

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：34311

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790268

研究課題名(和文) 前癌遺伝子リスク診断に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Identification of a novel precancerous marker for liver cancer

研究代表者

天ヶ瀬 葉子 (AMAGASE, Yoko)

同志社女子大学・薬学部・助教

研究者番号：90550822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓癌は世界的に死因の上位を占め、現在の癌早期発見の概念よりもさらに早い前癌段階で診断できるマーカーの同定は急務である。

ラットに肝臓癌を誘起させる物質を長期投与し飼育した。細胞死を誘導する蛋白質であるNADE(p75-NTR associated death executor)の発現上昇は、組織形態学的変化が見られる前に開始し、遅れて癌幹細胞マーカーの発現上昇が始まった。癌幹細胞マーカーの発現は死亡直前まで上昇し続けたのに対し、NADEの発現は減少した。NADEは前癌段階から顕著な発現を始め、発癌過程を通じて特徴的な発現パターンを示すことから、前癌マーカーとして有用性があることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Liver cancer is a leading cause of death in the world. Early diagnosis and treatment may improve morbidity and mortality of liver cancer. Identification of novel precancerous marker for early diagnosis and treatment is crucial.

When rats were treated with a carcinogenic agent diethylnitrosoamine for a long period of time, the increase of NADE (p75-NTR associated death executor) expression in the liver started before morphological changes were observed. The expression of some cancer stem cell markers started to increase later than NADE and the increase continued until cancerous tumours occupy large part of the liver. On the other hand, NADE expression was inversely decreased in the later stage. Considering the real time PCR and immunohistochemistry results together, NADE appears to express at damaged regions early, followed by the expression of cancer stem cell markers. NADE is potentially a good candidate for a novel precancerous marker of the liver as well as a therapeutic target.

研究分野：病態生理学

キーワード：遺伝子 癌 診断 シグナル伝達 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

(1) 安全な薬剤を開発・供給する上で、発癌性などの副作用を見極めることは必須である。しかし、そのためには長期(2、3年)に及ぶ動物実験が必要で、新薬開発において問題となっている。発癌前の早い段階で変化して、かつ発癌とも関連する遺伝子を発見できれば、発癌リスクの有無を新薬開発の早期に見極めることが可能になり、開発期間の短縮・費用削減につながる。

(2) 医療技術の進歩により、癌の早期発見・治療が可能になり、癌が治る病気になってきた今日でも依然日本の死因のトップは癌である。現在の早期発見の概念よりさらに早い前癌段階で診断でき対処できるようになれば、死亡率の低下、延いては医療費の削減に貢献する。実際、子宮頸癌は前癌診断・治療が可能で、検診でのスクリーニングによる患者の抽出、前癌治療が進み、効果をあげている。

肝臓癌は、有害物質の長期暴露による蓄積や、肝炎(ウイルス性、アルコール性、自己免疫性)や肝硬変などの肝発癌リスクをもつ患者で発症するのがほとんどで、原因となる肝疾患がない原因不明のものは少ない。従って肝発癌リスクを持った患者に対する前癌遺伝子診断法の確率は大きな効果を期待できるが、そのようなものはない。

2. 研究の目的

将来癌化する危険性、発癌リスクを見極めることができれば、新薬候補の発癌性試験を短縮できるだけでなく、患者が実際に癌を発症する以前に対処することが可能になる。本提案の申請時には、正常では発現が非常に低い3つの遺伝子が前癌状態のラットの肝臓で著しく上昇することを見出していた。そこで、(1) 前癌状態でなぜこれらの遺伝子の発現が上昇するのか?(2) この変化が発癌に直接影響を及ぼすのか?(3) これらは発癌リスクの診断マーカー候補となりうるのか? この3つの疑問を解決して、新薬の開発期間短縮に有用な情報を提供するとともに、癌の新たな診断や治療に応用できる知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ラットに非遺伝子傷害性発癌物質であるメタピリレン(MP)、チオアセトアミド(TAA)、ジエチルニトロソアミン(DEN)を最長28日間投与したラットの肝臓に発現する遺伝子と毒性情報を集積したデータベースTG-GATEs(Toxicogenomics Project-Genomics Assisted Toxicity Evaluation system)を使用し、共通して特徴的に発現変化する遺伝子及びそれらに関連する遺伝子を抽出、解析を行った。

(2) ラットに発癌性物質であるジエチルニトロソアミン(DEN)0.01%を含有する水を飲水させた。期間は、3日間、1週間、2週間、

4週間、8週間、15週間、8週間投与後に水道水に切り替えて11週間飼育(19週間)であった。各飲水投与・処置期間終了後に麻酔下、腹部大動脈から全血液を採取、失血死させた。次に、腹部大動脈から肝臓にかけて生理食塩水で灌流した。肝臓組織を一部採取し、RNAlaterに浸漬した。灌流液を4%パラホルムアルデヒド(PFA)に切り替え、灌流固定後、肝臓組織を切除し、4%PFAに一晩浸漬し、次に70%エタノールに置換した。

(3) RNAlaterに浸漬した肝臓組織からは、Nucleospin RNA kit(Macherey-Nagel)を用いてtotal RNAを抽出し、PrimeScript RT kit with gDNA eraserを用いて逆転写反応を行いcDNAを作製した。これらcDNAに対し、NADE(p75-NTR associated cell death executor)、DR6(death receptor 6)、APP(amyloid precursor protein)、second mitochondria-derived activator of caspase(Smac)、p75-NTR(p75 neurotrophin receptor)、Prom1(Prominin1)、CD44、EpCAM(Epithelial cell adhesion molecule)のmRNA発現変化をリアルタイムPCR法にて比較定量した。

(4) PFA固定された肝臓組織をパラフィン包埋し、3µmの厚さに薄切しスライドガラスに貼付した。NADE、DR6、MCM2、CD45、GST-Pに対する抗体を用い、Immunohistochemistry(IHC)によりそれぞれの発現を視覚化した。

(5) NADEとDR6が定常発現するHEK293細胞株を作製し、APPのN-末端305アミノ酸(N-APP)を添加し、NADEとDR6のタンパク質相互作用をDuoLink(Sigma)法を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) データベースTG-GATEsのデータを解析したところ、MP、TAA投与開始後3日目から、DENでは投与開始後1日目でNADEの発現が上昇していた。NADEに結合して細胞死を引き起こすことが知られている、p75-NTRとそのリガンドであるNGFの発現は低く、変化は見られなかった。ミトコンドリアに発現するアポトーシス阻害タンパク質であるSmacにもNADEは結合し、アポトーシス阻害を無効化することで細胞をアポトーシスに導くが、このSmacの発現もmRNAレベルで変化が見られなかった。NADEは単独で機能することは知られておらず、p75-NTRやSmac以外の新たなパートナー蛋白質の存在が示唆され、NADE同様にMPやTAA、DENで早期に発現が上昇する遺伝子の中でNADEのパートナーとなり得るものを探索した。その結果、NADEがp75-NTRとdeath domainで結合することからdeath domainを持つDR6(death receptor 6)を候補とした。DR6のリガンドはAPP(amyloid precursor protein)のN末端であり、DR6もAPPも共にNADE同様の時期に発現上昇が見られ、NADE、DR6、APPの肝発癌過程における相関を検討することにした。

(2) 100g のラットの1日の飲水量が平均 10 mL であることから、0.01% の DEN 含有水を飲水させると、1日の投与量は 10 mg/Kg 相当となりトキシコゲノミクスプロジェクトでラットに反復投与(最長 28 日間)した時の中用量に相当する。文献ではこの投与量で 25 週間投与した例が示されていた為、投与期間を最長 25 週間に設定したが、15 週間投与後に数匹のラットが死亡したため、15 週間で投与を終了し、生存していたラット及びコントロールのラットを剖検した。例数が少ないこと、生存ラットも黄疸や肝肥大が激しく、全身状態が非常に悪かったことから、15 週間連続の DEN 投与という条件が過酷であると考え、追加実験のラットには 8 週間の連続投与後、水道水 11 週間に切り替えた(19 週間処置)。

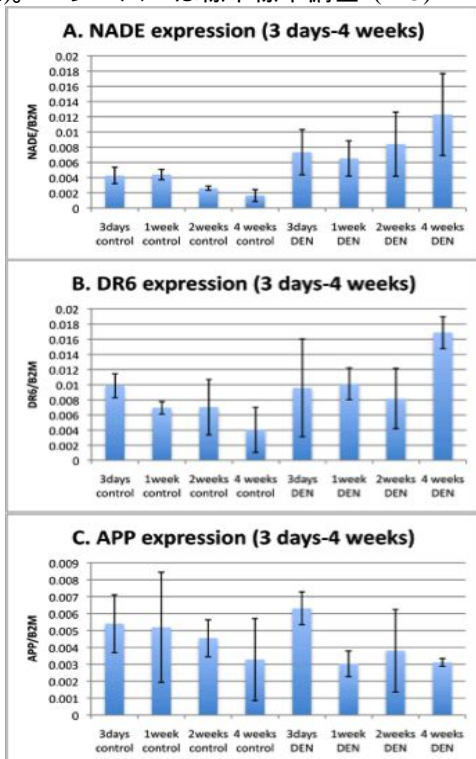
Fig. 1 19 週間処置ラットの摘出肝臓



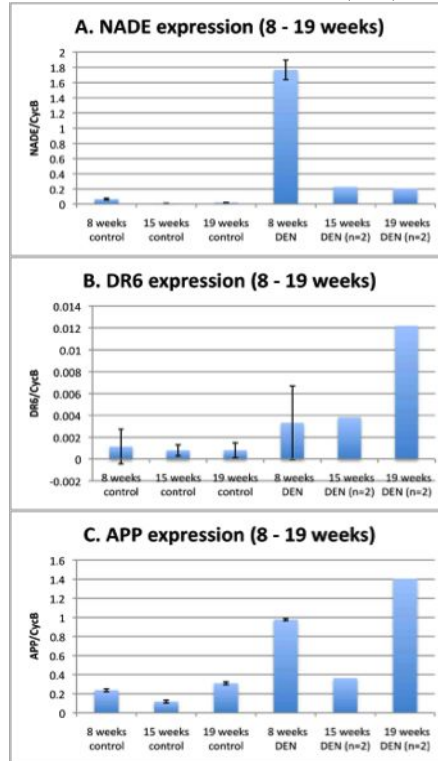
肝肥大が進み、硬く、白い結節が多数見られた。

(3) DEN を 3 日間、1 週間、2 週間、4 週間、8 週間、15 週間飲水投与、19 週間処置(8 週間 DEN 飲水投与 + 11 週間水道水)したラットの肝臓における各種遺伝子発現をリアルタイム PCR で定量した。レファレンス遺伝子としてハウスキーピング遺伝子である B-2-microglobulin (B2M) または、Cyclophilin B(CycB) の定量値で標準化し、各種遺伝子の発現量を比較定量した。

Fig. 2 コントロール群と DEN 投与群(3 日間~4 週間処置)における、A. NADE、B. DR6、C. APP の発現変化(B2M の発現で標準化した)。エラーバーは標本標準偏差 (n=3)

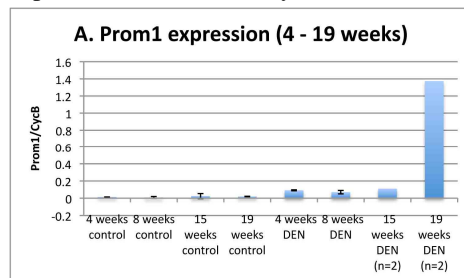


NADE の発現は、3 日間の投与で上昇し、TG-GATEs のマイクロアレイデータとほぼ合致したが、DR6 と APP の発現は安定せず、マイクロアレイデータと差異が見られた。Fig.3 コントロール群と DEN 投与群(8 週間~19 週間処置)における、A. NADE、B. DR6、C. APP の発現変化(CycB の発現で標準化した)。エラーバーは標本標準偏差(n=3)

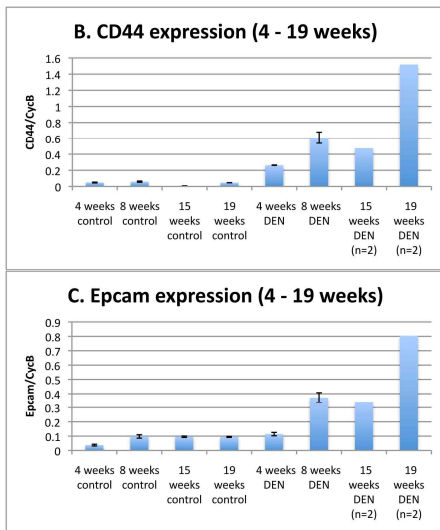


NADE の発現は 8 週間処置後が最高で、15 週間、19 週間処置では 8 週間処置後の発現量の 10% 程度まで低下していた。15 週間処置群は 15 週間続けて 0.01% DEN 含有水を飲水させた後に剖検したものであり、剖検直前に 4 匹中 2 匹が死亡した。19 週間処置群は 8 週間の DEN 飲水後、11 週間水道水を飲水させたものであるが、剖検直前には 4 匹中 2 匹が死亡した。NADE は NGF 存在下、p75-NTR と結合し細胞にアポトーシスを起こさせるが、NGF も p75-NTR も全投与期間を通じて発現は低く、定量限界値以下であった。また NADE は Smac との結合で TRAIL によるアポトーシスを促進するが、Smac の発現も低く、コントロール群との差は見られなかった。

Fig.4 癌幹細胞マーカーの発現変化
コントロール群と DEN 投与群(4 週間~19 週間処置)における、A. Prom1、B. CD45、C. EpCAM の発現変化(CycB の発現で標準化した)。



エラーバーは標本標準偏差 n=3



肝臓幹細胞マーカーとして汎用されている、Prom1(Prominin1)、白血球共通抗原 CD45、EpCAM (Epithelial cell adhesion molecule) のいずれもが 19 週間処置後の肝臓で発現が最大となった。これは、NADE の発現パターンとほぼ逆である。

4) 8 週間、19 週間処置後の肝臓 3 μm の連続切片に対し、細胞周期マーカー-MCM2、NADE、癌幹細胞マーカー-CD45、GST-P、DR6 の発現分布を IHC 法によりで視覚化した。

Fig.5 8 週間処置群(コントロール(左)、DEN(右))における各種タンパク質発現(IHC) 青:抗体反応陽性、赤:核 番号は連続切片の順番(No. 14-17, No. 27-30)を示す。

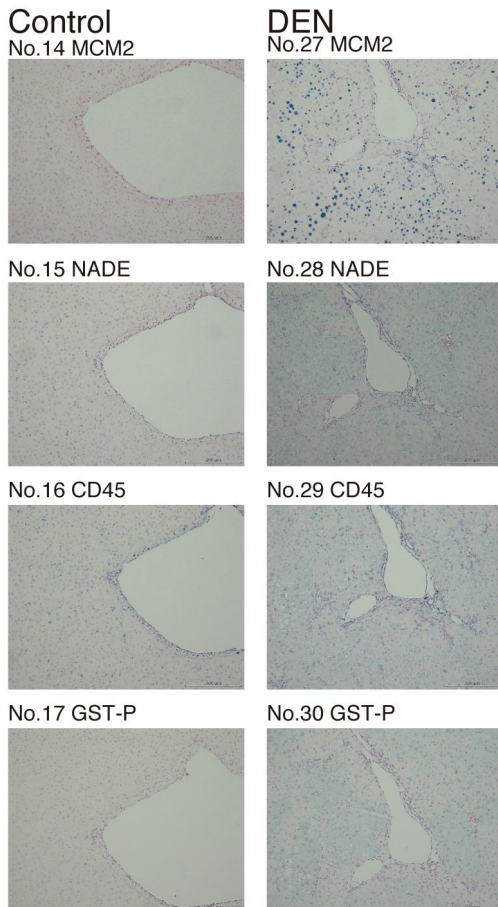
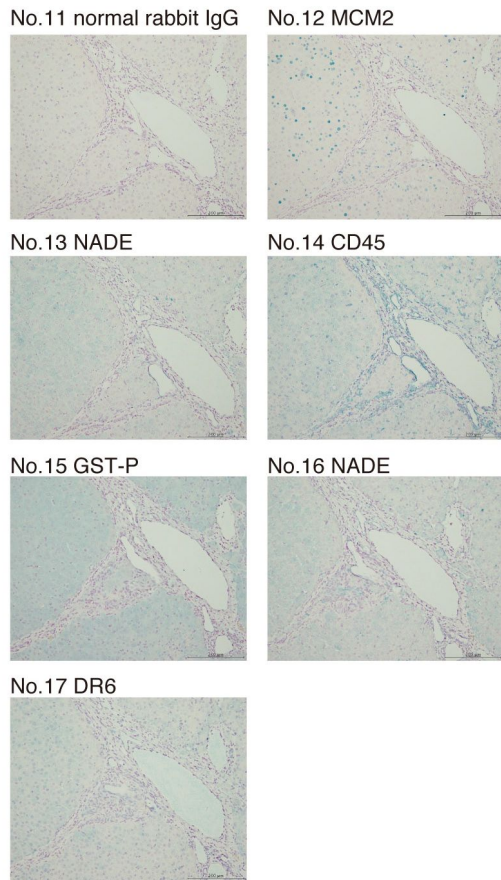


Fig.6 19 週間処置群(DEN 投与 8 週間+水道水 11 週間)の連続切片に対する各種タンパク質発現(IHC) 青:抗体反応陽性、赤:核 番号(No. 11-No. 17)は連続切片の順番を示す。



ラットでは肝臓癌になる前に、解毒系酵素であるグルタチオンS-トランスフェラーゼの胎盤型(GST-P)の陽性肝細胞塊が必ず発生し、この病変は肝前癌病変の指標として使われる。8 週間 DEN 投与ラット肝の GST-P 陽性細胞塊は、MCM2、NADE 陽性細胞塊と共通していることが見られる。19 週間 DEN 処置ラット肝の GST-P 陽性細胞塊は、MCM2、NADE、CD45、DR6 陽性細胞塊と共通していた。このことから、NADE と DR6 は前癌病変で発現していると言える。

(5) NADE、DR6 を定常発現している HEK293 細胞株を構築した。APP の N 末端タンパク質存在下、NADE、DR6 の相互作用を DuoLink 法で検討した。N 末端 APP 存在下では、コントロールに比べて強い相互作用が見られた。

本研究により、NADE の発現は早く前癌病変で見られること、その発現は癌の進行(増殖マーカーや癌幹細胞マーカーの発現上昇)により低下することから、NADE は前癌マーカーとなり得ることが示唆された。mRNA レベルでは、遺伝子傷害性・非遺伝子傷害性の発癌物質の投与開始後数日以内に NADE の発

現上昇が検知できることから、新薬開発における動物発癌性試験の短縮化を進める上で利用可能な知見が得られた。

組織上でDR6とNADEの発現部位は重なり、共発現細胞では相互作用があることも確認されたが、癌の進行に伴ってNADEの発現が低下するのに対し、DR6の発現が上昇することから、常に相互作用しているとは言えない。持続的な炎症などの危機的状況でNADE、DR6、APPは共発現しアポトーシスを誘導、その後NADEの発現低下により、この相互作用が破綻し、制御不能の細胞増殖が進行した可能性が考えられる。本研究の結果を踏まえ、ヒトの肝臓癌及びその発症リスクの高い患者のサンプルで検証し、NADEの前癌マーカーとしての有用性、治療ターゲットとしての可能性を検討するべきと考える。

〔学会発表〕(計 1件)

EMBO EMBL Symposium, Frontiers in Stem Cells & Cancer, 2015年3月29日-31日
ドイツ、ハイデルベルグ市
NADE as a novel precancerous marker in the rat liver
Yoko Amagase, Miki Esaki, Eri Shibano, Chiaki Morimoto, Yuika Nakanouchi, Ruri Takeya, Tetsuro Urushidani

〔その他〕

ホームページ等

<http://research-db.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天ヶ瀬 葉子 (AMAGASE, Yoko)

同志社女子大学・薬学部・助教

研究者番号：90550822