

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461001

研究課題名(和文) FoxM1トランスジェニックマウスを用いた肝発癌の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名(英文) The role of FoxM1 transcription factor in the development of hepatic inflammation, liver fibrosis, and hepatocellular carcinoma: the study using conditional transgenic mice

研究代表者

吉田 雄一 (YOSHIDA, YUICHI)

大阪大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：30457014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Forkhead Box M1 (FoxM1)は、主に細胞周期を制御し肝再生や肝発癌過程に関与する転写因子である。今回我々は、テトラサイクリンの制御下に肝細胞特異的にFoxM1の発現誘導可能なトランスジェニックマウスを作製し、肝細胞におけるFoxM1の役割を検討した。この結果、予想外に、肝細胞特異的なFoxM1の過剰発現は、肝細胞死や肝内炎症を誘導した。さらに、トランスジェニックマウスは、著明な肝線維化を自然発症した。この結果より、肝細胞FoxM1は、細胞増殖のみならず、細胞死、肝内炎症、線維化を経て、肝癌発症に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Forkhead Box M1 (FoxM1) is a transcription factor that regulates cell cycle and plays regeneration and plays an important role in the development of hepatocellular carcinoma. To elucidate the functional role of FoxM1 in hepatocytes, we developed a novel transgenic mice in which we can regulate expression of human FoxM1 in murine hepatocytes under the control of tetracycline. Unexpectedly, transgenic expression of FoxM1 in hepatocytes resulted in hepatocyte apoptosis and hepatic inflammation. Finally, these transgenic mice spontaneously developed marked liver fibrosis. These data revealed a new function of FoxM1 in hepatocyte death, hepatic inflammation, and subsequent liver fibrosis.

研究分野：肝臓病学

キーワード：FoxM1 肝細胞癌 肝細胞死 炎症 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

- (1) 慢性肝疾患のうち肝硬変患者の肝癌発症率は年率約 8%で、今後も増加する傾向にある。肝癌のほとんどが、C 型あるいは B 型肝炎ウイルスに起因する慢性肝炎及び肝硬変を背景にするが、近年のライフスタイルの欧米化に伴い、肥満・過栄養に伴う非アルコール性脂肪性肝疾患からの肝癌も増加の一途をたどり大きな社会的な問題となっている。
- (2) 一方、近年、進行肝癌患者に対しては、経口マルチキナーゼ阻害薬ソラフェニブが海外での安全性・有効性に関する報告 (N. Engl. J. Med. 359(4):378-90, 2008) を受け、本邦でも臨床応用されている。しかしながら、ソラフェニブ不応・不耐症例も散見され、新規分子標的治療薬の開発が期待されている。
- (3) Forkhead Box M1 (以下 FoxM1) は、1997 年に米国イリノイ大学、故 Robert Costa 博士らにより大腸癌細胞株 Caco2 より同定された Forkhead 型転写因子 (Fox ファミリー) の一員である (左図: FoxM1 の分子構造、Ye H, Costa RH, et al. Molecular Cellular Biology, 1997)。発見当初、他の Fox ファミリーのように細胞分化や代謝に関与すると考えられていたが、意外にも細胞周期能や発癌との関与が明らかとなった (Kalinichenko VV, Costa RH, et al. Genes & Development, 2004、Wang IC, Cosnta RH, et al. Molecular Cellular Biology, 2005)。
- (4) 申請者は、Costa 研究室において、同分子の臓器特異的遺伝子欠損マウス作製に従事し、同分子がマウス大腸癌モデルにおいて重要な役割を果たすこと (Yoshida Y, Costa RH, et al. Gastroenterology, 2007) を世界に先

駆けて報告した。申請者らの報告を皮切りに、多方面から FoxM1 と発癌に関する報告がなされ、これまで多くの FoxM1 関連論文の報告がなされている。また、近年、in vitro において FoxM1 と神経幹細胞との関与も報告されているが、肝癌において (癌) 幹細胞への関与は未だ不明である。さらに、申請者らは、肝癌手術標本を詳細に解析した結果、腫瘍部における FoxM1 発現量が術後予後を規定することを、さらに、興味深いことに非腫瘍部における FoxM1 の遺伝子発現量自体も術後再発を規定していることが明らかになった。この事実は、実際の臨床例においての同分子の重要性を強く示唆する。すなわち、本来、正常肝組織では、FoxM1 分子の発現が認められないことを鑑みると、肝病態進行過程、すなわち、脂肪化、炎症、線維化進展の過程において FoxM1 分子の発現量が変化し、ひいては癌幹細胞等との相互作用により肝発癌へ寄与しているという仮説を立てることができる

- (5) 本研究では、正常肝組織において、FoxM1 分子を肝臓特異的に発現誘導させることが可能なトランスジェニックマウスを作成し、正常肝あるいは肝病変進展過程において、いかなるタイミングで FoxM1 分子が発現することが肝発癌に関与するのかを明らかにすることを目的とした。

2. 研究の目的

原発性肝癌の約 95% を占める肝細胞癌 (以下、肝癌) は、そのほとんどが慢性肝疾患を背景に発生し、肝硬変患者の予後を規定する大きな要因となる。また、肝切除等の根治療法後においても、高い再発率を有するため、肝癌は依然として予後不良の悪性腫瘍である。そのため、背景肝から肝発癌

までの一連の分子機構を念頭においた新規治療法の開発が望まれる。本研究では、申請者等がその機能解析に携わってきた転写因子 FoxM1 に着目し、肝特異的発現誘導型トランスジェニックマウスの作製を通じて、肝発癌の病態解析ならびに同分子を標的とした新規分子標的治療法の確立を目指すものである。独自のモデル動物の作製を通じて、最終的には FoxM1 をターゲットとした肝癌に対する全く独創的な新規治療法の確立と臨床応用を目指した研究基盤の整備を本研究の目標とした。

3. 研究の方法

- (1) 8週齢 C57BL/6J マウスに対し高脂肪食餌を与え、8週及び12週後の肝内 FoxM1 蛋白発現量をウェスタンブロットにて検討した。
- (2) Tet-on システムを用いて、テトラサイクリン経口投与にて肝細胞特異的に FoxM1 発現誘導可能なトランスジェニックマウス (Tet07-FoxM1/Rosa26-LSL-rtTA/Alb-Cre(+), 以下 TG マウス) を作製、出生時より肝特異的に FoxM1 を発現誘導し、8週齢で解析した。対照 (WT マウス) とし て Tet07-EGFP-FoxM1/Rosa26-LSL-rtTA/Alb-Cre(-) を用いた。
- (3) TG マウス由来初代培養肝細胞及びマウス肝細胞株を用い分子機構を解析した。

4. 研究成果

- (1) 高脂肪食餌投与 C57BL/6 マウスで、肝内 FoxM1 蛋白発現の誘導をウェスタンブロットにて確認した。
- (2) 8週後の TG マウス肝組織で、テトラサイクリン依存性に FoxM1 蛋白の過剰発現が誘導されることをウェスタンブロ

ット及び免疫組織学的に確認した。TG マウスでは血清 ALT 値 (75.2 U/L vs 15.9 U/L, $p < 0.05$)、TUNEL 陽性細胞数が9倍と有意に増加 ($p < 0.05$) し、肝障害増強を認めた。肝内炎症関連分子 TNF、CCL2 の遺伝子発現は、それぞれ3.1倍 ($p < 0.01$)、14.9倍 ($p < 0.05$) と有意に増加し、これらの遺伝子発現の増加は、FoxM1 発現誘導解除により有意に低下した。

- (3) TG マウス初代肝細胞を用い FoxM1 蛋白発現を誘導したところ、CCL2 遺伝子発現の有意な増加を認めた。またマウス肝細胞株において siRNA を用い FoxM1 をノックダウンしたところ、CCL2 遺伝子発現の有意な低下を認めた。
- (4) マウス CCL2 のプロモーター解析により、上流 1343bp に FoxM1 会合配列を確認し、クロマチン免疫沈降法にて、同部位への FoxM1 の会合を確認した。
- (5) 12週後の TG マウス肝組織では、著明な肝線維化を呈した。
- (6) 現在、半年後及1年後の肝組織を解析中であり、肝腫瘍形成の有無を確認している。
- (7) 以上より、FoxM1 が肝細胞において CCL2 の発現制御を介して肝内炎症を制御し、その結果、肝線維化を誘導する可能性が示唆された。

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8件)

- (1) Kizu T*, Yoshida Y*, Kiso S, Takehara T, 他 10 人 Loss of Gab1 adaptor protein in hepatocytes aggravates experimental liver fibrosis in mice. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2015 Jan

23:ajpgi.00289.2014.

doi:10.1152/ajpgi.00289.2014.

(equal contribution of the first two authors*) 査読あり

- (2) Oze T, Hiramatsu N, Yoshida Y, Takehara T, 他 17 人 The real impact of telaprevir dosage on the antiviral and side effects of telaprevir, pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C patients with HCVgenotype 1. J Viral Hepat. 2015 Mar;22(3):254-62. doi: 10.1111/jvh.12289. 査読あり
- (3) Kamada Y, Yoshida Y, Takehara T, Miyoshi E, 他 9 人 Ectopic expression of N-acetylglucosaminyltransferase V accelerates hepatic triglyceride synthesis. Hepatol Res. 2015 Jun 3. doi: 10.1111/hepr.12541. 査読あり
- (4) Kamada Y, Yoshida Y, Takehara T, Miyoshi E, 他 16 人 A novel noninvasive diagnostic method for nonalcoholic steatohepatitis using two glycomarkers. Hepatology. 2015 Jul 21. doi: 10.1002/hep.28002. 査読あり
- (5) Morishita N, Hiramatsu N, Yoshida Y, Takehara T, 他 8 人 Erratum to: Liver stiffness measurement by acoustic radiation force impulse is useful in predicting the presence of esophageal varices or high-risk esophageal varices among patients with HCV-related cirrhosis. J Gastroenterol. 2015 Jun;50(6):705.

doi:10.1007/s00535-015-1072-1. 査読あり

- (6) Tahata Y, Hiramatsu N, Yoshida Y, Takehara T, 他 24 人 The impact of an inosine triphosphate pyrophosphatase genotype on bilirubin increase in chronic hepatitis C patients treated with simeprevir, pegylated interferon plus ribavirin. J Gastroenterol. 2016 Mar;51(3):252-9. doi: 10.1007/s00535-015-1105-9. 査読あり
- (7) Furuta K*, Yoshida Y*#, Kiso S, Takehara T, 他 9 人 Gab1 adaptor protein acts as a gatekeeper to balance hepatocyte death and proliferation during acetaminophen-induced liver injury in mice. Hepatology. 2015 Dec 17. doi:10.1002/hep.28410. (equal contribution of the first two authors*, corresponding author#) 査読あり
- (8) Egawa M*, Yoshida Y*, Kiso S, Takehara T, 他 13 人 Increased expression of Forkhead box M1 transcription factor is associated with clinicopathological features and confers a poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. Hepatol Res. 2016 Dec 21. doi:10.1111/hepr.12854. (equal contribution of the first two authors*, corresponding author#) 査読あり

〔学会発表〕(計 18 件)

- (1) 吉田雄一、古田訓丸、竹原徹郎 肝細胞壊死を起点とした再生/恒常性維持の“鍵分子”としての Gab1 の意義 (第 50 回 日本肝臓学会総会、ホテルニューオータニ(東京)平成 26 年 5 月 29 日、ワークショップ 2 臨床応用を視野に入れた肝再生研究の新たな展開、口頭発表)
- (2) 吉田雄一、木津 崇、古田訓丸、小倉智志、柄川真弓、茶谷徳啓、江崎久男、鎌田佳宏、木曾真一、竹原徹郎 肝線維化に対する新規治療標的としての肝細胞 Gab1-CCL5 経路の意義 (第 50 回 日本肝臓学会総会、ホテルニューオータニ(東京)平成 26 年 5 月 29 日、口頭発表)
- (3) 古田訓丸、吉田雄一、竹原徹郎 急性肝不全におけるアダプター分子蛋白質 Gab1 を介した恒常性維持と治療標的としての可能性について 第 18 回日本肝臓学会大会 平成 26 年 10 月 23 日、神戸国際会議場(神戸)W3-12、口頭発表)
- (4) 小倉智志、吉田雄一、柄川真弓、古田訓丸、木津 崇、木曾真一、鎌田佳宏、竹原徹郎 肝細胞癌におけるメバロン酸経路を介した FoxM1 転写因子の制御と臨床応用の可能性について (第 51 回日本肝臓学会総会 平成 27 年 5 月 22 日 ホテル日航熊本(熊本)、口頭発表)
- (5) 古田訓丸、吉田雄一、木津 崇、小倉智志、柄川真弓、茶谷徳啓、鎌田佳宏、木曾真一、竹原徹郎 重症肝不全病態におけるストレス応答制御分子としての肝細胞 Gab1 の意義と治療標的としての可能性 (第 51 回日本肝臓学会総会 平成 27 年 5 月 22 日 ホテル日航熊本(熊本)、口頭発表)
- (6) 小倉智志、吉田雄一、柄川真弓、古田訓丸、木津 崇、木曾真一、鎌田佳宏、竹原徹郎 肝細胞癌における HMG-CoA 還元酵素阻害剤による FoxM1 転写因子の発現制御 (第 19 回日本肝臓学会大会 平成 27 年 10 月 8 日 グラントプリンスホテル新高輪(東京)、口頭発表)
- (7) 小倉智志、吉田雄一、竹原徹郎 肝癌脂質代謝における FoxM1 転写因子を介したシグナル経路の意義 (第 41 回日本肝臓学会西部会 平成 27 年 12 月 3 日 名古屋国際会議場(名古屋)、口頭発表)
- (8) 小倉智志、吉田雄一、柄川真弓、倉橋 知英、古田訓丸、木曾真一、鎌田佳宏、竹原徹郎 FoxM1 転写因子を介した新たな肝癌脂質代謝制御：治療標的としての可能性について (第 102 回 日本消化器病学会総会 平成 28 年 4 月 23 日 京王プラザホテル(東京)、プレナリーセッション、口頭発表)
- (9) 小倉智志、吉田雄一、竹原徹郎 癌脂質代謝からみた肝癌制御の可能性：Rho/YAP/FoxM1 経路の意義 (第 52 回日本肝臓学会総会 平成 28 年 5 月 19 日 ホテルニューオータニ幕張(千葉)、ワークショップ 1 肝癌制圧の分子基盤と臨床への展開、口頭発表)
- (10) 小倉智志、吉田雄一、竹原徹郎 肝癌における癌脂質代謝経路の意義と FoxM1 の関与について (第 20 日本肝

臓学会大会 平成 28 年 11 月 3 日神戸
コンベンションセンター (神戸)、
W2(ワークショップ) 消化器疾患と代
謝異常の関わり、口頭発表)

- (11) 倉橋知英、吉田雄一、小倉智志、
柄川真弓、古田訓丸、鎌田佳宏、木曾
真一、疋田隼人、巽智秀、竹原徹郎
FoxM1 転写因子による慢性肝疾患の制
御機構：新規マウスモデルを用いた検
討 (第 41 回日本肝臓学会東部会 京
王プラザホテル(東京) 平成 28 年 12
月 8 日 一般演題 (口演) 39 NAFLD
(1)0 121、口頭発表)
- (12) Yuichi Yoshida, Takashi Kizu,
Kunimaro Furuta, Satoshi Ogura,
Mayumi Egawa, Norihiro Chatani,
Yoshihiro Kamada, Shinichi Kiso, and
Tetsuo Takehara Grb2-associated
binder 1 protects against liver
fibrosis via suppression of CCL5
production from hepatocytes (The
65th Annual Meeting of the American
Association for the Study of Liver
Diseases Boston, MA, USA - Hynes
Convention Center, 平成 26 年 11 月
9 日、ポスター発表)
- (13) Yuichi Yoshida, Kunimaro Furuta,
Satoshi Ogura, Tomohide Kurahashi,
Mayumi Egawa, Shinichi Kiso,
Yoshihiro Kamada, and Tetsuo
Takehara Gab1 adaptor protein is
an essential gatekeeper to balance
hepatocyte death and proliferation
during acetaminophen-induced liver
injury in mice (The 66th Annual
Meeting of the American Association
for the Study of Liver Diseases San

Francisco, CA, USA - Moscone West
Convention Center November, 平成
27 年 11 月 17 日、口頭発表)

- (14) Tomohide Kurahashi, Yuichi
Yoshida, Satoshi Ogura, Mayumi Egawa,
Kunimaro Furuta, Yoshihiro Kamada,
Shinichi Kiso, Hayato Hikita,
Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara.
Hepatic overexpression of oncogenic
FoxM1 transcription factor promotes
hepatocyte death and hepatic
inflammation in mice. (67th Annual
Meeting of the American Association
for the Study of Liver Diseases,
Boston, MA, USA - Hynes Convention
Center, 2016 年 11 月 12 日、ポスタ
ー発表)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/>

6. 研究組織
(1) 研究代表者
吉田 雄一 (YOSHIDA YUICHI)
大阪大学・医学系研究科・特任助教
研究者番号：30457014
- (2) 研究分担者
木曾 真一 (KISO SHINICHI)
大阪大学・医学系研究科・特任准教授
研究者番号：40335352