

令和元年5月23日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09342

研究課題名(和文)細胞外マトリックスプロテオグリカンVersicanを標的とした肝臓の診断・治療

研究課題名(英文) Targeting extracellular matrix proteoglycan Versican for diagnosis and therapy of hepatocellular carcinoma

研究代表者

建石 良介 (TATEISHI, RYOSUKE)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：50444089

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞外マトリックスは癌の浸潤、転移に抑制的に働く一方で、その一部には促進的に働く機能的分子が存在することが明らかになりつつある。その一つであるVersicanは肝臓癌で転移や腫瘍進展への関与が示唆されている。本研究では肝臓で高頻度に活性化が認められるWntシグナル活性化下でSharpinという分子がbeta-cateninと結合することにより、共にVersicanの発現を亢進させている可能性を示し、肝臓でWntシグナルが活性化した条件下では、Sharpinが治療の標的となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓癌患者の生命予後は手術やラジオ波焼灼療法を中心とした局所療法による根治的治療により伸びているが、肝臓癌の浸潤や遠隔転移は、肝臓癌患者の予後を悪化させる主な原因の一つである。本研究では、肝臓癌の浸潤を引き起こすと考えられている分子である細胞外マトリックスプロテオグリカンの一つVersicanに着目し、その発現調節機序と新規治療標的としての可能性を示し、本分子を標的とした治療が肝臓癌患者の予後改善へ寄与できる可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Versican is a functional extracellular matrix proteoglycan that plays important roles in tumor progression and invasion. In this study, we demonstrated that Sharpin interacted with  $\beta$ -catenin and induced Versican transcription synergistically with Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation, potentially contributing to hepatocellular carcinoma development. Under Wnt pathway activation, Sharpin and Versican could be an attractive therapeutic target for hepatocellular carcinoma.

研究分野：肝臓

キーワード：細胞外マトリックス 浸潤 転移 Versican 細胞外マトリックスプロテオグリカン Sharpin

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌患者の生命予後は手術やラジオ波焼灼療法 (RFA; radiofrequency ablation)を中心とした局所療法による根治的治療、また抗ウイルス療法による肝予備能の温存により飛躍的に伸びている。しかしながら、いまだ肝細胞癌の血管・胆管内への浸潤や遠隔転移は、肝細胞癌患者の予後を悪化させる主な原因の一つである。当科の臨床データでも肝細胞癌を RFA で根治的に治療した患者の脈管浸潤は 1, 3, 5 年で 1.1%, 5.9%, 10.4%ときわめて高頻度で起きており予後不良因子の一つとなっている (Plos One 2014)。さらに遠隔転移を起こす患者の全生存期間の中間値は 8.1 ヶ月と著しく不良となっており (Cancer 2011)、肝癌患者のさらなる予後の改善には、このような脈管浸潤や遠隔転移の予防が重要な課題となっている。

細胞外マトリックス (ECM; extracellular matrix) とは、生体を構成する体細胞の外側に存在して細胞間を満たし生体組織を支持する線維状や網目状の構造体で、主にコラーゲン・ヒアルロン酸・プロテオグリカンなどからなっている。癌細胞は自身または間質細胞が産生する各種プロテアーゼ、主にメタロプロテアーゼを利用して ECM を分解して浸潤していく。ECM は癌の浸潤、転移には阻害的に働く一方で、ECM を構成する一部の分子には癌の浸潤に促進的に働く機能的分子が存在することが明らかになりつつある。たとえば ECM の主要な糖鎖成分であるヒアルロン酸は、乳癌や大腸癌など多くの癌組織において産生レベルが亢進しており、癌進展との関与が示唆されている。

2013-2015 年度の研究課題である「肝細胞癌における直鎖状ポリコピキチン鎖の役割の解明」での検討において、直鎖状ポリコピキチン鎖を形成する分子群の構成成分である Sharpin の高発現は細胞浸潤を誘導することを見出した。また高浸潤能を持つ Sharpin の安定発現株を用いてマイクロアレイ遺伝子発現解析を行い表現型の責任分子同定を試みたところ、Sharpin の高発現株では Versican という ECM プロテオグリカンの発現亢進が認められた。臨床検体でも Versican は癌部で発現が増加しており、さらに Sharpin 高発現株で Versican をノックダウンしたところ浸潤能が低下したことより、Versican が Sharpin による浸潤能亢進という表現型を説明しうる分子の一つである可能性がしめされた。

Versican は N 末端にヒアルロン酸結合ドメイン、C 末端部分に EGF 様ドメイン、C 型レクチン様ドメイン、および補体制御タンパク質様ドメインを持ち、その間の中央部にグリコサミノグリカン付加ドメインをもつ。ヒト Versican 遺伝子は選択的スプライシングの結果、グリコサミノグリカン付加ドメインの長さの異なる V0、V1、V2、およびグリコサミノグリカン付加ドメインを持たない V3 の 4 つの異なる isoform をとり、癌幹細胞マーカー CD44 のみならず、integrin beta 1, epidermal growth factor receptor, L-selectin, P-selectin などと結合し、ECM において多様な分子ネットワークを形成している。isoform はそれぞれ独自の生物学的機能を有していると考えられており、たとえば V1 は細胞増殖や抗アポトーシス作用を発揮するといわれている。一方で V2 は V1 とは逆に細胞増殖を抑制するとも考えられている。V3 はグリコサミノグリカン付加ドメインを有しないため、V1、V2 とは異なった機能を有していると考えられているがその詳細はいまだ明らかではない。

さらにこの分子は分泌タンパクであることも知られており、転移性肺癌細胞株 Lewis lung carcinoma から無血清培養上清に分泌され、マクロファージを活性化し炎症性サイトカイン TNF- $\alpha$  の産生を介して転移を促進することが明らかとなり、独自の機能を持っていると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、Versican の肝癌進展における役割を明らかにし、本分子を標的とした肝細胞癌の新規治療法の可能性を検討する。そのために、Versican の発現制御機構の解明、および Versican の診断への応用を検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) Versican 発現制御機構の解明

既報では Versican のプロモーター領域には転写因子 TCF/LEF, p53, そして AP-1 の結合配列があり、これらにより転写が調節されていると考えられているがその制御は組織特異的であり、肝臓での発現制御機構は明らかではない。

肝細胞癌における Versican 高発現の機序を解明するために、肝細胞癌でのこれらのシグナル伝達系の活性化メカニズムを検討する。

Versican のプロモーター領域を組み込んだ、ルシフェラーゼレポーターを用いたルシフェラーゼアッセイ

クロマチン免疫沈降 (ChIP; Chromatin immunoprecipitation) による、Sharpin の Versican のプロモーター領域への誘導の検討

## 細胞内での Wnt シグナル活性下での Sharpin の局在の検討

### (2) Versican の診断・分子標的の可能性の検討

Versican は分泌タンパクであり、癌の悪性度や転移能を反映するバイオマーカーになる可能性がある。当科の患者の血清中の Versican の濃度測定を ELISA 法 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) を用いて行い、臨床病理学的因子との関連を検討する。

## 4 . 研究成果

### (1) Versican 発現制御機構の解明

既報では Wnt シグナル経路の活性化が Versican の転写を亢進させており、我々の検討でも Wnt シグナル活性下では Versican の転写が亢進し、それは Sharpin の強制発現により協調的に増強された。さらに Sharpin はまた Wnt シグナルの構成因子の一つ beta-catenin と結合し Versican の転写調節に寄与している可能性が示唆された。

クロマチン免疫沈降では、Wnt シグナル活性下で beta-catenin が Versican のプロモーター領域に誘導されたが、今回の検討では明らかな Sharpin の誘導は認められなかった。

Sharpin は細胞質・核内両方に存在したが、Wnt シグナル活性下では細胞質に存在する Sharpin の一部が核内に移行し、beta-catenin と共存した。

以上より Versican は Wnt シグナル経路の活性化により発現が増強し、Sharpin は Wnt シグナル活性化で細胞質から核内に移動し beta-catenin と共に coactivator として Versican の発現を亢進させている可能性が示唆され、新しい機序を介して肝癌の浸潤を促進しているものと考えられた。

### (2) Versican の診断・分子標的の可能性の検討

既報では Versican の発現が早期の肝細胞癌で上昇しているという報告があり、早期の肝細胞癌診断の有用性に関して検討したが、ELISA 法では血清中の Versican を検出することができなかった。おそらくは血清中の濃度が低いためと推測され、今後、バイオマーカーとしての可能性を検討するには、高感度な検出系、もしくは血清中の Versican の濃縮が必要と考えられた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Fujiwara H, Tateishi K, Kato H, Nakatsuka T, Yamamoto K, Tanaka Y, Ijichi H, Takahara N, Mizuno S, Kogure H, Matsubara S, Nakai Y, Koike K.  
Isocitrate dehydrogenase 1 mutation sensitizes intrahepatic cholangiocarcinoma to the BET inhibitor JQ1. *Cancer Sci.* 2018;109:3602-3610. doi: 10.1111/cas.13784. 査読有

Fujiwara N, Nakagawa H, Enooku K, Kudo Y, Hayata Y, Nakatsuka T, Tanaka Y, Tateishi R, Hikiba Y, Misumi K, Tanaka M, Hayashi A, Shibahara J, Fukayama M, Arita J, Hasegawa K, Hirschfield H, Hoshida Y, Hirata Y, Otsuka M, Tateishi K, Koike K.  
CPT2 downregulation adapts HCC to lipid-rich environment and promotes carcinogenesis via acylcarnitine accumulation in obesity. *Gut.* 2018;67:1493-1504. doi: 10.1136/gutjnl-2017-315193. 査読有

Enooku K, Kondo M, Fujiwara N, Sasako T, Shibahara J, Kado A, Okushin K, Fujinaga H, Tsutsumi T, Nakagomi R, Minami T, Sato M, Nakagawa H, Kondo Y, Asaoka Y, Tateishi R, Ueki K, Ikeda H, Yoshida H, Moriya K, Yotsuyanagi H, Kadowaki T, Fukayama M, Koike K.  
Hepatic IRS1 and  $\beta$ -catenin expression is associated with histological progression and overt diabetes emergence in NAFLD patients. *J Gastroenterol.* 2018;53:1261-1275. doi: 10.1007/s00535-018-1472-0. 査読有

Uchino K, Tateishi R, Nakagomi R, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Shibahara J, Shiina S, Koike K.  
Serum levels of ferritin do not affect the prognosis of patients with hepatocellular carcinoma undergoing radiofrequency ablation. *PLoS One.* 2018;13:e0200943. doi: 10.1371/journal.pone.0200943. 査読有

Tanaka Y, **Tateishi R**, Koike K.  
Proteoglycans Are Attractive Biomarkers and Therapeutic Targets in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2018;19: E3070. doi: 10.3390/ijms19103070. 査読有

Sato M, **Tateishi R**, Yasunaga H, Matsui H, Horiguchi H, Fushimi K, Koike K.  
Mortality and hemorrhagic complications associated with radiofrequency ablation for treatment of hepatocellular carcinoma in patients on hemodialysis for end-stage renal disease: A nationwide survey. *J Gastroenterol Hepatol*. 2017;32:1873-1878. doi: 10.1111/jgh.13780. 査読有

Uchino K, **Tateishi R**, Fujiwara N, Minami T, Sato M, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Yoshida H, Moriya K, Shiina S, Omata M, Koike K.  
Impact of serum ferritin level on hepatocarcinogenesis in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res*. 2016;46:259-68. doi: 10.1111/hepr.12517. 査読有

Sato M, **Tateishi R**, Yasunaga H, Horiguchi H, Matsui H, Yoshida H, Fushimi K, Koike K.  
The ADOPT-LC score: a novel predictive index of in-hospital mortality of cirrhotic patients following surgical procedures, based on a national survey. *Hepatol Res*. 2017;47:E35-E43. doi: 10.1111/hepr.12719. 査読有

Tanaka Y, Tateishi K, Nakatsuka T, Kudo Y, Takahashi R, Miyabayashi K, Yamamoto K, Asaoka Y, Ijichi H, **Tateishi R**, Shibahara J, Fukayama M, Ishizawa T, Hasegawa K, Kokudo N, Koike K.  
Sharpin promotes hepatocellular carcinoma progression via transactivation of Versican expression. *Oncogenesis* 2016;5:e277. DOI: 10.1038/oncsis.2016.76. 査読有

Minami T, **Tateishi R**, Nakagomi R, Fujiwara N, Sato M, Enooku K, Nakagawa H, Asaoka Y, Kondo Y, Shiina S, Koike K.  
The impact of direct-acting antivirals on early tumor recurrence after radiofrequency ablation in hepatitis C-related hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2016;65:1272-1273. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.043. 査読有

〔学会発表〕(計 1 件)

田中 康雄、立石敬介、**建石良介**、小池和彦  
「新規癌関連遺伝子 Sharpin は細胞外マトリックスプロテオグリカン Versican の発現を介して肝癌進展に寄与する」  
第 54 回日本臨床分子医学会学術集会  
2017 年

〔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

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：田中 康雄

ローマ字氏名：TANAKA YASUO

所属研究機関名：東京大学医学部附属病院

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：40422290

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。