

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 10 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590955

研究課題名(和文) 肝癌、膵癌における核内受容体と小胞体ストレスの相互作用に関する研究

研究課題名(英文) Involvement of androgen receptor and unfolded protein response in human liver and pancreatic cancers

研究代表者

神田 達郎 (KANDA, TATSUO)

千葉大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20345002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：1) 小胞体ストレスは自然免疫による肝細胞障害に重要な役割を果たしている。2) 男性優位癌の一つである肝癌ではアンドロゲンレセプターシグナルがGRP78をはじめとする小胞体ストレスシグナルに影響を及ぼしていることを確認した。3) HCV感染肝細胞ではGRP78の発現増強によりアポトーシス抵抗性を獲得している。4) アンドロゲンレセプター高発現膵癌細胞株KP-2細胞では、特に小胞体ストレスシグナルがアポトーシス抵抗性に關与していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：(1) Endoplasmic reticulum (ER) stress response plays a key role in hepatic cell damage induced by an innate immune response. (2) Androgen receptor (AR) and ER-stress response are cooperatively involved in human liver cancer, one of the male-dominant cancers. (3) Hepatitis C virus (HCV) infection enhances GRP78 expression, which confers to the resistance against apoptosis in HCV-infected hepatocytes. (4) ER stress response plays an important role in pancreatic cancer cell line KP-2, in which AR highly expresses.

研究分野：医歯学

キーワード：アンドロゲンレセプター 小胞体ストレス 自然免疫 肝細胞癌 膵癌 C型肝炎ウイルス GRP78
アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

- (1) C型肝炎ウイルス(HCV)およびB型肝炎ウイルス(HBV)感染による慢性肝炎、肝硬変から肝細胞癌が発症する。また非B非C型肝炎細胞癌ではその原因として非アルコール性脂肪肝炎なども注目されている。その病態形成に小胞体 (ER)ストレスが重要な役割を果たしていることが報告されている。
- (2) ER ストレスは unfolded protein response (UPR)と呼ばれ、inositol-requiring enzyme 1 (IRE1 α)、PKR-like ER kinase (PERK)、activating transcription factor 6 (ATF6) など ER stress response factor (ERSF)の活性化により誘導開始される。これらは ER 内分子シャペロン Glucose-regulated protein (GRP) 78 の発現亢進と関連している。
- (3) ER 内の蛋白の折りたたみ異常や構造異常のタンパク質(unfolded protein)の蓄積、すなわち ER ストレスが UPR を誘導し、過剰な場合は細胞がアポトーシス等により死んでゆく。
- (4) 様々な癌で ER ストレスシグナルと腫瘍発育および進展の関連が示唆されている。
- (5) 肝細胞癌はその原因に限らず多かれ少なかれその発症頻度に2:1~4:1で男性優位という性差が存在する。
- (6) 膵癌でもアンドロゲン受容体(AR)シグナルが癌発育、進展に重要である。
- (7) GRP78 が AR の標的遺伝子であることが明らかにされた。AR、GRP78、AKT の分子間相互作用が非常に重要であるとされている。

2. 研究の目的

- (1) これまでに男性優位である肝癌において ER ストレスと AR シグナル伝達経路を詳細に検討した報告は国内外においてみられていない。
- (2) 肝疾患および膵疾患における ER ストレスシグナルと AR を含む核内レセプターシグナルの相互作用を検討することにより新たな発癌進展の分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

- (1) Stat3 および AR を knock-down した肝細胞を得るために、short hairpin RNA 発現 vectors psh-Stat3、psh-AR、psh-control (コントロール vector)を HepG2 に遺伝子導入し、Stable cell line を作成した。Stat3、AR の発現および ER ストレス関連分子の発現を real-time RT-PCR および Western blotting にて確認した。
- (2) AR を knock-down した肝癌細胞 Huh7-sh-AR とコントロール Huh7-sh-control を用いて、ER ストレスマーカーGRP78 の発現状態を real-time RT-PCR および Western blotting にて検討した。
- (3) AR を強制発現させた場合の GRP78 発現および ER stress responsive elements (ESRE)、AR-responsive elements (ARE)の活性化を Western blotting およびレポーターアッセイにてそれぞれ検討した。

- (4) 臨床検体(OriGene Tissue-qPCR-array)を用いて肝細胞癌における AR および GRP78 発現状態を real-time PCR にて検討した。
- (5) AR 及び GRP78 の knock-down が Sorafenib 誘導性アポトーシスに与える影響を検討した。
- (6) ER ストレス誘導剤 Thapsigargin (TG) (1 μ M)の存在下および非存在下で膵癌細胞株における GRP78 およびその下流分子の発現を Western blotting を用いて検討した。
- (7) GRP78 に対する siRNA を用いて TG 存在下における PARP 切断を Western blotting を用いて検討した。
- (8) HCV JFH1 の感染による ER ストレスの誘導を行なった。
- (9) HepG2 control と HepG2-NS5A 細胞に TG により細胞死を誘導し、HCV NS5A の影響を検討した。
- (10) NS5A ISDR に変異を導入し、その影響を検討した。
- (11) LPS 投与による GRP78 誘導、PARP 切断をはじめとする肝細胞アポトーシスに与える影響を検討した。GRP78 強制発現を行いこれらに対する GRP78 の効果を確認した。

4. 研究成果

- (1) HepG2-sh-AR では GRP78 をはじめとする ER ストレス関連分子の発現が低下していた。
- (2) HepG2-sh-AR では Tg による ER ストレス誘導も低下していた。HepG2 を AR 阻害剤 Flutamide にて処理すると容量依存性に GRP78 発現の低下がみられた。
- (3) Huh7-sh-control と比較すると Huh7-sh-AR では GRP78 の発現が低下していた。
- (4) Huh7 細胞で AR を強制発現させると ARE および ESRE の活性化の増強が確認された。
- (5) 臨床検体を用いた検討で、特に Stage I/II の肝細胞癌で AR および GRP78 mRNA の強い相関関係がみられた。
- (6) HepG2 を用いた検討で、AR と GRP78 両者とともに knock-down すると、Sorafenib 誘導性アポトーシスが増強した。
- (7) 膵癌細胞株 (KP-2, MIAPaCa-2, Panc-1, SUIT-2)は恒常的に GRP78 を発現していた。
- (8) TG は膵癌細胞株において GRP78 発現を増加させ、TG 存在下において GRP78 の knock-down は PARP 切断を増強させた。AR を高発現している KP-2 細胞では TG により、GADD34、ATF4、ATF6、XBPI の発現増強および eIF2 α のリン酸化の増加が特に強くみられた。
- (9) Huh7 に HCV JFH1 の感染実験を行なうと GRP78 をはじめとする ER ストレス関連分子の発現誘導を real time RT-PCR で確認した。
- (10) 一方、HepG2 細胞を用いた検討で HCV NS5A は TG 誘導性アポトーシスを阻害した。この作用は HCV NS5A による GRP78 の発現増強と関連していた。
- (11)HCV NS5A により PARP 切断、Caspase-3、-7、-9 や Bax の発現減弱がみられた。

(12) また免疫染色により NS5A と GRP78 の相互作用を確認した。

(13) NS5A ISDR に変異を導入しても影響はみられなかった。

(14) LPS により GRP78 の発現低下がみられ、PARP 切断がみられた。GRP78 の強制発現により PARP 切断は改善した。

以上のように肝細胞癌・膵癌では AR シグナル・GRP78 など ER ストレスが発癌・進展、特にアポトーシスに重要な影響を及ぼしていることを確認した。

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 12 件)

Xia Jiang, Tatsuo Kanda, Shingo Nakamoto, Kengo Saito, Masato Nakamura, Shuang Wu, Yuki Haga, Reina Sasaki, Naoya Sakamoto, Hiroshi Shirasawa, Hiroaki Okamoto, Osamu Yokosuka. The JAK2 inhibitor AZD1480 inhibits hepatitis A virus replication in Huh7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (査読有), 458(4), 2015, 908-912. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.02.058.

Shuang Wu, Shingo Nakamoto, Tatsuo Kanda, Xia Jiang, Masato Nakamura, Tatsuo Miyamura, Hiroshi Shirasawa, Nobuyuki Sugiura, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Tooru Gono, Osamu Yokosuka. Ultra-deep sequencing analysis of the hepatitis A virus 5'-untranslated region among cases of the same outbreak from a single source. *International Journal of Medical Sciences*. (査読有), 11(1), 2014, 60-64. doi: 10.7150/ijms.7728.

Xia Jiang, Tatsuo Kanda, Shingo Nakamoto, Tatsuo Miyamura, Shuang Wu, Osamu Yokosuka. Involvement of androgen receptor and glucose-regulated protein 78 kDa in human hepatocarcinogenesis. *Experimental Cell Research*. (査読有), 323(2), 2014, 326-336. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.02.017.

Xia Jiang, Tatsuo Kanda, Shuang Wu, Masato Nakamura, Tatsuo Miyamura, Shingo Nakamoto, Arup Banerjee, Osamu Yokosuka. Regulation of microRNA by hepatitis B virus infection and their possible association with control of innate immunity. *World Journal of Gastroenterology*. (査読有), 20(23), 2014, 7197-7206. doi: 10.3748/wjg.v20.i23.7197.

Xia Jiang, Tatsuo Kanda, Shuang Wu, Shingo Nakamoto, Kengo Saito, Hiroshi Shirasawa, Tomoko Kiyohara, Koji Ishii, Takaji Wakita, Hiroaki Okamoto, Osamu Yokosuka. Suppression of La antigen exerts potential antiviral effects against hepatitis A

virus. *PLoS One*. (査読有), 9(7), 2014, e101993. doi:

10.1371/journal.pone.0101993.

Tatsuo Kanda, Xia Jiang, Osamu Yokosuka. Androgen receptor signaling in hepatocellular carcinoma and pancreatic cancers. *World Journal of Gastroenterology*. (査読有), 20(28), 2014, 9229-9236. doi: 10.3748/wjg.v20.i28.9229.

Xia Jiang, Tatsuo Kanda, Shingo Nakamoto, Yuki Haga, Reina Sasaki, Masato Nakamura, Shuang Wu, Rintaro Mikata, Osamu Yokosuka. Knockdown of glucose-regulated protein 78 enhances poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in human pancreatic cancer cells exposed to endoplasmic reticulum stress. *Oncology Reports*. (査読有), 32(6), 2014, 2343-2348. doi: 10.3892/or.2014.3533.

Xia Jiang, Tatsuo Kanda, Shuang Wu, Shingo Nakamoto, Takaji Wakita, Hiroshi Shirasawa, Osamu Yokosuka. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A inhibits thapsigargin-induced apoptosis. *PLoS One*. (査読有), 9(11), 2014, e113499. doi: 10.1371/journal.pone.0113499.

Xia Jiang, Tatsuo Kanda, Takeshi Tanaka, Shuang Wu, Shingo Nakamoto, Fumio Imazeki, Osamu Yokosuka. Lipopolysaccharide blocks induction of unfolded protein response in human hepatoma cell lines. *Immunology Letters*. (査読有), 152(1), 2013, 8-15. doi: 10.1016/j.imlet.2013.03.006.

Tatsuo Kanda, Xia Jiang, Shingo Nakamoto, Masato Nakamura, Tatsuo Miyamura, Shuang Wu, Osamu Yokosuka. Different effects of three interferons L on Toll-like receptor-related gene expression in HepG2 cells. *Cytokine*. (査読有), 64(2), 2013, 577-583. doi: 10.1016/j.cyto.2013.08.010.

Shuang Wu, Tatsuo Kanda, Shingo Nakamoto, Xia Jiang, Tatsuo Miyamura, Sueli M. Nakatani, Suzane Kioko Ono, Azusa Takahashi-Nakaguchi, Tooru Gono, Osamu Yokosuka. Prevalence of hepatitis C virus subgenotypes 1a and 1b in Japanese patients: ultra-deep sequencing analysis of HCV NS5B genotype-specific region. *PLoS One*. (査読有), 8(9), 2013, e73615. doi: 10.1371/journal.pone.0073615.

Masato Nakamura, Tatsuo Kanda, Shingo Nakamoto, Tatsuo Miyamura, Xia Jiang, Shuang Wu, Osamu Yokosuka. No correlation between PNPLA3 rs738409 genotype and fatty liver and hepatic cirrhosis in Japanese patients with HCV. *PLoS One*. (査読有), 8(12), 2013, e81312. doi: 10.1371/journal.pone.0081312.

〔学会発表〕(計 20 件)

T. Kanda. TARGETING THERAPY Hepatitis C. 24th Annual Conference of APASL, Istanbul, Turkey, 2015.3.14 (HARBİYE AUDITORIUM, HARBİYE AUDITORIUM). (口演)

Shingo Nakamoto, Tatsuo Kanda, Shuang Wu, Xia Jiang, Yuki Haga, Reina Sasaki, Masato Nakamura, Hiroshi Shirasawa, Osamu Yokosuka. Screening of epigenetic compound library using primary cell-based hepatitis B virus infection system. 24th Annual Conference of APASL, Istanbul, Turkey, 2015.3.13. (HARBİYE AUDITORIUM, BEYAZIT). (口演)

Y. Haga, T. Kanda, R. Sasaki, M. Nakamura, X. Jiang, S. Wu, S. Nakamoto, O. Yokosuka. mRNAs expression profiles of MAPKs and their related genes in human hepatoma cell lines with integrated HBV DNA fragments. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B – Recent Progress in Basic and Clinical Research – Hotel Granvia Hiroshima, Hiroshima, 2014.11.20. P-13

M. Nakamura, T. Kanda, Y. Haga, R. Sasaki, X. Jiang, S. Wu, S. Nakamoto, O. Yokosuka. MicroRNA-122 negatively regulates the production of inflammatory cytokines and chemokines in human hepatic stellate cells. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B – Recent Progress in Basic and Clinical Research – Hotel Granvia Hiroshima, Hiroshima, 2014.11.20. P-16

T. Kanda, S. Wu, S. Nakamoto, Y. Haga, R. Sasaki, X. Jiang, M. Nakamura, O. Yokosuka. HBV up-regulates IGFBP1 and MCA expressions in hepatocytes from humanized SCID Alb-uPA mouse model. The 11th JSH Single Topic Conference Hepatitis B – Recent Progress in Basic and Clinical

Research – Hotel Granvia Hiroshima, Hiroshima, 2014.11.20. P-19

X. Jiang, T. Kanda, S. Wu, Y. Haga, R. Sasaki, M. Nakamura, S. Nakamoto, F. Imazeki, O. Yokosuka. HCV NS5A blocks MG132-induced apoptosis in hepatocytes through the inhibition of NF-κB activation. The Liver Meeting 2014. The 65rd Annual Meeting of The American Association for the Study of Liver Diseases, HYNES CONVENTION CENTER, Boston, Massachusetts, USA, 2014.11.8-11.

T. Kanda, S. Wu, S. Nakamoto, X. Jiang, M. Nakamura, T. Miyamura, H. Shirasawa, O. Yokosuka. Ultra-deep sequencing analysis of the HAV 5'-untranslated region among HAV-outbreak patients associated with a revolving sushi bar. 23rd Annual Conference of APASL, Brisbane, Australia, 2014.3.12-15.

S. Wu, T. Kanda, S. Nakamoto, X. Jiang, M. Nakamura, T. Miyamura, H. Shirasawa, O. Yokosuka. RIPK2 could play an important role in controlling HBV replication. 23rd Annual Conference of APASL, Brisbane, Australia, 2014.3.12-15.

X. Jiang, T. Kanda, S. Wu, T. Miyamura, S. Nakamoto, O. Yokosuka. Hepatitis C virus nonstructural protein 5A inhibits thapsigargin-induced apoptosis. 23rd Annual Conference of APASL, Brisbane, Australia, 2014.3.12-15. (口演)

S. Wu, T. Kanda, T. Miyamura, X. Jiang, S. Nakamoto, F. Imazeki, O. Yokosuka. Cooperative effects of Hepatitis B virus and TNF might play important roles in hepatocarcinogenesis through activation of NF-κB, metabolic and ER stress signaling. The 64th Annual Meeting of The American Association for the Study of Liver Diseases, Walter E. Washington Convention Center, Washington, DC, USA, 2013.11.1-5.

姜霞, 神田達郎, 横須賀收 肝癌における Androgen receptor (AR)を介した ER ストレスに関する検討 日本消化器病学会関

連研究会第9回消化器病における性差医学・医療研究会「大阪大学中之島センター10階佐治敬三メモリアルホール(大阪府・大阪市)」2013.8.3.

X. Jiang, T. Kanda, S. Nakamoto, T. Miyamura, S. Wu, F. Imazeki, O. Yokosuka. Endoplasmic reticulum stress response dependent of androgen receptor signaling in human hepatocellular carcinoma. APASL Liver week, Suntec Singapore International Convention & Exhibition Center, Singapore, 2013.6.6-10.

Xia Jiang, 神田達郎, 呉霜, 中本晋吾, 宮村達雄, 今関文夫, 横須賀収 肝癌における肝自然免疫と Unfolded protein response (UPR)に関する研究 第49回日本肝臓学会総会(京王プラザホテル 東京都・新宿区), 2013.6.6.

神田達郎, 呉霜, 中本晋吾, 姜霞, 宮村達雄, 新井誠人, 藤原慶一, 横須賀収次世代シークエンスを用いた感染源が同一と考えられたA型肝炎例におけるHAVゲノム解析 第20回浜名湖シンポジウム「アクトシティ浜松 コングレスセンター(静岡県・浜松市)」, シンポジウム9, 2012.12.22.

神田達郎, 呉霜, 横須賀収 HBV コア蛋白およびHBe抗原のRIPK2を介した肝自然免疫応答によるウイルス増殖制御 第39回日本肝臓学会東部会「グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都・品川区)」, シンポジウム3 B型肝炎診療「ウイルス増殖と免疫反応から」, 2012.12.7.

姜霞, 神田達郎, 横須賀収 肝癌における Androgen receptor (AR)を介した ER ストレス誘導に関する検討. 第39回日本肝臓学会東部会「グランドプリンスホテル新高輪 国際館パミール(東京都・品川区)」, 2012.12.7.

T. Kanda, X. Jiang, S. Nakamoto, T. Miyamura, S. Wu, F. Imazeki, O. Yokosuka. Different roles of three interferon-lambdas

on innate immune response and IL29 inhibits hepatitis C virus internal ribosomal entry site-mediated translation and replication in human hepatoma cell lines. The 10th JSH Single Topic Conference “Hepatitis C: Best Practice Based on Science” Keio Plaza Hotel, Shinjuku, Tokyo, Japan, 2012.11.21-22.

T. Kanda, S. Nakamoto, X. Jiang, T. Miyamura, S. Wu, M. Arai, K. Fujiwara, F. Imazeki, O. Yokosuka. Different effects of IL28A, IL28B and IL29 on Toll-like receptor related gene expression in human hepatocytes. The Liver Meeting 2012. The 63rd Annual Meeting of The American Association for the Study of Liver Diseases, HYNES CONVENTION CENTER, Boston, Massachusetts, USA, 2012.11.9-13.

神田達郎, 呉霜, 横須賀収 肝癌、膵癌におけるアンドロジェンレセプターシグナリングの解析 第16回日本肝臓学会大会「神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)」, ワークショップ7 消化器疾患と性差, 2012.10.10.

姜霞, 神田達郎, 今関文夫, 宮村達雄, 呉霜, 中本晋吾, 横須賀収, 肝癌における Androgen receptor (AR)の ER ストレスシグナル伝達経路に及ぼす影響に関する検討, 第48回日本肝臓学会総会「石川県立音楽堂ほか(石川県・金沢市)」, ポスターセッション16 肝癌基礎, 2012.6.7.

6. 研究組織

(1)研究代表者

神田 達郎 (KANDA, Tatsuo)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号: 20345002