

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19710167  
 研究課題名 (和文) 肝発がんの機序解明：肝前がん病変及び肝臓腫瘍のプロテオーム及び  
 バイオマーカー解析  
 研究課題名 (英文) Investigation of hepatocarcinogenesis mechanisms:  
 targeted proteomics of liver preneoplastic lesions and tumors  
 研究代表者  
 梯 アンナ (KAKEHASHI ANNA)  
 大阪市立大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号： 60382222

研究成果の概要：本研究ではラットやマウスの肝発がんにおける前がん病変及び肝臓腫瘍のプロテオーム解析を行った。ラットの肝臓において、phenobarbital (PB) の高用量投与によるGST-P陽性細胞巣または肝臓腫瘍内にはがん促進に関与すると考えられる特異的な蛋白 (例：CK8/18, APOA1, PHB1, 2, SEPT9 など) の発現が認められた。PB投与のラット肝発がんにおけるCK8/18はGST-P陽性細胞巣から肝臓腫瘍に進展する前がん病変の新たなマーカーであることが認められた。さらに、マウスの肝発がんにおけるCK8/18は前がん病変の新たなバイオマーカーであることが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	0	1,900,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：発癌、プロテオミクス

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：プロテオーム、発癌、プロファイリング、バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

最近、欧米では、プロテオーム解析のための巨大研究組織が生まれている。ヒトや動物発がんにおいても、プロテオームの研究が重要性を増している。プロテオミクスとは、細胞・組織で発現している全蛋白質 (プロテオーム) を系統的・網羅的に扱うことで生命現象を解き明かそうとする学問体系である。その基盤原理は蛋白質化学、蛋白質物理化学、蛋白質情報科学であり、基盤技術は、質量分析計、二次元電気泳動、多次元 HPLC、分子間相互作用検出計、プロテイン・チップなどである。質量分析法は、質量分析装置 (MS) を用

いて蛋白質やペプチドのような試料をイオン化し、得られたイオンを質量/電荷 (m/z) に従い分離して、その強度を測定する。蛋白質やペプチド分析のための MS は、1980 年代から急速に発展した。いまや MS は、プロテオーム解析に不可欠な分析装置になっている。

化学物質の発がん過程は、遺伝子の突然変異が生じる開始段階 (イニシエーション)、単一の変異細胞が増殖することによって腫瘍となる促進過程 (プロモーション)、さらに遺伝子の変異が伴ってがんに生育する進行段階 (プログレッション) と、多段階であるという説が広く受け入れられている。化学

物質の発がんリスク評価のための動物実験では、現在長期発がん性試験の代替法が模索されているところである。短期に発がん病変を評価するためには、腫瘍に至る前がん病変を検索するのが最良である。しかしながら、前がん病変と目される病変は組織学的に評価が困難な場合もあれば、これらの前がん病変と考えられる病変がすべて腫瘍になるとは限らない。そこで、すべての人が容易に同定できる組織学的に腫瘍に至る前がん病変の新規マーカーの開発が必要となってきた。これまでに、我々は化学物質の肝発がん性評価のマーカーとしてGST-P陽性細胞巢を用いてきた。しかしながら、一部の肝前がん病変はGST-P陰性であるため、またすべての前がん病変やGST-P陽性細胞巢が肝がんになるわけではないため、新規の前がん病変マーカーの開発を切望していた。しかし、前がん病変という微小な病変から得られる微量な試料からの蛋白・ペプチドの同定や解析は非常に困難であった。今回、新規に開発が進められてきたプロテイン・チップシステムは非常に高感度で高解析能を有するため、数マイクログラムのサンプルから解析が可能となっている。このシステムと前がん病変だけからサンプルを回収するマイクロダイセクション法を合わせて用いれば、我々が切望する前がん病変の新規マーカーが開発できると確信する。

## 2. 研究の目的

我々はプロテオミクスの新しい方法論と技術を開発するとともに、プロテオミクスの視点から、発がん物質 diethylnitrosamine (DEN) 及び phenobarbital (PB) 投与によるラット肝発がんにおける前がん病変の新たなバイオマーカーをプロテオミクスや分子病理学的手法を用いて明らかにすることを目的とした。すなわち、GST-P陽性細胞巢を指標にしたラット肝発がん試験を施行し、出現したGST-P陽性細胞巢における蛋白・ペプチドの発現パターンを網羅的に解析するために、ProteinChip Array法及びQSTAR Elite LC-MS/MSで比較検討するとともに、蛋白質の同定 (Peptide Mass Fingerprinting) 法や Real-time Q-PCR 及び免疫組織染色法を用いて発現している蛋白・ペプチドを比較検討することにより、肝発がんに関連するバイオマーカーになる蛋白質を見出し、肝発がんの機序を明らかにした。

さらに、マウス肝発がんにおける、肝臓の腫瘍性病変及び前がん病変 (好塩基性細胞巢) のプロテオーム解析を行い、マウスの前がん病変の新たなバイオマーカーを検索した。

## 3. 研究の方法

### (1) ラットの発がん性試験

#### ① 動物並びに飼育条件

5週齢の Fisher F344 ラット雄各 60 匹を Charles River 株式会社から入手し、発がん性試験に用いた。動物の飼育は大阪市立大学大学院医学研究科動物実験施設のバリアーシステムの動物室にて行い、室内の環境条件は温度  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度  $60 \pm 10\%$ 、12 時間蛍光灯照明、12 時間消灯の条件下で行った。

#### ② 一般状態、体重、摂餌量

全動物は、一般状態を毎日観察し、投与開始の 3 ヶ月後まで週 1 回体重及び摂餌量を測定し、その後は 1 ヶ月に 1 回測定した。

#### ③ 実験プロトコール

6週齢 F344 雄ラットを用いて、DEN 100 mg/kg bw を週 1 回、3 週間腹腔内投与し、その後 PB を高用量の 500 ppm 及び 0 ppm を混餌で 10 週間あるいは 33 週間投与し、肝を摘出し、前がん病変と腫瘍の ProteinChip Array、QSTAR Elite MS/MS 解析及び分子生物学的解析に用いた。PB を 10 週間投与した肝凍結標本では、GST-P 陽性細胞巢の免疫染色を行い、PB を 33 週間投与した肝では、肝腫瘍凍結標本の HE 及び Toluidine Blue 染色を行った。GST-P 陽性細胞巢を免疫組織学的に定量し、PB を 33 週間投与した肝では、肝腫瘍の発生を検索した。

### (2). マウスの発がん性試験

#### ① 動物並びに飼育条件

14 日齢の B6C3F1 マウス雄 30 匹を Charles River 株式会社から入手し、発がん性試験に用いた。さらに、*Ogg1* 欠損及び野生型マウス (C57Bl/6J) の繁殖を行い、マウス雄 60 匹を発がん性試験に用いた。

#### ② 一般状態、体重、摂餌量

全動物は、一般状態を毎日観察し、投与開始の 3 ヶ月後まで週 1 回体重及び摂餌量を測定し、その後について 1 ヶ月に 1 回測定した。

#### ③ 実験プロトコール

実験 1. 14 日齢雄性 B6C3F1 マウスに DEN を 10 mg/kg bw 腹腔内投与し、実験開始後 18 週及び 38 週で動物を屠殺した。

実験 2. 8-hydroxydeoxyguanosine の修復酵素である、oxoguanine glycosylase 1 (*Ogg1*) の遺伝子を欠損させた 6 週齢雄性マウスと野生型マウスの双方に、高濃度 PB (500 ppm) の長期投与を続ける実験系を設定し、肝前がん病変 (好塩基性細胞巢) と肝臓腫瘍の発生を検索した。また、この実験における肝臓腫瘍のプロテオーム解析を行い、さらに HPLC-ECD 法を用いて肝発がんの酸化的 DNA 傷害マーカー、8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) の形成を測定した。

### (3) 上記の発がん実験における PB 投与の GST-P 陽性細胞巣及び肝臓腫瘍のプロテオーム及びバイオマーカー解析

#### ① SELDI-TOF-MS を用いたプロテオーム解析

レーザーマイクロダイセクション(PALM Microlaser Technologies)を用いて、GST-P 陽性細胞巣、肝臓腫瘍、好塩基性細胞巣及び周囲正常肝組織を dot dissection 法により切り出した。切り出した組織を lysis buffer (9 M Urea/2% Chaps lysis buffer)に溶かした。ProteinChip Array (SELDI Protein Chip System Series 4000, Bio-Rad)を用いて、測定を行った。解析には Q10 : 陰イオン交換チップ及び CM10 : 陽イオン交換チップを用いた。

#### ② QSTAR LC-MS/MS を用いたプロテオーム解析

iTRAQ 試薬キット、DiNa-AI nano LC System (KYA Technologies, Tokyo, Japan)及び QSTAR Elite hybrid mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA)を用いて、測定及び蛋白質発現定量解析を行った。

#### ③ Peptide Mass Fingerprinting 法

GST-P 陽性細胞巣及び肝臓腫瘍のバイオマーカーとなる蛋白の同定には Peptide Mass Fingerprinting 法及び Ultra-sensitive Automated MALDI-TOF Mass-spectrometer (Bruker Daltonics 社)を用いた。蛋白を同定するために GST-P 陽性細胞巣 (30 µg 蛋白量)をマイクロダイセクションした。

#### ④ Real-time Q-PCR

ProteinChip Array 法で認められたバイオマーカーの遺伝子発現について Real-time Q-PCR 法で確認した。

#### ⑤ 免疫組織化学染色

CK8/18, histone H2A, apolipoprotein A1 (APOA1), prohibitin 1 及び 2 (PHB1, PHB2)、Septin 9 免疫組織化学染色には一次抗体として、CK 8/18 : Guinea pig polyclonal 抗体 (1:500)、CK8 rat monoclonal 抗体 (1:200)、CK18 rat monoclonal 抗体 (1:200)、apolipoprotein A1 goat polyclonal 抗体 (1:1000)、PHB1 及び PHB2 rat monoclonal 抗体 (1:800)、Septin 9 rat monoclonal 抗体 (1:200)、Histone H2A polyclonal 抗体 (1:1500)を用いた。

#### ⑥ 二重染色

ラット肝臓の GST-P 陽性細胞巣における細胞増殖能 (PCNA 陽性率) やアポトーシス (ssDNA) を検索した。また、CK8/18 と PCNA の二重染色を行い、CK8/18 の発現と細胞増殖との関連について検索を行った。

#### ⑦ 統計学的解析

体重・摂餌量・臓器重量の検査結果については、ANOVA による解析を行い、群間に有意差が観察された場合に、Student's t-test の方法で対照群と投与群の間で検定を行った。病理組織学的検査結果については、Fischer の直接確率検定法を用いて統計学的解析を実施した。病変の発生率については Exact probability test を用いて解析した。なお、腫瘍および前がん病変については、必要に応じて別途検定方法を選択して行った。

### 4. 研究成果

#### (1) ラットの肝発がん性試験

ラットの肝臓において、肝発がんの誘発剤である diethylnitrosamine (DEN) と phenobarbital (PB) 投与後に発生した GST-P 陽性細胞巣及び周囲正常肝組織を切り出し、の SELDI ProteinChip Array 及び Biomarker Wizard software の解析を行った結果、Q10 array では周囲正常肝組織に対して、m/z 15,224 (P<0.01)、47,760 (P<0.001) 及び 54,020 (P<0.0001) ピークの増加が認められた (図 1)。

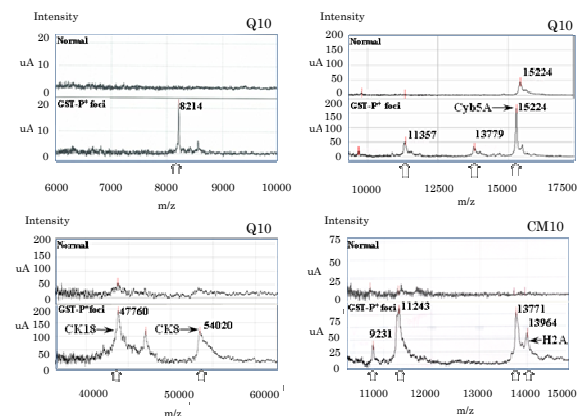


図 1. PB 投与したラット GST-P 陽性細胞巣における Q10 及び CM10 ProteinChip Array 解析

Peptide Mass Fingerprinting 法を行い、その三つの蛋白質は microsomal cytochrome A5 (Cyb5A; pI 4.6)、cytokeratin 18 (CK18; pI 5.8)、及び cytokeratin 8 (CK8; pI 5.8) として同定された。さらに、m/z 8214、11,357 及び 13,779 ピークの上昇が観察された。また、周囲正常肝組織に比べて、DEN 投与の GST-P 陽性細胞巣の内部では m/z 8214、11,357 及び 54,020 (CK8) の蛋白質の発現上昇傾向が認められた。

CM10 array では、PB 投与で肝臓の GST-P 陽性細胞巣内に m/z 8126、9231、11,243、13,771 及び 13,964 ピークの有意な増加が見られた。m/z 13,964 ピーク (P<0.05) が Histone type 2 H2aa3 (His H2aa3, pI 11.55) として同定された。さらに、イニシエーシ

ン群の GST-P 陽性細胞巢内に m/z 13,771 と 13,964 ピーク (His H2aa3) の上昇傾向、また、DEN-PB 投与において GST-P 陽性細胞巢の内部では m/z 6904 ピークの増加傾向が示された。Q10 Array では、SELDI の single marker 解析を行った結果、周囲正常肝組織に対して、m/z 47,760 (CK18; P<0.01) 及び m/z 54,020 (CK8; P<0.00012) 蛋白質それぞれが PB 投与により促進された GST-P 陽性細胞巢の有用なバイオマーカーになりうると考えられた。また、免疫組織染色及び Real-time Q-PCR により、GST-P 陽性細胞巢 (大) 及び肝臓腫瘍における CK8/18 の過剰発現が認められた。さらに、CK8/18 陽性細胞巢の中に細胞増殖マーカーである、PCNA が陽性である細胞の数が増加していることが明らかになった。

さらに、我々はラットの肝臓を用いて GST-P 陽性細胞巢、肝細胞癌及び周囲正常肝組織をマイクロダイセクションし、QSTAR Elite LC-MS/MS 解析を行った。その結果により DEN-PB の高用量投与による GST-P 陽性細胞巢または肝細胞癌内のがん促進に関与すると考えられる特異的な蛋白 (例: cytokeratins (CK) 5, 8, 18, apolipoprotein A1 (APOA1)、apolipoprotein E (APOE)、prohibitin 1 (PHB1)、prohibitin 2 (PHB2)、progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1)、Septin 9 など) の発現が認められた (図 2)。

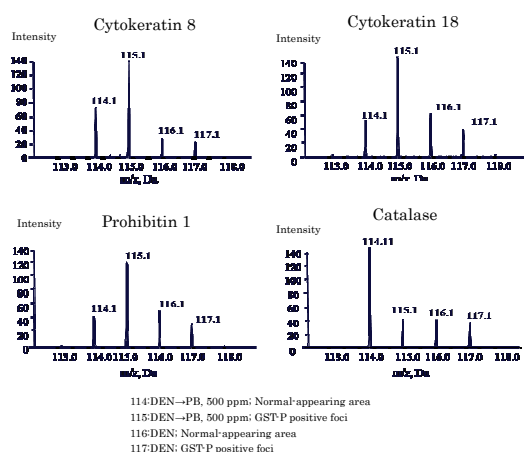


図 2. PB を与えたラットの GST-P 陽性細胞巢における CK8、CK18、PHB1 の過剰発現及び catalase の発現低下

また、DEN-PB 投与での GST-P 陽性細胞巢において解毒酵素である catalase 及び urea cycle 代謝酵素 (carbamoyl-phosphate synthetase 1 (CPS1)、ornithine carbamoyl transferase (OTC)、argininosuccinate synthase (ASS1)) の発現減少が見られた (図 2)。その結果によりラット肝発がんにおける CK8/18、APOA1、PHB1、PHB2 及び Septin 9 は

前がん病変の新たなバイオマーカーになりうると考えられる。

GST-P 陽性細胞巢と肝細胞癌における PCNA 陽性細胞の数を調べた結果、サイズの大きい (>20 細胞) GST-P 陽性細胞巢で PCNA 陽性細胞の有意な増加が見られた。腫瘍においても、PCNA 陽性細胞の有意な増加が認められており、細胞増殖の増加が腫瘍の促進に関与することが分かった。最近、CK8 や CK18 が tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) と結合することが報告され、JNK 細胞内情報伝達及び NFkappa B 活性化に関与すると考えられている (Caulin C. et al, 2000)。すなわち、本実験で観察された PCNA の labeling index が今まで報告された研究データと関連していた。

以前、免疫染色法を用いた実験において、ヒトの肝細胞癌では CK8/18 の過剰発現が見られた (Athanasidou P. et al, 2007)。CK8 や CK18 は中間径フィラメントであり、正常肝臓組織では細胞膜に強い発現が見られる (Abe M. et al, 1990)。In vitro の実験と形質転換動物モデルの研究結果により、CK8/18 が肝細胞を多様なストレス及び毒性物質から守っていることが知られている (Lau A. et al, 2007)。CK8 や CK18 の変異が肝臓病 (ウイルス性肝炎、肝硬変など) のリスク要因であることが報告されている (Ku N. et al, 2003)。CK8 が c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38 及び protein kinase C delta (PKC  $\delta$ ) のターゲットであり、リン酸化された CK8 が CK18 と結合し、その複合体の活性化により正常細胞ががん細胞に変更すると考えられる (He T. et al, 2002)。すなわち、ラット肝発がんにおける CK8/18 は GST-P 陽性細胞巢から肝細胞癌に進展する前がん病変の新たなバイオマーカーになりうると考えられる。

## (2) マウスの肝発がん性試験

B6C3F1 マウス肝発がんにおける SELDI TOF-MS の結果により DEN 投与による肝臓の前がん病変 (好塩基性細胞巢) 及び肝臓腫瘍性病変の CK8 (m/z 54, 565 ピーク) と CK18 (m/z 47, 538 ピーク) の有意な発現上昇が認められた (図 3)。

また、QSTAR Elite LC-MS/MS の結果により DEN 投与による肝細胞癌内に 35 個の特異的な蛋白・ペプチドの発現が認められた。Ingenuity Pathway 解析の結果において CK8、CK18、Bcl-1 結合蛋白質 BCL2-associated athanogene (BAG-1)、laminin 3 (LAMA3)、prolyl 4-hydroxylase、beta polypeptide (P4HB) 及び cingulin (CGN) がマウスの肝細胞癌のバイオマーカーとして認められた。



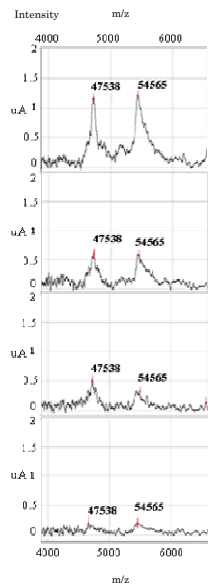


図3. B6C3F1マウスの肝臓におけるSELDI ProteinChip Array解析

さらに、マウスにおいて、前がん病変の定義が明確ではないのに対し、今回の実験結果において、免疫染色では全ての好塩基性細胞巣及び混合型変異肝細胞巣でCK8/18の発現が認められたことにより、これらが最も腫瘍に近い変異肝細胞巣であることが示唆された(図4)。

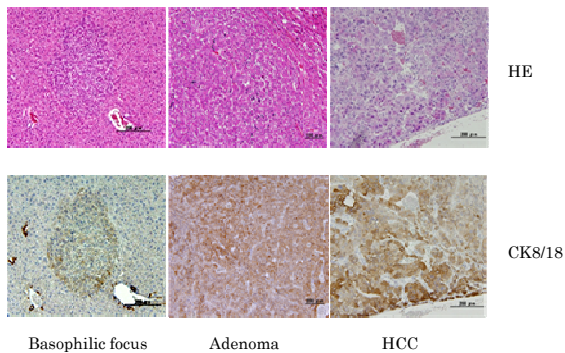


図4. B6C3F1マウスの肝臓におけるCK8/18の免疫組織染色

また、マウス肝組織を用いて、CK8/18及びPCNAの二重染色を行い、CK8/18陽性細胞巣内と周囲正常肝組織におけるPCNA陽性細胞数を計算した結果、CK8/18陽性細胞巣内でPCNA陽性細胞の有意な増加が認められた。また、免疫組織染色により、好塩基性細胞巣及び肝臓腫瘍におけるAPOA1、PHB1、PHB2及びSeptin 9の有用性が明らかにされた。Ogg1欠損マウス肝発がんにおいてQSTAR LC-MS/MS解析を行った結果、CK8/18及びAPOA1の発現が見られ、免疫組織染色でも確認された。Ogg1欠損マウスの好塩基性細胞巣及び腫瘍性病変におい

てCK8/18またはAPOA1が陽性を示した。その結果によりマウスの肝発がんにおけるCK8/18、APOA1、PHB1、PHB2及びSeptin 9は前がん病変の新たなマーカーであることが示唆された。

発がん性試験は、環境発がん物質の同定や医薬品の安全性評価に重要な試験であり、CK8/18は肝発がん性の指標として、今後用いられることが期待される。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

1) Kakehashi A., Inoue M., Wei M., Fukushima S., Wanibuchi, H. Cytokeratin 8/18 overexpression and complex formation as an indicator of GST-P positive foci transformation into hepatocellular carcinomas. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238:71-79, 2009 (査読有).

(Kinoshita A. → Kakehashi A.)

2) Fukushima, S., Kakehashi, A., Wei, M., Wanibuchi, H. Existence of a threshold for the genotoxic carcinogens: Evidence from mechanism-based carcinogenicity studies (Review). *Genes and Environment*, 2009 (in press) (査読有).

3) Kushida, M., Wanibuchi H., Wei, M., Kakehashi, A., Ozaki, K., Sukata, T., Miyata, K., Ogata, K., Uwagawa, S., Fukushima, S. Ethanol does not promote MeIQx-initiated rat colon carcinogenesis based on evidence from analysis of a colon cancer surrogate marker. *J. Toxicol. Pathol.*, 22:65-70, 2009 (査読有).

4) Yamaguchi, C., Wanibuchi, H., Kakehashi, A., Tanaka, R., Fukushima, S. Chemopreventive effects of a serratane-type triterpenoid, 3alpha-methoxyserrat-14-en-21beta-ol (PJ-1), against rat lung carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.*, 46: 1882-1888, 2008 (査読有).

5) 福島 昭治, 魏 民, 梯 アンナ, 鰐淵 英機. 発がん物質にも閾値が存在する. *Mytotoxins*, 58: 119-128, 2008 (査読有).

6) 福島 昭治, 魏 民, 梯 アンナ, 鰐淵 英機. 食品などに含まれる発がん物質に閾値が存在するのか. *食衛誌* 49: J314-J318, 2008 (査読有).

7) 福島 昭治, 魏 民, 梯 アンナ, 鰐淵 英機. 環境化学発がん物質とその閾値 食品などに含まれる発がん物質を例として. グリーンテクノロジー, 18, 20-25, 2008 (査読有).

8) Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Morimura, K., Wei, M., Nakae, D., Arai, T., Minowa, O., Noda, T., Nishimura, S., Fukushima, S. Carcinogenicity of dimethylarsinic acid in Ogg1-deficient mice. Cancer Sci., 98: 803-14, 2007.

9) Kinoshita, A., Wanibuchi, H., Wei, M., Yunoki, T., Fukushima, S. Elevation of 8-hydroxydeoxyguanosine and cell proliferation via generation of oxidative stress by organic arsenicals contributes to their carcinogenicity in the rat liver and bladder. Toxicol. Appl. Pharmacol., 221: 295-305, 2007 (査読有).

10) Kang, J. S., Wanibuchi, H., Murai, T., Morimura, K., Kinoshita, A., Fukushima, S. Analysis of gene expression in different stages of MeIQx-induced rat hepatocarcinogenesis. Oncology Reports, 17: 747-52, 2007 (査読有).

[学会発表] (計 5 件)

1) 梯 アンナ, 石井 真美, 山野 莊太郎, 魏 民, 鰐淵 英機. マウス肝発がんにおけるプロテオームおよびバイオマーカー解析. 第 25 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 1 月 27-28 日, 浜松, 2009 (第 25 回日本毒性病理学会講演要旨集 p. 88).

2) 梯 アンナ, 魏 民, 森村 圭一朗, 串田 昌彦, 福島 昭治, 鰐淵 英機. ラット肝発がんにおける GST-P 陽性細胞巢のプロテオームおよびバイオマーカー解析. 第 24 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 2 月 6-7 日, 名古屋, 2008 (第 24 回日本毒性病理学会講演要旨集 p. 79).

3) 梯 アンナ, 今中 麻幸代, 魏 民, 大西 真里子, 福島 昭治, 鰐淵 英機. ラット肝発がんにおける GST-P 陽性細胞巢のプロテオーム及びバイオマーカーの検討. 第 67 回日本癌学会学術総会, 10 月 28-30, 2008 (Proceedings of 67<sup>th</sup> Annual Meeting of Japanese Cancer Association, p.122)

4) 加藤 あゆみ, 梯 アンナ, 魏 民, 多胡 善幸, 山野 莊太郎, 村井 隆, 鰐淵 英機. マウス肝発がんにおける前がん病変マーカーの検索および機序解析. 第 24 回日本毒性病理学会総会及び学術集会, 2 月 6-7 日, 名古屋, 2008 (第 24 回日本毒性病理学会講演要旨集 p. 79).

5) Yamano, S., Kato, A., Kakehashi, A., Wei, Min., Morimura, K., Doi, K., Toma, K., Wanibuchi, H. Cytokeratin 8/18 as a novel biomarker of preneoplastic lesions in mice hepatocarcinogenesis. 99th AACR Annual Meeting, American association for Cancer Research, April 12-16, San Diego, CA, USA, 2008 (Proceedings of the 99th Annual Meeting of the AACR, April 14, 2008).

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梯 アンナ (KAKEHASHI ANNA)  
大阪市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 60382222

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし