

平成30年6月14日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19346

研究課題名(和文)小胞体ストレス応答を標的とした新規肝細胞癌治療薬の探索

研究課題名(英文) Explore new therapies targeting endoplasmic reticulum stress response for Hepatocellular Carcinoma

研究代表者

ZHANG YIZHOU (Zhang, Yizhou)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・研究員

研究者番号：70711117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではgenome-wide transcriptome profilesに基づいて、小胞体ストレスセンサー-BBF2H7の肝癌促進機序を解明した。BBF2H7は肝癌組織において過剰発現し、細胞核内で蓄積することを確認した。BBF2H7の高発現レベルは悪性度の高いHoshida S2肝癌サブクラスと強い関連を持ち、臨床的に予後不良に繋がることがわかった。分子レベルの解析により、プロセシング産物であるBBF2H7の部分断片の一種がAP-1構成蛋白と競争的に結合することによって、間接的にp53蛋白の安定性を抑制した。この部分断片が新たな肝細胞癌治療ターゲットとしての可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Using genome-wide transcriptome profiles and in vitro validation, we elucidated the mechanism of how ER stress transducer CREB3L2/BBF2H7 promotes hepatocarcinogenesis. BBF2H7 is over-activated in hepatocellular carcinoma (HCC), and is associated with an aggressive HCC subtype correlating with poor clinical outcome. At the molecular level, we found a partial fragment of BBF2H7 to be competitively bound to a subunit of AP-1, thus blocking AP-1 transcriptional activity and indirectly suppressing the stability of p53. In rescue experiments, we demonstrated that this fragment is indispensable to the proliferation of HCC, suggesting a potential target for the treatment of this common cancer.

研究分野：医歯薬学

キーワード：肝細胞癌 小胞体ストレス BBF2H7 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

進行性肝細胞癌に対するソラフェニブとプロテアソーム阻害薬の併用療法が試みられ、抗腫瘍効果の増強が報告されたが、プロテアソーム阻害薬による小胞体ストレスを介したアポトーシスは、正常細胞にも生じることから、副作用等の問題が残っている。現段階では、癌細胞と正常細胞の小胞体ストレス機構の差異は不明であり、癌細胞特異的な小胞体ストレス制御メカニズムの解明は新規治療薬の開発につながる可能性が高い。

2. 研究の目的

近年、我々は小胞体ストレスセンサーの一つである BBF2H7 が骨芽細胞分化初期段階で小胞体ストレス依存的に発現誘導され、軟骨細胞分化・増殖促進に関与することを見出した。その後の研究から、BBF2H7 は肝細胞癌を含め数種類の固形癌で発現亢進し、癌細胞核内に異常蓄積することを発見した。さらに、肝癌細胞株 HepG2 と Huh7 において、BBF2H7 の発現が抑制されると、細胞増殖が顕著に低下することも観測できた。以上の結果から、BBF2H7 の異常発現を抑制することで肝癌細胞特異的な小胞体ストレス応答を阻害し、ストレス応答システムを介した癌細胞増殖を特異的に抑制できる可能性が考えられる。本研究では臨床応用を念頭におき、BBF2H7 を標的とした新たな治療法を探る。

3. 研究の方法

(1) 肝癌細胞における BBF2H7 過剰活性化の生理/臨床的な意味の解明

BBF2H7 の発現レベルと肝細胞癌の臨床転帰との関連性の解析：374 人の肝癌組織 transcriptome prolife を用いて、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) を行う。BBF2H7 の発現レベルと肝癌サブタイプおよび臨床経過/予後の関連を調べる。

小胞体ストレス応答関連遺伝子発現の解析：内因性 BBF2H7 の発現を knockdown できる siRNA を設計し、肝癌細胞株 HepG2 に導入する。そして knockdown 細胞株と対照株に生じる増殖、細胞周期、アポトーシスの相違を検討する。具体的には、細胞増殖速度、細胞周期遺伝子の発現、抗アポトーシス関連遺伝子、細胞内シグナル伝達への影響などを解析し、小胞体ストレスセンサー BBF2H7 を起点とするシグナルが肝癌細胞内ストレス応答システムへの影響を調べる。

(2) 肝細胞癌における BBF2H7 機能ドメインの解析

細胞増殖促進機能を持つ BBF2H7 断片の同定：小胞体ストレス依存的に BBF2H7 が膜内切断を受ける。プロセッシング産物であ

る N 末端断片と C 末端断片の発現プラスミドを構築し、肝癌細胞株 HepG2 に導入した後、薬剤耐性マーカーで N 末端あるいは C 末端断片をそれぞれ安定に発現している細胞株を選別する。BBF2H7 siRNA を、上記樹立した N 末端および C 末端断片安定発現細胞に導入し、内因性 BBF2H7 の発現をブロックする。Live-cell imaging system を用いて二種類の安定発現細胞株の増殖速度、アポトーシスを観測し、N 末端断片と C 末端断片の発現における小胞体ストレス応答の違いを解析する。BBF2H7 機能ドメインの肝癌増殖に及ぼすメカニズムの同定：肝癌細胞株 siRNA による BBF2H7 の機能損失が細胞分裂およびアポトーシスシグナル伝達への影響を検討し、その中で BBF2H7 機能ドメインがどのような役割を演じるかを調べる。

4. 研究成果

(1) 肝癌細胞における BBF2H7 の過剰活性化とその臨床的な意味：

ヒト肝癌組織を用いて、BBF2H7 の発現および局在を免疫染色法で調べた。肝癌隣接部の正常組織では BBF2H7 の発現が細胞内に均等に分布しているの 비해、癌組織での BBF2H7 の発現は亢進し、膜内切断された細胞質側ドメインが核へ移行していることが確認された (図 1)。Gene Set Enrichment Analysis

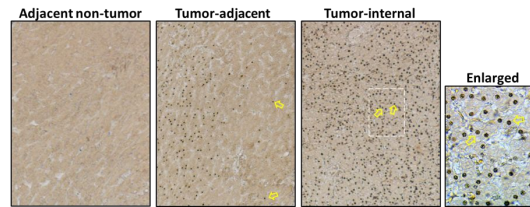


図 1. 肝癌組織における小胞体ストレスセンサー BBF2H7 の発現

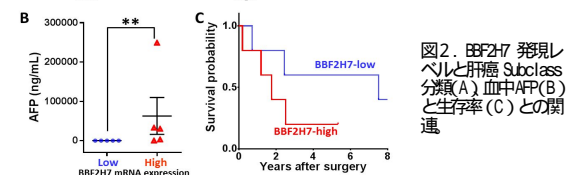
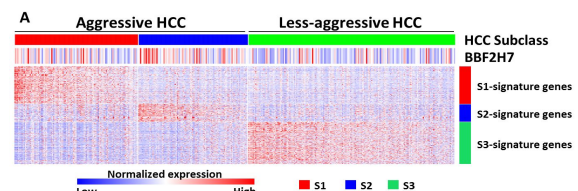


図 2. BBF2H7 発現レベルと肝癌 Subclass 分類 (A)、血中 AFP (B) と生存率 (C) との関連

から、BBF2H7 発現レベルの高い症例は悪性の高い Subclass 2 に分類され、血中 AFP 値および死亡率は BBF2H7 発現の低い症例と比べ有意に高いことがわかった (図 2)。

(2) BBF2H7 は肝細胞癌の増殖、抗アポトーシスを促進する

Real-Time PCR で各細胞株間 BBF2H7 mRNA の発現を測定した結果、ヒト肝癌 Huh7 および HepG2 細胞の BBF2H7 の発現レベルがヒト胚性腎臓

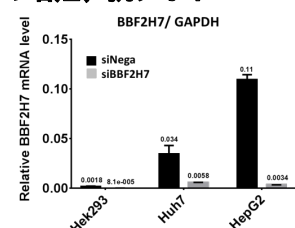


図 3. 各細胞株における BBF2H7 mRNA の発現。

Hek293 細胞と比べ、それぞれ20倍と60倍ほど亢進している(図3)ことがわかった。siRNAを用いてBBF2H7の発現をknockdownすることで肝癌細胞株Huh7とHepG2の増殖が著明に低下したのに対し、Hek293細胞の増殖は亢進した(図4)。さらにトポイソメラーゼII阻害剤Etoposideでアポトーシスを誘導する際、BBF2H7 siRNA

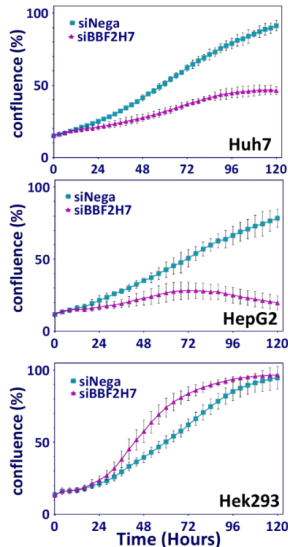


図4. BBF2H7 knockdownによる、Hek293, Huh7, HepG2細胞増殖スピードの推移。

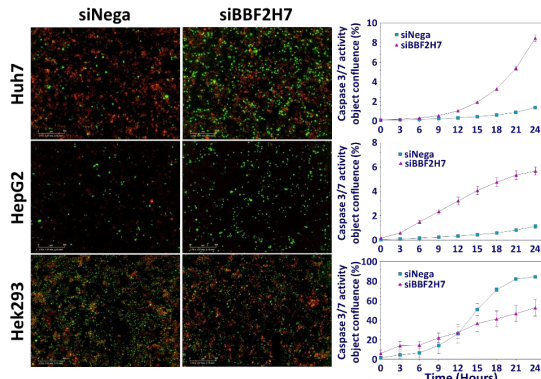


図5. Hek293, Huh7, HepG2細胞にBBF2H7 siRNAを導入し、72時間後にトポイソメラーゼII阻害剤Etoposideを細胞培養上清に添加した。CellEvent™ Caspase 3/7 Green Detection Reagentでアポトーシス細胞を標識し、Live-cell imaging systemでEtoposide添加後から24時間の間のcaspase3/7の活性を観測した。標識色素: 緑: caspase3/7; 赤: mitochondria。

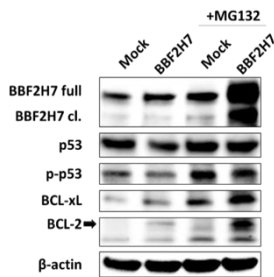


図6. HepG2細胞においてBBF2H7のp53, p-p53, BCL-xL, BCL-2の発現への影響。

の導入によってHek293細胞でcaspase3/7活性が低下していたが、Huh7とHepG2細胞のcaspase3/7活性(緑)が著明に上昇した(図5)。以上よりBBF2H7が肝癌細胞の増殖およびアポトーシスに影響を与えることが

明らかになった。BBF2H7の過剰発現は癌抑制遺伝子であるp53のリン酸化を抑制し、抗アポトーシス分子Bcl-2とBCL-xLの発現を促進させたことが蛋白レベルの解析によりわかった(図6)。またmRNAレベルで、細胞周期遺伝子cyclin A2, cyclin B1およびアポトーシス誘導遺伝子NOXA, PUMAの発現がBBF2H7のknockdownによって著明に変化した(図7)。BBF2H7のp53リン酸化の抑制はBBF2H7とAP-1の構成蛋白cJunとの競合的結合にあることが示され(図8)、細胞増殖や抗アポトーシスに関与することを示唆した。その反面、Hek293細胞においてBBF2H7のknockdownはcyclin A2, cyclin B1, NOXA, PUMAの発現に影

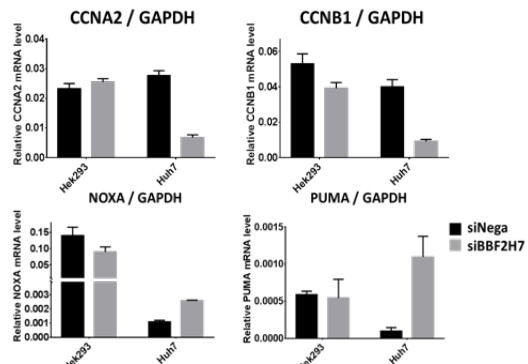


図7. HepG2細胞においてcyclin A2, cyclin B1, NOXA, PUMAの発現がBBF2H7 knockdownによって顕著に変化した。

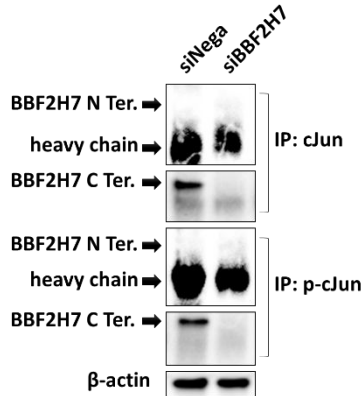


図8. 抗cJunおよび抗p-cJun抗体を用いて、HepG2 cell lysateの免疫沈降を行い、抗BBF2H7 N末端抗体と抗BBF2H7 C末端抗体で抗原抗体複合体をblotした。

響を与えなかった。**(3)BBF2H7 C末端断片が細胞増殖促進機能を持つ** 小胞体ストレス依存的にBBF2H7が膜内切断を受ける。プロセシング産物であるN末端断片

とC末端断片をそれぞれ安定に発現している細胞株(N2株とC5株)を樹立した。BBF2H7 siRNAで内因性BBF2H7の発現を抑制しN2株とC5株の細胞増殖能力の違いを観察したところ、N2株の増殖速度がBBF2H7 siRNAで大幅に抑制されたのに対し、C5株はほぼその影響を受けずwild type細胞とほぼ同等な増殖速度を示した(図9)。

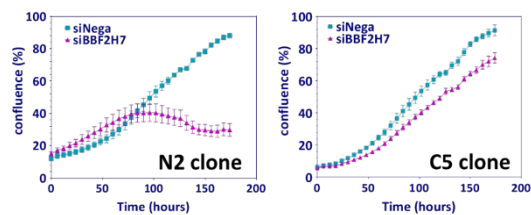


図9. BBF2H7 N末端断片或はC末端断片をそれぞれ安定に発現している細胞株(N2株とC5株)へBBF2H7 siRNAを導入し、細胞増殖をLive-cell imaging systemで観測した。

本研究はヒト肝癌細胞とヒト胚性腎臓細胞における小胞体ストレス応答の差異に着目し、BBF2H7の肝癌増殖に及ぼすメカニズムを解明した。Hedgehog signalingを介した細胞増殖制御効果を示した既報と異なり、本研究はBBF2H7と転写因子AP-1とのinteractionおよびp53 signalingへの影響を見出した。機能性BBF2H7の欠失により、肝癌細胞において増殖が停止したうえ、アポトーシスが早期に惹起され速やかに死滅に至った。これに基づいて、肝癌を含めBBF2H7が高発現している癌細胞に対して特異性の高い薬物開発につながるが大いに期待できる。さらに

今回は BBF2H7 C 末端断片が細胞増殖を促進できることを証明した。現在、我々は細胞増殖を制御できる BBF2H7 機能ドメインの同定を進めている。今回の実験結果を踏まえ、癌進行を抑えるゲノム編集の応用の可能性が開けば、BBF2H7 の異常発現を抑える新規癌分子標的治療薬の開発が期待できる。

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 4 件)

1. Masuda K, Ono A, Aikata H, Kawaoka T, Nelson Hayes C, Teraoka Y, Daijo K, Nakamura-Inagaki Y, Morio K, Fujino H, Kan H, Uchida T, Masaki K, Kobayashi T, Nakahara T, Makokha GN, Zhang Y, Nagaoki Y, Miki D, Tsuge M, Hiramatsu A, Imamura M, Abe-Chayama H, Kawakami Y, Ochi H, Chayama K. Serum HMGB1 concentrations at 4 weeks is a useful predictor of extreme poor prognosis for advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib and hepatic arterial infusion chemotherapy. *J Gastroenterol.* 2018 Jan;53(1):107-118. [査読有]
2. Kurihara M, Tsuge M, Murakami E, Mori N, Ohishi W, Uchida T, Fujino H, Nakahara T, Abe-Chayama H, Kawaoka T, Miki D, Hiramatsu A, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Zhang Y, Makokha GN, Hayes CN, Chayama K. The association between serum cytokine and chemokine levels and antiviral response by entecavir treatment in chronic hepatitis B patients. *Antivir Ther.* 2017 Sep 21. doi: 10.3851/IMP3196. [Epub ahead of print] [査読有]
3. Uchida T, Imamura M, Hayes CN, Hiraga N, Kan H, Tsuge M, Abe-Chayama H, Zhang Y, Makokha GN, Aikata H, Miki D, Ochi H, Ishida Y, Tateno C, Chayama K. Persistent Loss of Hepatitis B Virus Markers in Serum without Cellular Immunity by Combination of Peginterferon and Entecavir Therapy in Humanized Mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017 Aug 24;61(9). pii: e00725-17. doi: 10.1128/AAC.00725-17. [査読有]
4. Tsuge M, Hiraga N, Uchida T, Kan H, Miyaki E, Masaki K, Ono A,

Nakahara T, Abe-Chayama H, Zhang Y, Naswa MG, Kawaoka T, Miki D, Imamura M, Kawakami Y, Aikata H, Ochi H, Hayes CN, Chayama K. Antiviral effects of anti-HBs immunoglobulin and vaccine on HBs antigen seroclearance for chronic hepatitis B infection. *J Gastroenterol.* 2016 Nov;51(11):1073-1080. [査読有]

[学会発表](計 2 件)

1. Yizhou Zhang, C Nelson Hayes, Tadahiko Yoshima, Masataka Tsuge, Hiromi Abe-Chayama, Kazuaki Chayama. New insights on the role of endoplasmic reticulum stress response in development of hepatocellular carcinoma. AASLD LiverLearning, Oct 20, 2017; 194249
2. Yizhou Zhang, Kazuaki Chayama. Hepatocellular Carcinoma Promotion by Endoplasmic Reticulum Stress Transducer BBF2H7. *AASLD LiverLearning*. Nov 11, 2016; 143347. Boston, USA, 2015.

[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]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

張 奕宙 (Zhang, Yizhou)

広島大学・医歯薬保健学研究科・研究員
研究者番号：70711117

(2)研究分担者

該当なし