

氏名	水野諭良
(ふりがな)	(みずの ゆたか)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲第 号
学位審査年月日	平成30年7月18日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Expression of delta-like 3 is down-regulated by aberrant DNA methylation and histone modification in hepatocellular carcinoma (肝細胞癌において delta-like 3 の発現は、異常な DNA メチル化やヒストン修飾によって低下する)
論文審査委員	(主) 教授 樋口和秀 教授 田中慶太朗 教授 矢野貴人

### 学位論文内容の要旨

《緒言》

肝細胞癌は、慢性肝炎や肝硬変を母地として genetic な異常や epigenetic な異常が蓄積することにより発生する。Epigenetic な異常には、ゲノムワイドな DNA の低メチル化、遺伝子プロモーター領域 CpG アイランドの局所的高メチル化、ヒストン修飾(メチル化やアセチル化など)等が知られている。吉川らは、Restriction Landmark Genomic Scanning(RLGS)法による CpG アイランドの網羅的な解析により、*Suppressors of cytokine signaling 1 (SOCS-1)*, *Suppressors of cytokine signaling 3 (SOCS-3)*, *Apoptosis Speck Protein-Like (ASCL)* および *Delta-like3 (DLL3)* が肝細胞癌において癌組織特異的にメチル化されていることを見出した。申請者は、DLL3 を本研究の対象とし、ヒト肝細胞癌組織における DLL3 の発現変化を調べるとともに、癌細胞株における DLL3 のプロモ-

ター領域のメチル化状態を解析した。また、DLL3 mRNA の発現調節における DNA メチル化とヒストン修飾の役割について各種阻害剤を用いて調べた。

#### 《方法》

1. 肝細胞癌組織 36 例、隣接する非腫瘍部組織 9 例で、免疫組織化学染色により DLL3 の発現強度を比較した。
2. 肝細胞癌細胞株である HuH2 および HuH4 を用いて、*DLL3* のプロモーター領域の CpG アイランドのメチル化状態を Bisulfite sequencing 法により解析した。
3. DNA メチル化状態およびヒストンのメチル化・アセチル化の変化が DLL3 mRNA の発現に及ぼす影響を調べるため、HuH2 細胞を DNA の脱メチル化剤 (5-azadeoxycytidine:5-Aza-dC)、ヒストンの脱アセチル化酵素 (histone deacetylation:HDAC) の阻害剤トリコスタチン A (TSA)、ヒストン H3 lysin9 のメチル化阻害剤 BIX01294 およびヒストン H3 lysin27 や H4 lysin20 のメチル化阻害剤 DZNeP で処理し、RT-PCR にて DLL3 mRNA の発現量の変化につき検討した。

#### 《結果》

1. DLL3 の発現量は肝細胞癌で低下していた。
2. HuH2 細胞で *DLL3* のプロモーター領域のメチル化が HuH4 細胞や慢性肝炎組織に比し亢進していた。
3. HuH2 細胞に 5-Aza-dC を処理することで *DLL3* のプロモーター領域のメチル化を抑制した結果、DLL3 mRNA の発現は約 2 倍となり有意に上昇した。HuH2 細胞への TSA 単独処理では、DLL3 mRNA の発現は 5 倍に増加した。さらに、HuH2 細胞を TSA と 5-Aza-dC で併用処理すると、約 28 倍の有意な DLL3 mRNA の発現上昇を認めた。しかし、BIX01294 単独処理では、DLL3 mRNA の発現に影響を及ぼさなかった同時に、他の薬剤との併用においても発現の上昇は見られなかった。一方、DZNeP 単独処理では、DLL3 mRNA の発現上昇は認められず、DZNeP を 5-Aza-dC と TSA と併用した

場合、DLL3 mRNA の発現は上昇せず、むしろ抑制される傾向にあった。

#### 《考察》

ヒト肝細胞癌および隣接正常肝細胞に対する免疫組織化学染色では、正常肝細胞に比較して癌部において DLL3 の発現が減弱していた。肝細胞癌における epigenetic な変化に着目して Bisulfite sequencing 法による解析を行うと、HuH2 細胞の *DLL3* のプロモーター領域の CpG アイランドが高度にメチル化されていた。この HuH2 細胞に脱メチル化剤である 5-Aza-dC を添加することで、抑制されていた DLL3 mRNA の発現が増加した。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA 単独処置においても DLL3 mRNA の発現は上昇した。さらに 5-Aza-dC と TSA を併用すると、DLL3 mRNA の大幅な発現上昇を認めた。このことから *DLL3* プロモーター領域のメチル化およびヒストンの脱アセチル化が肝細胞癌における DLL3 の発現抑制を担っていることが示唆された。DLL3 は Notch 受容体のリガンドである Delta Serrate Lag2(DSL)リガンドの 1 つである。Notch シグナルは発生過程および幹細胞において細胞の運命の決定を調節することが知られている。DLL3 は DLS リガンドの中でも構造的に最も異質であり、DLL3 の細胞内局在も細胞膜ではなくゴルジ装置であると報告されている。そのため DLL3 は隣接する細胞の Notch シグナルを制御せずに、同一細胞内で Notch の活性化を阻害するという特殊な機能を有しているのではないかと考えられている。また、癌においては異常な Notch シグナルが癌の形成に寄与していることが数多く報告されている。このことから、epigenetic な変化がもたらす DLL3 の発現抑制は、肝組織での異常な細胞分化および癌細胞増殖など肝細胞癌への多段階進展に寄与することが考えられる。前村らによる以前の研究において、HuH2 細胞に DLL3 を過剰発現させるとアポトーシスが誘導されることが報告されている。そのため DLL3 の発現が抑制されている肝細胞癌において、DLL3 を再発現させることによる、アポトーシス誘導の可能性が示唆された。

## 《結論》

肝細胞癌細胞株 HuH2 では、DNA プロモーター領域のメチル化に加えてヒストンのアセチル化が DLL3 mRNA の発現低下をもたらし、発癌過程に関与する可能性が示唆された。DLL3 が Notch のリガンドであることを考えると、DLL3 のエピジェネティック制御により Notch シグナルを正常化することが、肝細胞癌に対する新たな治療戦略となる可能性が考えられた。

## 論文審査結果の要旨

申請者は、ヒト肝細胞癌において Delta-like 3(DLL3)の発現が低下していることを根拠として、DLL3 発現のエピジェネティックな制御変化が発癌に寄与しているとの仮説を立て、肝細胞癌細胞株 HuH2 において DLL3 のプロモーター領域のメチル化状態を調べ、またヒストンのアセチル化やメチル化と癌化状態との関連を検討した。

癌組織と、隣接する非腫瘍組織で、免疫組織化学染色により DLL3 の発現強度を比較すると、正常肝組織に比べて肝細胞癌で DLL3 の発現が低下していた。*DLL3* のプロモーター領域のメチル化状態の解析では、肝細胞癌細胞株 HuH2 細胞で *DLL3* のメチル化が、HuH4 細胞や慢性肝炎組織に比し亢進していることを示した。

HuH2 に対するヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA の投与により DLL3 mRNA の発現は上昇し、脱メチル化剤 5-Aza-dC と併用すると、DLL3 の顕著な発現上昇を認めた。DNA プロモーター領域のメチル化とヒストンアセチル化が肝細胞癌における DLL3 の発現を抑制している可能性を示唆した。

今後、DLL3 のエピジェネティック制御の詳細なメカニズム解明のために、臨床標本を用いたさらなる検討が必要であろう。しかし、本研究により申請者は肝細胞の癌化過程において、DLL3 のエピジェネティック制御による抑制は、Notch 依存的な肝細胞の癌化に関与する事を示唆し、DLL3 は肝細胞癌治療の新たな標的となる可能性を示した。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Oncology Reports 39(5): 2209-2216, 2018