

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23790449

研究課題名（和文） 肝細胞の障害とがん化機構に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Experimental study of cellular damage and carcinogenesis of hepatocyte

研究代表者

内木 綾 (NAIKI AYA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20509236

研究成果の概要（和文）：肝細胞ギャップ結合タンパクである、Connexin 32(Cx32)のドミナントネガティブトランスジェニックラットおよびCx32導入ラット肝癌細胞株を樹立し、それらに対するAcetaminophenの肝細胞死発現を解析した結果、Acetaminophenによる肝細胞死にアポトーシスが関与することを明らかにした。またCx32はアポトーシスの制御を介して肝発がんや肝癌細胞の増殖能を抑制していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Connexin 32 (Cx32) is a major gap junction protein in the liver. We established Cx32 dominant negative transgenic rats and Cx32 transfected rat hepatocellular carcinoma cells. The present study by using them indicated that caspase 3 dependent apoptosis was an important mechanism of acetaminophen-induced hepatotoxicity. Moreover, Cx32 regulates apoptotic signaling in both normal liver tissue and hepatocellular carcinoma cells, may play important roles in preventing carcinogenesis by inducing apoptosis in genetically damaged cells with cancer initiation.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：ギャップ結合、肝発がん、動物モデル

1. 研究開始当初の背景

肝癌は、肝炎、肝硬変などの慢性肝疾患の進行を背景に発生することが多い。またギャップ結合は細胞間連絡能を担っており、肝細胞のギャップ結合の主要な構成タンパクであるCx32は、慢性肝炎、肝硬変さらに肝細胞癌と肝障害の進行とともに発現が低下している。また当研究室で作製したCx32ドミナントネガティブトランスジェニックラット(Tg)は、野生型ラットと比較して、細胞間連絡能が低下しており(図1)、複数の肝障害物質による肝細胞死が抑制される一方、肝発がん物質に対して高感受性を示すことが明らかになっている。これらのことから、Cx32

機能低下時に起こる肝細胞死誘導の阻害が、発がん感受性の亢進に寄与している可能性が示唆される。

2. 研究の目的

本研究では、肝細胞障害と肝発がん性の関係、およびCx32が担う細胞間連絡能の役割を明らかにするため、Tgラットモデルを用いて、Acetaminophen (APAP) 誘発肝障害がdiethylnitrosamine (DEN) 肝発がん性に与える影響を解析する。またCx32の低下したラット肝癌細胞にCx32を導入した安定細胞株を樹立し、Cx32の肝細胞死や肝癌細胞の増殖に対する作用を調べる。

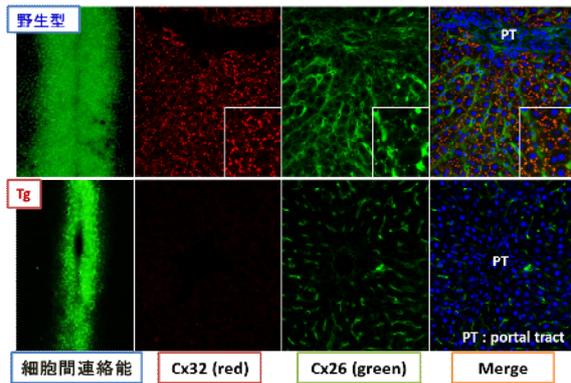


図1. Cx32 ドミナントネガティブトランスジェニックラット

3. 研究の方法

(1) Tg と野生型ラットに対し、APAP (500mg/kg x 2 回/週、5 週間) を投与し、それに続き DEN を 50ppm、12 週間投与する。肝発がん性は、glutathione S-transferase placental form (GST-P) 免疫組織染色により陽性を示す細胞巣を前癌病変として定量する。また Tg、野生型ラットそれぞれ APAP 投与および無処置群の肝をサンプルとし、cDNA マイクロアレイ解析を行うことで、肝細胞障害後に起こるがん化の機構に関与する遺伝子変化を追究することを試みる。

(2) ラット肝癌細胞 C6 に GFP ベクターを用いて、Cx32 遺伝子を導入した安定細胞株を作製する。樹立した Cx32 導入肝癌細胞株に APAP を投与し、肝癌細胞の細胞増殖活性、生存率アッセイおよびアポトーシスの解析を行う。

4. 研究成果

(1) Tg および野生型ラットに APAP を投与し肝細胞障害を誘発した後、肝発がん物質 DEN を投与し、APAP による肝障害発現と GST-P 免疫染色における陽性細胞巣の解析を行った。その結果、APAP 投与群では小葉中心性肝細胞死が観察され、野生型ラットと比較して Tg ラットでは肝細胞死の抑制傾向を認めた。免疫組織学的に障害肝細胞は、TUNEL 陽性、Cleaved-caspase 3 陽性を示し、アポトーシスが作用していることが明らかとなった(図2)。次に DEN 投与による GST-P 陽性領域形成は、Tg および野生型ラットいずれにおいても無処置群と比較し APAP 投与群で増大傾向を認めたが、Tg でのみ有意差を認めた(図3)。

(2) 以上よりギャップ結合機能の低下状態では、障害肝細胞に対するアポトーシス誘導が阻害され、障害細胞が残存した状態となり、その結果発がん物質に対する感受性が上昇することが示唆された。そこで、Tg および野生型ラットの APAP 投与群、無処置対照群の肝組織をサンプルとして、mRNA およびに対するマイクロアレイ解析を行い、APAP 誘発肝障害時の遺伝子変化を検討した。その結果、APAP 投与群で野生型と比較し Tg ラットで2倍以上発

現上昇した mRNA の 1 つとして malic enzyme 1 (Me1) を同定した。定量的 RT-PCR により、Me1 は APAP により野生型ラットでは発現変化しないのに対し、Tg では約4倍の発現上昇を認めた。

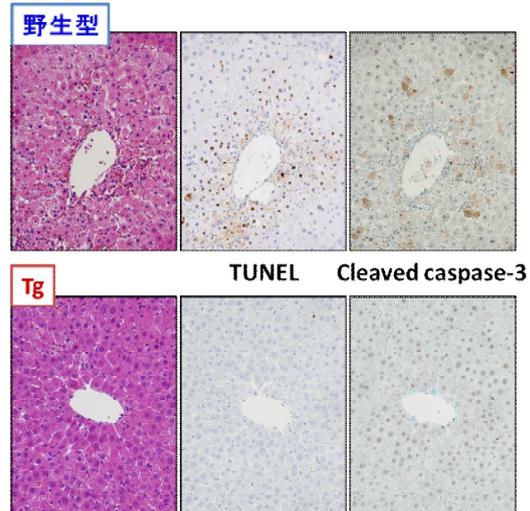
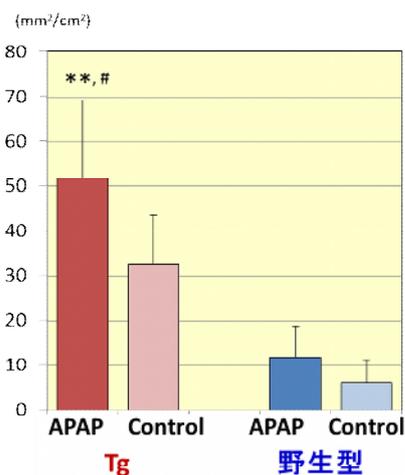


図2. TgにおけるAPAP誘導アポトーシス抑制



* P < 0.05, ** P < 0.01 v.s. treatment -matched wild

P < 0.01 v.s. Tg control

図3. TgにおけるAPAPによる肝発がん性亢進

(3) ラット肝癌細胞 C6 に、GFP ベクターを用いて Cx32 遺伝子を導入した結果、Cx32 タンパク発現と細胞間連絡能が回復した安定細胞株 (C6-Cx32) の樹立に成功した。C6-Cx32 およびベクターを導入した C6-Mock 培養液中に APAP を添加し、24 時間後の細胞形態の変化、増殖活性およびアポトーシスの解析を行った。その結果、APAP 投与により両者で浮遊細胞の出現と、Caspase 3 の活性化を伴うアポトーシスが確認された。Cleaved-caspase 3 のシグナルは、C6-Mock と比較し C6-Cx32 においてより強く検出された(図4)。また C6-Cx32 では C6-Mock と比較し、有意な細胞増殖活性の低下とアポトーシス細胞の増加

を認めた。以上より、Cx32 はラット肝癌細胞において APAP によるアポトーシスシグナルの伝達を促進することが明らかとなり、Cx32 を介する細胞間連絡能は、正常肝組織および肝癌細胞株いずれにおいても、アポトーシスシグナル伝達を制御していることが示唆された。

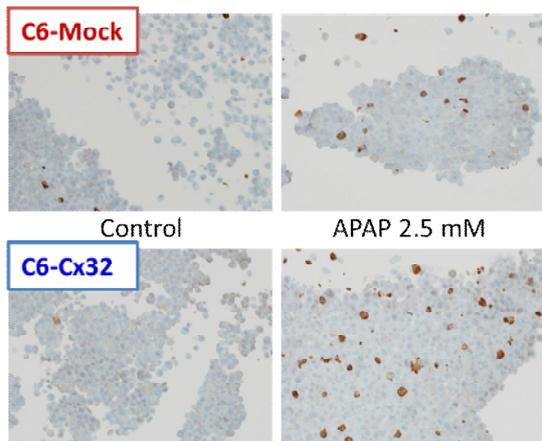


図4. Cleaved-caspase 3, 免疫染色: ラット肝癌細胞における Cx32 による APAP 誘導アポトーシス感受性の亢進

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 6 件)

- ① Long N, Suzuki S, Sato S, Naiki-Ito A, Sakatani K, Shirai T, Takahashi S. Purple corn color inhibition of prostate carcinogenesis by targeting cell growth pathways. *Cancer Sci* 104:298-303, 2013, doi: 10.1111/cas.12078. Epub 2013 Jan 20.
- ② Naiki-Ito A, Kato H, Asamoto M, Naiki T, Shirai T. Age dependent carcinogenic susceptibility in rat liver is related to potential of gap junctional intercellular communication. *Toxicol Pathol* 40:715-21, 2012, doi: 10.1177/0192623312441402. Epub 2012 May 8.
- ③ Ogawa K, Mamiya S, Sato S, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Cohen SM, Shirai T. Immunohistochemical analysis of uroplakins, urothelial-specific proteins in sinonasal Schneiderian papillomas. *Histopathology* 60:365-9, 2012, doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02228.x. Epub 2012 Mar 28.

④ Naiki T, Asamoto M, Toyoda-Hokaiwado N, Naiki-Ito A, Tozawa K, Kohri K, Takahashi S, Shirai T. Organ specific Gst-pi expression of the metastatic androgen independent prostate cancer cells in nude mice. *Prostate* 72:533-41, 2012, doi: 10.1002/pros.21455. Epub 2011 Jul 11.

⑤ Delhase M, Kim SY, Lee H, Naiki-Ito A, Chen Y, Ahn ER, Murata K, Kim SJ, Lautsch N, Kobayashi KS, Shirai T, Karin M, Nakanishi M. TANK-binding kinase 1 (TBK1) controls cell survival through PAI-2/serpinB2 and transglutaminase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:4332-5, 2012, doi: 10.1073/pnas.1119296109. Epub 2011 Dec 27.

⑥ Ogawa K, Pitchakarn P, Suzuki S, Chewonarin T, Tang M, Takahashi S, Naiki-Ito A, Sato S, Takahashi S, Asamoto M, Shirai T. Silencing of connexin 43 suppresses invasion, migration and lung metastasis of rat hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Sci* 103:860-7, 2012, doi: 10.1111/j.1365-2559.2011.04018.x. Epub 2011 Nov 29.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Shinya Sato, Shugo Suzuki, Aya Naiki-Ito, Yoriko Yamashita, Makoto Asamoto, Tomoyuki Shirai, Satoru Takahashi: Histone deacetylase inhibition has potential to suppress growth of androgen dependent and independent prostate cancer *in vitro* and *in vivo*. AACR Annual Meeting 2013, 2013 年 4 月 7 日 (米国、ワシントン)
- ② 内木綾、朝元 誠人、加藤 寛之、白井 智之、高橋 智: ラット肝癌細胞における Acetaminophen 誘導アポトーシスに対する細胞間コミュニケーションの関与. 第 29 回日本毒性病理学会学術集会、2013 年 1 月 31 日 (茨城県)
- ③ 春日部 こずえ、内木綾、朝元 誠人、白井 智之、高橋 智: ラット肝癌細胞でのアポトーシス誘導におけるコネクシン 32 の役割. 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 21 日 (北海道)
- ④ 内木綾、朝元 誠人、加藤 寛之、白井 智之、高橋 智: Ethanol promotes diethylnitrosamine-induced

hepatocarcinogenesis in connexin32 dominant negative transgenic rats. 第71回日本癌学会学術総会、2012年9月19日（北海道）

- ⑤ Naiki-ito A, Asamoto A, Takahashi S, Shirai T: Age dependent carcinogenic susceptibility in rat liver is related to potential of gap junctional intercellular communication. AACR Annual Meeting 2012、2012年4月4日（米国、シカゴ）
- ⑥ Taku Naiki, Makoto Asamoto, Aya Naiki-Ito, Kenji Yamada, Ryosuke Ando, Youichi Ikegami, Noriyasu Kawai, Keiichi Tozawa, Satoru Takahashi, Kenjiro Kohri: Organ-specific Gst-pi expression in new metastatic androgen-independent prostate cancer animal model. AACR Annual Meeting 2012、2012年4月3日（米国、シカゴ）
- ⑦ 内木綾：ギャップ結合タンパク connexin32 によるラット肝発がん細胞死制御。第28回日本毒性病理学会学術集会、2012年2月2日（東京都）招待講演
- ⑧ 内木綾、朝元 誠人、鈴木 周五、高橋 智、白井 智之：The role of connexin32 formed gap junctional intercellular communication in hepatocarcinogenesis. 70回日本癌学会学術総会、2011年10月3日（愛知県）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内木 綾 (NAIKI AYA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：20509236