

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590835

研究課題名（和文）DNA二重鎖傷害早期応答因子に着目した肝癌リスク予測マーカーの開発  
研究課題名（英文）Prospective analysis of DNA damage and repair markers in the patients  
with high risk of hepatocellular cancer

研究代表者

松田 康伸 (MATSUDA YASUNOBU)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40334669

研究成果の概要(和文)：

DNA二重鎖は、強い傷害をうけると、DNA修復反応が不十分となり、癌化へのステップに寄与することになる。本研究では、DNA傷害応答因子の肝発癌初期過程における役割に着目した。マウス肝癌モデルを作成して、発癌前後のDNA修復因子を解析した。さらに解析結果が、ヒト肝癌患者においても有用な発癌予測マーカーであるかを検討した。その結果、動物モデル・ヒト肝硬変組織ではgamma-H2AXが著明に活性化しており、発癌した患者の多くはWip1の活性が高くDNA修復シグナルが抑制される傾向にあることを見いだした。本解析の結果、DNA修復因子のなかでもgamma-H2AXおよびWip1が肝癌発症の予知マーカーになりえる可能性が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：

**Background:** It has been widely considered that the DNA damage response is strongly involved in the step of early carcinogenesis. In case of hepatocellular carcinoma (HCC), however, it has been remained unclear whether DNA damage response molecules are useful for the tumor markers of the patients with high risk of HCC.

**Methods:** We evaluated the phosphorylation levels of DNA damage response markers in animal models with HCC by Western blotting or immunohistochemical staining. Based on the animal model experiments, we addressed whether any of the DNA-damage response molecules are involved in the cancer development of the patients with high risk of HCC.

**Results:** Western blotting and immunohistochemical analysis showed that the levels of gamma-H2A were significantly increased in HCC-prone mice. Interestingly, increase in the levels of gamma-H2AX was observed from several months before the development of HCC. The increase in the levels of gamma-H2AX and Wip1 activity was also observed in human liver tissues adjacent to HCC.

**Conclusion:** DNA damage response molecules gamma-H2AX and Wip1 might be useful markers for predicting the development of HCC.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野: 医歯薬学

科研費の分科・細目: 内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード: 肝臓病学

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 二重鎖は、紫外線や化学物質などで傷害を受けて自己修復を行う働きを有している。しかしながら、傷害の程度が強く、かつ持続する場合はDNA修復反応が不十分となり、癌化へのステップに寄与することになる。

ところで肝癌は、ウイルスとの関連性が推測される、数少ない悪性疾患のひとつである。世界中で肝癌の70%以上がB型(HBV)やC型(HCV)肝炎ウイルスに感染しており、これまで明らかにされた発癌機序は、①ウイルス慢性肝炎の細胞傷害がゲノム不安定化や活性酸素 etc. を引き起こす、いわばウイルスを介した“間接的”発癌作用と、②ウイルス自体が宿主遺伝子異常や酸化ストレスなどを誘導する、ウイルスの“直接的”発癌作用、に大きく分けられる。しかしながら実際のヒト組織におけるウイルス肝発癌の機序はいまだ不明であり、われわれも過去にヒト肝癌の細胞周期因子などを検討したが(Matsuda et al., *Gastroenterology* 116(2):394-400, 1999; *Clin Cancer Res* 9(9):3389-3396, 2003, etc.)、解析対象が進行癌であったためか、他報告と同様に肝炎ウイルスによる特徴は不明であった。一般に癌研究では、正常組織-癌ハイリスク組織-前がん病変-癌組織と、一連のシーケンスを通して組織サンプルを解析することが望ましいが、肝臓の場合は経時的なサンプル採取は困難である。そこでわれわれはウイルス肝発癌モデルを経時的に解析し、その結果をヒトと摺り合わせる手順による発癌機序の研究を試みた。

### 2. 研究の目的

本研究では、DNA傷害の早期に応答するマーカー因子 gamma-H2AX(リン酸化H2AX)を初めとするDNA傷害応答因子の肝発癌初期過程における役割に着目した。様々な動物の肝発癌モデルやヒト肝癌組織におけるDNA修復シグナルを解析し、精度の高い肝癌予測マーカーの開発を行うことが、本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物発癌モデルの解析

マウス肝癌モデルとして、HBVX 遺伝子トランスジェニックマウス(HBx-Tgマウス)、ジエチルニトロサミン誘発肝癌モデル(DENマウス)を作成した。特に、HBx 遺伝子トランスジェニック(HBx-Tg)マウスは、アルブミン遺伝子プロモーター制御下で肝細胞に特異的にHBV X 遺伝子産物を長期間発現する。同マウスは肝炎を経ずに、高率(60-80%)に肝癌を発症するためHBVの直接的発癌作用の研究に適した生体モデルと

される(Kim CM. et al., *Nature* 351(6324): 317-20, 1991)。予備実験の結果、HBx-Tgマウスでは8-10ヶ月、DENマウスでは10ヶ月後に発癌しやすいことが明らかになったため、同時期から経時的にH2AXシグナル関連因子をWestern blot, 免疫染色で解析した。同時に、発癌前後のDNA修復因子(ATM/ATAR, 53BP, Chk1/2, ERCC1, TFIIF, XPG等)も解析した。

#### (2) ヒト肝癌非癌部組織の解析

動物モデルの解析の結果、発癌に関与している可能性が推測されるDNA傷害早期応答因子に的を絞り、ヒト肝癌非癌部組織における発現・活性化レベルを観察し、ヒト肝がん患者における有用な発癌予測マーカーになりうるかを検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 動物発癌モデルの解析

両動物モデル共に、発癌の数ヶ月前からH2AXが強クリン酸化して活性化していることをWestern blot・免疫染色で見いだした。さらにHBV X 遺伝子トランスジェニックマウスは、ATRが強ク活性化するにも関わらず、その下流シグナルChk1/Chk2の活性化は阻害されていた。この理由として、発癌過程においては、Wip1が活性化するために正常なDNA修復が行えないためである可能性が示唆された。

#### (2) ヒト肝癌非癌部組織の解析

ヒト肝硬変組織ではgamma-H2AXが著明に活性化しており、発癌した患者の多くはWip1の活性が高くDNA修復シグナルが抑制される傾向にあることを見いだした。すなわち、DNA傷害は、肝がんの発癌時期のかなり前から惹起されており、Wip1が発癌リスクを促進することが明らかになった。ヒト肝癌組織を解析した結果では、マウスモデルと同様に、肝がん患者の非癌部組織において高率にgamma-H2AXとWip1活性の上昇が認められた。

#### (3) 考察および今後の展望:

DNA傷害修復因子は、予想以上に、発癌の全段階から活性化していることが明らかになった。この成果は、これらDNA修復因子が、肝がん患者の発癌時期を予測する有用なマーカーになりうることを強く示唆している。なかでもgamma-H2AXとWip1は、ヒト肝癌患者で強く活性化していることが明らかになったため、今後は発癌予防の重要なターゲット因子としての研究が望まれる。

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 14 件)

- [1] Matsuda Y, Fukumoto M. Sorafenib: complexities of Raf-dependent and Raf-independent signaling are now unveiled. *Med Mol Morphol* in press 査読有
- [2] Kamimura H, Yamagiwa S, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Ohkoshi S, Inoue M, Wakai T, Shirai Y, Nomoto M, Aoyagi Y. Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. *J Hepatol* in press 査読有
- [3] Matsuda Y, Ichida T, Fukumoto M. Hepatocellular carcinoma and liver transplantation: clinical perspective on molecular targeted strategies. *Med Mol Morphol* 44(3):117-124 (2011) 査読有
- [4] Kawai H, Nomoto M, Suda T, Kamimura K, Tsuchiya A, Tamura Y, Yano M, Takamura M, Igarashi M, Wakai T, Yamagiwa S, Matsuda Y, Ohkoshi S, Kurosaki I, Shirai Y, Okada M, Aoyagi Y. Multicentric occurrence of hepatocellular carcinoma with nonalcoholic steatohepatitis. *World J Hepatol* 3(1):15-23 (2011) 査読有
- [5] Aoki YH, Ohkoshi S, Yamagiwa S, Yano M, Takahashi H, Waguri N, Igarashi K, Sugitani S, Takahashi T, Ishikawa T, Kamimura T, Wakabayashi H, Watanabe T, Matsuda Y, Nomoto M, Aoyagi Y. Characterization of elevated alanine aminotransferase levels during pegylated-interferon  $\alpha$ -2b plus ribavirin treatment for chronic hepatitis C. *Hepatol Res* 41(2):118-125 (2011) 査読有
- [6] Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Matsuda Y, Korita PV, Takamura M, Ajioka Y, Hatakeyama K. Prognostic significance of NQO1 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 4(4):363-370 (2011) 査読有
- [7] Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Korita PV, Matsuda Y, Takamura M, Ohashi R, Nagahashi M, Ajioka Y, Hatakeyama K. Alteration of p53-binding protein 1 expression as a risk factor for local recurrence in patients undergoing resection for extrahepatic cholangiocarcinoma. *Int J Oncol* 38(5):1227-1236 (2011) 査読有
- [8] Ohkoshi S, Yamagiwa S, Yano M, Takahashi H, Aoki YH, Matsuda Y, Aoyagi Y. Very-Low-Dose Pegylated Interferon  $\alpha$ 2a

Plus Ribavirin Therapy for Advanced Liver Cirrhosis Type C: A Possible Therapeutic Alternative without Splenic Intervention.

*Case Rep Gastroenterol* 4(2):261-266 (2010) 査読有

- [9] Korita PV, Wakai T, Shirai Y, Matsuda Y, Sakata J, Takamura M, Yano M, Sanpei A, Aoyagi Y, Hatakeyama K, Ajioka Y. MRP2 determines the efficacy of cisplatin in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 23(4):965-972 (2010) 査読有
- [10] Takamura M, Yamagiwa S, Wakai T, Tamura Y, Kamimura H, Kato T, Tsuchiya A, Matsuda Y, Shirai Y, Ichida T, Ajioka Y, Aoyagi Y. Loss of liver-intestine cadherin in human intrahepatic cholangiocarcinoma promotes angiogenesis by upregulating metal-responsive transcription factor-1 and placental growth factor. *Int J Oncol* 36(1):245-254 (2010) 査読有
- [11] Matsuda Y, Ichida T. Impact of hepatitis B virus X protein on the DNA damage response during hepatocarcinogenesis. *Med Mol Morphol* 42(3):138-142 (2009) 査読有
- [12] Tsukada M, Wakai T, Matsuda Y, Korita PV, Shirai Y, Ajioka Y, Hatakeyama K, Kubota M. Loss of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 expression predicts metachronous pulmonary metastasis and poor survival in patients with hepatoblastoma. *J Pediatr Surg* 44(8):1522-1528 (2009) 査読有
- [13] Kurita S, Ohkoshi S, Yano M, Yamazaki K, Suzuki K, Aoki YH, Matsuda Y, Wakai T, Shirai Y, Ichida T, Aoyagi Y. Progression of hypermethylation of the p16(INK4A) gene from normal liver to nontumorous liver and hepatocellular carcinoma: an evaluation using quantitative PCR analysis. *Dig Dis Sci* 54(1):80-88 (2009) 査読有
- [14] Tsuchiya A, Kamimura H, Takamura M, Yamagiwa S, Matsuda Y, Sato Y, Nomoto M, Ichida T, Aoyagi Y. Clinicopathological analysis of CD133 and NCAM human hepatic stem/progenitor cells in damaged livers and hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* 39(11):1080-1090 (2009) 査読有

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

Matsuda Y, Wakai T. Molecular mechanism of DNA damage response pathway during hepatic carcinogenesis. (Hepatocellular Carcinoma/Book 1) (ISBN 978-953-307-748-2) in press

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

松田 康伸 (MATSUDA YASUNOBU)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号:40334669

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし