

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19334

研究課題名(和文) 肝癌進展に及ぼすB細胞活性化因子の作用

研究課題名(英文) The role of BAFF in progression of hepatocellular carcinoma

研究代表者

小泉 光仁(Koizumi, Mitsuhiro)

愛媛大学・医学部附属病院・講師(病院教員)

研究者番号：40748307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌におけるB細胞活性化因子(BAFF)の役割、生理的意義を同定して肝細胞癌での作用を明らかにすることを目的に研究を開始した。ヒト肝癌細胞株においてBAFFの発現を弱めて細胞の変化を観察したが、変化は乏しかった。そこで研究の過程で新たに着目したANP32B(Acidic Nuclear Phosphoprotein 32 Family Member B, APRIL)の肝細胞癌における役割について検討した。ヒト肝細胞癌組織におけるANP32Bの発現低下は肝細胞癌患者における予後不良と関連しており、ANP32Bの発現低下はアポトーシスを抑制し、癌の進展に寄与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Originally we aimed to identify the role of B cell activation factor belonging to the tumor necrosis factor family (BAFF) and its physiological significance in hepatocellular carcinoma (HCC). Using BAFF expression attenuated liver cancer cell lines, we failed to show significant features that may explain physiological alteration in HCC. During our above mentioned research, we encountered to a protein, Acidic Nuclear Phosphoprotein 32 Family Member B (ANP32B), which may contribute to the pathogenesis of HCC. Therefore, we investigated the role of ANP32B in HCC. ANP32B was expressed in human HCC tissue and low levels of ANP32B were correlated with poor prognosis. Down-regulation of ANP32B plays a role in the suppression of apoptosis and contributes to the progression of cancer.

研究分野：消化器

キーワード：肝細胞癌 ANP32B BAFF

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌では肝切除術、ラジオ波焼灼術などの根治療法あるいは、肝動脈化学塞栓術や動注化学療法などの局所療法が初回治療として多く行われる。これらの治療効果が期待できないと考えられる進行した肝細胞癌では、体内に存在する特定の分子機能を抑える分子標的治療薬であるソラフェニブの有効性が示され、進行した肝細胞癌症例の予後延長が可能となってきた (Llovet JM, et al. N Engl J Med 359: 378-390, 2008. Cheng AL, et al. Lancet Oncol 10; 25-34, 2009.)。しかし、その治療効果は生存期間 (中央値) 2-3 か月の延長と十分ではなく、新規の分子標的治療薬が開発されているが期待した有効性は得られていない。

B 細胞の生存維持・分化・抗体産生に重要な役割を果たす血清 B 細胞活性化因子 (BAFF) は TNF superfamily に属する分子である。申請者らはこれまでに、BAFF は転移のある膵癌症例において血清濃度が上昇し、膵癌細胞の上皮間葉移行関連遺伝子を変化させ、膵癌細胞の運動能および浸潤能を亢進させることを明らかにした。この研究の過程で、肝細胞癌の進展に伴って血清 BAFF 濃度が上昇することが示唆された。BAFF とその受容体はヒト肝癌組織、肝癌細胞株に発現することが報告されているが、肝癌において BAFF の増加機序、および腫瘍進展に対する生理的役割については不明である。

2. 研究の目的

肝細胞癌における BAFF の役割、生理的意義を肝細胞癌組織、肝癌細胞株を用いた検討により同定し、肝細胞癌の臨床マーカーとしての有用性、肝細胞癌治療標的としての BAFF の可能性を明らかにすることを研究の目的とした。

3. 研究の方法

BAFF siRNA を使用して肝癌細胞株の変化を観察したが、細胞株の形態変化、遺伝子変化は乏しかった。

研究の過程で新たに着目した ANP32B (Acidic Nuclear Phosphoprotein 32 Family Member B, APRIL) の肝細胞癌における役割について検討をすすめた。ANP32 は新規の核内リン酸化蛋白で、細胞の分化、転写制御、蛋白のリン酸化、細胞内遊走因子、細胞死経路を制御していると報告されている。これまでに癌における ANP32B の作用機序、腫瘍進展に対する生理的役割については明らかになっていない。そこで ANP32B の役割、生理的意義を肝細胞癌組織、肝癌細胞株を用いて検討した。

4. 研究成果

ヒト肝癌細胞株組織において ANP32B が発現していることを RT-PCR、Western Blot で証明した (図 1)。さらにヒト肝細胞癌組織

において周囲の非腫瘍部と比較して相対的に腫瘍部の ANP32B mRNA 発現が低下している群において、肝癌の UICC stage が進行しており、予後不良と関連していた (図 2、表 1)。

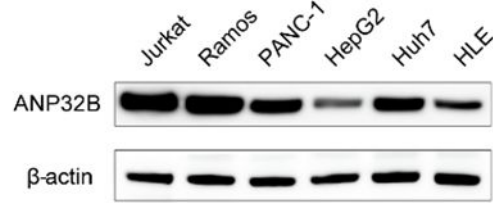


図 1: 肝癌細胞株の ANP32B 発現

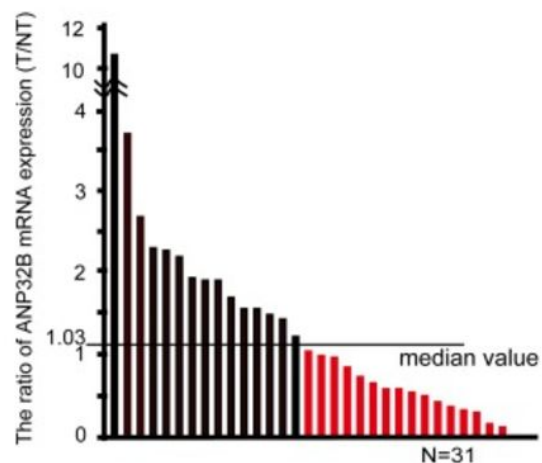


図 2: ヒト肝細胞癌組織での ANP32B 発現

	Tumor low ANP32B (N = 16)	Tumor high ANP32B (N = 15)	p-value
Age (mean ± SD), year	69 (49-81)	67 (51-83)	0.729
Sex (M/F)	12/ 4	12/ 3	0.739
Virus (HBV/HCV/none)	4/ 8/ 4	5/ 7/ 3	0.865
Child-Pugh (A/B/C)	16/ 0/ 0	14/ 0/ 1	0.223
Fibrosis (F1/ F2/ F3/ F4)	2/ 2/ 3/ 9	2/ 6/ 2/ 5	0.331
Pathological stage (I-II/ III-IV)	10/ 6	14/ 1	0.032 ²
AFP, ng/ml (range)	26.5 (2-1525)	7.2(1.6-936)	0.710
DCP, mAU/ml (range)	409 (16-418820)	65 (13-6012)	0.284
PT, % (range)	84.1 (72.8-100.8)	86.6 (56.5-180.9)	0.976
Tumor size	36 (15-160)	30 (18-160)	0.976
Tumor differentiation (well/ moderate/ poor)	2/ 12/ 2	4/ 10/ 1	0.557
Tumor multiplicity (solitary/ multiple)	12/ 4	9/ 6	0.371

表 1: ANP32B と肝癌病期の関係

次にヒト肝癌細胞株の ANP32B をノックダウンして (図 3)、PCR アレイを用いて変化する遺伝子の網羅的な解析を行った。その結果、ANP32B の発現低下によりアポトーシス関連遺伝子の低下がみられた。



図 3: siRNA による ANP32B の発現低下

そこでアポトーシスを誘導する物質であるスタウロスポリンを肝癌細胞株に添加した。アポトーシス誘導下において ANP32B のノックダウンはカスパーゼ3とカスパーゼ9の切断・活性化を抑制した(図4)。さらにアネキシンVによってアポトーシス細胞を標識した結果、ANP32B 発現低下によりスタウロスポリンによるアポトーシスの誘導が抑制された(図5)。

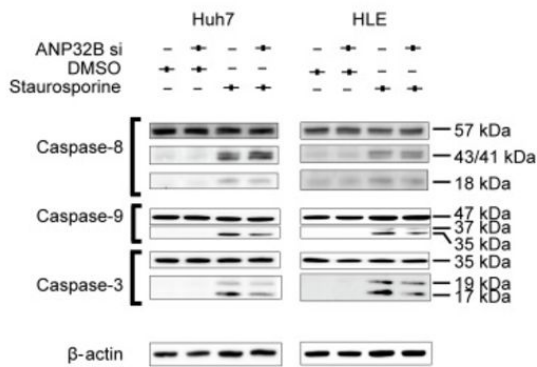


図4 : ANP32B 発現低下とカスパーゼ活性

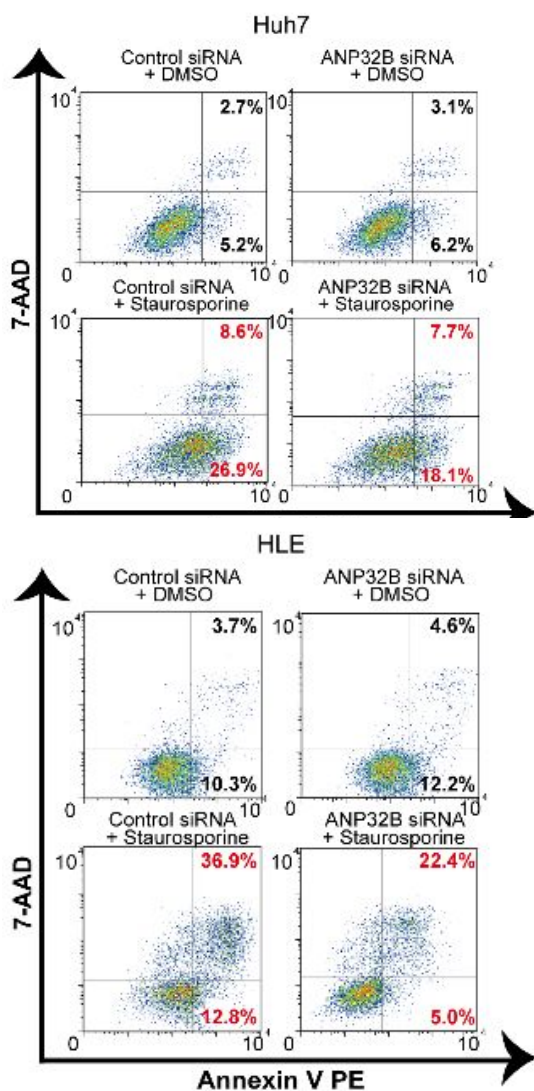


図5 : ANP32B 発現低下とアポトーシス変化

これまでの結果より ANP32B の発現低下により肝癌細胞株のアポトーシスが抑制されると考えられた。その機序を詳細に検討するためヒト肝癌細胞株のアポトーシスを誘導して RT-PCR、Western Blot で遺伝子発現の変化を観察した。その結果 ANP32B はミトコンドリアにおけるアポトーシスを調節する Bad リン酸化(図6)や Bak 発現(図7)に関与していた。

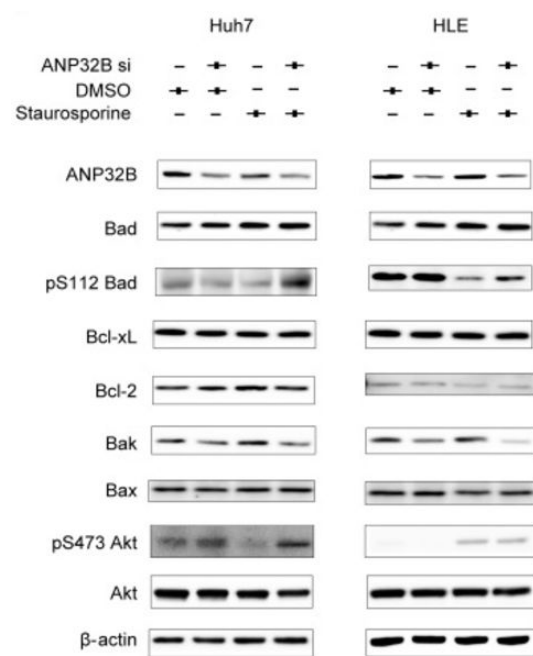


図6 : ANP32B 発現低下と Bad リン酸化の変化

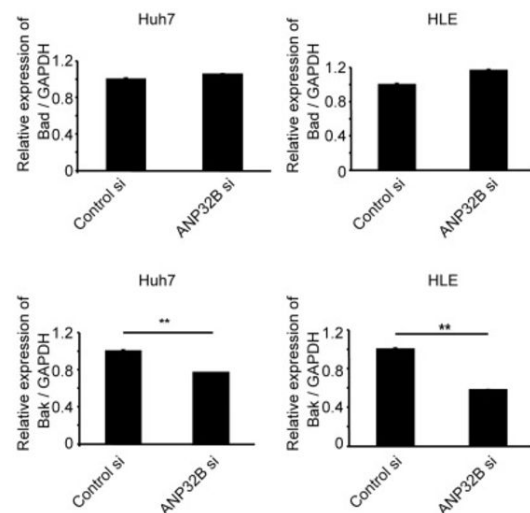


図7 : ANP32B 発現低下と Bak, Bad の変化

以上の結果よりヒト肝細胞癌組織における ANP32B の発現低下は肝細胞癌患者における予後不良と関連しており、ANP32B の発現低下はミトコンドリアにおけるアポトーシスを抑制して癌の進展に寄与していると考えられた。

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3件)

1. Ohno Y, Koizumi M, Nakayama H, et al. Downregulation of ANP32B exerts anti-apoptotic effects in hepatocellular carcinoma. PloS One. 2017 May 9;12(5): e0177343. 査読あり
2. Kuroda T, Hirooka M, Koizumi M, et al. Pancreatic congestion in liver cirrhosis correlates with impaired insulin secretion. J Gastroenterol. 2015 Jun;50(6): 683-93. 査読あり
3. Miyake T, Kumagi T, Hirooka M, Furukawa S, Kawasaki K, Koizumi M, et al. Significance of exercise in nonalcoholic fatty liver disease in men: a community-based large cross-sectional study. J Gastroenterol. 2015 Feb;50(2): 230-7. 査読あり

〔学会発表〕(計3件)

1. The American Association for the Study of Liver Diseases The Liver Meeting 2016 (2016.11.11-15. ボストン, アメリカ合衆国): Ohno Y, Koizumi M Nakayama H, et al. Down-regulated acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member B (ANP32B) has a role in suppression of apoptosis, and is associated with poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma.
2. 第19回日本がん分子標的治療学会学術集会(2015.6.10-12. 松山全日空ホテル, 愛媛県松山市): 膵癌進展におけるB細胞活性化因子の作用. 小泉光仁, 渡辺崇夫, 大野芳敬, 日浅陽一.
3. 第101回日本消化器病学会総会(2015.4.23-4.25. 仙台国際センター, 宮城県仙台市): 生体肝移植後の胆管狭窄に対する内視鏡治療の現状と課題. 小泉光仁, 熊木天児, 日浅陽一.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小泉 光仁 (Koizumi, Mitsuhiro)
愛媛大学・医学部附属病院・講師(病院教

員)

研究者番号: 40748307

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし