの細胞株として、HLE、HLFを用いた。K19陽性コントロールとして大腸癌細胞株HT29を用いた。

免疫組織学的染色

切除肝標本のパラフィン切片を用いて免疫組織学的染色法 (immunohistochemistry: IHC) を行った。脱パラフィンと内因性ペルオキシダーゼのブロック後に、マイクロウェーブによる抗体除去を行った。K19の他に胆管細胞マーカー (K7、NOTCH-1)、肝細胞マーカー (HepPar-1、arginase-1)、EMTマーカー (E-cadherin、vimentin) の染色を行った。K19、K7、NOTCH-1、vimentinは5%以上の染色で陽性と判断した。HepPar-1、arginase-1、E-cadherinは51%以上の染色で陽性と判断した。

Western blotting

細胞株におけるK19タンパクの発現をWestern Blottingで調べた。

DNA抽出とバイサルファイト処理

細胞株および切除標本のパラフィン包埋切片からそれぞれDNAを抽出し、およそ1 μ gのDNAをバイサルファイト処理した。

Bisulfite sequencing

*KRT19*のプロモーターのPCR産物を増幅してバイサルファイトDNAクローニングを行い、DNAシーケンシングを行った。

*KRT19*および*LINE-1*のDNAメチル化解析

肝細胞癌腫瘍部およびその背景肝、細胞株において、*KRT19*および*LINE-1*遺伝子のプロモーターCpGアイランドの定量的メチル化解析を行った。バイサルファイト処理したDNAテンプレートを用いて、fluorescence high-sensitive assay法 (Hi-SA法) で解析した。*HhaI* (New England BioLabs, Massachusetts, USA) で制限酵素処理した蛍光標識PCR産物を、ABI 310-Avant NA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) で解析した。*KRT19*プロモーターの異なる2か所を、region1、region2として解析した。メチル化バンドと非メチル化バンドの長さの比からメチル化レベルを求めた。

また、cBioportal for cancer genomics (<http://www.cbioportal.org/>) のデータを用いて HCC における *KRT19* のメチル化と K19 発現の相関を調べた。

脱メチル化およびヒストン脱アセチル化酵素阻害

HCC 細胞株(HLF, HLE, PLC/PRF/5, HepG2, HuH7)を 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dC) およびトリコスタチン A (TSA) で処理した。細胞株から DNA と RNA を抽出し、メチル化と RNA 発現のステータスをマイクロアレイで解析した。

統計学的手法

全ての統計解析は JMP (version 10.0; SAS Institute, Inc, Cary, NC) を用いて行った。

まず、K19 発現と臨床病理学的特徴を Fisher 正確検定で比較した。次に、K19 のメチル化レベルは連続変数としても名義変数(メチル化レベル 10%以上で陽性)としても解析した。*LINE-1* のメチル化は 55%以上で hypermethylation、55%未満で hypomethylation とした。名義変数は、Fisher の正確検定を用いて比較した。連続変数の差は、ANOVA で解析した。連続変数の相関はノンパラメトリックに解析した(Spearman's correlation coefficient [ρ])。全生存期間は手術日から死亡か打ち切り患者の最終受診日を基に計算した。無再発生存期間は手術日から、6 か月毎に定期的に行われる CT/MRI 検査によって同定され、局所、領域、遠隔部位での再発、または二次病変が最初に確認された日を基に計算した。同様に遠隔転移無再発生存期間を、遠隔転移再発が最初に確認された日を基に計算した。全生存期間、無再発生存期間、肝外転移無再発生存期間は Kaplan-Meier 法を用いて解析した。次いで、Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行った。全ての p 値は両側で検定し、0.05 以下の時、統計学的有意差があるものと見なした。

【結果】

HCC 細胞株における KRT プロモーターメチル化と K19 発現の関連

バイサルファイトシークエンシングの結果、K19 陰性 HCC の HLF では *KRT19* プロモーター全領域に密なメチル化を認めた。それに対して、K19 陽性 HCC の HuH7 ではメチル化を認めなかった(Figure 1b)。また、定量的 DNA メチル化解析において、K19 陰性 HCC 細胞株 (HLE、HLF) では *KRT19* プロモーターは高率にメチル化されていた。一方 K19 陽性 HCC 細胞株 (HepG2、HuH7) では *KRT19* プロモーターのメチル化はほとんど認めなかった(Figure 1c)。 *KRT19* プロモーターメチル化は K19 タンパク発現と有意な逆相関を示した($p=0.0014$)。 K19 陰性 HCC 細胞株 (HLE,HLF) を 5'-Aza-dC および TSA で処理すると、*KRT19*-RNA の発現が回復した(Figure 1d)。 K19 発現にはプロモーターメチル化だけではなく、ヒストン修飾も関与している可能性が示唆された。

LINE-1 retrotransposons に存在する CpG のメチル化を定量し、全ゲノムにおけるメチル化レベルの解析を行った。K19 陽性細胞では陰性細胞に比べて *LINE-1* メチル化レベルが高かったが、有意差はなかった (36.5% vs 26.8%, $p=0.6$, Figure 1b)。

K19 陽性 HCC 患者の臨床病理学的特徴

564 例中、除外例を除いた 125 例を解析したところ、29 例 (23.2%) が K19 陽性を示した。K19 陽性 HCC 患者は K19 陰性 HCC 患者に比べて、若年、女性に多く、血清 AFP が高く、微小血管浸潤が多かった (それぞれ $p=0.020, 0.027, 0.021, 0.019$, Figure 3a and Table 1)。TNM ステージやサイズ、個数、分化度とは関連を見出せなかった。また、K19 陽性 HCC 患者は K19 陰性 HCC 患者に比べて、有意に全生存期間や肝外転移無再発期間が短かった (それぞれ $p=0.025, 0.017$, Figure 3b-d)。多変量解析では、K19 発現は独立した予後予測因子であった (Table 2)。

パラフィン包埋切片における KRT プロモーターメチル化とタンパク発現の関連

KRT19 Region1 では、K19 陽性 HCC は K19 陰性 HCC に比べ有意にメチル化レベルが低かった (2.3% vs 8.7%, $p=0.0315$)。Region2 でも同様の結果であった (2.7% vs 15.7%, $p=0.0228$)。背景肝のメチル化レベルが 4.3 - 8.3% であることから、メチル化の陽性カットオフを 10% と定めたと、*KRT19* プロモーターのメチル化は 125 例中、Region1 で 20 例 (16.0%)、Region2 で 28 例 (22.4%) であった。Region1 メチル化の 20 例はすべて、K19 陰性 HCC であった。また、K19 陽性の 29 例はすべて、Region1 非メチル化であった ($p=0.0038$, Figure 4a)。Region2 でも同様の傾向が認められた ($p=0.12$, Figure 4b)。

cBioportal for cancer genomics にあるデータを引用し、442 の HCC の *KRT19* のメチル化と K19 発現について調べたところ、K19 陽性 HCC のほとんどは *KRT19* プロモーター領域の CpG は低メチル化を示していた。

以上、K19 発現にはプロモーターのメチル化が関与している可能性が示唆された。

K19 陽性 HCC における LINE-1 メチル化と KRT19 プロモーターメチル化の関連

LINE-1 メチル化レベルの平均は 54.8% であった。55% 以上を高メチル化、55% 未満を低メチル化と定義したところ、*LINE-1* 高メチル化は K19 陰性 HCC に比べ、K19 陽性 HCC で有意に多く観察された ($p=0.0079$, Figure 4c)。

ゲノムワイドなメチル化レベルと *KRT19* プロモーターメチル化レベルの関連を解析するために、*LINE-1*、*KRT19* プロモーターの Region1、Region2 の多変量相関を行った (Figure 4d, e)。K19 発現ステータスによらず、Region1 と Region2 は正相関した。K19 陽性 HCC では、*LINE-1* メチル化レベルと *KRT19* プロモーターメチル化レベルが逆相関した。

K19 陽性 HCC における EMT マーカー、肝細胞/胆管細胞マーカーの発現

K19 陽性 HCC では E-cadherin 喪失 ($p=0.043$) や vimentin 発現 ($p=0.084$) という EMT の特徴を認めた (Table 3)。K19 陽性 HCC では肝細胞マーカー (HepPar-1、arginase-1) の発現例が減少したが、すべてどちらか一方は陽性だった。多変量相関では、K19 陰性 HCC は肝細胞マーカーは vimentin や NOTCH-1 と逆相関した (Figure 5)。対して、K19 陽性 HCC では、E-cadherin 発現が減少し K7 発現が増加した一方で、HepPar-1 と arginase-1 は正相関しており、肝細胞の特徴が保存されていることを示唆した。

【考察】

HCCにおいてK19発現が生物学的に重要であるということ、*KRT19*プロモーターのメチル化や、*LINE-1*のメチル化、EMTに関連付けて示した。In vitro および臨床サンプルにおいて、K19陰性HCCはK19陽性HCCに比べて*KRT19*プロモーターのメチル化が高頻度であったことから、K19発現が*KRT19*プロモーターのメチル化によって制御されている可能性が示唆された。脱メチル化に加えヒストンアセチル化酵素阻害を行うことで*KRT19*メッセンジャーRNAの発現が回復したことから、*KRT19*発現の制御にはメチル化だけでなくヒストン修飾も含めたエピジェネティックな機序が関与していると考えられる。

これまでに報告されているように[4-8]、K19はHCCにおける予後不良マーカーであることが示された。特筆すべきことに、今回我々は、肝切除症例564例から、予後を解析する上でバイアスとなりえる主要血管浸潤、再発、術前TACE療法を除外して、臨床病理学的にできる限りhomogeneousな125例を対象として解析した。29例(23.2%)がK19陽性を示した。K19陽性HCC患者はK19陰性HCC患者に比べて、若年、女性に多く、血清AFPが高く、微小血管浸潤が多かった。

K19陽性HCCはE-cadherin喪失とvimentin発現というEMTの特徴を示したが、この結果はこれまでの報告に合致する[5]。EMTは癌の浸潤や転移における重要な機序であると考えられている[31,32]。このEMTの仮説に合致して、K19陽性HCCは予後が悪く、肝外転移を起こしやすいという結果がえられた。

原発性肝癌は一般的に、HCC、胆管細胞癌、混合型肝癌、肝芽腫、fibrolamellar hepatocellular carcinomaに分類される。このうち通常K19が発現するのは胆管細胞癌と混合型肝癌であるが、それらの細胞起源や分化は十分に解明されていない。近年、マウスを使った肝細胞のfate tracingで、胆管細胞癌が、完全に分化した肝細胞からNOTCHシグナルの活性化を通して発生する可能性が示されている[35, 36]。混合型肝癌は、古典的には一つの腫瘍内に典型的なHCCと胆管細胞癌が混在するものとされるが、最新のWHO分類では幹細胞性を有するサブタイプが提唱されているように[37]、混合型肝癌には形状では分類不能な複数のサブタイプが混在している可能性がある。このように、原発性肝癌の発生は複雑で、臨床病理学的分類は必ずしもその細胞起源を反映していない。同様に、K19陽性HCCが、肝細胞やHCCからの分化なのか、幹細胞の発癌なのかは明らかではない。

KawaiらはK19陽性HCCがEMTの特徴やTGFβ/Smadシグナルカスケードの活性化などの癌幹細胞の特徴を有することを示した[38]。ZhangらはCD133がHCCにおける幹細胞マーカーであり、CD133陽性HCCが全DNAメチル化マーカーである*LINE-1*の低メチル化を示したことを報告している[39]。そこで今回我々は、K19陽性HCCと*LINE-1*メチル化の関連を調べた。特筆すべきことに、K19陽性HCCは*LINE-1*の高メチル化を示した。この結果はin vitroでK19陽性細胞株が*LINE-1*メチル化レベルが高かったことで裏付けられる(Figure 1b)。Kimらの報告によるとCD133とK19療法陽性のHCCは1.5%のみなので、K19陽性HCCはCD133陽性HCCとは一致せず、*LINE-1*メチル化レベルも違うと考えるのが妥当である。

免疫染色の結果において、K19 の発現に関わらず、NOTCH-1 と肝細胞マーカーは逆相関した。K19 陽性 HCC は EMT や胆管細胞系の特徴が増え、肝細胞マーカー発現例が減っていたものの、肝細胞の特徴を強く保存していた。

【結論】

今回の試験には、解析した臨床サンプルが単施設の後ろ向きコホートである等様々な限界があるが、K19 陽性 HCC に関し、以下の新しい知見を提供した。EMT の特徴を有すること、*KRT19* プロモーターのメチル化濃度が低下していること、ゲノムワイド DNA メチル化は亢進していることを示した。これらに加えて、*in vitro* に、HCC における K19 の発現はメチル化やヒストン修飾によって制御されている可能性を示した。臨床データによって、HCC において K19 発現を調べることは肝外転移や予後を予測するのに役立つということのみならず、K19 陽性 HCC がエピジェネティックな再プログラミングによって肝細胞や HCC から発生している可能性があるということを示唆した。以上、今回今回の研究により得られた知見は HCC 発生の複雑性に関する新たな洞察をもたらした。