

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24701006

研究課題名(和文)肝細胞癌臨床検体におけるレチノイン酸標的遺伝子の発現解析

研究課題名(英文) Gene expression analysis of retinoic acid-responsive genes in hepatocellular carcinoma

研究代表者

神吉 けい太 (KANKI, Keita)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10516876

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌の発生・進展に関連する遺伝子を同定することを目的とし、171例の癌部・非癌部を用いて定量的PCR解析を行い、レチノイン酸応答性遺伝子の発現解析を行った。統計学的解析の結果、OTUD7B遺伝子の癌部における発現が患者の生存期間に影響を与え、その発現低下は予後不良と有意に相関していた。肝癌細胞株を用いたin vitroでの機能解析により、OTUD7BはNF- $\kappa$ Bシグナルの抑制制御に働いていることが示され肝癌細胞の生存に影響を与えた。これらの結果はOTUD7Bがレチノイン酸の抗腫瘍効果の実行因子のひとつであり、肝細胞癌の治療標的分子としての応用の可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：We performed a gene screening based on in silico analysis of retinoic acid response elements (RAREs) to identify the genes facilitating the antitumor activity of retinoic acid (RA) and investigated their clinical significance in hepatocellular carcinoma (HCC). We identified 201 candidate genes with promoter regions containing consensus RARE and finally selected 26 RARE-responsive genes. Of these, downregulation of OTU domain-containing 7B (OTUD7B) gene, which was upregulated by ATRA, in tumor tissue was associated with a low cancer-specific survival of HCC patients. Functional analyses revealed that OTUD7B negatively regulates nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling and decreases the survival of HCC cells. We identified RA-responsive genes which are regulated by retinoid signal and found that low-OTUD7B mRNA expression is associated with a poor prognosis for HCC patients. OTUD7B-mediated inhibition of NF- $\kappa$ B signaling may be an effective target for antitumor therapy for HCC.

研究分野：総合領域

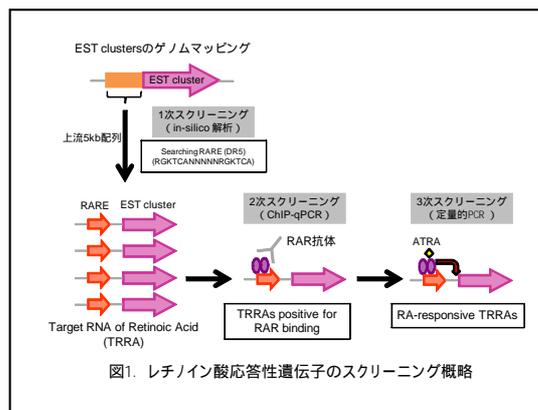
科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード：肝細胞癌 レチノイド

1. 研究開始当初の背景

(1) ビタミン A (レチノール) やカロチノイドの血中濃度と癌罹患率との間には負の相関が認められ、体内ビタミン A の欠乏は発癌と密接に関連することが疫学的に示唆されてきた。肝臓は体内の 80%~90% に相当するビタミン A を貯蔵し、それらはレチノイドと総称され肝星細胞の脂肪滴に蓄えられている。肝炎や肝硬変などの慢性肝疾患の病態においては、肝星細胞は筋線維芽細胞様に形質転換しレチノイドを含む脂肪滴が消失するため、肝臓内の貯蔵ビタミン A の減少が起こる。従って抗腫瘍効果をもつレチノイドの減少が、慢性肝疾患の進展や肝細胞癌の発生、進展を促進する一要因であると推測される。

(2) ビタミン A の代謝によって生じるレチノイン酸 (RA) は、核内において RA シグナルと呼ばれる転写調節機構を活性化し、多くの遺伝子群の発現を調節し抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。従って RA 応答性遺伝子の同定と機能解析は、癌の予防や治療に役立つ標的分子の発見につながると期待される。我々はこれまでに *in silico* 解析による RA 応答配列のゲノムワイドスクリーニング、ChIP 解析、および定量的 PCR 法により 26 個の RA 応答性遺伝子を同定した (図 1) (特願 2010-093226)。



2. 研究の目的

RA 応答性遺伝子の肝細胞癌における遺伝子発現解析、および機能解析は肝細胞癌の発生や進展に関わるメカニズムの解明につながると考えられる。そこで本研究では、我々が選び出した 26 種類の RA 応答性遺伝子について、ヒト肝臓臨床検体における発現解析を行い、肝細胞癌病態との関連や臨床病理学的意義を調べることで、肝細胞癌の発生・進展に関連する遺伝子を同定する。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌検体の収集

生存予後などの臨床病理学的データがはっきりとそろったヒト肝臓臨床検体 (癌部および非癌部) を鳥取大学医学部、京都大学医学

部より組織または RNA の状態で提供を受ける。例数は 100 例以上を収集し、cDNA を作成する。

(2) 遺伝子発現解析

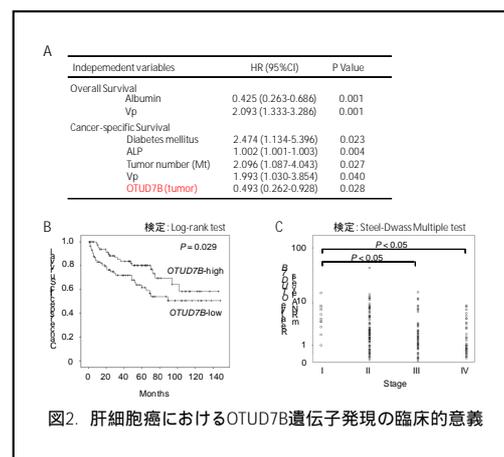
RA 応答性遺伝子の遺伝子発現を定量的リアルタイム PCR 法により解析し、癌部および非癌部における発現量を比較する。また遺伝子解析データと臨床病理学的データをあわせたデータベースを作成し、統計学的解析を行うことで生存期間、肝機能、腫瘍マーカー、転移能といった臨床病理学的因子と関連する遺伝子発現パターンをみつける。

(3) RA 応答性遺伝子の機能解析

生存期間などの臨床病理学的因子と有意な関連が認められた遺伝子については、肝細胞癌株における強制発現、ノックダウンを行い、*in vitro* 実験系での機能解析を行う。

4. 研究成果

(1) 計 171 例の肝細胞癌切除例の癌部、非癌部を用いて遺伝子発現解析を行った。癌部で発現上昇する遺伝子として OTUD7B, OSR1, KIF21B の 3 遺伝子、癌部で発現減少する遺伝子として CSF3R, TXNIP, CYP26A1, OLFML1 の 4 遺伝子を見出した。生存期間との関連を調べるため、Cox 比例ハザードモデル単変量解析および多変量解析を行ったところ、これらの遺伝子の中で OTUD7B の癌部における遺伝子発現が患者の Cancer-specific survival と有意に関連していた。OTUD7B の発現の高い群では低い群に比べ予後が良好であり、また癌の進行度が進むにつれてこの遺伝子の発現は低下傾向を示すことが明らかとなった (図 2)。従ってこの遺伝子の発現は肝細胞癌の発生や進展と関わりがあるものと考えられた。



(2) OTUD7B は脱ユビキチン化酵素をコードし、NF- $\kappa$ B シグナルの抑制制御因子であることが知られている。OTUD7B はレチノイン酸シグナルによって発現誘導される遺伝子であり、レチノイン酸の抗腫瘍効果に関わって

る可能性が考えられた ( 図 3 )

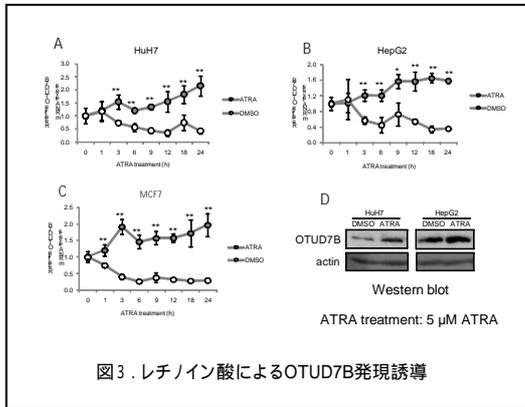


図 3 . レチノイン酸による OTUD7B 発現誘導

肝癌細胞株において siRNA による OTUD7B ノックダウンを行ったところ、NF- $\kappa$ B シグナルレポーター活性が上昇し、WST アッセイでは cell viability の増加が認められた。従って、肝細胞癌において OTUD7B の発現低下は NF- $\kappa$ B シグナルの活性化を惹起し、腫瘍細胞の生存能を高めていると考えられる。一方、アデノウイルスによる OTUD7B 強制発現によつては NF- $\kappa$ B シグナルレポーター活性が抑制され、WST アッセイでは cell viability の減少が認められた ( 図 4 )。またこの時 caspase 3/7 活性の増加が認められたことから、OTUD7B 強制発現により細胞死誘導を介した抗腫瘍効果が発揮されることが分かった。これらの結果から、レチノイン酸の抗腫瘍効果には OTUD7B 発現誘導による NF- $\kappa$ B シグナルの抑制が関わっていると考えられた。

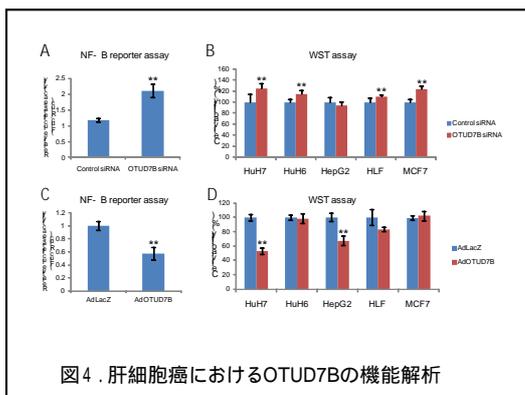


図 4 . 肝細胞癌における OTUD7B の機能解析

## 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 2 件 )

Shiota G, Kanki K. Retinoids and their target genes in liver functions and diseases. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1, 33-7, 2013. 査読無 DOI: 10.1111/jgh.12031.

Kanki K, Akechi Y, Ueda C, Tsuchiya H, Shimizu H, Ishijima N, Toriguchi K, Hatano E, Endo K, Hirooka Y, Shiota G. Biological and clinical implications

of retinoic acid-responsive genes in human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of Hepatology* 59, 1037-44, 2013. 査読有

[ 学会発表 ] ( 計 17 件 )

神吉けい太、清水寛基、汐田剛史、レチノイン酸応答性遺伝子 FZD4 の機能解析：肝細胞癌進展への影響、第 50 回日本肝臓学会総会、2014 年 5 月 20 - 30 日、ホテルニューオータニ ( 東京都 )

Shiota G, Kanki K, Identification of molecular targets for retinoid signaling to regulate human hepatocellular carcinoma development: Contribution of OTUD7B, a negative regulator of NF- $\kappa$ B signaling, in antitumor effect of retinoic acid. AACR Annual Meeting 2014, 2014 年 4 月 5-9 日、San Diego Convention Center, San Diego, California USA

神吉けい太、汐田剛史、レチノイン酸応答性遺伝子から見た肝細胞癌の分子標的探索 NF- $\kappa$ B 抑制因子 OTUD7B 発現の臨床的意義と抗腫瘍効果の検討、第 40 回肝臓学会西部会、平成 25 年 12 月 6 - 7 日、長良川国際会議場 ( 岐阜県岐阜市 )

神吉けい太、肝細胞癌におけるレチノイン酸応答性遺伝子の生物学的、臨床的意義の検討、第 72 回癌学会学術集会、2013 年 10 月 3-5 日、パシフィコ横浜 ( 神奈川県、横浜市 )

Keita Kanki, Preserved hepatocyte integrity by retinoid signaling: identification of retinoic acid-responsive genes and their contribution to the prevention of human hepatocellular carcinoma. 17th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid (ISCHS)、2013 年 9 月 23-25 日、大阪国際会議場 ( 大阪府 )

神吉けい太、レチノイン酸応答性遺伝子の遺伝子発現解析、機能解析による肝細胞癌の分子標的探索、第 24 回日本消化器癌発生学会、2013 年 9 月 5-6 日、石川県立音楽堂 ( 石川県金沢市 )

神吉けい太、レチノイド応答性 micro RNA の同定と肝細胞癌における発現解析、第 24 回日本レチノイド研究会学術集会、2013 年 8 月 30-31 日、星薬科大学 ( 東京都 )

石島直樹、神吉けい太、汐田剛史、レチノイドの肝癌細胞抑制機構における AMPK 活性化の関与、第 49 回日本肝臓学会総会、2013 年 6 月 6 - 7 日、京王プラザホテル ( 東京都 )

神吉けい太、肝細胞癌におけるレチノイン酸応答性遺伝子の発現解析 NF- $\kappa$ B 抑制因子 OTUD7B 発現の臨床病理学的意義について、第 49 回日本肝臓学会総会、

2013年6月6-7日、京王プラザホテル(東京都)

神吉けい太、レチノイン酸応答性遺伝子の抗腫瘍効果と肝細胞癌での臨床的意義、第50回日本臨床分子医学会学術集会、2013年04月12-13日、東京国際フォーラム(東京都)

Shiota G, Kanki K, Prognostic significance of the expression levels of target genes of retinoic acid in hepatocellular carcinoma, American Association for Cancer Research, Annual Meeting, April 6-10, 2013, Walter E. Washington Convention Center (米国ワシントン DC)

神吉けい太、肝細胞癌におけるレチノイド応答性遺伝子の生物学的・臨床的意義、第20回浜名湖シンポジウム、2012年12月22-23日、アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡県浜松市)

神吉けい太、Genome-wide identification of retinoic acid-responsive genes by a novel screening strategy and mRNA expression and functional analysis of the genes in human hepatocellular carcinoma、第10回 JSH Single topic conference、2012年11月21-22日、京王プラザホテル(東京都)

神吉けい太、レチノイン酸応答性遺伝子による抗腫瘍効果と肝細胞癌における発現の臨床的意義、第9回酸化ストレスと肝研究会、2012年11月17-18日、博多エクセルホテル東急(福岡県博多市)

神吉けい太、レチノイン酸応答性遺伝子による抗腫瘍効果の解析と肝細胞癌における発現解析、日本レチノイド研究会第23回学術集会、2012年10月19日-20日、米子市コンベンションセンター(鳥取県米子市)

神吉けい太、肝細胞癌におけるレチノイン酸応答性遺伝子の発現と臨床病理学的意義、第48回日本肝臓学会総会、一般演題、2012年6月7-8日、ホテル日航金沢(石川県金沢市)

神吉けい太、肝細胞癌増殖抑制におけるレチノイン酸応答性遺伝子 Frizzled4及び OTUD7B 発現の意義、第48回日本肝臓学会総会、2012年6月7-8日、ホテル日航金沢(石川県金沢市)

〔図書〕(計 4件)

神吉けい太、汐田剛史、医歯薬出版株式会社、「In-silico 解析に基づいたレチノイン酸応答性遺伝子の同定と肝細胞癌の分子標的探索」医学のあゆみ「レチノイドと癌治療」、14022-14027、2014

神吉けい太、汐田剛史、株式会社アークメディア、「肝細胞癌治療の標的分子探索を目指したレチノイン酸応答性遺伝子の

解析」肝胆膵 第68巻、429-435、2014  
神吉けい太、汐田剛史、株式会社メディカルトリビューン、「レチノイン酸応答性遺伝子による抗腫瘍効果と肝細胞癌における発現の臨床的意義」酸化ストレスと肝疾患 第9巻、83-86、2013

神吉けい太、汐田剛史、株式会社メディカルトリビューン、「レチノイン酸応答性遺伝子の発現・機能解析による肝細胞癌治療の分子標的探索」酸化ストレスと肝疾患 第8巻、111-115、2012

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

神吉 けい太 (KANKI, Keita)  
鳥取大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10516876

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：