

令和 2 年 7 月 15 日現在

機関番号：83301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15777

研究課題名（和文）血管内皮細胞が肝発がん・再発に関わるメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism by which vascular endothelial cells are involved in liver carcinogenesis/recurrence

研究代表者

西川 昌志（Nishikawa, Masashi）

独立行政法人国立病院機構（金沢医療センター臨床研究部）・その他部局等・研究員

研究者番号：90794511

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）：C型肝炎ウイルス排除達成（SVR）群とSVR後肝癌群の網羅的メチル化解析、および発現量解析にて今回TMEMを同定した。TMEMは新規かつ機能未知の遺伝子である。TMEMは腫瘍浸潤血管内皮細胞に発現が見られ、TMEM高発現群で有意に肝癌無再発期間が短期であった。TMEM過剰発現血管内皮細胞は、腫瘍形成を有意に亢進することが確認できた。TMEMは、ERストレス経路を介して腫瘍形成を亢進することが示された。TMEMは、肝発がん及び肝細胞癌の治療標的に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

C型肝炎ウイルス排除達成（SVR）後の肝発がんが社会的問題となっている。SVR後肝組織を用いた網羅的メチル化解析により今回同定したTMEMは新規かつ機能未知の遺伝子であるが、我々の研究によりTMEMが腫瘍浸潤血管内皮細胞に発現し、肝発がんに関与していることを確認した。したがって、TMEMは肝発がん及び肝細胞癌の治療標的になり得ることが示唆され、臨床応用により治療へとつなげる可能性があると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We identified TMEM this time by comprehensive methylation analysis of the group achieving sustained viral response (SVR) and HCC group after achieving SVR, and expression level analysis. TMEM is a novel gene of unknown function. TMEM was found to be expressed in tumor-infiltrating vascular endothelial cells, and the recurrence-free period of liver cancer was significantly short in the high TMEM-expressing group. It was confirmed that TMEM-overexpressing vascular endothelial cells significantly promote tumor formation. TMEM has been shown to enhance tumorigenesis via the ER stress pathway. It was suggested that TMEM could be a therapeutic target for liver carcinogenesis and hepatocellular carcinoma.

研究分野：肝発がん

キーワード：肝発がん SVR メチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

C型肝炎ウイルス(HCV)感染は高率に慢性肝炎を惹起し、肝硬変・肝癌の誘因となる。C型慢性肝炎に対する治療法が格段に進歩し、従来のペグインターフェロン+リバビリンの2剤から、直接抗ウイルス剤(Direct Antiviral Drug: DAA)へ移行した。治療によりHCV排除を示すSustained viral response (SVR)状態になると、HCVによる肝臓への慢性炎症が除去され肝癌発症は有意に抑制される。SVR症例が増え、肝癌発症例は将来減少すると予測されたが、SVR状態にも関わらず肝癌を発症する例が存在する。治療によりウイルスを排除したにも関わらずなぜ肝癌を発症するのか、肝癌の病態形成機序解明は重要な課題である。

また、腫瘍形成には遺伝子の突然変異に加えて、エピゲノム異常が深く関わっている。エピゲノムには、クロマチン修飾および発現プロモーターのCpG islandのメチル化が存在する。C型肝炎におけるSVRと肝癌に関連するメチル化異常について網羅的解析された報告はなく、申請者は発現プロモーターのCpG islandのメチル化に着目した。本研究を開始するにあたって、C型肝炎におけるSVRと肝癌の臨床検体を用いた網羅的メチル化アレイ探索を行い、TMEM(全く未知な遺伝子)を抽出した。この標的遺伝子は血管内皮細胞に発現しており、HCV肝癌手術症例においてTMEM高発現症例は有意に再発期間が短期であった。またヒト臍帯静脈内皮細胞(Huvec)、不死化ヒト肝内皮細胞(TMNK1)を用い、TMEMの過剰発現およびsiRNAによる遺伝子抑制をしたところ、炎症性サイトカインIL6およびIL8が有意に相関を示した。以上より、標的遺伝子TMEMの発現は炎症と関与していることを確認した。したがって、予備的実験からメチル化制御因子であるTMEMにより、炎症を介して血管内皮細胞が肝発がん再発に関与していることが推測された。

2. 研究の目的

新規のメチル化異常を特定することで、メチル化異常を有する患者をピックアップでき、肝癌サーベイランスにおいて早期発見、発症予防への方策を練ること、および肝癌治療においてメチル化異常を有する遺伝子への分子標的治療など診断薬の開発につながると考えた。その可能性のある標的遺伝子TMEMの機能解析を行い、血管内皮細胞と肝発がん再発の機序解明を行う。

3. 研究の方法

1) 免疫不全マウスへの移植

TMEM陽性血管内皮細胞が肝細胞の発癌や腫瘍形成に関わるのではないかと考えた。そこで、肝由来血管内皮細胞株TMNK1にTMEMを過剰発現させ、私たちの研究室で作製したヒト初代肝細胞癌細胞と既存のヒト肝細胞癌細胞株Huh7に混合させ、免疫不全マウスに移植させた。

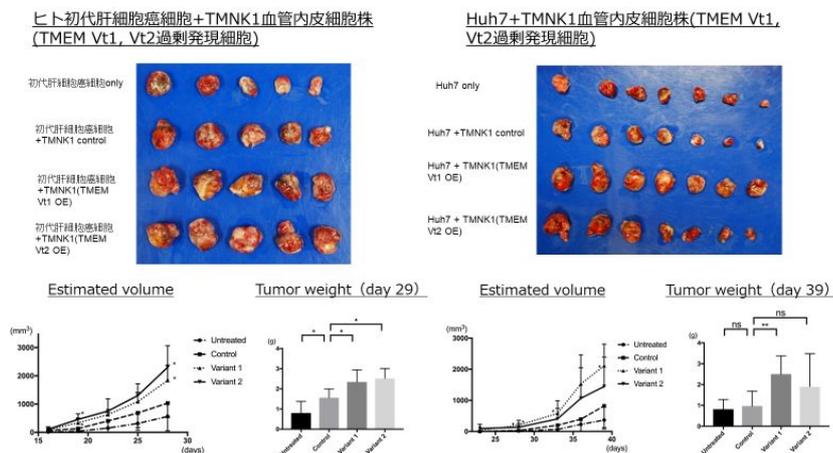
2) ERストレスと腫瘍形成

TMEMが血管内皮細胞の小胞体中存在していることを蛍光2重染色から発見した。小胞体ストレスは、慢性肝炎、肝線維化や肝発がんに関わることがこれまでに多数報告がある(J Hepatol 2018 69:927-947, Nat Commun 2019 10:947)。そこで、申請者は、肝由来血管内皮細胞株TMNK1に灌流培養によるShear stressを与えERストレスを誘導させた。更に、siRNAを用いてTMEMの発現を抑制した時のShear stressによるERストレス解析も行った。

4. 研究成果

1) 免疫不全マウスへの移植

TMEM過剰発現血管内皮細胞は、腫瘍形成を有意に亢進することが確認できた。

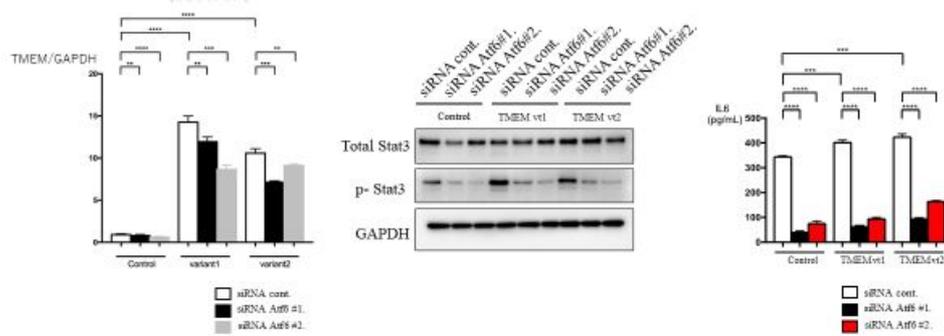


2) ERストレスと腫瘍形成

Shear stress誘導は、TMEMの発現を顕著に増加させ、siRNA TMEMによる発現抑制すると shear stressによるERストレスは有意に抑制させた。そこで、申請者はTMEM過剰発現させた肝由来

血管内皮細胞株 TMNK1 の ER ストレスの影響を解析した。ER ストレスシグナルである ATF6/p-STAT3/IL6 経路を特徴的に活性化させることが分かった。

TMEM過剰発現血管内皮細胞は、ATF6依存的ERストレスによりIL6を過剰分泌することで腫瘍形成を亢進させる



これらの結果から、TMEMは、ER ストレスシグナルからの p-Stat3 を活性化させることで、過剰に IL6 を分泌させ、腫瘍形成を亢進することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 西川昌志、本多政夫、金子周一
2. 発表標題 C型肝炎ウイルス排除後肝臓における背景肝メチル化測定の有用性
3. 学会等名 肝臓研究会 PD2-10
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西川昌志、本多政夫、金子周一
2. 発表標題 C型肝炎ウイルス排除後肝臓における背景肝メチル化と肝線維化
3. 学会等名 第105回消化器病学会総会 WS12-8
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masashi Nishikawa, Masao Honda, Hikari Okada, Kazunori Kawaguchi, Rika Horii, Tetsuro Shimakami, Kuniaki Arai, Taro Yamashita, Yoshio Sakai, Tatsuya Yamashita, Eishiro Mizukoshi, and Shuichi Kaneko
2. 発表標題 Genome-wide methylation analysis identified a new intrahepatic vascular endothelial marker associated with induction of tumorigenesis after successful eradication of HCV
3. 学会等名 AASLD2019 (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----