

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15317

研究課題名（和文）核内受容体PXRの上皮間葉転換抑制作用：肝がんに対する影響と機序の解明

研究課題名（英文）Understanding the influence of PXR activation on the epithelial mesenchymal transition of liver cancer cells

研究代表者

志津 怜太（Shizu, Royta）

静岡県立大学・薬学部・助教

研究者番号：50803912

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：最近当研究室では、肝がんモデルマウスを用いた解析において、肝に特異的に高発現する転写因子PXRの活性化が肝がんの進行を顕著に抑制することを見出した。本研究ではその分子機序解析をすすめ、PXRは肝がんの微小環境を構成する周辺細胞である肝星細胞の活性化型への形質転換を抑制し、本細胞による液性因子を介した肝がん細胞の上皮間葉転換誘導作用を抑制すること、さらにPXRによる星細胞の活性化抑制作用には、細胞外マトリックスの構成タンパク質であるペリオスチンのNF- κ Bによる転写抑制作用が関与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在の全身的なマルチキナーゼ阻害薬による肝がん化学療法は、5年再発率が80%と非常に高く、再発予防効果の向上のためには、肝がん特異的な治療ターゲット見出し、既存のがん治療に加えて、長期間にわたってがんの進行をコントロールできる治療計画が求められる。上皮間葉転換は、がん細胞が浸潤能や転移能を獲得するための重要なステップであり、肝がん治療の絶好のターゲットとなる。本研究で見出した肝がん細胞の上皮間葉転換調節因子であるPXRは、肝特異的に発現する転写因子であり、そのEMTの抑制作用は、PXRが発現している肝のみで起こると考えられ、全身的なEMTの抑制に伴う副作用発現の懸念もないと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the molecular mechanism underlying the inhibitory effect of PXR on the promotion of liver cancer cells. Our findings reveal that activation of PXR leads to the suppression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) in liver cancer cells, a critical process in cancer development. Furthermore, our results suggest that PXR-mediated inhibition of liver cancer cells is attributed to its ability to impede the trans-differentiation of hepatic stellate cells and inhibit the secretion of humoral factors known to induce EMT in liver cancer cells. Collectively, our findings identify PXR as a key regulator of EMT and a potential target for liver cancer treatment.

研究分野：肝がん

キーワード：核内受容体 上皮間葉転換 PXR 肝がん 肝星細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

現在の肝がん治療では、病変部位の切除や肝動脈塞栓療法などの外科的手法により局所的な治療が行われているが、化学療法等により断続的にがんの進行をコントロールすることができる治療計画が求められている。肝がんの治療には特異的な標的タンパク質が明らかとなっていないため、全身的なマルチキナーゼ阻害薬が使用されてきたが、予後不良であり、5年再発率は80%と高い。このような現況を踏まえると、肝がんの治療成績、再発予防効果の向上には、肝がん特異的な治療ターゲット見出し、新たな治療法を確立することが求められる。申請者は最近、肝がんモデルマウスを用いた解析において、肝に高発現する核内受容体 PXR の活性化が、がん病巣の個数及び大きさを顕著に減少させることを見出した。さらに肝がん組織由来 RNA を用いたトランスクリプトーム解析において、PXR 活性化によるがん進行の抑制は、上皮間葉転換 (EMT) に関連した種々のイベントを抑制することによると思われる (Arch Toxicol, 2021)。EMT は、がんの種類によらずがん細胞が浸潤能や転移能を獲得するための重要なステップである。肝がんは、主に肝内転移によりがんが進行するため、EMT は肝がん治療における絶好のターゲットとなる可能性がある。さらに、PXR による EMT の抑制作用は、PXR の発現している肝のみで起こると考えられ、PXR は肝がんの特異的な治療標的となる可能性が高い。

2. 研究の目的

本研究では、PXR が肝がんの新規治療標的として有用であるか否かを明らかにすることを目的として、申請者らが見出した PXR による EMT の抑制作用の機序解明を目指した。

肝がん細胞の RNA を用いたトランスクリプトーム解析において、PXR は EMT において重要な役割を担う transforming growth factor (TGF) シグナルを抑制することが示唆された。通常、肝がん細胞の EMT は肝がんの微小環境を構成している周辺細胞 (主に星細胞あるいはクッパー細胞) からのサイトカインシグナルによって調節されている。また、肝がん細胞では PXR の発現及び活性は著しく低下することが明らかとなっている。よって PXR はこれら周辺細胞からのシグナル、特に TGF- β などのサイトカイン分泌の抑制を介して EMT を抑制していると思われる。したがって本研究では、PXR による EMT 抑制性作用の機序として、PXR による周辺細胞からのサイトカインシグナルの調節に焦点を絞り、この機序について調べた。

3. 研究の方法

3-1. マウス初代肝星細胞、ヒト肝星細胞株における PXR の発現レベルの解析と、PXR 安定発現肝星細胞株の作製

C57/BL6 マウスより、コラゲナーゼ灌流法により、肝実質および非実質細胞を得た。さらに密度勾配遠心によりマウス初代肝星細胞を単離した。単離した星細胞を CO₂ インキュベーターにて単層培養し、培養 0、1、3、6、12 時間後に RNA を回収し、定量的逆転写 PCR により *Pxr* mRNA 発現レベルを調べた。肝星細胞株である LX-2 細胞、TWNT1 細胞についても同様に、定量的逆転写 PCR により *Pxr* mRNA 発現レベルを調べた。N 末端に不安定化ドメインである DD タグを融合させたヒト PXR 遺伝子を作製し、細胞中において Plasmid が細胞分裂後の娘細胞に分配される Episomal 型ベクター (pEBMulti-puro) にクローニングした。本プラスミドを LX-2 細胞、TWNT1 細胞に導入し、puromycin によりセレクションすることで、DD タグ融合 PXR 安定発現細胞を樹立した。本細胞は Shield1 と呼ばれる化合物処置により DD タグ依存的な分解が抑制され、PXR の発現量をコントロール可能である。ウェスタンブロットおよび CYP3A4 遺伝子プロモーター上の PXR 応答配列を用いたレポーターアッセイにより、両細胞の PXR の発現量および活性化を調べた。

3-2. PXR 活性化の肝星細胞活性化への影響解析

肝星細胞活性化への PXR の影響を調べるため、DD タグ融合 PXR 安定発現 LX-2 細胞および TWNT1 細胞に、Shield1 およびヒト PXR 活性化薬である rifampicin を処置し、リコンビナント TGF- β 1 タンパク質の処置により活性化型への形質転換を誘導させた。ウェスタンブロットおよび定量的逆転写 PCR により、星細胞活性化マーカーの発現レベルを調べた。

3-3. 肝がん培養細胞株 HepG2 細胞の EMT 評価系の構築

HepG2 細胞に TGF- β 、IL-6、TNF α を処置し、上皮系マーカーである E-cadherin、間葉系マーカーである N-cadherin、Vimentin、Snail、Twist、Zeb1 の遺伝子発現を調べた。より簡便に EMT を評価するため、Vimentin プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミド (VIM-pGL4.11) を作製し、TGF- β 1 処置後のレポーター活性を調べた。HepG2 細胞に VIM-pGL4.11 を導入後、LX-2 細胞と共培養し、LX-2 細胞による HepG2 細胞 EMT 誘導作用を調べた。

3-4. HepG2 細胞 EMT への肝星細胞培養上清処置の影響解析

DD タグ融合 PXR 安定発現 LX-2 細胞および TWNT1 細胞に Shield1 および rifampicin を処置後、TGF β 処置により形質転換を誘導させた。その後、培地交換を行い、24 時間インキュベートし、培養上清 (CM) を回収した。VIM-Luc を導入した HepG2 細胞に CM を処置し、EMT への影響をレポーターアッセイにより調べた。また、TGF- β 中和抗体および TGF- β 受容体阻害薬である RepSox を共処置し、CM 処置における TGF- β シグナル阻害の影響を調べた。

3-5. PXR による肝星細胞活性化抑制作用の機序解析

DD タグ融合 PXR 安定発現 LX-2 細胞および TWNT1 細胞の網羅的な遺伝子発現解析により、細胞外マトリックスの構成タンパク質である Periostin (POSTN) の mRNA 発現レベルが減少していることが見出されたため、POSTN プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミドを作製し、レポーターアッセイにより PXR 活性化の影響を調べた。他方、LX-2 細胞に POSTN タンパク質を TGF- β と共処置し、LX-2 細胞活性化への影響、また共処置に対する PXR 活性化の影響を調べた。

4. 研究成果

4-1. マウス初代肝星細胞、ヒト肝星細胞株における PXR の発現レベルの解析と、PXR 安定発現肝星細胞株の作製

マウス初代肝星細胞の *Pxr* mRNA レベルは、播種により著しく低下し、播種 1 時間後には播種前の 10% 程度まで、3 時間後には 1% 程度まで低下することが示された。また初代マウス肝星細胞を培養後、PCN を処置し、24 時間後における PXR 標的遺伝子 *Cyp3a11*, *Slc35a5* の mRNA を調べたが、PCN 処置による増加を確認出来なかった。すなわち、マウス初代肝星細胞は、培養により PXR 発現レベルが低下してしまうため、PXR 活性による影響の評価は難しいと思われた。一方で、LX-2 細胞および TWNT1 細胞の *Pxr* mRNA 発現レベルも、播種前のマウス初代肝星細胞に比べて非常に低いことが確認され、PXR 応答配列を用いたレポーターアッセイにおいて、内在性 PXR によるレポーター活性の増加は認められなかった。そこで、肝星細胞における PXR 活性化の影響評価のためのモデル細胞構築のため、Episomal 型ベクターを用いて、両細胞に DD タグを融合させたヒト PXR を安定発現させた。ウェスタンブロットにより、Shield1 の処置濃度依存的な PXR 発現レベルの増加が確認され、さらに PXR 応答配列を用いたレポーターアッセイでは、Shield1 および rifampicin の処置により、レポーター活性の明らかな増加が確認された。以上より Shield1 の処置により、PXR 発現を調節可能な肝星細胞株を作製した。

4-2. PXR 活性化の肝星細胞活性化への影響解析

DD タグ融合 PXR 安定発現 LX-2 細胞および TWNT1 細胞を用いて、PXR 活性化の TGF- β 1 処置依存的な形質転換への影響を調べた。その結果、TGF- β 1 処置による両細胞の筋線維芽細胞様の細胞形態変化が PXR 活性化により明らかに抑制され、さらに、ウェスタンブロットおよび定量的逆転写 PCR により、COL1A1 や α -SMA 等の活性化肝星細胞マーカー、TGFB、Fibronectin の発現レベルを調べたところ、TGF- β 1 処置によりこれらのマーカーは増加したが、その増加は PXR 活性化により明らかに抑制された。

4-3. 肝がん培養細胞株 HepG2 細胞の EMT 評価系の構築

HepG2 細胞への TGF- β 1 処置により上皮系遺伝子マーカーの低下と間葉系遺伝子マーカーの増加が確認された。VIM-pGL4.11 を用いたレポーターアッセイにおいて、TGF- β 1 処置によってレポーター活性の増加が観察されたため、本実験系により EMT の評価が可能であることが示唆された。HepG2 細胞に発現プラスミドにより PXR を過剰発現させ、VIM-pGL4.11 を用いて HepG2 における PXR 活性化の EMT への影響を調べたところ、予想に反して、PXR 活性化は TGF- β 1 処置によるレポーター活性の増加を抑制させず、むしろ増加させた。すなわち、HepG2 細胞における PXR の活性化は、EMT を促進させることが示された。一方で、HepG2 細胞に VIM-pGL4.11 を導入し、LX-2 細胞と共培養すると、LX-2 細胞からの液性因子のパラクラインあるいは、ジャクスタクラインにより、レポーター活性の増加すなわち EMT は誘導されたが、LX-2 細胞の DD タグ融合 PXR の活性化により、HepG2 細胞の EMT は抑制された。

4-4. HepG2 細胞 EMT への肝星細胞培養上清処置の影響解析

VIM-pGL4.11 を用いた HepG2 細胞の EMT の評価において、LX2 細胞由来 CM の処置は、処置濃度依存的にレポーター活性を増加させた。CM 処置によるレポーター活性の増加は、RepSox および抗 TGF- β 抗体の共処置により抑制されたため、LX-2 細胞 CM による HepG2 細胞 EMT の誘導は、CM 中の TGF- β により引き起こされたと考えられた。一方で、DD-PXR 発現 LX-2 細胞 CM を用いて同様の解析を行ったところ、PXR の活性化依存的に CM 処置に伴う EMT 誘導は抑制されたため、LX-2 細胞における PXR 活性化は、LX-2 細胞の活性化型への形質転換を抑制し、それに伴い EMT 誘導に關与する液性因子の分泌を抑制させることが示された。

4-5. PXR による肝星細胞活性化抑制作用の機序解析

PXR 活性化による LX-2 細胞の形質転換抑制作用の分子機序を明らかにするため、DD-PXR 発現 LX-2 細胞及び DD-PXR 発現 TWNT1 細胞を用いた遺伝子発現解析により、関連遺伝子の発現レベルを調べた。PXR 活性化は TGF- β 1 処置の有無に関わらず細胞外マトリックスの構成タンパク質であり、インテグリン受容体を介して星細胞の形質転換に関与することが知られている POSTN の mRNA レベルを著しく減少させることが示された。LX-2 細胞に TGF- β 1 に加えて POSTN を共処置すると、星細胞活性化マーカー遺伝子の TGF- β 1 単独処置以上の増加が認められた。また DD 融合 PXR の活性化により、TGF- β 1 による活性化マーカー遺伝子の増加と POSTN によるその増強作用は、いずれも抑制された。POSTN プロモーターを用いたレポーターアッセイにおいて、PXR はレポーター活性を抑制させた。転写因子予測アルゴリズムを用いて、POSTN プロモーターの転写因子を予測したところ、NF- κ B、AP-1、SMAD、STAT 等の転写因子が抽出された、これらの転写因子を発現プラスミドによって過剰発現させ、それらによる転写活性化に対する PXR の影響を調べたところ、NF- κ B の発現に伴う明らかなレポーター活性の増加と PXR によるその抑制が認められた。以上より、PXR 活性化による POSTN の発現抑制メカニズムの一端が明らかとなった。

以上本研究により、PXR による肝がん細胞 EMT の抑制作用の分子機序が明らかとなった。C 型肝炎由来の肝がん患者に対する臨床試験において、PXR を活性化薬であるリファンピシンが経口投与で肝がん細胞の肝内転移を抑制することが報告されており (Cancer Res, 2009)、肝がん細胞の EMT 調節因子として見出された PXR が、肝がんの新たな治療ターゲットになる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shizu Ryota, Nishiguchi Hikaru, Tashiro Sari, Sato Takumi, Sugawara Ayaka, Kanno Yuichiro, Hosaka Takuomi, Sasaki Takamitsu, Yoshinari Kouichi	4. 巻 297
2. 論文標題 Helix 12 stabilization contributes to basal transcriptional activity of PXR	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100978
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2021.100978	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shizu Ryota, Ezaki Kanako, Sato Takumi, Sugawara Ayaka, Hosaka Takuomi, Sasaki Takamitsu, Yoshinari Kouichi	4. 巻 10
2. 論文標題 PXR suppresses PPAR α -dependent HMGCs2 gene transcription through inhibiting the interaction between PPAR α and PGC1 α	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3550
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells10123550.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Lee Su-Jun, Shizu Ryota, Negishi Masahiko	4. 巻 553
2. 論文標題 Glucocorticoid receptor dimerization in the cytoplasm might be essential for nuclear localization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 154 - 159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.071	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 志津怜太、吉成浩一
2. 発表標題 核内受容体を介した肝化学発がん：リスク評価に向けた機序と種差の理解
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志津怜太、吉成浩一
2. 発表標題 化学物質による肝化学発がんの種差解析～発がん性試験結果のヒト外挿性の理解～
3. 学会等名 日本薬学会第142年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 牧田夏希、志津怜太、曾部圭一郎、保坂卓臣、菅野裕一朗、佐々木崇光、吉成浩一
2. 発表標題 核内受容体CARのヒト型変異導入マウスを用いたCARによる肝発がんプロモーション作用の種差解析
3. 学会等名 第4回医薬品毒性機序研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田代紗莉依、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 乳幼児期マウスにおける核内受容体CARの活性化が甲状腺ホルモンシグナルに及ぼす影響
3. 学会等名 第4回医薬品毒性機序研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤拓海、志津怜太、馬場遼之介、石村麻衣、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 核内受容体PXRによる肝がん進行抑制機序の解析
3. 学会等名 第4回医薬品毒性機序研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤拓海、志津怜太、三浦佳恵、保坂卓臣、菅野裕一朗、佐々木崇光、吉成浩一
2. 発表標題 化学物質によるラットCAR活性化スクリーニング系の確立
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志津怜太、西口輝、田代紗莉依、佐藤拓海、菅原彩加、保坂卓臣、菅野裕一朗、佐々木崇光、吉成浩一
2. 発表標題 PXR活性化評価系構築のための、リガンド依存的に構造変化し活性化するPXR変異体の作製
3. 学会等名 日本薬物動態学会第36回年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧田夏希、志津怜太、曾部圭一郎、保坂卓臣、菅野裕一朗、佐々木崇光、吉成浩一
2. 発表標題 ヒト型変異導入マウスを用いた核内受容体CARによる肝発がんプロモーションの種差解析
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田代紗莉依、志津怜太、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 乳幼児期における核内受容体CAR活性化の甲状腺ホルモンシグナルに対する影響
3. 学会等名 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部合同学術大会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 志津怜太、吉成浩一
2. 発表標題 PXR活性化は肝がん細胞の上皮間葉転換抑制を介して肝がんの進行を抑制する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下大輔、志津怜太、西口輝、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 転写共役因子との相互作用に着目したアンドロゲン受容体バリエーション7の恒常的な活性化機序の解析
3. 学会等名 フォーラム2021衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤拓海、志津怜太、三浦佳恵、保坂卓臣、佐々木崇光、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 ラットにおける化学物質による非遺伝毒性肝発癌に対するCAR活性化の寄与
3. 学会等名 フォーラム2021衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato Takumi, Shizu Ryota, Miura Yoshie, Yoshinari Kouichi
2. 発表標題 Contribution of CAR activation to the chemical-induced non-genotoxic liver cancer in rats.
3. 学会等名 フォーラム2021衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三浦佳恵、志津怜太、佐藤拓海、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 非遺伝毒性肝がんを誘発する化学物質の核内受容体活性化作用
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤拓海、志津怜太、三浦佳恵、保坂卓臣、菅野裕一朗、吉成浩一
2. 発表標題 化学物質による肝がん予測のためのラットCAR活性化作用評価
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021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
---------	---------