

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 14 日現在

機関番号：13701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19320

研究課題名(和文) レチノイド受容体遺伝子改変マウスを用いた新規肝癌治療法の開発

研究課題名(英文) The development of novel therapy for hepatocellular carcinoma using RXR-alpha genetically modified mice

研究代表者

境 浩康 (Sakai, Hiroyasu)

岐阜大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40738259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：リン酸化RXR が肝発癌に及ぼす影響についてRXR 遺伝子改変マウスを用いて検討を行った。この遺伝子改変マウスは肝発癌剤であるDiethylnitrosamine投与に対して、対象マウスと比較して有意な肝腫瘍形成を認めた。また、この肝腫瘍ではPCNA陽性細胞が有意に増加し、細胞周期調節因子であるcyclin D1遺伝子/蛋白発現の増加も認めた。さらに、cyclin D1の発現調節に関わる b-catenin蛋白の増加も確認された。以上の結果から、リン酸化RXR は b-catenin/cyclin D1を介した増殖シグナルを亢進させることでin vivoの肝化学発癌に關与する事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The role of phosphorylated-RXRα (p-RXRα) on the development of liver tumorigenesis was investigated by using RXRα genetically modified mice. The transgenic mice were more susceptible to the treatment of diethylnitrosamine (DEN), and developed more liver tumors compared to the control mice. In addition, liver tumors observed in the transgenic mice had more PCNA positive cells, indicating that those tumors had high proliferative capacity. Besides, increased mRNA and protein expressions of cyclin D1 were observed in transgenic liver tumors, and the protein expressions of either p-Rb or PCNA, both of which are the downstream targets of cyclin D1, were also increased in those liver tumors. Interestingly, the transgenic liver tumors had more b-catenin protein expression, which regulates the expression of cyclin D1. Thus, these results indicate that the p-RXRα is associated with the development of DEN-induced liver tumorigenesis by promoting b-catenin/cyclin D1 signaling pathway.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝細胞癌 レチノイド RXR 核内受容体 肝化学発癌

1. 研究開始当初の背景

(1) ビタミン A の誘導体であるレチノイドは、肝細胞の恒常性 (分化・増殖・死) 維持において重要な働きをしている。これまでに我々の教室では、レチノイド核内受容体の 1 つである、Retinoid X Receptor- (RXR) がヒト肝臓においてリン酸化修飾を受け、機能不全に陥っていることを明らかにした。具体的には、リン酸化修飾を受けた RXR 受容体は、正常な RXR 受容体の機能を阻害することでレチノイドシグナル伝達を妨げ、肝臓癌に関与することが肝臓癌細胞株を用いた研究で明らかになった。これらの事実は、リン酸化修飾を受けた RXR 受容体 (以下、リン酸化 RXR) がヒト肝臓癌治療の分子標的と成り得ることを示唆するものであった。

(2) 肝臓癌細胞株を用いた研究から、リン酸化 RXR のヒト肝臓癌への関与が示唆されたが、*in vivo* の肝臓癌過程への影響については明らかになっていない。そこで、本研究の開始に先立って、リン酸化 RXR の発現誘導が可能で RXR 遺伝子改変マウスを作製した。興味深いことに、この遺伝子改変マウスに肝臓癌剤である Diethylnitrosamine (DEN) を腹腔内投与し、リン酸化 RXR を強制発現させたところ、DEN 単独群と比較して有意に肝腫瘍数・腫瘍体積の増加を認めた。これらの事実は、リン酸化 RXR が *in vivo* における肝化学発癌においても重要な役割を果たしていることを示唆するものであった。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、細胞の「分化・増殖・死」といった幅広い領域に影響を及ぼすレチノイド核内受容体 RXR の機能異常が、肝臓癌機構において重要な役割を果たしていることを *in vivo* において明らかにし、その詳細なメカニズムを解明することで、臨床において有用な新規肝臓癌治療 (予防) 法を開発することを目的とする。

(2) 我々が新たに作製した、レチノイド核内受容体 RXR 遺伝子改変マウスを用いて行った網羅的遺伝子解析の中から、肝臓癌リスクや慢性肝疾患患者の長期予後の予測に有用な、簡便かつ特異性の高い biomarker を見いだすことによって、肝臓癌の新規予後予測法の開発を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、以下(1)(2)(3)の研究を通して、新規肝臓癌治療法の分子標的となる異常分子を同定し、その成果を臨床へフィードバックする。

(1) DEN 肝臓癌の背景にある分子メカニズムの同定 我々の予備実験において、RXR 遺伝子改変マウスは DEN に対して高感受性を示し、対照群と比較して有意な肝腫瘍数・腫瘍

体積の増加を認めた。DEN による肝臓癌の過程は、ヒト肝臓癌と同様の経過をたどることが知られており、DEN 肝臓癌メカニズムの解明はヒト肝臓癌治療法の確立にとって重要な鍵と成り得る。我々の遺伝子改変マウスでは、リン酸化修飾による異常な RXR が、正常な RXR の機能を阻害し、細胞周期やアポトーシス調節に異常を来すことが予想された。そこで、遺伝子改変マウスの腫瘍や非腫瘍における細胞周期関連分子の発現をウエスタンブロッティングやリアルタイム PCR 等を用いて定量的に評価する。また、マイクロアレイやプロテオーム解析を行い、リン酸化 RXR に関連した新たな分子異常を同定する。

(2) 新規肝臓癌モデル (NASH 肝臓癌) の確立

近年、肥満や糖尿病を背景とした脂肪肝や非アルコール性脂肪肝炎が増加し、これら生活習慣病に関連した肝臓癌 (メタボ肝臓癌) が問題となっている。そこで、これらメタボ肝臓癌も視野に入れた新規肝臓癌治療法を開発するためには同モデルを用いた肝臓癌研究が必要と考えた。そこで、RXR 遺伝子改変マウスに高脂肪食やコリン欠乏食といった特別餌を投与することによってインスリン抵抗性を誘導し、脂肪肝や NASH の病態を確立する。その後、観察期間を延長、あるいは、DEN といった化学発癌物質を投与することで NASH を背景肝とした肝腫瘍形成を誘導する。肝腫瘍確認の際には、DEN モデル同様に肝腫瘍の分子生物学的・組織学的な評価を行い、NASH 肝臓癌において重要な分子異常を同定する。

(3) 肝臓癌の予後予測に有用な新規 biomarker の同定 上記(1)(2)の研究を通して、各種肝臓癌モデルに共通する分子異常が同定された際には、慢性肝疾患患者の臨床サンプルを用いてそれら候補分子の発現状態を比較検討し、肝臓癌の予後予測因子として有用な新規 biomarker と成り得るか検討する。

さらに、候補となる biomarker が同定された際には、当院及び関連病院で構築された患者データベースの臨床情報と照らし合わせることによって、その有用性や臨床応用への可能性について評価を行う。

4. 研究成果

(1) DEN 肝臓癌モデルにおける成果

リン酸化型 RXR が肝臓癌に及ぼす影響について、RXR 遺伝子改変マウスを用いて検討を行った。始めに、肝臓癌モデルとして一般的な Diethylnitrosamine (DEN) モデルを用いた。遺伝子改変マウスをリン酸化 RXR 発現群と非発現群 (対照群) の 2 群に分け、DEN (25mg/kg) を生後 15 日でそれぞれ腹腔内投与した後、月齢 6 カ月にて屠殺・解剖を行い、DEN に対する発癌感受性を検討した。リン酸化 RXR 発現群では、対照群と比較して肝腫瘍の総数 (リン酸化 RXR 群 vs 対照群; 33.61 ± 11.98 vs 8.14 ± 7.66 個) や腫瘍最大

径 (リン酸化 RXR 発現群 vs 対照群 ; 5.36 ± 2.54 vs 2.86 ± 1.21 mm) が有意に増加し、総腫瘍に占める肝細胞癌の割合も有意に増加した。さらに、RXR 遺伝子改変マウスで確認された肝腫瘍では、PCNA 陽性細胞数が有意に増加しており、細胞増殖能が高い状態にあった。また、細胞周期制御蛋白である、Cyclin D1 の遺伝子や蛋白発現が増加し、下流のリン酸化 Rb 蛋白や PCNA 蛋白の発現も増加していた。加えて、Cyclin D1 の発現調節に関わる β -catenin の蛋白発現にも増加を認めた。 β -catenin 発現を制御する GSK3 の遺伝子変異やリン酸化修飾について検討したが、RXR 遺伝子改変マウスと対象マウスの両群で GSK3 遺伝子に変異は無く、GSK3 のリン酸化の程度にも差を認めなかった。リン酸化 RXR が β -catenin の発現誘導に関わるメカニズムについては今後の検討が必要であるが、DEN 肝発癌モデルにおいては、 β -catenin/Cyclin D1 を介した増殖シグナルを亢進させることで肝発癌に関与することが明らかになった。本研究は、*in vivo* の肝発癌におけるリン酸化 RXR の関与を明らかにし、その肝発癌治療のターゲットとなる可能性を示唆する意義ある成果を示した。

(2) NASH 肝発癌モデルにおける成果

NASH の病態形成においてインスリン抵抗性が重要であることが知られている。そこで、RXR 遺伝子改変マウスに高脂肪食を投与することによってインスリン抵抗性を誘導した。興味深いことに、高脂肪食を投与された RXR 遺伝子改変マウスは、高脂肪食のみの対照マウスと比較して明らかな耐糖能異常を示した。これらの結果は、リン酸化 RXR の糖代謝への関与を示唆している。現在、観察期間を延長し、脂肪肝や NASH の病態が誘導されるか確認を行っている。

(3) 研究の総括

現時点で、NASH 肝癌モデルの確立には至っていないが、(1)(2)の研究から、リン酸化 RXR が *in vivo* の病態 (DEN 肝発癌・耐糖能異常) に関与することが明らかになった。このように、*in vivo* でのエビデンスが示せたことは、「ヒト創薬への応用」を目指すうえで大きな一歩となる成果であった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 8 件)

Fukuta K, Shirakami Y, Maruta A, Obara K, Iritani S, Nakamura N, Kochi T, Kubota M, Sakai H, Tanaka T, Shimizu M. Preventive Effects of Pentoxifylline on the Development of Colonic Premalignant Lesions in Obese and Diabetic Mice. *Int J Mol Sci*, 2017 Feb 15;18(2). Pii:E413. doi: 10.3390/ijms18020413 査読有

Shirakami Y, Sakai H, Kochi T, Seishima M, Shimizu M. Catechins and Its Role in Chronic Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2016;929:67-90. http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-3-319-41342-6_4 査読有

Miyazaki T, Shirakami Y, Kubota M, Ideta T, Kochi T, Sakai H, Tanaka T, Moriwaki H, Shimizu M. Sodium alginate prevents progression of non-alcoholic steatohepatitis and liver carcinogenesis in obese and diabetic mice. *Oncotarget*. 2016 Mar 1;7(9):10448-58. doi: 10.18632/oncotarget.7249. 査読有

Sakai H, Shirakami Y, Shimizu M. Chemoprevention of obesity-related liver carcinogenesis by using pharmaceutical and nutraceutical agents. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan 7;22(1):394-406. doi:10.3748/wjg.v22.i1.394. 査読有

Ohno T, Shimizu M, Shirakami Y, Miyazaki T, Ideta T, Kochi T, Kubota M, Sakai H, Tanaka T, Moriwaki H. Preventive effects of astaxanthin on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in C57/BL/KsJ-db/db obese mice. *Hepatol Res*. 2016 Mar;46(3):E201-9. doi: 10.1111/hepr.12550. Epub 2015 Jul 27. 査読有

Ideta T, Shirakami Y, Miyazaki T, Kochi T, Sakai H, Moriwaki H, Shimizu M. The Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor Tenzinagliptin Attenuates Hepatic Lipogenesis via AMPK Activation in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Model Mice. *Int J Mol Sci*. 2015 Dec 8;16(12):29207-18. doi: 10.3390/ijms161226156. 査読有

Shirakami Y, Sakai H, Shimizu M. Retinoid roles in blocking hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Surg Nutr*. 2015 Aug;4(4):222-8. doi: 10.3978/j.issn.2304-3881.2015.05.01. 査読有

Shimizu M, Shirakami Y, Sakai H, Kubota M, Kochi T, Ideta T, Miyazaki T, Moriwaki H. Chemopreventive potential of green tea catechins in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2015 Mar 17;16(3):6124-39. doi:10.3390/ijms16036124. 査読有

[学会発表](計 3 件)

Sakai H, Shirakami Y, Shimizu M. The role of the phosphorylated RXR-alpha on cellular proliferation and liver tumorigenesis. AACR annual meeting 2016, 2016年4月19日, New Orleans (USA)

Sakai H, Yamada Y, Shirakami Y, Hara A, Shimizu M. The role of the phosphorylated

RXR-alpha on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in mice. 25th Conference of the Asial Pacific Association for the Study of the Liver, 2016年2月22日, 東京

Sakai H, Yamada Y, Shirakami Y, Hara A, Shimizu M. The role of the phosphorylated RXR-alpha on diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in mice. The 13th Korea-Japan Joint Symposium on Cancer and Ageing Research, 2016年2月26日, Jeju (Korea)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

境 浩康 (SAKAI, Hiroyasu)
岐阜大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：40738259

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()