

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590998

研究課題名(和文)ガンキリンのプロテアソーム制御機構を利用した展開医療研究

研究課題名(英文)Translational research focusing on the regulation of proteasome by Gankyrin

研究代表者

櫻井 俊治 (SAKURAI, Toshiharu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90397539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：多くの肝癌は慢性炎症による組織の線維化を背景に発癌し、この過程において活性酸素種(ROS)の蓄積およびその下流分子JNKが重要な役割を果たしている。癌幹細胞の増殖にはROS依存性と非依存性の経路があり、前者にはc-Jun/JNK, SOX2が、後者にはガンキリンによる血管内皮増殖因子(VEGF), Nanog発現の制御が関与している。ヒト大腸、肝癌において、ガンキリンの発現量は癌幹細胞マーカーであるCD133の発現量と有意な相関を認め、ガンキリンは炎症や幹細胞の制御を介して発癌に関与していると思われる。ROS、ガンキリンを標的とした新しい治療効果予測のバイオマーカーや治療薬の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Liver-specific p38-alpha ablation was found to enhance ROS accumulation, because it reduced the expression of HSP25. p38-alpha-deficiency also increased the expression of SOX2, c-Jun and Gankyrin and led to enhanced TAA-induced hepatocarcinogenesis. The up-regulation of SOX2 and c-Jun was prevented by administration of the antioxidant butylated hydroxyanisole. The risk of human HCC recurrence is positively correlated with ROS accumulation in the liver. Augmented oxidative stress of liver parenchymal cells may explain the close relationship between liver fibrosis and hepatocarcinogenesis. In addition, expression of CD133, a cancer stem cell marker, was significantly correlated with Gankyrin expression. Gankyrin knockdown decreased the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and stemness factors such as Nanog and Oct-4 in colorectal and liver cancer cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床学・消化器内科学

キーワード：ガンキリン 幹細胞 炎症と発癌

1. 研究開始当初の背景

肝臓は世界で3番目に死亡率の高い癌である。肝臓癌率は炎症の遷延により生じる肝線維化の進行とともに上昇し、線維化の終末像であるC型肝硬変では毎年7-8%と高率に発癌する。主な危険因子はB型、C型肝炎ウイルス(HBV, HCV)による慢性感染であるが、垂直感染防御事業や輸血血液のスクリーニングの施行により、新たなウイルス肝炎患者は減少し、一方で肝臓癌の原因としてNASHの重要性が指摘されている。NASHは肥満を背景に発生し、インスリン抵抗性を主な病態とする。プロテアソームはインスリン抵抗性および肥満の発生に重要な役割を果たしており(Wing SS, BMC Biochem 2008)、またヒトにおいて肥満とプロテアソーム活性の逆相関が認められる(Chang et al., Metabolism 2009, 58;1643)。このようなことからNASHの病態にはプロテアソームが関与していることが考えられる。

発癌とプロテアソームの関連については多くの報告がある。プロテアソームは癌抑制遺伝子 p53 を MDM2/HDM2 依存的に分解し、細胞死および細胞周期を制御する。また炎症と発癌に重要な NF- κ B の活性はプロテアソームによる I κ B の分解により制御される。このようにプロテアソームは炎症および発癌において重要な役割を果たしている。実際、血清プロテアソームレベルが肝臓癌早期に上昇することが報告されている(Henry et al., Gut 2009)。

ガンキリンは Rb と結合し、強制発現により Rb のリン酸化および分解は促進し、転写因子 E2F-1 を介して細胞周期は亢進する。また、MDM2/HDM2 と結合して p53 のユビキチン化および分解を介して細胞死を制御する。ガンキリンは7つの ankyrin repeat を有し、構造的に類似する I κ B と同様、Rel A と結合し、NF- κ B 活性を抑制する(Higashitani et

al., 2007)。近年、ガンキリンの発現の亢進は、プロテアソームの regulatory particle と core particle との相互作用を阻害し、プロテアソームの生理的な機能を阻害することが報告された (Roelofs et al., Nature 2009)。一方で、ガンキリンはプロテアソームの不可欠な構成要素である(Saeki et al., Cell 2009)。臨床的には肝臓で高発現し、発癌との関連が示唆されているが、in vivo でのガンキリンの機能は不明である。そこで本研究では、ガンキリンの transgenic mouse および conditional knock-out mouse を用いて、ガンキリンおよびプロテアソームを介する NASH、肝臓癌の分子メカニズムの解明とその臨床応用を模索する。

2. 研究の目的

肝臓は線維化を伴う慢性肝炎から高率に発生する。肝臓癌の原因として肥満、非アルコール性脂肪肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis, NASH) が指摘され、慢性炎症と肝臓との関連が重要視されている。またプロテアソームは炎症性発癌に関わる遺伝子を制御する。近年、肝臓で高発現するガンキリンがプロテアソームの不可欠な構成要素であり、その機能に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。そこで本研究は、transgenic mouse および conditional knock-out mouse を用いて、ガンキリンの NASH、肝線維化、肝臓癌における in vivo での役割をプロテアソームとの関わりに注目しながら解明する。

3. 研究の方法

(1) NASH、肝線維化におけるガンキリン及びプロテアソームの役割を解明する: ヒト NASH、肝硬変におけるガンキリン発現量、プロテアソーム活性を解析する。NASH、肝線維化マウスモデルを用いて、肝臓でのガンキリンおよびプロテアソ

ームの役割を解明する。

- (2) ガンキリンにより制御される癌関連遺伝子を同定する: ガンキリンとの結合蛋白を同定する。
- (3) ガンキリンおよびプロテアソームと肝発癌の関連について分子レベルで明らかにし、新規癌治療薬の開発を目指す: 肝発癌モデルを用いて *in vivo* で解析する。発癌に重要である NF- κ B, IL-1, MAPK へのガンキリンの影響を検討する。

4. 研究成果

HBx promoter/enhancer を使用したガンキリントランスジェニックマウスは生後 10 か月の時点で血管肉腫様の腫瘍が出現した。また、化学発癌剤である diethylnitrosamine (DEN) を 2 週齢の雄に投与すると、8 か月後に高分化肝細胞癌を認め、トランスジェニックマウスでコントロールマウスに比べてその腫瘍数と腫瘍サイズが有意に亢進した。SAP promoter を使用したトランスジェニックマウスにおいても同様に、DEN 投与後の肝発癌が亢進した。

ヒト肝細胞癌の生検サンプルより RNA を抽出し qRT-PCR を行った。ガンキリンの発現量と vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現量との間に正の相関を認めた。ヒト大腸癌組織においてガンキリンと VEGF の発現量との間に有意な相関を認め、このことはガンキリンが血管新生を介して肝、大腸発癌に関わっていることを示唆している。

肝癌細胞株を用いて実験を行った。ガンキリンは検討したすべての細胞株で発現が亢進していた。siRNA にてガンキリンの発現を低下させると、VEGF の発現が低下した。大腸癌細胞株においても、ガンキリンが VEGF, stemness factor Nanog の発現を促進し、また VEGF は Nanog の発現を直接制御することを確認した(Lui et al 2012; Mine et al 2013)。

ガンキリンが幹細胞の増幅を制御している可能性がある。

MAPK の一つである p38 は肝発癌に重要である。p38alpha floxed mouse と Albumin-Cre トランスジェニックマウスを交配すると、肝細胞だけでなく幼若な細胞においても p38alpha が欠損する。この conditional KO mouse において、DEN 投与後、ガンキリンおよび幹細胞の分子マーカーである SOX2 の発現が亢進する。

多くの肝癌は慢性炎症による組織の線維化を背景に発癌し、この過程において活性酸素種 (ROS) の蓄積およびその下流分子 JNK が重要な役割を果たしている。Thioacetamide (2.5%) をマウスに 10 か月間経口投与することで、慢性肝炎、肝線維化を経て肝細胞癌ができることを見出した。TAA 投与による慢性肝炎において、ROS 依存性に c-Jun/JNK 経路の活性化および stemness factor SOX2 の発現が亢進し、また ROS 非依存性にガンキリンの発現が亢進し、発癌に貢献する。

epithelial mesenchymal transition (EMT) は癌細胞の浸潤、転移に重要な病態と考えられている。ガンキリンは、TWIST, SNAIL など EMT に関わる遺伝子発現に影響があった。一方で、ガンキリン knock-down による NF- κ B, MAPK への影響は限定的であった。ストレス応答蛋白は外界からの刺激に対して生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。HSP27 は ROS の蓄積を阻害し、肝発癌を抑制し、一方で EMT 及び癌の脱分化に関与する可能性がある。ガンキリンとストレス応答蛋白の関連について今後研究を進めていく。

分子標的薬ソラフェニブ治療前に肝生検にて採取した肝組織を用いた検討にて、治療抵抗性に関わる遺伝子を検討した肝癌患者におけるソラフェニブ治療抵抗性および予

後と癌幹細胞マーカーである CD133 の発現量との間に相関があり、治療抵抗性の獲得における癌幹細胞の重要な関与が示唆された。JNK 活性がソラフェニブ治療抵抗例で高い傾向を示した。ガンキリンの幹細胞制御機構を考えると、ガンキリンがソラフェニブなど化学療法奏功性と関連があることが予想される。今後ヒトにおいても研究を進めていく。

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 28 件)

* corresponding author

Sakurai T*, Kudo M. Molecular Link between Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer*. 2013;2:365-366. 査読有

Nishida N, Arizumi T, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Inoue T, Minami Y, Ueshima K, Sakurai T, Kudo M. Reactive Oxygen Species Induce Epigenetic Instability through the Formation of 8-Hydroxydeoxyguanosine in Human Hepatocarcinogenesis. *Dig Dis*. 2013;31(5-6):459-66. 査読有

Sakurai T*, Kudo M., Watanabe T, Itoh K, Higashitsuji H, Arizumi T, Inoue T, Hagiwara S, Ueshima K, Nishida N, Fukumoto M, Fujita J. Hypothermia Protects against Fulminant Hepatitis in Mice by Reducing Reactive Oxygen Species Production. *Dig Dis*. 2013;31(5-6):440-6. 査読有

Nishida N, Kudo M., Nishimura T, Arizumi T, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Inoue T, Minami Y, Ueshima K, Sakurai T, Yokomichi N, Nagasaka T, Goel A. Unique Association between Global DNA Hypomethylation and Chromosomal Alterations in Human Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One*. 2013 Sep 2;8(9):e72312. 査読有

Hagiwara S, Kudo M., Osaki Y, Matsuo H, Inuzuka T, Matsumoto A, Tanaka E, Sakurai T*, Ueshima K, Inoue T, Yada N, Nishida N. Impact of peginterferon alpha-2b and entecavir hydrate combination therapy on persistent viral suppression in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol*. 2013 Jun;85(6):987-95. 査読有

Mine H, Sakurai T*, Kashida H, Matsui S, Nishida N, Nagai T, Hagiwara S, Watanabe T, Kudo M. (2013) Association of Gankyrin and stemness factor expression in human colorectal cancer. *Dig Dis Sci*. 2013 Aug;58(8):2337-44. 査読有

Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. (2013) Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 432:22-7. 査読有

Sakurai T*, Kudo M., Umemura A, He G, Elsharkawy AM, Seki E, Karin M. (2013) p38 Inhibits Liver Fibrogenesis and Consequent Hepatocarcinogenesis by Curtailing Accumulation of Reactive Oxygen Species. *Cancer Res*. 73(1):215-24. 査読有

Nagata Y, Kudo M., Nagai T, Watanabe T, Kawasaki M, Asakuma Y, Hagiwara S, Nishida N, Matsui S, Kashida H, Sakurai T*. (2013) Heat shock protein 27 expression is inversely correlated with atrophic gastritis and intraepithelial neoplasia. *Dig Dis Sci*. 58:381-8. 査読有

Arao T, Ueshima K, Matsumoto K, Nagai T, Kimura H, Hagiwara S, Sakurai T, Haji S, Kanazawa A, Hidaka H, Iso Y, Kubota K, Shimada M, Utsunomiya T, Hirooka M, Hiasa Y, Toyoki Y, Hakamada K, Yasui K, Kumada T, Toyoda H, Sato S, Hisai H, Kuzuya T, Tsuchiya K, Izumi N, Ariei S, Nishio K, Kudo M. (2013) FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 57:1407-15. 査読有

Nishida N, Arizumi T, Takita M, Nagai T, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Inoue T, Minami Y, Ueshima K, Sakurai T, Ida H, Kudo M. (2013) Quantification of tumor DNA in serum and vascular invasion of human hepatocellular carcinoma. *Oncology*. 84 Suppl 1:82-7. 査読有

Inoue T, Kudo M., Hatanaka K, Arizumi T, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Minami Y, Sakurai T, Ueshima K, Nishida N. (2013) Usefulness of Contrast-Enhanced Ultrasonography to Evaluate the Post-Treatment Responses of Radiofrequency Ablation for

Hepatocellular Carcinoma: Comparison with Dynamic CT. *Oncology*. 84 Suppl 1:51-7. 査読有

Hagiwara S, Sakurai T, Takita M, Ueshima K, Minami Y, Inoue T, Yada N, Kitai S, Nagai T, Hayaishi S, Arizumi T, Nishida N, Kudo M. (2012) Risk of Hepatocellular Carcinoma Development in Cases of Hepatitis C Treated by Long-Term, Low-Dose PEG-IFN -2a. *Dig Dis*. 30:561-7. 査読有

Nishida N, Arizumi T, Hayaishi S, Takita M, Kitai S, Yada N, Hagiwara S, Inoue T, Minami Y, Ueshima K, Sakurai T, Ikai I, Kudo M. (2012) Gender differences in the livers of patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C infection. *Dig Dis*. 30:547-53. 査読有

Hagiwara S, Sakurai T, Nishina S, Tanaka K, Ikeda M, Ueshima K, Minami Y, Inoue T, Yada N, Kitai S, Takita M, Nagai T, Hayaishi S, Arizumi T, Park AM, Munakata H, Nishida N, Kudo M (2012) Characteristic Pattern of Reactivation of Hepatitis B Virus during Chemotherapy for Solid Cancers. *Dig Dis*. 30:541-6. 査読有

Sumitomo Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Liu Y, Fujita T, Sakurai T, Candeias MM, Itoh K, Chiba T, Fujita J. (2012) Identification of a novel enhancer that binds Sp1 and contributes to induction of cold-inducible RNA-binding protein (cirp) expression in mammalian cells. *BMC Biotechnol*. 12:72. 査読有

Masuda T, Itoh K, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Nakazawa N, Sakurai T, Liu Y, Tokuchi H, Fujita T, Zhao Y, Nishiyama H, Tanaka T, Fukumoto M, Ikawa M, Okabe M, Fujita J. (2012) Cold-inducible RNA-binding protein (Cirp) interacts with Dyrk1b/Mirk and promotes proliferation of immature male germ cells in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:10885-90. 査読有

Watanabe T, Yamashita K, Sakurai T, Kudo M, Shiokawa M, Uza N, Kodama Y, Uchida K, Okazaki K, Chiba T. (2012) Toll-like receptor activation in basophils contributes to the development of IgG4-related disease. *J Gastroenterol*. 48:247-53. 査読有

Hagiwara S, Kudo M, Nagai T, Inoue T, Ueshima K, Nishida N, Watanabe T, Sakurai T*. (2012) Activation of JNK and High Expression Level of CD133 Predict

a Poor Response to Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma. *Br J Cancer* 106:1997-2003. 査読有

Park AM, Kudo M, Hagiwara S, Tabuchi M, Watanabe T, Munakata H, Sakurai T*. (2012) p38MAPK suppresses chronic pancreatitis by regulating HSP27 and BAD expressions. *Free Radical Biol Med*. 52:2284-2291. 査読有

②① Inoue T, Kudo M, Komuta M, Hayaishi S, Ueda T, Takita M, Kitai S, Hatanaka K, Yada N, Hagiwara S, Chung H, Sakurai T, Ueshima K, Sakamoto M, Maenishi O, Hyodo T, Okada M, Kumano S, Murakami T. (2012) Assessment of Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI for HCC and dysplastic nodules and comparison of detection sensitivity versus MDCT. *J Gastroenterol*. 査読有 47(9):1036-47.

②② Hagiwara S, Kudo M, Chung H, Ueshima K, Haji S, Watanabe T, Park AM, Munakata H, Sakurai T*. (2012) Activation of JNK in the non-cancerous liver tissue predicts a high risk of recurrence after hepatic resection. *Hepatol Res*. 42:394-400. 査読有

②③ Sakurai T*, Kudo M, Itoh K, Ryu U, Higashitsuji H, Fujita J. (2011) Adriamycin Enhances Proteasome-Mediated Generation of the Proapoptotic Processed Form of MAGE-A4 in Hepatoma Cells. *Oncology*. 81 Suppl 1:30-5. 査読有. 査読有

②④ Sakurai T*, Kudo M. (2011) Signaling pathways governing tumor angiogenesis. *Oncology*. 81 Suppl 1:24-9. 査読有

②⑤ Sakurai T, Kudo M. (2011) Association of interleukin-28B and hepatitis C genotype 1 with a high viral load and response to pegylated interferon plus ribavirin therapy. *Digestion*. 84 Suppl 1:56-61. 査読有

②⑥ Watanabe T, Yamashita K, Fujikawa S, Sakurai T, Kudo M, Shiokawa M, Kodama Y, Uchida K, Okazaki K, Chiba T. (2011) Involvement of activation of toll-like receptors and NOD-like receptors is involved in enhanced IgG4 responses in autoimmune pancreatitis. *Arthritis Rheum*. 64:914-24. 査読有

②⑦ Ueshima K, Kudo M, Takita M, Nagai T, Tatsumi C, Ueda T, Kitai S, Ishikawa E, Yada N, Inoue T, Hagiwara S, Minami Y, Chung H, Sakurai T. (2011) Des- -Carboxyprothrombin May Be a Promising Biomarker to Determine the Therapeutic Efficacy of Sorafenib for

Hepatocellular Carcinoma. *Digestion*. 29, 321-325. 査読有

- ⑳ Sakurai T, Kudo M, Fukuta N, Nakatani T, Kimura M, Park AM, Munakata H. (2011) Involvement of angiotensin II and reactive oxygen species in pancreatic fibrosis. *Pancreatology*. 11 suppl 2:7-13. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

櫻井俊治, 他、Japan Digestive Disease Week 2013 ワークショップ、肝発癌および治療抵抗性獲得における幹細胞の役割、2013年10月11日 東京

櫻井俊治, 他、日本消化器癌発生学会総会シンポジウム、大腸発癌における幹細胞の制御機構、2013年9月5日 金沢

永田嘉昭、櫻井俊治, 他、第99回日本消化器病学会総会、胃粘膜上皮のHSPA27発現は上皮内癌の発生リスクと負の相関を示す、2013年3月23日 鹿児島

櫻井俊治, 他、第99回日本消化器病学会総会、慢性膵炎におけるp38MAPK, HSPA27の役割、2013年3月21日 鹿児島

櫻井俊治, 他、Digestive Disease Week 2012、Activation of JNK in the non-cancerous liver tissue predicts a high risk of recurrence after hepatic resection for hepatocellular carcinoma、2012年5月21日 米国サンディエゴ

萩原智、櫻井俊治、工藤正俊、日本肝臓学会総会シンポジウム、肝細胞癌治療におけるJNK活性の重要性、2011年6月2日 東京

〔図書〕(計2件)

櫻井俊治, 他、The Liver Cancer Journal、シグナル伝達異常とバイオマーカー探索、2012年 Vol.4 35-39

櫻井俊治, 他、最新医学社、トップラナーに聞く、2011年 Vol. 66 1207-1210

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 俊治 (SAKURAI, Toshiharu)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：90397539

(2) 研究分担者

工藤 正俊 (KUDO, Masatoshi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：10298953

(3) 連携研究者

藤田 潤 (FUJITA, Jun)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50173430