

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590991

研究課題名(和文) 肝癌の増殖と肝再生における Apg-2 の意義

研究課題名(英文) The role of Apg-2 in hepatocarcinogenesis and regeneration

研究代表者

伊藤 義人 (Itoh, Yoshito)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70244613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：ヒト肝癌に過剰発現することが報告されているHeat shock蛋白110ファミリーの一つであるApg-2は、マウス脂肪肝モデルにおいて脂肪化肝細胞での発現が上昇していた。そこでApg-2の脂肪肝における役割を検討するためにApg-2-/-マウスを作成し高脂肪食による脂肪肝を誘導したところ、肝脂肪化の抑制だけでなく、体重増加の抑制、脂肪組織の縮小が確認された。さらに肝癌でのApg-2発現の意義を検討すべく、Apg-2-/-マウスにおいてDEN誘発肝発癌モデルを作成したところ、肝癌個数の抑制、腫瘍径の縮小が確認された。以上からApg-2は肝脂肪化、肝発がんに促進的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Expression level of Apg-2, which is one of the Hsp110 family members and reported to be overexpressed in human hepatocellular carcinomas, was upregulated in hepatocytes in high fat diet (HFD)-induced mouse fatty liver models. However, HFD-induced liver steatosis, obesity and lipid accumulation in adipose tissues were greatly ameliorated in Apg-2 KO mouse. Furthermore, to examine the role of Apg-2 in hepatocarcinogenesis, we used DEN-induced models and found that both the incidence and tumor size of hepatocellular carcinomas were significantly decreased in Apg-2 KO mouse. Consequently, these results suggest that Apg-2 plays important roles in liver steatosis and hepatocarcinogenesis through their chaperoning activities.

研究分野：消化器内科

キーワード：脂肪肝 肝細胞癌 Apg-2

1. 研究開始当初の背景

細胞接着は細胞機能に大きな影響を与える。細胞同士や細胞と細胞外基質との相互作用は、細胞極性、細胞増殖、アポトーシスのみならず様々な遺伝子発現に影響を与える。その過程には Nuclear Adhesion Complex と総称される種々の分子が関与するが、上皮を形成する細胞が相互に接着することにより形成される tight junction はそういった細胞同士の繋がりのひとつであり種々のシグナル伝達に関わる。一般的に tight junction 構成蛋白は細胞増殖に抑制的かつ細胞分化に促進的に働く。また、tight junction 構成蛋白はシグナル伝達や転写制御を介して癌の増殖・転移や細胞増殖・再生に重要な役割を果たす。

Tight junction 蛋白 ZO-1 は ZONAB の核移行を阻害する。結果、ZO-1 は ZONAB に結合する CyclinD1 や CDK4 の核移行を抑制し細胞増殖を抑える (Balda MS et al. JCB 2003)。最近、Heat Shock Protein 110 family の一つである Apg-2 が ZONAB の ZO-1 との結合を競合的に阻害し、その核移行を促進し細胞増殖を惹起することが明らかになった (Tsapara A et al. MBC 2006, BMC cell biology 2007)。また、ヒト肝癌において Apg-2 が高頻度に高発現していることが報告された (Gotoh K et al. FEBS Lett. 2004)。しかし、肝癌の増殖や肝再生における Apg-2 の働きはほとんど検討されていない。

2. 研究の目的

我々は以前に肝癌組織由来の subtracted cDNA library から肝細胞癌に高頻度に高発現する遺伝子群を解析し癌遺伝子 gankyrin(PSMD10) や transcriptional co-factor p300 の肝発癌過程における発現とその意義を既に報告した (Umemura A et al. Hepatology 2008, Yokomizo C et al. Cancer Lett 2011)。本研究では、同様に肝細胞癌に

高頻度に高発現する Apg-2 に関して肝癌と肝再生における役割に焦点をあてて解析する。また、Apg-2 は Heat Shock Protein であることから ZONAB 関連の細胞増殖だけでなく、酸化ストレス環境でも発現増加の報告がある。従って本研究は、近年増加傾向にある酸化ストレスが大きく関与する脂肪肝炎からの肝発がん機序を検討する上で重要であると考えられる。

3. 研究の方法

Apg-2 ノックアウトマウスを用いて肝発癌モデル、肝切除モデル、高脂肪食による NAFLD モデルを作成し、それぞれの肝病態またはその組み合わせにおける ZO-1、ZONAB、CyclinD1 や CDK4 などの動態を検討する。

Western blotting、免疫組織化学、real time PCR 法で Apg-2、ZO-1、SONAB、CyclinD1 や CDK4 等の動態を検討し、雄性 Apg-2+/+マウスと比較する。

1) Apg-2 ノックアウトマウスにおける Apg-2 遺伝子欠損の確認

Apg-2 ノックアウトマウスは以下のように作成した。すなわち、Apg-2 遺伝子の転写開始領域を含む 8-kb を loxP で挟み込む形で PGK-neo 遺伝子で置換し 1.1-kb MC1-DTA 遺伝子をベクターの 3' 側に付加してベクターを作成、エレクトロポレーション法で E14 embryonic stem (ES) 細胞に導入した後、G418 抵抗性コロニーをサザンプロットでスクリーニングした。出生した Apg-2 遺伝子欠損雄性マウスを雌性 C57BL/6 マウスと掛け合わせた。Apg-2+/- のヘテロ F1 マウスを CAG Cre deleter マウスと掛け合わせ germ line の選択遺伝子を含む領域を除去し、ヘテロの Apg-2+/- およびホモの Apg-2-/- マウスを得た。継代飼育されたマウスの尾の一部から DNA を採取しホモの雄性 Apg-2-/- マウスがメンデルの法則に則って生まれることを確認した。

2) 肝発がんモデルにおける検討

生後14日の雄性C57BL/6B6マウスとApg-2^{-/-}マウス(対照:ヘテロの雄性Apg-2^{+/-}マウスとコントロールマウス)に0.01 ml/gのジエチルニトロサミン(DEN)を0.05 μmol/g body wtを腹腔内投与する。40週後にマウスを犠牲死させ、肝臓内に癌結節が確認されたマウスの肝臓を摘出し、血清を採取する。採取された肝組織からHE染色標本を作製し、血清からALT/AST値を測定、Western blottingでApg-2, ZO-1, SONABの発現を定量的に、免疫組織化学とin situ hybridizationでApg-2, ZO-1, SONABの肝細胞内での局在を検討する。また、real time PCR法でApg-2, ZO-1, SONAB, CyclinD1やCDK4の動態を検討する。同時に、PCNA等で検討した細胞増殖の指標と対比する。

3) 肝切除モデル、高脂肪食によるNAFLDモデルにおける検討

肝切除モデル(70%部分肝切除)、高脂肪食によるNAFLDモデルは以下のように作成する。

肝切除モデルは、これらのマウスに70%部分肝切除を行い48時間後に実験に供する。高脂肪食によるNAFLDモデルは60%脂肪分を含んだ高脂肪食(Yu et al. Hepatology 2005)で24週間飼育する。採取された肝組織からHE染色標本を作製し、血清からALT/AST値を測定、Western blottingでApg-2, ZO-1, SONABの発現を定量的に検討する。また、real time PCR法でApg-2, ZO-1, SONAB, CyclinD1やCDK4の動態を検討する。同時に、PCNA等で検討した細胞増殖の指標と対比する。

4. 研究成果

1) Apg-2^{-/-}マウスがメンデルの法則に従って産まれることを確認した。しかし4週令のApg-2^{-/-}マウスの体重はApg-2^{+/-}およびApg-2^{+/+}マウスの70%前後にとどまるものの、8週令ではほぼ同等に達していた。また、

主要臓器のHE標本では明らかな病変を認めなかった。

2) Apg-2^{-/-}マウスにおけるDEN誘発肝癌モデル作成前に、WtマウスにおけるDEN誘発肝癌についての検討を行った。Wtでは投与後40週で発生する肝癌において、背景肝と比べて腫瘍部で明らかにApg-2発現が亢進している腫瘍とそれほど亢進していない腫瘍が散在していた。Apg-2の発現が亢進している腫瘍部ではki-67の発現が免疫組織学上増加しており細胞増殖活性が高いと判断した。アポトーシスに関してはTUNEL染色ではApg-2発現の高い腫瘍とそうでない腫瘍に統計学的な差は見られなかった。次に、Apg-2^{-/-}マウスにおけるDEN投与40週後の解析では、明らかに肝癌腫瘍個数の減少、腫瘍径の減少が確認された。この傾向はDEN投与後40週で高脂肪食を約30週間投与したマウスでさらに明らかであった。以上の検討からApg-2蛋白の肝発がんへの促進効果が示唆された。次にIn Vitroの系で、ヒト肝癌細胞株を用いてApg-2の発現に及ぼす影響を検討した。Huh7、PLC/PR5、HLE細胞株においてApg-2蛋白をSiRNAによりRNAレベルでサイレンシングを行ったところ、細胞数の低下、BrdU取り込み能を始めとする細胞増殖の低下、カスパーゼ3/7の活性化を伴うアポトーシスの亢進がPLC/PR5細胞株において確認された。

3) 高脂肪食による脂肪肝モデルを作成したところApg-2^{-/-}マウスでは著明に肝脂肪化が抑制されただけでなく、体重増加、全身の脂肪組織の肥大化が抑制された。高脂肪食投与前の6週令マウスの肝臓からRNAを抽出しcDNAアレイを施行したところ、Apg-2^{-/-}マウスではWtに比べカタラーゼの発現が約3倍上昇しておりペロキシゾームの活性化が示唆された。また、高脂肪食2週投与と24週投与後のいずれにおいてもAMP-activated protein kinase (AMPK)のリン酸化、peroxisome proliferator-activated

receptor の発現が亢進していた。以上より、Apg-2

がないことでペロキシゾームにおける脂肪酸の酸化の亢進がみられ脂肪肝の抑制に寄与したと考えられた。これらの結果を踏まえて、マウス肝細胞の細胞株である AML-12 を用いて Apg-2 サイレンシングの検討を追加し、同様に Apg-2 サイレンシング時に AMPK のリン酸化が亢進することを確認した。

以上 2) 3) の結果から、Apg-2 は肝脂肪化、肝発がんに重要な役割を果たしていると考えられ、その機能の制御が治療対象と成り得ると考えられた。

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 3 件)

1. Yasui K, Itoh Y et al. EVI1, a target gene for amplification at 3q26, antagonizes TGF- β -mediated growth inhibition in hepatocellular carcinoma. Cancer Sci. 2015 May 10. (査読有)
2. Yamaguchi K, Itoh Y et al. Blockade of interleukin 6 signalling ameliorates systemic insulin resistance through upregulation of glucose uptake in skeletal muscle and improves hepatic steatosis in high-fat diet fed mice. Liver Int. 2015 Feb;35(2):550-61. (査読有)
3. Okada Y, Yamaguchi K, Itoh Y et al. Rosuvastatin ameliorates high-fat and high-cholesterol diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats. Liver Int. 2013 Feb;33(2):301-11. (査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 第 63 回 アメリカ肝臓学会 ポストン Yamaguchi K, Itoh Y et al. Blockade of interleukin-6 signaling improves systemic insulin resistance and hepatic steatosis through mainly up-regulation of glucose uptake in skeletal muscle in high fat diet-fed lean mice.
2. 第 63 回 アメリカ肝臓学会 ポストン Okada Y, Yamaguchi K, Itoh Y. Rosuvastatin ameliorates high fat and high cholesterol diet-induced rat nonalcoholic steatohepatitis through not only its lipid-lowering activity but also its anti-inflammatory and fibrotic effects.
3. JDDW 2012 神戸. 山口寛二, 伊藤義人. 高脂肪食負荷マウスの肝臓と骨格筋における IL-6 シグナル阻害とインスリン抵抗性について。
4. 第 64 回 アメリカ肝臓学会 ワシントン D.C. Yamaguchi K, Itoh Y et al. Mouse non-alcoholic steatohepatitis livers up-regulate expression of T-cell regulatory gene PD-1 and LAG3.
5. JDDW 2013 東京. 山口寛二, 伊藤義人. マウス脂肪肝炎における制御性 T 細胞の発現解析。
6. 肝臓学会総会 . 2014 年 5 月 30 日 ; 東京 . 山口寛二、岡嶋亮、瀬古裕也、石破博、杼木希、森口理久、角田圭雄、光吉博則、安居幸一郎、南 祐仁、岡上 武、伊藤義人 . マウス脂肪肝炎における PD-1 陽性 T 細胞の発現・機能解析 .

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 義人 (京都府立医科大学 医学研究科 教授)

研究者番号：70244613

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

藤田 潤 (京都大学 医学研究科 教授)

研究者番号： 50173430