

令和元年9月12日現在

機関番号：35405

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18419

研究課題名(和文) 核内IKK を介した肝線維化と肝がん発症の制御機構

研究課題名(英文) Nuclear IKKbeta regulates DEN-induced hepatic carcinogenesis through the suppression of DNA-binding activity of HNF4alpha

研究代表者

土谷 佳弘 (TSUCHIYA, Yoshihiro)

広島女学院大学・人間生活学部・准教授

研究者番号：90611301

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)：我々が開発した肝細胞特異的なIKK 遺伝子の改変マウスでは、DENによる化学発がんの亢進がほとんど見られない。この分子機構を解析したところ、慢性炎症が進行している肝臓では、TNF や IL-1 により肝細胞特異的な転写因子であるHNF4 による遺伝子発現誘導が抑制されていることが、この発がん抑制の原因であることを見いだした

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に炎症は発がんを亢進するが、逆に炎症による組織障害が化学発がんの抑制につながる新たなケースが本実験により示された。炎症による肝特異的転写因子HNF4 の活性抑制が、シトクロムp450などの代謝系遺伝子の発現抑制をもたらし、これが発がん抑制に至ることまで解明した。この研究成果は、炎症による発がん制御において新しい分子機構の解明につながるものであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Gene analysis revealed that expression of hepatic cytochrome P450 (CYP) enzymes including Cyp2E1, which mediates the activation of chemical carcinogens, was markedly reduced in Tg-IKK hep. Injection of TNF or IL-1 in mice markedly suppress the expression of cyp genes in livers. Although HNF4 express normally in liver, its binding to the chromatin was prevented in livers in Tg-IKK hep and mice injected with TNF or IL-1. These results suggest that suppression of Cyp2E1 expression reduced DEN induced hepatocarcinogenesis in inflammatory conditions.

研究分野：生化学 分子生物学

キーワード：肝炎 肝がん 化学発がん

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝炎ウイルスの感染や非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) による慢性炎症は、肝組織の線維化を合併して最終的に肝細胞がん (HCC) に至る。HCC の発生は慢性炎症と密接に関連する。肝炎ウイルスの感染や、非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) などによる慢性炎症により肝線維化が進行し、肝硬変の病態を介して最終的に HCC に至る。しかし、どのような分子機構を介して HCC が発生するのかは未解明であり、このために HCC の発生を防止する方法はおろか、肝硬変に対する治療戦略も確立していない。

我々はこれまでに、炎症で重要な役割を果たす I κ B キナーゼ β (IKK β) 遺伝子を改変することにより、出生直後から肝細胞死が誘導されて、慢性炎症による肝線維化 (肝硬変) の病態を呈するマウスを樹立している。肝細胞特異的にストレス応答性 NF- κ B 経路のみが駆動される遺伝子改変マウス (*Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{Δhep}*) を作成した結果、出生後 4 週齢で肝小葉において広範な肝細胞死と肝炎が進行し、8 週齢後、肝線維化の進展と肝硬変の病態を呈することが明らかとなった。

興味深いことに、IKK β 遺伝子を肝細胞特異的に欠損したマウス (*IKK β ^{Δhep}*) ではジエチルニトロサミン (DEN) による化学発がんが亢進するのに対して、我々が開発した肝細胞特異的な IKK β 遺伝子の改変マウス (*TG-IKK β ^{Δhep}*) では、DEN による化学発がんの亢進がほとんど見られなかった (図 1)。

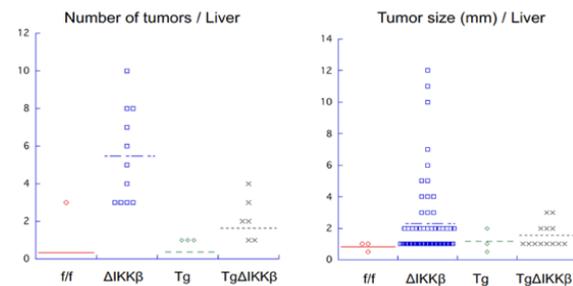


図 1. DEN 投与による化学肝発がん誘導実験

2. 研究の目的

本研究では、*Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{Δhep}* マウス (*TG-IKK β ^{Δhep}*) における DEN 投与による HCC の発症の抑制機構を解明するために、核内受容体 Hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) の活性制御機構の解析に焦点をあて、シトクロム p450 (Cyp) の発現低下の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{Δhep}* マウスの HCC 発生に対する DEN の影響について、① 免疫染色法、② DNA マイクロアレイ解析、③ クロマチン免疫沈降法 (CHIP) により解析を行なった。

(2) 炎症性サイトカイン (TNF α , IL-1 β) による HNF4 α の活性制御機構について CHIP により解析を行なった。

4. 研究成果

(1) *Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{Δhep}* マウスの DEN による HCC 発症抑制機構の解析

① *Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{Δhep}* マウスの肝臓における DEN による DNA 損傷の解析

f/f、*IKK β ^{Δhep}*、*Tg-NLS-IKK β KN (TG)*、*Tg-NLS-IKK β KN IKK β ^{Δhep} (TG-IKK β ^{Δhep})* マウスに DEN を投与し、24 時間後の肝臓における DNA 損傷について H2AX リン酸化をマーカーとした免疫染色法により解析を行なった。DEN 投与により *f/f*、*IKK β ^{Δhep}*、*TG* マウスの肝臓では顕著に H2AX リン酸化が誘導された。これに対して、*TG-IKK β ^{Δhep}* マウスの肝臓では DEN 投与により誘導される DNA 損傷が軽減されていることが明らかとなった (図 2)。

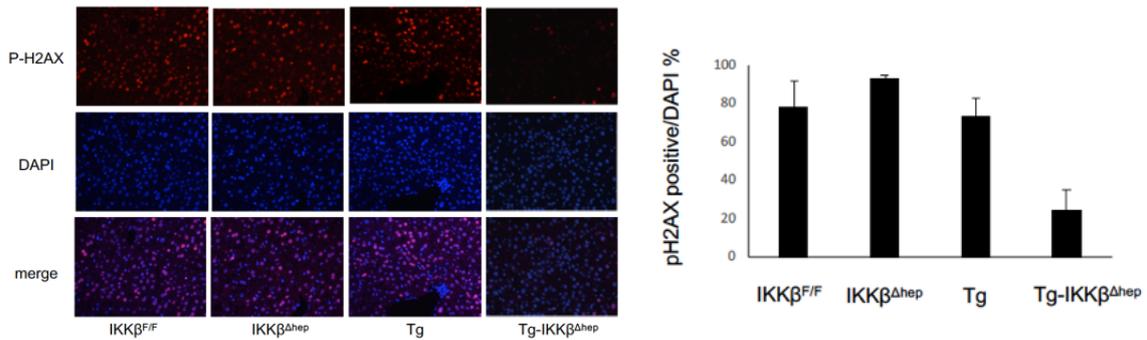


図2. 肝組織におけるDENによるDNA損傷の比較

② *TG-IKKβ^{Δhep}*マウスの肝臓における遺伝子発現のDNAマイクロアレイ解析

DNA マイクロアレイ解析より、コントロールのマウスと比較して、*TG-IKKβ^{Δhep}*マウスの肝臓においては、薬物代謝酵素である Cyp 遺伝子発現が低下していることが判明した。さらに、Cyp 遺伝子発現を制御する PXR、CAR などの核内受容体の遺伝子発現も抑制されていた (図 3)。一方で、PXR、CAR の上流の転写因子である Hepatocyte nuclear factor 4α (HNF4α) の遺伝子発現に変化しないことが判明した。これまでに Cyp2E1 欠損マウスに DEN を投与しても肝臓がんが抑制されることが報告されている。このことから Cyp の発現低下に伴い、変異原性による HCC 発症が抑制されると示唆された。

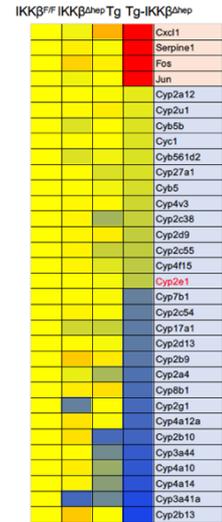


図3 DNAマイクロアレイ解析

③ *TG-IKKβ^{Δhep}*マウスの肝臓における HNF4α のクロマチン免疫沈降法 (CHIP) 解析

RNA 合成酵素である RNA ポリメラーゼ II (Pol II) と HNF4α の Cyp2E1, Cyp7a1, Cyp8b1, CAR のプロモーター領域に対する結合変化をみるために CHIP 解析を行なった (図 4)。それぞれのプロモーター領域に対して Pol II および HNF4α のクロマチン結合活性が低下しているが明らかとなった。このことから *TG-IKKβ^{Δhep}*マウスの肝臓では、HNF4α の活性低下により Cyp の発現が抑制され、このために DEN の代謝が阻害されて化学発がんが抑制されると考えられた。これらのことから、一般に炎症は発がんを亢進するが、逆に化学発がんに対して抑制的に働くことが示唆された。

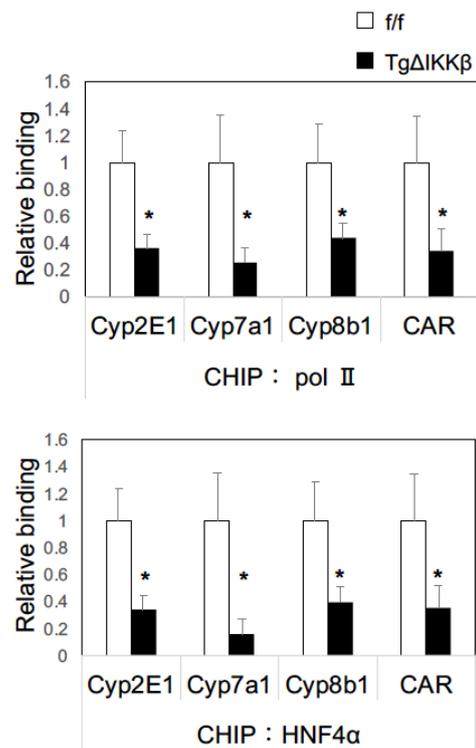


図4. *TG-IKKβ^{Δhep}*マウスの肝臓における Pol II と HNF4α のクロマチン結合の変化

(2) 炎症性サイトカインによる HNF4 α の活性制御機構

① 炎症性サイトカイン投与による肝臓の遺伝子発現の網羅解析

TG-IKK β ^{Δ hep} マウスでは慢性肝炎の発症しており、腫瘍壊死因子 TNF α などの炎症性サイトカインの産生が増加しているが明らかとなっている。そこで、炎症性サイトカインによる Cyp の遺伝子発現に対する影響を解析した。インターロイキン 1 β (IL-1 β) を尾静脈注射し、4 時間後の肝臓における遺伝子発現の変化を DNA マクロアレイ解析により網羅的に解析した (図 5)。TNF α および IL-1 β を投与したマウスの肝臓における Cyp 関連遺伝子の発現は、顕著に減少していることが明らかとなった。また、*TG-IKK β ^{Δ hep}* マウスと同様に、遺伝子発現を制御する PXR、CAR などの核内受容体の遺伝子発現も抑制されていた。興味深いことに、PXR、CAR の上流の転写因子である HNF4 α の遺伝子発現に変化は見られなかった。

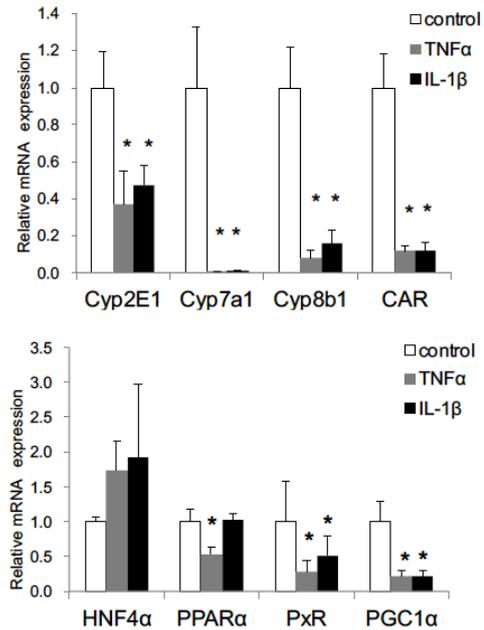


図 5. 炎症性サイトカインによる肝臓の遺伝子発現の変化

② 炎症性サイトカインによる Pol II と HNF4 α のクロマチン結合の変化

TNF α の投与後のマウス肝臓を回収し、Pol II と HNF4 α の Cyp2E1、Cyp7a1、Cyp8b1、CAR のプロモーター領域に対する結合変化を CHIP により解析を行なった (図 6)。TNF α の投与によって肝臓における Pol II と HNF4 α のクロマチン結合活性が低下しているが明らかとなった。慢性炎症が進行している肝臓では、TNF α や IL-1 β により肝細胞特異的な転写因子である HNF4 α による遺伝子発現誘導が抑制されていることが、この発がん抑制の原因であることを見いだした。興味深いことに、遺伝子発現の抑制は HNF4 α の活性阻害に起因するものではなく、炎症に伴うエピジェネティクスな変化によるクロマチン構造の改変が関与している可能性が見出された。

これらのことから、慢性炎症による肝特異的転写因子 HNF4 α の活性抑制が、Cyp などの代謝系遺伝子の発現抑制をもたらし、これが発がん抑制に至ることが示唆された。この研究成果は、炎症による発がん制御において新しい分子機構の解明につながるものと考えられた。

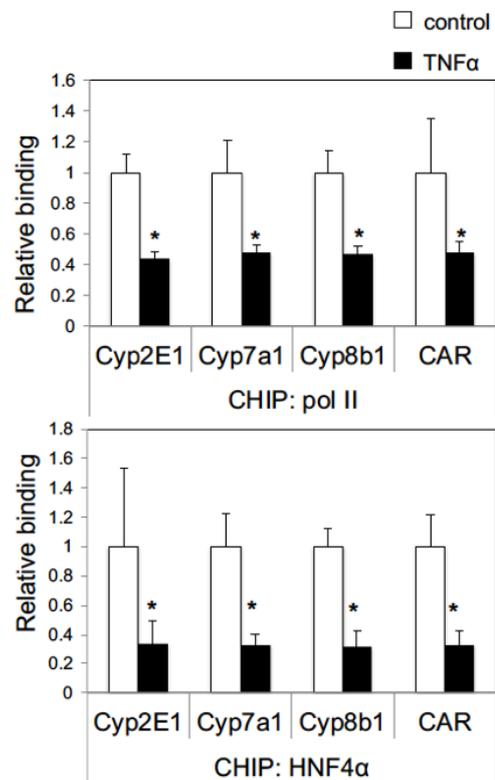


図 6. 炎症性サイトカイン投与による Pol II と HNF4 α のクロマチン結合の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計2件）

- ① Kanamoto Mayu, Tsuchiya Yoshihiro, Nakao Yuki, Suzuki Takafumi, Motohashi Hozumi, Yamamoto Masayuki, Hideaki Kamata. Structural instability of I κ B kinase β promotes autophagic degradation through enhancement of Keap1 binding. PLoS ONE 13(11) e0203978, 2018. (査読有) <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203978>
- ② Yoshihiro Tsuchiya, Keiko Osaki, Mayu Kanamoto, Yuki Nakao, Ena Takahashi, Toru Higuchi and Hideaki Kamata. Distinct B Subunits of PP2A Regulate the NF- κ B Signaling Pathway through Dephosphorylation of IKK β , I κ B α , and RelA. FEBS Letters 591, 2017. (査読有) <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12912>

〔学会発表〕（計4件）

- ① 土谷佳弘、金井昭教、金輪真佐美、外丸 祐介、前田慎、鎌田英明, 「Chronic inflammation in liver of IKK β transgenic mice suppresses chemical carcinogenesis by changes in gene expression」 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017), 神戸, 2017.12.8
- ② 土谷佳弘, 松永泰花, 中津祐介, 鎌田英明, 「IKK β 遺伝子改変マウスにおける肝線維化誘導と肝がん抑制機構」 第39回 日本分子生物学会年会, 横浜, 2016.11.30
- ③ 土谷佳弘, 松永泰花, 外丸祐介, 前田慎, 鎌田英明, 「Suppression of chemical hepatocarcinogenesis in transgenic mice expressing nuclear-localized kinase negative IKK β 」 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016.10.06
- ④ 土谷佳弘, 浅野知一郎, 鎌田英明, 「肝細胞特異的 IKK β 遺伝子改変マウスにおける酸化ストレスと細胞死の発生と肝細胞がんの抑制」 第89回日本生化学大会, 仙台, 2016.9.26.

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：鎌田 英明

ローマ字氏名：KAMATA Hideaki

所属研究機関名：広島大学

部局名：医歯薬保健学研究院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：10233925