

令和元年6月25日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05293

研究課題名(和文)核マトリクス蛋白を標的としたオートファジー関連消化器難病疾患の早期診断法の開発

研究課題名(英文)Development of an early diagnosis method targeting nuclear matrix protein for autophagy-related digestive disorder disease

研究代表者

渡辺 純夫(WATANABE, SUMIO)

順天堂大学・医学部・特任教授

研究者番号：20138225

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝腫瘍細胞株と膵腫瘍細胞株においてオートファジー機能障害と関連する共通の核マトリクス蛋白として14-3-3、Importin 4、Importin 1の3つが同定された。これらの核マトリクス蛋白の核内局在は、膵癌組織でも観察された。これらの3つの蛋白の核内蓄積は、p62蛋白の細胞質内蓄積を介したNrf2-Notchシグナル活性化と協調して細胞増殖や細胞死抑制を惹起する可能性が考えられた。これらの核マトリクス蛋白は消化器難病疾患である肝癌・膵癌の診断マーカーとしてだけでなく、治療標的としても有望である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝腫瘍細胞株と膵腫瘍細胞株においてオートファジー機能障害と関連する共通の核マトリクス蛋白として同定された14-3-3、Importin 4、Importin 1は、いくつかの膵癌組織において核内発現が確認された。これらの蛋白の核内発現は細胞増殖や細胞死抑制に作用すると考えられることから、これらの核マトリクス蛋白は消化器難病疾患である肝癌・膵癌の診断マーカーとしてだけでなく、治療標的としても有望と考えられ、社会的にも有用な研究結果と考えられた。オートファジー研究において核の不溶分画解析の報告はなく学術的にも重要な研究と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Three nuclear matrix proteins, 14-3-3, Importin-4 and Importin-1, were identified in liver and pancreatic tumor cell lines as autophagy-related proteins. These proteins were confirmed to be expressed in the nucleus of cancer cells in several pancreatic cancer tissues. These nuclear matrix proteins were thought to be involved in cell proliferation and cell death suppression. This feature was strongly confirmed in cell lines in which p62 expression is particularly increased in the cytoplasm, so it was suggested that nuclear accumulation of 14-3-3, Importin-4 and Importin-1 cooperates with the p62 protein to enhance cell proliferation and to suppress cell death. Since accumulation of p62 protein in cytoplasm affects cell proliferation through Nrf2-Notch signal activation, cell growth promotion and cell death inhibitory effects induced by nuclear accumulation of 14-3-3, Importin-4 and Importin-1 might be related to Nrf2-Notch signal activation.

研究分野：消化器内科 肝臓病学

キーワード：オートファジー 核マトリクス蛋白 バイオマーカー 膵癌 肝癌

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

オートファジーはユビキチン-プロテアソーム経路とは異なり、非選択的に細胞質内の蛋白や小器官など大きな分子も分解する蛋白分解経路である。オートファジーは変性蛋白や傷害された細胞内小器官を分解除去し細胞保護的に作用する。オートファジー機能が障害されると細胞内への変性蛋白蓄積が誘導され、細胞内に不溶性蛋白の凝集体である封入体が形成される (Komatsu et al. *J Cell Biol.* 2005)。細胞内封入体はアルコール性肝炎、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH)、肝癌において Mallory-Denk body として観察されることから、これら肝疾患の発症進展にはオートファジー機能異常が大きく寄与すると考えられている。我々は、脂肪肝では mTOR 活性化によるオートファジー誘導の低下とともにリソソーム蛋白分解酵素発現低下やリソソーム酸性化障害が生じオートファジー機能障害が惹起されることを報告してきた。さらにオートファジー機能障害によって細胞内に蓄積する p62 蛋白が Keap1 と競合的に結合し Nrf2 の核内移行を介して肝発癌を誘導することを明らかにした。近年、オートファジーは自然免疫・発癌・細胞死などにも関与する事が明らかとなり、クローン病、二型糖尿病や膵癌発症にも関与することがわかってきた (Simmons et al., *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2010)。以上のことから各臓器におけるオートファジー機能を評価する血清マーカーの発見はさまざまな病態診断に有効であると考えられた。また近年、オートファジーは細胞内小器官だけでなく核蛋白の分解にも関与することが明らかとなった (Mochida et al. *Nature*, 2015)。我々はオートファジー欠損肝組織より単離した核蛋白不溶分画 (核マトリクス蛋白) においてコントロール群では検出されない蛋白を複数検出した。さらに脂肪肝モデルでも検出される核マトリクス蛋白を同定し、血清中でも検出されることを確認した。これらの蛋白はオートファジー抑制や NASH で観察される mTOR 活性化や酸化ストレス、小胞体ストレスに関連する蛋白であることからオートファジー障害や NASH 診断に有用と考えられた。核マトリクスは核より DNA と可溶性蛋白を除去した際の難溶性残存物として発見された構造体で DNA 複製・転写などの核内イベントを効率的に制御し行う場と考えられている。核マトリクス蛋白の変性、量的変化は細胞増殖や核内シグナル伝達に影響を与え発癌に関与すると考えられている。また細胞が脱落した際に核マトリクス蛋白は細胞外に放出されることから、腫瘍化によって発現が増加する核マトリクス蛋白の同定は新規腫瘍マーカーとして有望視され、実際に臨床において膀胱癌診断などで利用され、保険適応となっている。以上のようにオートファジー機能障害のような非可溶性蛋白の凝集体を形成する病態においては、核の非可溶性蛋白である核マトリクス蛋白の解析は病態解析や血清マーカー創製の上で非常に理にかなったものと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、動物モデル、腫瘍細胞株、ヒト検体を用いて、オートファジー抑制によって発現が誘導される核マトリクス蛋白を明らかにし、オートファジー機能障害と関連する消化器難病疾患 (肝癌、膵癌) の発症とどのようにリンクするのかを検証し、疾患評価のためのバイオマーカーとしての有用性について検討を行う。またその核マトリクス蛋白の細胞内機能を明らかにし、病態生理学的役割についても検証する。以上の検討を通して、肝臓癌、膵臓癌における特異的核マトリクス蛋白を同定し、発病メカニズムとの関連を解明するとともに、これら疾患の早期診断用の新規体外診断用血清マーカー創製の基盤となる研究を行うことを目的としている。

## 3. 研究の方法

### 膵臓におけるオートファジー抑制による核マトリクス蛋白発現変化と病態生理学的意義の解明

#### 膵癌細胞株、肝癌細胞株を用いたオートファジー抑制による核マトリクス蛋白発現変化の解析

膵癌細胞株 (Panc-1) と肝腫瘍細胞株 (HepG2) にオートファジー阻害薬として用いられることの多い 3-Methyladenine (3-MA) を添加し、オートファジー誘導を抑制し、その後、核を単離する。単離した核を DNA 分解酵素と lysis buffer にて処理し非可溶性蛋白 (核マトリクス蛋白) を遠心分離にて抽出する。さらに膵癌細胞株と肝腫瘍細胞株に Atg7-siRNA を用いて遺伝子的にオートファジー誘導を抑制し、上記と同様に核の非可溶性蛋白を抽出する。これらの核マトリクス蛋白を 2 次元電気泳動にて分離したうえで銀染色を行い可視化する。オートファジー抑制細胞群とコントロール群の蛋白スポットを比較しオートファジー抑制によって発現が増加する蛋白スポットより蛋白を抽出する。抽出蛋白を質量分析器によって解析し、肝・膵腫瘍細胞におけるオートファジー抑制によって発現が増加する核マトリクス蛋白を同定する。

#### ヒト検体を用いた核マトリクス変化と病態との関連性の解明

膵臓癌の手術検体を用いて肝・膵腫瘍細胞においてオートファジー抑制によって発現増加した 3 つの核マトリクス蛋白 14-3-3、Importin 4、Importin 1 蛋白の抗体を用いて免疫組織染色を行い、これらの蛋白の組織内局在および細胞内局在を観察する。また組織内蛋白発現細

胞数と腫瘍の大きさとの関係についても検証を行う。

## 核マトリクス蛋白と細胞増殖・細胞死との関連についての検証

### 細胞株を用いたオートファジー関連核マトリクス蛋白と細胞増殖・細胞死との関連についての検討

14-3-3、Importin 4、Importin 1それぞれの蛋白に対する siRNA を作製し、肝癌細胞株 (HepG2, JHH5) と膵癌細胞株 (Panc-1) に遺伝子導入し、これらの蛋白発現を抑制する。発現抑制後に通常の培養液下で培養を行い WST - 1 アッセイにて細胞数の経時的変化について解析を行う。さらに siRNA によってこれら蛋白の発現抑制を行った肝癌細胞株と膵癌細胞株を Krebs-Ringer Modified Buffer (低栄養環境) 下で培養し、WST - 1 アッセイにて細胞数の数的評価を行い、細胞死誘導に関して検討する。

### 動物モデルを用いた p62 蛋白と肝細胞増殖の解析

リソソーム蛋白分解酵素の1つを欠損させオートファジー機能の一部を抑制し p62 蓄積を誘導することが可能な Cathepsin L 欠損マウス (*Ct11* 欠損マウス) と wild type マウスを用いて、70% 肝部分切除術を行う。肝部分切除後の肝重量変化、肝組織切片の免疫組織学的染色による BrdU 陽性細胞数の割合を評価し、肝再生の変化について検討を行う。ウエスタンブロット法によって Cyclin D1, p62, cleaved-Notch, Hes1 の蛋白発現の変化について解析を行う。さらに肝組織より核蛋白と細胞質蛋白を抽出し、Nrf2 発現をウエスタンブロット法にて評価し、Nrf2 蛋白の核移行について評価した。

## 4. 研究成果

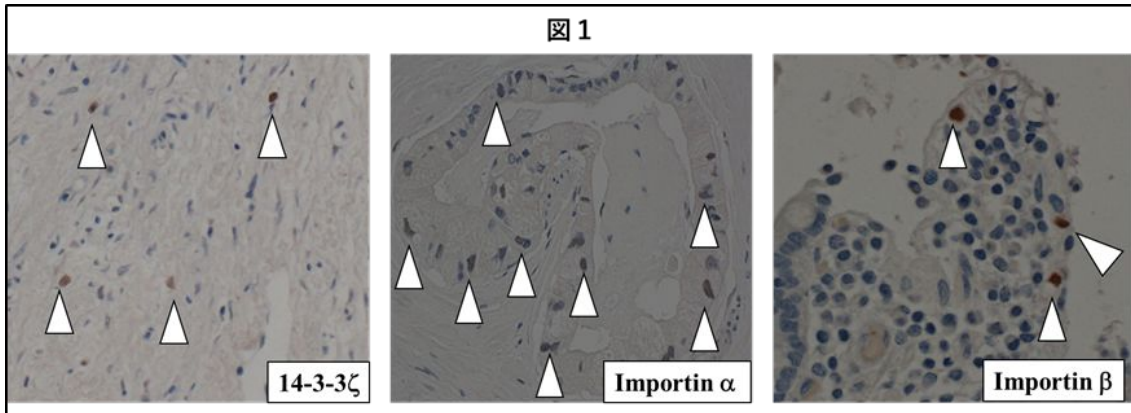
### 膵臓におけるオートファジー抑制による核マトリクス蛋白発現変化と病態生理学的意義の解明

#### 膵癌細胞株、肝癌細胞株を用いたオートファジー抑制による核マトリクス蛋白発現変化の解析

3-MA 添加によってオートファジー抑制を誘導した肝腫瘍細胞株 (HepG2) と膵癌細胞株 (panc-1) より核不溶性蛋白を抽出し 2 次元電気泳動を行った。さらに Atg7-siRNA を用いてオートファジー抑制を誘導した肝腫瘍細胞株 (HepG2) と膵癌細胞株 (panc-1) より核不溶性蛋白を抽出し 2 次元電気泳動を行った。3-MA 添加群で誘導される蛋白スポットと Atg7-siRNA によって誘導される蛋白スポットの発現が異なるため、より効率的にオートファジーを抑制する処置を選別するために 3-MA 処置細胞と Atg7-siRNA 処置細胞それぞれより細胞質蛋白を抽出し、オートファジーの分解基質である p62 蛋白の発現をウエスタンブロット法にて評価した。Atg7-siRNA 導入細胞群のほうが 3-MA 群よりも p62 発現が増加していたことから Atg7-siRNA 導入法のほうがよりオートファジー機能を効率的に抑制しているものと考えられたため、以後の解析は Atg7-siRNA 導入法で行うこととした。Atg7-siRNA 導入によるオートファジー抑制は核不溶性蛋白スポット数を劇的に増加させることがわかった。オートファジー抑制によって発現が増加する核マトリクス蛋白の数が膨大であったため、肝癌細胞株 (HepG2) と膵癌細胞株 (panc-1) においてともに発現が増加し、かつ動物モデルにおいても発現が増加した核マトリクス蛋白として 14-3-3、Importin 4、Importin 1 蛋白を同定したので以後、この3つの蛋白に着目し、解析を行うこととした。

#### ヒト検体を用いた核マトリクス発現と病態との関連性の解明

ヒト膵癌の検体を用いて、オートファジー抑制によって発現が増加する核マトリクス蛋白 14-3-3、Importin 4、Importin 1 蛋白の膵癌組織における発現について免疫組織染色によって評価を行った (図 1)。膵癌組織周囲に存在している正常の膵組織部ではこれらの蛋白の核への局在は認められなかった。しかし膵癌組織部では、これら核マトリクス蛋白が核に集積する細胞が観察された。なかでも Importin 4 がより核に局在している傾向にあり、14-3-3 は核にも局在するが、細胞質に局在している細胞も観察された。またこれらの蛋白が局在した核では核のサイズが大きい傾向にあった。また、これらの蛋白の発現と患者の年齢、性別との関連性は認められなかった。一方、これらの蛋白が核に発現している細胞が多い症例では、腫瘍径が大きい傾向にあったことから、これらの蛋白の核内発現は細胞増殖に関連している可能性が示唆された。しかし膵腫瘍組織部であってもこれらの蛋白が核内に検出されない細胞も混在することから、膵癌におけるこれらの核マトリクス蛋白の役割についてはさらなる検討を要すると考えられた。



### 核マトリクス蛋白と細胞増殖・細胞死との関連についての検証

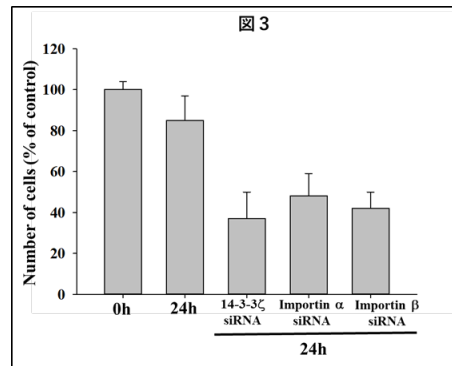
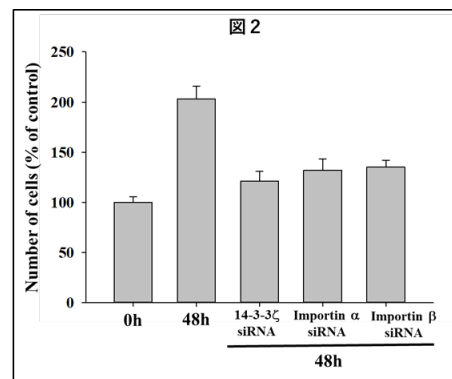
#### 細胞株を用いたオートファジー関連核マトリクス蛋白と細胞増殖・細胞死との関連についての検討

14-3-3、Importin 4、Importin 1 蛋白に対する siRNA を用いて、これらの蛋白をそれぞれ発現抑制した肝腫瘍細胞を通常の培養液下で培養し、48 時間後の細胞数の変化を WST-1 アッセイにて評価した。これらの蛋白の発現抑制は肝癌細胞株の増殖を有意に抑制することがわかった (図 2)。特に 14-3-3 の発現抑制は細胞増殖を強く抑制する傾向にあった。

さらに siRNA を用いて蛋白の発現抑制を行った肝癌細胞株を **Krebs-Ringer Modified Buffer (低栄養環境)**

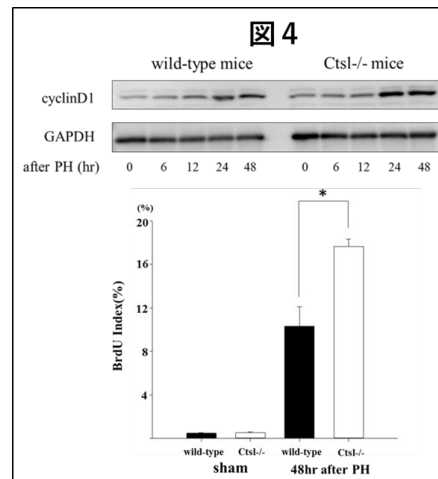
**下で培養し、細胞死誘導** に関して評価を行ったところ、

これら蛋白の発現抑制を行った肝癌細胞株では低栄養に対する細胞死が有意に強く誘導されることが分かった (図 3)。この実験でも特に 14-3-3 の発現抑制は細胞死を強く誘導する傾向にあった。以上のことから肝腫瘍細胞株ではオートファジー機能抑制において生じる細胞内環境変化に適応するために、核マトリクス蛋白変性を介して増殖促進や細胞死耐性を獲得するシステムを構築している可能性が示唆された。特にオートファジー基質蛋白 p62 が強発現している肝癌細胞株 JHH5 細胞株、膵癌細胞株 Panc-1 細胞株においてこれらの特性は強く観察されたことから肝癌細胞株や膵癌細胞株において細胞質への p62 蛋白蓄積が核マトリクス蛋白発現の変化に関連している可能性や p62 蛋白発現とこれらの核マトリクス蛋白が相関・協調し細胞増殖や細胞死誘導耐性を誘導している可能性が考えられた。そこで p62 蛋白と細胞増殖との関係について動物モデルを用いて検証を行うこととした。



#### 動物モデルを用いた p62 蛋白と肝細胞増殖の解析

リソソーム蛋白分解酵素の一部を欠損させオートファジー機能を部分的に抑制し p62 発現増加を誘導させるカテプシン L 欠損マウスでは、肝部分切除 (PH) 後の肝重量の回復が Wild type マウスと比較し有意に促進していることが分かった。さらにカテプシン L 欠損によって肝部分切除後の BrdU の核内取り込みと肝組織中の CyclinD1 発現がともに増加した (図 4) ことから、p62 蛋白蓄積が細胞増殖を促進したことによって肝重量が増加したものと考えられた。またカテプシン L 欠損によって Nrf2 の核内移行が誘導されること、活性型 Notch 発現が増加し、さらに Notch シグナルによって誘導される Hes-1 発現が増加したことから (図 5) オートファジーによる p62 増加は Nrf2-Notch シグナルの亢進を介して肝再生を促進させると考えられた。以上のことから、癌組織において発現が亢進しているこ

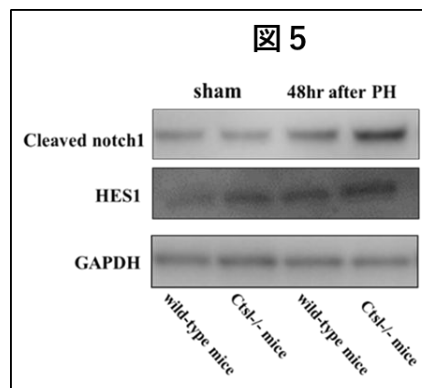


これらの核マトリクス蛋白は Nrf2-Notch シグナルと協調し、細胞増殖促進に寄与している可能性が示唆された。

これらの検討から、オートファジー抑制によって誘導される核マトリクス蛋白 14-3-3、Importin 4、Importin 1 は肝癌、膵癌組織においても検出される。

14-3-3、Importin 4、Importin 1 の核内蓄積は細胞増殖促進、細胞死抑制に関連する。オートファジー抑制によって生じる細胞質内の p62 蛋白蓄積も Nrf2-Notch シグナル活性化を介して細胞増殖に作用する。

14-3-3、Importin 4、Importin 1 の核内蓄積によって誘導される細胞増殖促進や細胞死抑制効果は p62 蓄積を介した Nrf2-Notch シグナル活性化と関連している可能性がある。ということがわかった。核マトリクス蛋白 14-3-3、Importin 4、Importin 1 は肝癌・膵癌の診断マーカーとしてだけでなく、治療標的ともなりうる可能性があると考えられた。



## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

1. **Sato T, Yamashina S, Izumi K, Ueno T, Koike M, Ikejima K, Peters C, Watanabe S. Cathepsin L-deficiency enhances liver regeneration after partial hepatectomy. Life Sci. 2019 Mar 15;221:293-300. doi: 10.1016/j.lfs.2019.02.040. Epub 2019 Feb 20.**

[学会発表](計 4 件)

1. 山科 俊平, 泉 光輔、福嶋浩文、青山友則、内山明、今一義、池嶋 健一、渡辺 純夫 オートファジー機能障害による核不溶画分における Importin 4、Importin 1、14-3-3 発現増加に関する生理学的機序についての検証、日本消化器病学会週間、2016
2. Toshifumi Sato, Shunhei Yamashina, Hirofumi Fukushima, Tomonori Aoyama, Akira Uchiyama, Kazuyoshi Kon, Kenichi Ikejima, Sumio Watanabe, Cathepsin L inhibitor improves liver regeneration impaired in fibrotic liver、アメリカ肝臓病学会、2017
3. 佐藤 寿史、山科 俊平、渡辺 純夫、肝再生研究の進歩 カテプシン L 欠損による肝部分切除後肝再生の促進作用とその機序について、日本消化器病学会週間、2017
4. 佐藤寿史、山科俊平、青山友則、内山明、今一義、渡辺純夫、池嶋健一、カテプシン L 阻害剤による肝部分切除後肝再生の促進作用についての検討、肝臓学会総会、2018

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：池嶋 健一

ローマ字氏名：**IKEJIMA, KENICHI**

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：**20317382**

研究分担者氏名：山科 俊平

ローマ字氏名：**YAMASHINA, SHUNHEI**

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：**30338412**

研究分担者氏名：今 一義

ローマ字氏名：**KON, KAZUYOSHI**

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号（**8**桁）：**30398672**

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。