

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32713

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591998

研究課題名(和文)ヌクレオフォスミン(NPM)の解析による肝細胞癌発癌機構及びその治療法の解明

研究課題名(英文)Discover the Full Breadth of Liver carcinogenesis and Treatment with Analysis of NPM

研究代表者

榎本 武治(Enomoto, Takeharu)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：70350626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：HBxは肝細胞癌発癌機構に最も関与することが報告されている。我々は様々な機能を有し世界的に研究されているNPMとの関連について研究した。
J Biol Chem. 2001にあるHBxadrを作成して申請書類に準じて研究を予定とした。Gengらによって報告されたProc Natl Acad Sci U S A. 2012によればadr型のHBxは亜型であり、Addgene社よりpcDNA3.1FlagHBxを購入した。しかし、flag、HBx両方にatgが付加されていた。タカラ社のSite-directed mutagenesis kitで作成からやり直したため、研究に大幅な遅れが生じた。

研究成果の概要(英文)：HBx is well reported to be associated with Liver Carcinogenesis. We investigated that relation with multifunctional protein NPM and HBx. According to the Forgues et al. used HBxadr for examination so that we started to use same vector. But recently, Geng et al reported that they used new peptide sequences. We decided to use this new sequence. They had some mistakes in the sequences. We are figure out that problem and we made again from the beginning using Site-directed mutagenesis kit (TaKaRa). The effect of this step will be to delay having done experiments.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：NPM HBx

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は原発性肝悪性腫瘍の約90%を占め、原因として多くは肝炎ウイルスが関係している。世界的には、アジアとアフリカを中心として3億5千万人も持続感染しているB型肝炎ウイルスが原因となる肝細胞癌の患者数の方がC型肝炎ウイルスより多いのが現状である。ウイルス感染による発癌機序として、C型肝炎ウイルスは慢性炎症を繰り返すことにより、各種遺伝子の変異が起こりこの蓄積で発癌するのに対して、B型肝炎ではウイルス自体が直接的に発癌に関与していると考えられている。

Hepatitis B X protein (HBx)はB型肝炎ウイルスにエンコードされ、B型肝炎ウイルスによる肝細胞癌発癌機構に最も関与することが報告されている蛋白質である(Mark A. Feiston. *J Cell Physiol* 181:188-202, 1999)。その機序として、この蛋白質を核から細胞質へ輸送するという重要な機序に関わる核外輸送因子Crm1がHBxを細胞質に輸送し、中心体分裂に不安定性を引き起こし発癌することが報告されている(Forgues M. et al. *Mol Cell Biol.* 23:5282-5292, 2003)。

核小体蛋白質ヌクレオフォスミン(NPM)は5量体を形成して非常に安定する蛋白質である。Multifunctional nucleolar proteinと呼ばれ様々な機能を有し世界的に研究されているが、特に癌との関連では、以前より癌遺伝子として報告されていたが(Feuerstein, N. et al. *J Biol Chem.* 262:11389-11397, 1987)、腫瘍抑制機能があると考えられ、癌抑制遺伝子の経路として最も重要な一つとして理解されているp14ARF-MDM2-p53経路を調節している分子シャペロンである(*Mol. Cell* 12:1151-1164, 2003)。また、NPM遺伝子が癌関連転座(NPM/ALK)におけるパートナーであることから、一部の白血病およびリンパ腫では発癌因子様にも作用している(Morris SW., et al.

Science 263:1281-4, 1994)。白血病や悪性リンパ腫といった造血系腫瘍とNPMの局在が非常に重要であると報告されている(*N Engl J Med.* 352:254-66, 2005)。細胞周期制御においては、中心体分裂に関与することが知られていたが(Okuda M. et al. *Cell* 103:127-40, 2000)、最近になり、NPMの細胞質への輸送能はCrm1によってコントロールされていることが報告された(Wei Wang et al. *Nat Cell Biol.* 7:823-30, 2005)。多くの癌で過剰発現するNPMが、B型肝炎ウイルス発がんの原因となるHBxによる新しい肝細胞癌発癌機構制御に関わる可能性があり、治療に応用される可能性が示唆された。

2. 研究の目的

Hepatitis B X protein (HBx)は、B型肝炎ウイルス発がんに必要な蛋白質である。研究代表者は、白血病、悪性リンパ腫の原因物質として世界的に研究が進められているヌクレオフォスミン(NPM)の基質識別領域と結合することを明らかにし、HBxの機能発現にはNPMがその制御に一躍を担っていることを目的とした。

3. 研究の方法

NPMとHBxの発現部位と構造の解析が重要である。NPM発現抑制下でのHBxの相互作用をin vitroの観点から検討する。in vitroのみならずin vivoの検討も追加して、HBxによる肝細胞癌の発癌制御を検討する。

- (1) 癌細胞由来の培養細胞株においてNPMを強制的に発現抑制下に、HBxの局在について観察する。
- (2) Crm1複合体に対して特異的に陰性の作用を示すleptomycin Bの投与下に、NPMとHBxの関連を見るため、in vitroで共発現させたこの二つの蛋白質を検討する。
- (3) 変異型NPMをコントロールすることに肝癌標的治療の可能性があると考え、HBxペプチドを作成しNPMにおける機能抑制を検

討する。NPM及び上記した点変異型NPMを用いてHBxペプチドとミックスした上で、In vitro translation kitにて解析を行う。

- (4) in vivoにて肝癌発癌マウスを用いたNPMの強制発現抑制下においてHBxの機能解析を行う。HBxの強発現が確認される肝細胞癌細胞株をヌードマウスに移植し、肝癌マウスを作成する。NPM siRNAを作成し、体内の癌細胞の変化をRT-PCRを用いたmRNAの発現頻度にて検討する。

4. 研究成果

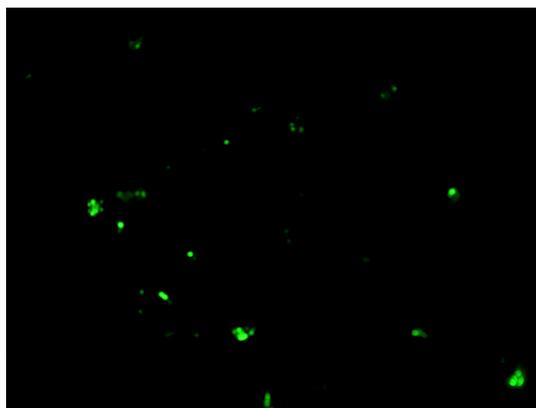
Forguesらによって2001年に報告された(J Biol Chem. 2001 Jun 22. 276(25):22797-803) adr型HBxを用いて研究を開始した(GenBank: AY123041.1)。GFP強制発現可能なベクターに導入されたHBxを核内に確認した(Figure. 1)。その後は研究計画に準ずる予定であったが、2012年にGengらによって報告された論文(Proc Natl Acad Sci USA. 2012 Nov 6;109(45):18471-6. doi: 10.1073/pnas.1204668109. Epub 2012 Oct 22)によれば、adr型HBxの発現は、HBxの発現としては亜型と判断した。我々は時間短縮のため、Gengらが使用しpcDNA3.1FlagHBxをAddgene社より購入することが可能であったため、使用することとした。HBx蛋白発現を確認するため行ったウェスタンブロッティング法を用いて発現を確認することが出来た。変異体作成のため行ったマッピングにて、この発現物質にはflag並びにHBx両方に開始コドンであるメサオニン(atg)が付加されていた。タカラ社のSite-directed mutagenesis kitを使用し、プライマーとしてflagHBxMGF5' -T GAC AAG ATG GCT GCT AGG CTG TAC TGC-3'並びにflagHBxMGR3' -TTC CTA CTG CTA CTG TTC TAC CGA CGA TC-5'を作成し、PCR法を用いて作成した(Figure. 2a, b)。ウェスタンブロッティング法を用いてHBx蛋

白の発現を確認することが出来た

(Figure. 3)が、免疫染色法を用いてHBxの局在を確認できなかった。今後、違う抗体を使用して更なる実験を勧めていく。

NPMに関して、U2OS細胞において細胞内発現がすでに確認されており、今回我々の検討でも確認することが出来た(Figure. 4)。また、今後の研究成果を左右するNPMの細胞内移動の検討であるが、抗癌剤である5Fu, 10nMを24時間細胞内に封入し、このまま免疫染色法にて(Figure. 5a, 5b)観察した。5Fuの投与にてNPMが核内から核外に移動することを確認した。

Figure. 1



U2OS細胞にpGFP-HBxをリポフェクタミン2000にて遺伝子導入し、24時間後に蛍光顕微鏡にて観察。

Figure. 2

a. Addgene社より購入したプラスミドのシーケンス結果

```
3U          4U          5U          6U
: A T G A C A A G A T G G C T G C T A G G C T G T A C T G C C A A
```

b. 我々の Site-directed mutagenesis kit を用いた方法

3' AC G AT G AC AA G 5' CT GC T A G G CT G T AC T G CC AA 3'

Figure. 3

pcDNA3.1flagHBx のウェスタンブロッティング法による解析

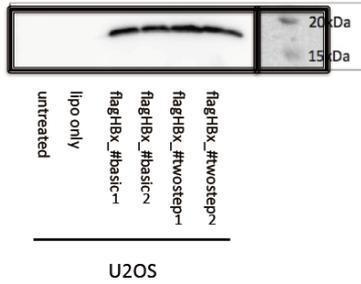


Figure. 4

a. U2OS 細胞内の NPM 蛋白の発現について

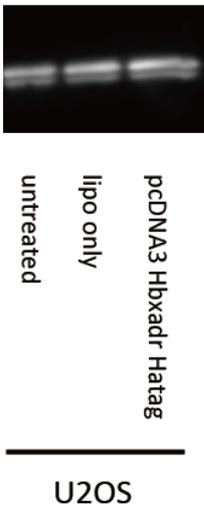
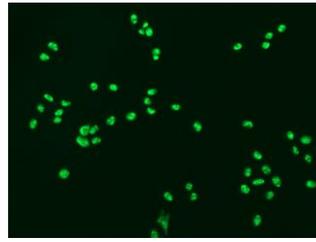
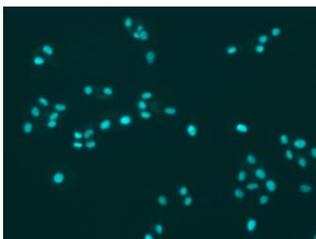
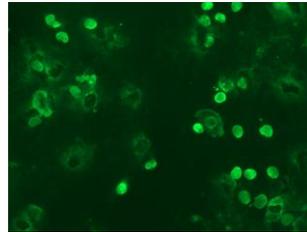
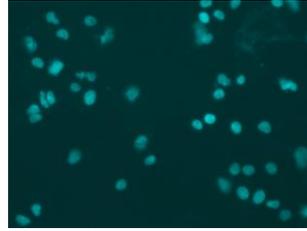


Figure. 5a, b

a. 5Fu 未投与 U2OS 細胞内 NPM



b. 5Fu 10nM 24 時間投与 U2OS 細胞 細胞内 NPM



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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 武治 (ENOMOTO, Takeharu)

聖マリアンナ医科大学・医学部・助教

研究者番号：70350626