

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K15102

研究課題名(和文)肝細胞癌早期再発マーカートランスグルタミナーゼ2の腫瘍生物学的意義と臨床的意義

研究課題名(英文)Biological and clinical significance of transglutaminase 2 as a marker for early recurrence of hepatocellular carcinoma

研究代表者

山口 裕美(YAMAGUCHI, Hiromi)

日本大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90547118

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):肝細胞癌早期再発へのTGM2寄与メカニズムを明らかにするため、JHH7由来TGM2高発現細胞株(shCont)と低発現株(shTGM2)の比較解析を行った。shContはshTGM2と比較し有意に細胞増殖能が高く、Wnt/ β -catenin signalアンタゴニストであるDKK family遺伝子の発現低下が観察された。また、hTGF- β 1による刺激により、shControl、shTGM2ともTGM2の発現量が上昇した。以上の結果から、TGM2は腫瘍微小環境におけるWnt/ β -cateninシグナルの異常やTGF- β 等の液性因子に応答し、腫瘍悪性化に間接的に関与している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TGM2が肝細胞癌早期再発群で高発現する意義と、再発に寄与するメカニズムは未知である。

今回、TGM2高発現の肝癌細胞は、Wnt/ β -catenin pathwayやTGF- β pathwayに応答している可能性が示された。これらのsignaling pathwayはがん微小環境において重要な役割を果たしており、TGM2もこれらのpathwayの異常に連動して腫瘍の悪性化に間接的に寄与している可能性がある。今後は関連する分子の発現変化を観察することで肝細胞癌早期再発診断マーカーとしての有用性を確立し、また各シグナル伝達に関わる分子を標的とした肝細胞癌再発予防に繋がる可能性があるものと考えられる。

研究成果の概要(英文):To elucidate the TGM2 contribution to early hepatocellular carcinoma recurrence, We performed a comparative analysis between TGM2-high expression cell line (shCont) and TGM2-low expression cell line (shTGM2), derived from the liver cancer cell line JHH7. The shCont cells showed significantly higher cell proliferation ability and the lower mRNA levels of Wnt/ β -catenin signal antagonists DKK family genes, compared to shTGM2. Recombinant hTGF- β 1 stimulation resulted in an increase of TGM2 expression in both shControl and shTGM2 cells. These results suggest that TGM2 may respond to signaling pathways changed under cancer-stromal interaction (such as Wnt/ β -catenin pathway and TGF- β pathway) and indirectly contribute to tumor malignancy.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：トランスグルタミナーゼ2 肝細胞癌 早期再発 Wnt/ β -catenin signaling TGF- β がん微小環境

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の治療は外科的切除が第一選択であるが、再発頻度が高く予後は悪い。そのため、肝細胞癌の再発・発がんに関わる因子を明らかにすることが、この病気を制御する上で重要である。我々はこれまでに HCV 感染による肝細胞癌発癌・再発予測因子を明らかにすべく、主にプロテオーム解析技術を用いた研究を行ってきた。早期に再発する再発早期群と、長期に亘って再発を起こさない再発遅延群との間で初発癌のタンパク質発現にいかなる違いがあるかを明らかにすべく、プロテオーム発現解析を行った結果 1 年以内に早期再発する症例では、4 年以上再発しない遅延群と比べて「トランスグルタミナーゼ 2 (TGM2)」タンパク質が高発現であると判明した (Yamaguchi et al., 2017)。

更に、TGM2 発現肝癌細胞の肝がん組織内での分布を確認したところ、癌組織内に散在するのではなく、癌間質近傍に集団をなして限局していた。これは、TGM2 陽性癌細胞が、がんの増殖や転移と関連する「reactive stroma」と深く関わると推測された。肝細胞癌の早期再発には、TGM2 陽性肝癌細胞と間質との相互作用が関与し、転移浸潤が起こりやすい「微小環境」が構築されている可能性が示唆された。

2. 研究の目的

TGM2 が肝細胞癌早期再発群で高発現する意義と、再発に寄与するメカニズムは未知である。本研究の目的は、TGM2 がどのようなシグナル伝達系を介して肝細胞癌の早期再発に働いているのか、特に腫瘍周囲の微小環境との相互作用に着目して、その生物学的意義を明らかにすることである。また、TGM2 を始めとする関連分子が早期再発する肝細胞癌の組織中で発現変化することを明らかにできれば、早期再発診断マーカーとしての有用性を確立できる可能性があり、その臨床的意義も大きい。

3. 研究の方法

肝癌細胞株 JHH7 に TGM2 の shRNA を導入した TGM2 低発現細胞株 (shTGM2) と control shRNA を導入した TGM2 高発現細胞株 (shCont) を用いて、細胞の増殖及び移動能の比較を行った。また、GeneChip array を用いた網羅的遺伝子発現パターンの比較解析を実施した。更に培地中に recombinant Human TGF- β 1 を添加し、TGM2 及び上皮間葉転換 (EMT) 関連遺伝子の発現変化を観察した。

4. 研究成果

shCont と shTGM2 の細胞増殖能を比較すると、shTGM2 ではわずかにではあるが統計的に有意に細胞増殖能が低下していた。しかし、異なる血清ロットを使用し培養した場合、増殖能の差が観察されなくなった。移動能は両者の間で差が見られなかった。

GeneChip arrayにて遺伝子発現パターンを網羅的に比較し、real time RT-PCRで発現量を確認したところ、shContではWnt/ β -cateninシグナルアンタゴニストであるDKK family 遺伝子の発現が低下していた(図1.)。また、発現量に差があった約800のprobe setを対象にpathway analysisを実施したところ、TGM2発現量の違いによりp53 pathwayに関連する遺伝子群の変動があることが分かった。

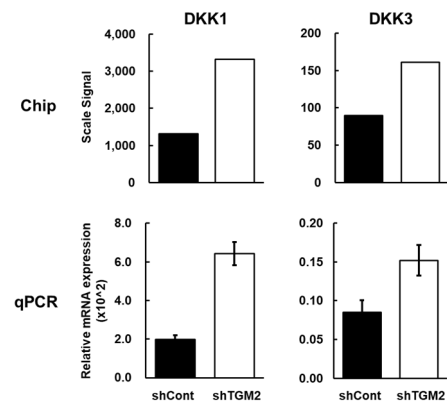


図1. Wnt/ β -cateninシグナルアンタゴニストであるDKK family 遺伝子の発現低下

更に、Recombinant hTGF- β 1を培地に加え細胞を刺激したところ、shCont, shTGM2ともTGM2の発現量が上昇したが、依然両者の発現量には明確な差があった(図2.)。乳癌ではTGF- β 下流での上皮間葉転換(EMT)にはTGM2が必須との報告があるため(Kumar et al., 2010)、肝癌由来JHH7細胞株でのEMT関連遺伝子の発現変化を確認したが、HIF1AやN-cadherin、Vimentin遺伝子の発現の亢進はTGM2量に非依存的にshCont, shTGM2ともに見られた。

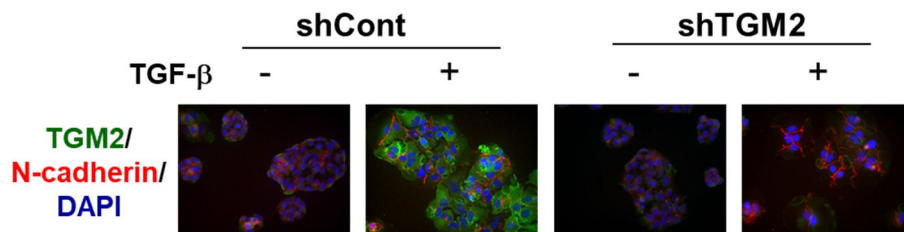


図2. TGF- β 1刺激下におけるTGM2及びN-cadherinの発現変化

細胞から分泌された潜在型TGF- β は、latent TGF β -binding protein 1 (LTBP1)などのECMタンパク質と複合体を形成することが知られている。TGM2はLTBP1やFibrillinの架橋を介し、TGF- β の活性化に関与すると考えられている(Cairns et al., 2022)。TGF- β などの液性因子がTGM2発現亢進をもたらし、TGM2が更にTGF- β の活性レベルに影響を与えるTGF- β とTGM2相互作用が肝癌微小環境でも生じている可能性があり、肝細胞癌ではTGM2は腫瘍微小環境におけるWnt/ β -cateninシグナルの異常や活性化したTGF- β 等の液性因子に応答し、腫瘍悪性化に間接的に関与している可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山口裕美, 阿部百合子, Ramiro J.G. Duarte, 高田伊知郎, 秦咸陽, 小嶋聡一, 横島誠, 江角真理子
2. 発表標題 早期再発肝癌に発現亢進していたトランスグルタミナーゼ2の肝細胞癌培養細胞における機能解析
3. 学会等名 第 42 回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------