

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17432

研究課題名(和文)p53活性化による肝発癌促進機序の検討

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms of accelerated liver carcinogenesis caused by p53 over-activation.

研究代表者

牧野 祐紀 (Makino, Yuki)

大阪大学・医学系研究科・特任助教(常勤)

研究者番号：60771334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：慢性肝疾患患者の肝細胞では、癌抑制遺伝子p53が恒常的に活性化している。我々は肝発癌モデルマウスの肝細胞でp53を過剰に活性化させると肝発癌が促進されることを見出し、その機序について検討した。

肝細胞のp53が活性化すると肝細胞死・細胞老化により肝障害が惹起され、肝前駆細胞が出現した。肝腫瘍は肝前駆細胞から連続して形成され、肝前駆細胞由来オルガノイドが腫瘍形成能を示したことから、肝前駆細胞が発癌母地であると考えられた。

本研究課題により肝細胞のp53活性化が肝前駆細胞を介した肝発癌を促進することが明らかとなり、p53が慢性肝疾患患者の発癌予防の新規治療標的にな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

p53は代表的な癌抑制遺伝子であるが、本研究課題では肝細胞のp53が過剰に活性化すると逆に発癌が促進されることが示され、従来よく知られてきたp53の新たな側面を明らかにしたという点において大きな学術的意義を有する。

さらに本研究課題により、活性化したp53が慢性肝疾患患者における肝発癌予防の治療標的になることが示された。慢性肝疾患患者の肝発癌予防のためには、ウイルス性肝炎、アルコール性肝炎等の原疾患の治療以外に有効な方法がないのが現状であり、本研究課題によりこれまでにない新たな肝発癌予防法の開発に繋がる可能性があり、臨床的意義にも富んでいる。

研究成果の概要(英文)：In hepatocytes in chronic liver disease patients, tumor-suppressor p53 is constitutively activated. In our previous analysis, we have revealed that p53 activation increased hepatocarcinogenesis in liver cancer model mice. We investigated its mechanisms in the present study. Over-activation of hepatocyte p53 caused liver injury via increased hepatocyte apoptosis and senescence, leading to the emergence of liver progenitor cells. Tumors were histologically spreading from liver progenitor cells. Organoids generated from liver progenitor cells showed tumor-formation ability. These findings suggested that liver progenitor cells were the origin of liver tumors. The present study revealed that over-activation of hepatocyte p53 accelerated liver carcinogenesis originating from liver progenitor cells. Activated p53 could be a novel therapeutic target to prevent liver carcinogenesis in chronic liver disease patients.

研究分野：消化器内科学

キーワード：p53 肝発癌 肝前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

p53 は「ゲノムの守護神」と称される代表的な癌抑制遺伝子であり、肝細胞癌においても約30%の症例で機能喪失性変異が認められ、主要な肝発癌ドライバーと考えられている。一方、慢性肝疾患患者の背景肝組織中においては野生型 p53 が活性化していることが知られている (Akyol G, et al. Pathol Int. 1999, Loguercio C, et al. J Viral Hepat. 2003)。これは肝細胞に対するウイルス感染やエタノール刺激、脂肪蓄積などのストレス刺激が原因と考えられているが、その意義は不明である。

Kras 変異肝発癌モデル (Kras^{LSL-G12D/+} AlbCre ; Kras^{G12D} マウス) の肝細胞において p53 を欠損させると (Kras^{LSL-G12D/+} p53^{fl/fl} AlbCre) 肝発癌が促進されるが (図1)、この結果は p53 の癌抑制遺伝子としての機能を反映していると考えられる。一方、我々は Kras 変異肝発癌モデルにおいて p53 の分解を促進する Mdm2 を肝細胞特異的に欠損させると (Kras^{LSL-G12D/+} Mdm2^{fl/fl} AlbCre)、p53 が過剰に蓄積して活性化し、肝発癌が促進することを見出した (図2)。さらに Mdm2 に加えて p53 を欠損させると (Kras^{LSL-G12D/+} Mdm2^{fl/fl} p53^{fl/fl} AlbCre)、p53 野生型に比し肝発癌が抑制された (図3)。これらの結果は p53 の過剰状態が肝発癌を促進していることを示している。同様の現象は diethylnitrosamine (DEN) による肝発癌モデルにおいても認められた。

これらの知見は、慢性肝疾患患者の肝組織において認められる p53 の活性化が、肝発癌の一因となっている可能性を示唆していると考えられる。

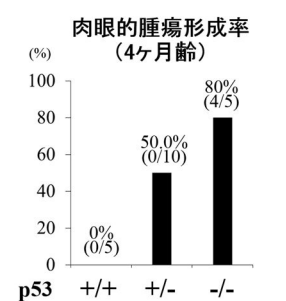


図1. p53欠損による肝発癌促進作用

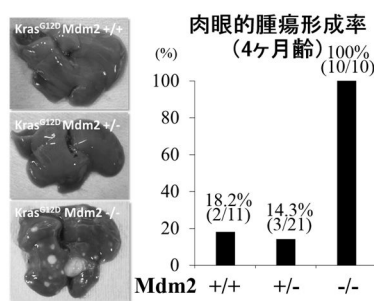


図2. Mdm2欠損による肝発癌促進作用

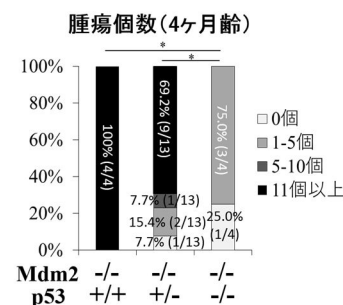


図3. p53欠損による肝発癌抑制作用

2. 研究の目的

本研究は、肝細胞における p53 の活性化が肝発癌を促進するメカニズムを解明することを目的とした。本研究により、代表的な癌抑制遺伝子として従来よく知られてきた p53 の新たな側面を明らかにするとともに、慢性肝疾患における肝発癌の新たな分子機序を解明すること、および肝発癌予防のための新規治療標的を見出すことを目標とした。

3. 研究の方法

上記肝細胞特異的 Mdm2 欠損 Kras^{G12D} マウスおよび肝細胞特異的 Mdm2・p53 欠損 Kras^{G12D} マウスの検体を用いて、p53 の活性化により肝発癌が促進する要因について検討した。また肝細胞の細胞株として HepG2 細胞、CL2 細胞、Ac2F 細胞を用いて細胞実験を行った。さらに当科において経皮的肝生検を行った慢性肝疾患患者の非癌部肝組織、および比較対照の正常肝として転移性肝癌の非癌部肝組織を用い、マウスモデル・細胞株において認められた知見を臨床検体において検証した。臨床検体を用いた解析の結果は、The Cancer Genome Atlas (TCGA) のデータベースにおいても検証した。

4. 研究成果

肉眼的腫瘍を認めない6週齢時点において、肝細胞特異的 Mdm2 欠損 Kras^{G12D} マウスの非癌部肝組織を用いて RNA シークエンスによる網羅的な遺伝子発現解析を行ったところ、Mdm2 欠損 Kras^{G12D} マウスでは Mdm2 野生型 Kras^{G12D} マウスに比し、p53 経路の活性化に加えて複数の炎症関連シグナルの活性化を認めた。

Mdm2 欠損 Kras^{G12D} マウスでは血清 ALT 値の上昇を認め、肝障害の存在が示唆された。同マウスの背景肝ではアポトーシスを促進する p53 下流遺伝子 (p21, bax, noxa) の発現が上昇していた。肝組織中では TUNEL 染色陽性肝細胞が増加し、血清中では caspase 3/7 活性が上昇しており、肝細胞アポトーシスの亢進を認めた。また同マウスの背景肝では p16 の発現上昇および β-galactosidase 染色陽性細胞が増加しており、肝細胞の細胞老化が亢進していた。さらに背景肝組織・肝細胞において種々の炎症性サイトカイン (TNFα, CCL2, IL-1β ほか) の発現が上昇しており、senescence-associated secretory phenotype (SASP) の誘導が示唆された。このような肝細胞のアポトーシス・細胞老化・SASP の亢進が、肝障害の一因であると考えられた。

各種肝細胞株において siRNA または Mdm2 阻害剤である Nutlin-3 により Mdm2 の機能を

阻害すると、アポトーシスの誘導により細胞増殖が阻害された。肝細胞の増殖が阻害されるような状況において肝障害が誘導されると、肝前駆細胞が出現し得ることが知られている。肝前駆細胞は未分化性を有した細胞集団であり、肝障害時に出現して肝細胞や胆管細胞に分化して肝再生に寄与する細胞集団である一方、肝癌幹細胞の前駆体として肝癌の発生源ともなり得る (Ma S, et al. Gastroenterology. 2007 ほか)。そこで肝前駆細胞の存在について検討すると、6 週齢の Mdm2 欠損 Kras^{G12D} マウスの背景肝において、各種肝前駆細胞マーカー (CK7、CK19、CD90、CD133、AFP、Dlk1 など) の発現上昇を認めた。免疫染色において、これら肝前駆細胞マーカーを発現する細胞集団の存在が組織学的に確認された。また肝前駆細胞の活性化因子として知られる種々の液性因子 (LIF、OSM、LTB、IFN- γ など) の発現も肝組織中において上昇していた。4 か月齢においては、肝前駆細胞から広がるように肝腫瘍が形成される像を認め、腫瘍は肝前駆細胞マーカーが陽性であった。

これらの結果から、肝前駆細胞が肝腫瘍の発生源である可能性を考え、肝細胞特異的 Mdm2 欠損 Kras^{G12D} マウスより肝前駆細胞をオルガノイドとして抽出した。オルガノイドは肝細胞に比し肝前駆細胞マーカーの発現が著明に高く、成熟肝細胞マーカー (Alb) は極めて低発現であり、肝前駆細胞の遺伝子発現パターンとして矛盾しない結果であった。このオルガノイドを超免疫不全マウスである NOG (NOD/Scid/IL2R γ null) マウスの皮下に移植すると、3 週後に皮下腫瘍の形成を認め、腫瘍形成能を有することが示された。この皮下腫瘍は肝腫瘍と同様に各種肝前駆細胞マーカーが陽性であった。そこで次に、肝前駆細胞の分化誘導およびアポトーシス誘導作用を有する非環式レチノイドを Mdm2 欠損 Kras^{G12D} マウスに投与し、発癌抑制効果について検証した。その結果、非環式レチノイドにより腫瘍形成が抑制され、背景肝では肝前駆細胞の出現が抑制され、各種肝前駆細胞マーカーの発現低下を認めた。以上の結果から、肝細胞特異的 Mdm2 欠損 Kras^{G12D} マウスにおいて、肝前駆細胞が肝腫瘍の発生源であることが想定された。

肝細胞特異的 Mdm2 欠損 Kras^{G12D} マウスにおいてさらに p53 を欠損させると肝発癌が抑制されることは既に見出していたが、p53 の欠損により、肝発癌の抑制に先立ち肝障害、肝細胞アポトーシス・細胞老化・SASP および肝前駆細胞の出現が全て消失した。このことから、Mdm2 欠損 Kras^{G12D} マウスにおいて認められた肝障害、肝細胞アポトーシス・細胞老化・SASP、肝前駆細胞の出現は全て p53 の活性化に起因していたことが示された。

臨床検体を用いた解析では、慢性肝疾患患者の肝組織では正常肝組織に比し p53 下流遺伝子 p21 の発現が上昇しており、p53 が活性化していることが確認された。慢性肝疾患患者の肝組織中の p21 の発現量は、各種アポトーシス促進分子、細胞老化・SASP 関連分子、肝前駆細胞マーカーおよび肝前駆細胞活性化因子の発現量と正の相関を示した。p21 とこれらの分子の相関は、TCGA データベースにおける HCC 切除検体非癌部肝組織においても確認された。さらに当科の肝生検症例において、p21 を高発現する症例は低発現の症例に比し肝生検後の累積発癌率が高率であった。これらの結果から、臨床検体においても慢性肝疾患における p53 活性化と肝細胞アポトーシス・SASP・肝前駆細胞・肝発癌との関連が示唆された。

本研究課題により、慢性肝疾患患者において p53 の恒常的活性化は肝細胞アポトーシス・SASP により肝障害を誘導し、肝前駆細胞の出現を促す結果、肝発癌を促進することが明らかとなった (図 4)。p53 は最も代表的な癌抑制遺伝子であるが、本研究課題により p53 の発癌促進作用という新たな側面が明らかとなり、p53 に関する既存の概念を転換させ得るような大きな学術的成果が得られた。また、慢性肝疾患患者は慢性肝炎から肝硬変を経て肝発癌を来し得るが、肝発癌予防のためには、ウイルス性肝疾患をはじめとする背景肝疾患のコントロール以外に有効な治療法が存在しないのが現状である。本研究課題により、慢性肝疾患患者における p53 活性化を介した新たな肝発癌メカニズムが明らかになるとともに、活性化した p53 が肝発癌予防のための新規治療標的となることが示唆された。この知見により p53 を標的とした新たな肝発癌予防法の開発に繋がる可能性があり、臨床的にも意義の大きな成果が得られたと考えられる。

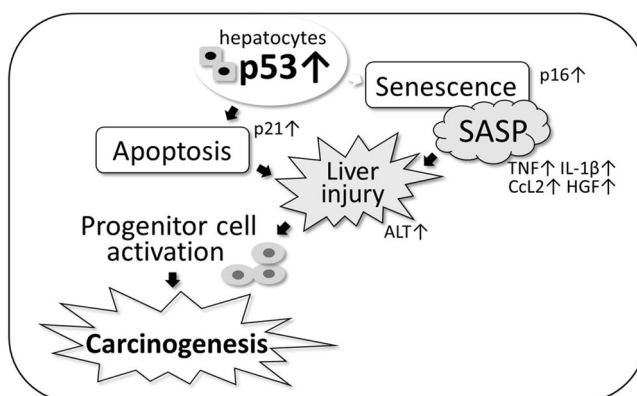


図4.肝細胞におけるp53活性化による発癌機序

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yuki Makino, Hayato Hikita, Takahiro Kodama, Ryotaro Sakamori, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara
2. 発表標題 Overactivation of hepatocyte p53 activates hepatic progenitor cells and promotes hepatocarcinogenesis.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野祐紀 疋田隼人 竹原徹郎
2. 発表標題 p53の活性化による肝前駆細胞の誘導と肝発癌
3. 学会等名 第105回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野祐紀 疋田隼人 竹原徹郎
2. 発表標題 癌抑制遺伝子p53の活性化による肝発癌促進
3. 学会等名 第55回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 牧野祐紀 疋田隼人 竹原徹郎
2. 発表標題 癌抑制遺伝子p53の過剰な活性化による肝前駆細胞の誘導と肝発癌
3. 学会等名 第26回肝細胞研究会
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
---------	---------