

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08345

研究課題名(和文) TCF-4 isoform高精度発現解析による肝癌特異的Wntシグナル異常の探求

研究課題名(英文) Exploring Liver Cancer-Specific Wnt Signaling Abnormalities by High-precision Analysis of TCF-4 Isoform Expressions

研究代表者

古賀 浩徳 (Koga, Hironori)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：90268855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでの研究から、各TCF-4 isoformの発現量や比が肝癌形質の多彩さを調節していることが示唆されたものの、従来の発現解析法では定量性に限界があった。本研究ではペプチド核酸を用いた新しいPCRシステムで、この限界を克服した。TCF-4JとTCF-4Kとの発現比較では、肝よりもむしろ胃や大腸などの消化管癌においてTCF-4J型が強く発現していることがわかった。また胎児由来不死化肝細胞ではTCF-4Eが特異的に高発現していることもわかった。総じて、TCF-4 isoformのプロファイルは癌の悪性度および臓器特有のWntシグナル活性化状況を反映してい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

本研究では、14種すべてのTCF-4 isoformを解析対象とした。その結果、TCF-4M以外の13種のisoformの半定量的測定が可能であった。この測定系を初めて開発したことで、今後も独自に種々の腫瘍細胞や組織におけるTCF-4 isoformのプロファイル解析が可能となった。また、癌微小環境において、TCF-4 isoformプロファイルとWntシグナル活性との相関を評価することが可能となり、Wntシグナルを標的とする創薬研究にも大きく貢献できると考えている。

研究成果の概要(英文)：Previous studies have suggested that the expression levels and ratios of each TCF-4 isoform regulate the variety of hepatocellular carcinoma traits, but our previous analysis methods are limited in their quantitative nature. In this study, we have overcome this limitation with a new PCR system using peptide nucleic acids. Comparison of TCF-4J with TCF-4K expression showed that TCF-4J type is strongly expressed in gastrointestinal cancers such as stomach and colon, rather than the liver. We also found that TCF-4E is specifically highly expressed in fetus-derived immortalized hepatocytes. The results suggest that TCF-4 isoform profiles reflect cancer aggressiveness and organ-specific Wnt signaling activation status.

研究分野：消化器病学

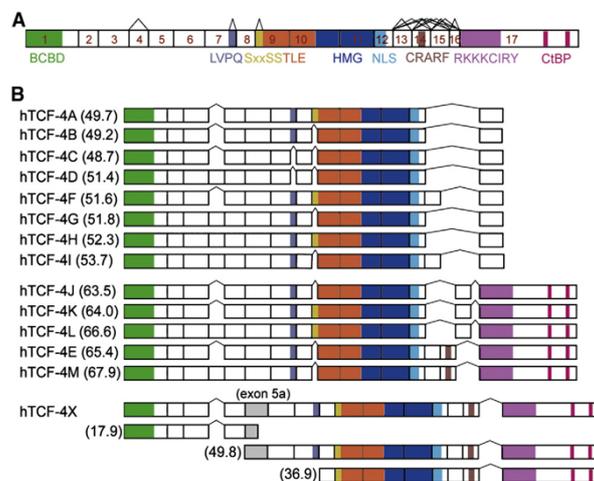
キーワード：T-cell factor-4 Wnt Isoform Splice variant

## 1. 研究開始当初の背景

GWAS による解析の結果、肝細胞癌 (HCC) では Wnt シグナル伝達系の破綻が高率に存在することが示された (Nat Genet 2016). 一方我々は、2008 年から Wnt シグナル伝達系の中核転写因子 TCF-4 に注目してきた. そして、ヒト肝癌細胞株から新規 12 クローンを含む 14 クローンの TCF-4 isoforms を単離・同定してきた (図 1, GenBank 登録済み; Exp Cell Res 2011).

図 1 (→)

TCF-4 にはその転写活性と密接に関連する特徴的な構造が存在する. 例えば TCF-4 分子中央には Groucho/TLE 結合サイトがあり、転写の強力な抑制に関与する. こうした既知の構造・機能相関を頼りに、我々は Exon 9 の先頭に位置する転写制御モチーフ「SxxSS」(JBC 2001, JBC 2003) の機能について検討してきた. 我々がクローニングしてきた TCF-4 isoform の中には、「SxxSS」の有無に関して 3 つの比較可能なペアが存在する. すなわち、図 1 の A と B, G と H, J と K の組み合わせである. さらに、A は K の、B は J の、それぞれ C 末端領域が欠落した“short form”である. G と H は Exon 4 を持たない、“short” vs. “long” および



「SxxSS」の“有” vs. “無”の比較を行うために、Exon 4 を持たない A, B, J, K の 4 つに焦点を当て種々の解析を行ってきた. その結果、ヒト HCC 組織 (特に低分化 HCC) に強く発現しているのは B でなく J であり、弱いながらも発現しているのは A でなく K であった. さらに「SxxSS」を欠く J のほうが「SxxSS」を持つ K に比べて tumor-initiating potential が高かった (PLoS ONE 2012).

しかし、これまでの研究には 2 つの限界があった. 1) TCF-4 isoform の発現測定系がアガロースゲル電気泳動におけるバンドの画像解析で行われたため、測定レンジや定量性に限界があったこと、2) 他臓器の癌組織における TCF-4 isoform の発現プロファイルとの比較データがなかったこと、である. 従って TCF-4 isoform 研究において、この 2 点を克服することが、HCC における「破綻した Wnt シグナル伝達系の機序解明」に必須だと考えていた.

近年、核酸技術の進歩が著しい. 我々はペプチド核酸 (Peptide Nucleic Acids, PNA) を TCF-4 isoform 検出のための qPCR に応用することを考案した. PNA は DNA や RNA と異なり、主鎖が (N-(2-アミノエチル) グリシン) のペプチド結合で繋がれている. このため陰電荷がなく、静電反発の減少により PNA と DNA もしくは RNA で形成される 2 重鎖が非常に強くなる. また配列適合性にも優れている. しかも PCR 時にエクソヌクレアーゼ活性を阻害するため、希望しない塩基配列の増幅を阻止することができる. 予備実験において、この PNA を TaqMan PCR に応用して、TCF-4 isoform を特異的かつ定量的に測定する技術を確認することができた.

## 2. 研究の目的

(主要目的) ヒト HCC 組織における 14 個すべての TCF-4 isoform の正確な発現プロファイルを新しいストラテジーに基づく qPCR 法で明らかにし、臨床病理学的悪性度や予後との相関を解析すること.

(副次目的) ヒト大腸癌組織においては、特に TCF-4 isoform J 型に着目し、J 型の発現量と臨床病理学的悪性度や予後との相関を解析すること.

## 3. 研究の方法

(1) 細胞: ヒト肝癌細胞株 (HAK-1A, HAK-1B, Hep3B, Huh-7), 混合型肝癌細胞株 (KMCH-2), 胃癌細胞株 (MKN74), 膵癌細胞株 (BxPC-3), 大腸癌細胞株 (HCT-119, HT-29) を用い予備実験を行った. この結果を踏まえ、さらに特徴的形質を持った 3 種の肝癌細胞株 (HAK-5 (肉腫様肝癌), KYN-2 (高門脈内浸潤能), HLF (間葉系形質保持)) においても isoform 解析を行う. そして、大腸癌細胞株で高発現している J 型や B 型 isoform が、それら 3 種の肝癌細胞株でも低発現なのかどうかを検討する.

(2) 組織: 本学外科および病理・病理診断科から提供された大腸癌組織および HCC 組織 (ともに凍結) を用い、まず 4 種 isoform (A, B, J, K) の定量的解析を行う. 明らかに転移があり予後が悪い群を設定し、その対極の予後良好群と比較する. 測定費が高額なため、必要最小限のサンプル数 (悪 vs. 良 = 20 vs. 10 x 2 癌種 = 60) を想定している.

(3) PNA を用いた TaqMan PCR の確立と測定

目的としない isoform の増幅を避けるように PNA の配置を設定することで、まず A, B, J, K に

については完全に特異的な定量系が完成した。次にこの系を応用して 14 種 isoform の検出系確立へと展開した。HAK-1A (高分化 HCC), HAK-1B (低分化 HCC), HCT-119 (εJ 型優位の陽性対照) を用いて, 14 種の検出系自体の validation および肝癌細胞での 14 isoform プロファイルの予備データ取得後, HCC (および大腸癌) の臨床病理学的データを加味し, 統合的解析を行った。

#### 4. 研究成果

2021 年度までの技術的な改善により, 全 14 種中 TCF-4M 以外の 13 種の TCF-4 isoforms の半定量的測定が可能であった。測定の結果, ヒト肝癌や膵癌細胞株では概ね TCF-4 isoforms 全体の発現レベルは低く, 大腸癌や胃癌細胞株では高い傾向にあった。ヒト大腸癌組織を含めた解析において, 癌の悪性化に伴う特徴的なパターンは見られず, むしろ Wnt/beta-catenin/TCF-4 経路の canonical pathway が活性化している癌 (大腸癌や胃癌) とそうでない癌 (肝癌や膵癌) とに分けることができる可能性が示唆された。さらに, p53 の解析の結果から同一クローンからの発生と考えられる高分化型肝細胞癌株 HAK-1A と低分化型肝細胞癌株 HAK-1B において, TCF-4 isoforms の発現パターンがほぼ同じであることもわかった。このことから, TCF-4 isoforms は癌の悪性化に伴って劇的に変化するのではなく, 癌の起源臓器由来の traits を表していることが示唆された。それは膵神経内分泌腫瘍の細胞株 (3 種) における TCF-4 isoforms の解析からも裏付けられた。すなわち, 発生起源が, 肝癌や膵癌, 胃癌などと全く異なる腫瘍の isoform パターンは, 上記癌種のパターンとは大きく異なっていたからである。

肝癌細胞とは発生臓器が同じでも大きく異なった TCF-4 isoforms パターンを示した細胞株があった。それは胎児肝由来不死化肝細胞株だった。この細胞では TCF-4E が最も強く発現しており, TCF-4B や TCF-4J がそれに続いた。このことは, 肝において未分化な細胞ほど TCF-4 isoforms の発現が全体的に高く, また TCF-4E が特異的に高いことを示唆している。肝癌細胞に TCF-4E の発現が相対的に乏しいことを考えると, TCF-4E は発生の初期段階で働き, 非腫瘍性の保持に必要な isoform であることも考えられ, 今後, 幹細胞レベルでの解析に役立つと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hironori Koga, Hideki Iwamoto, Hiroyuki Suzuki, Shigeo Shimose, Masahiko Nakano, Takumi Kawaguchi	4. 巻 29
2. 論文標題 Clinical practice guidelines and real-life practice in hepatocellular carcinoma: A Japanese perspective	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical and Molecular Hepatology	6. 最初と最後の頁 242 ~ 251
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3350/cmh.2023.0102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hironori Koga	4. 巻 11
2. 論文標題 Beyond management to conquer life-threatening tumor thrombosis in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hepatobiliary Surgery and Nutrition	6. 最初と最後の頁 773 ~ 774
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/hbsn-22-365	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古賀浩徳, 中村徹, 岩本英希, 増田篤高, 阪上尊彦, 田中俊光, 鈴木浩之, 矢野博久, 鳥村拓司
2. 発表標題 Wntシグナル中枢転写因子TCF-4バリエーションの消化器系細胞における発現様式
3. 学会等名 第53回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hironori Koga, Tomoya Sudo, Yoshito Akagi, Hideki Iwamoto, Takahiko Sakaue, Toshimitsu Tanaka, Jun Akiba, Hirohisa Yano, Takuji Torimura
2. 発表標題 Precise evaluation of TCF-4 isoform expressions in tumors derived from digestive organs
3. 学会等名 第79回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古賀浩徳, 阪上尊彦, 増田篤高, 中村徹, 矢野博久, 鳥村拓司
2. 発表標題 Wntシグナル中枢転写因子TCF-4/バリエーションの癌細胞における高精度発現解析
3. 学会等名 第52回 日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

先端癌治療研究センター肝癌部門 <a href="http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/kangan/">http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/kangan/</a> 久留米大学先端癌治療研究センター肝癌部門 <a href="http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/kangan/">http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/sentanca/kangan/</a>
---

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
---------	---------